

0846322

CB-846322000001

**Estación Experimental de Aula Dei
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.)
Zaragoza**

Departamento de Nutrición Vegetal



Tesis Doctoral

**Caracterización de mecanismos de adquisición
de Fe en plantas superiores**

Memoria presentada por Dña. Elena B. González Vallejo, Licenciada en Ciencias,
sección Químicas, para optar al grado de Doctor en Ciencias

Zaragoza, Febrero de 1999

R - 10.058

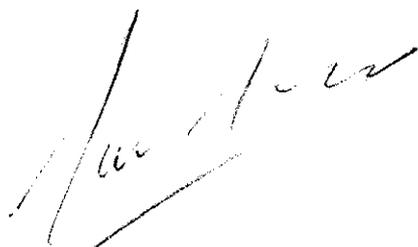


D. JAVIER ABADÍA BAYONA, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Dña. ANUNCIACIÓN ABADÍA BAYONA, Científico Titular del mismo organismo

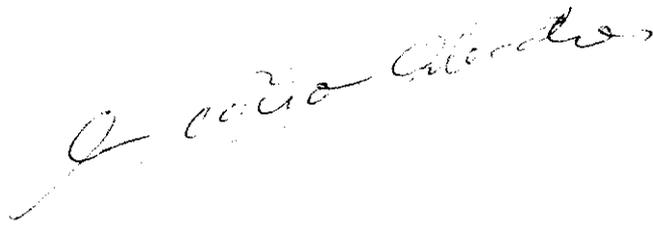
CERTIFICAN

Que la Tesis Doctoral titulada **“Caracterización de mecanismos de adquisición de Fe en plantas superiores”**, ha sido realizada por la Licenciada en Ciencias Químicas Dña. ELENA BEGOÑA GONZÁLEZ VALLEJO, en el Departamento de Nutrición Vegetal de la Estación Experimental de Aula Dei del Consejo Superior de Investigaciones Científicas bajo su dirección y reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al Grado de Doctor en Ciencias

Zaragoza, Febrero de 1999



Fdo: Javier Abadía Bayona



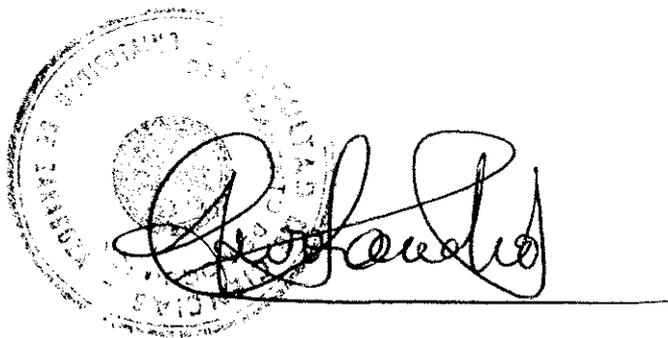
Fdo: Anunciación Abadía Bayona

D. JAVIER SANCHO SANZ, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza.

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral titulada **“Caracterización de mecanismos de adquisición de Fe en plantas superiores”**, ha sido realizada por la Licenciada en Ciencias Químicas Dña. ELENA BEGOÑA GONZÁLEZ VALLEJO, bajo su tutela como ponente en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza y, a su juicio, reúne las condiciones requeridas para optar al Grado de Doctor en Ciencias

Zaragoza, Febrero de 1999

A circular official stamp of the University of Zaragoza is partially visible, overlaid by a handwritten signature in black ink. The signature is written over a horizontal line. The stamp contains text in Spanish, including "UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA" and "FACULTAD DE CIENCIAS".

Fdo: Javier Sancho Sanz



Quisiera agradecer a todas las personas que de una manera u otra han puesto su *granito de arena* en la realización de este trabajo y especialmente:

Al Dr. Javier Abadía y la Dra. Anunciación Abadía, directores de este trabajo. En primer lugar por confiar en mí para llevarlo adelante poniendo a mi disposición todos los medios necesarios. Posteriormente por su apoyo y estímulo constante y por sus magníficas enseñanzas científicas.

Al Dr. René Rémy del Institut de Biotechnologie de Plantes (C.N.R.S.) en Orsay, Francia por sus enseñanzas y colaboración en el aislamiento de mitocondrias y por proporcionarnos los anticuerpos de FDH y ATPasa. Al Dr. Jean Vidal por proporcionarnos el anticuerpo de PEPC.

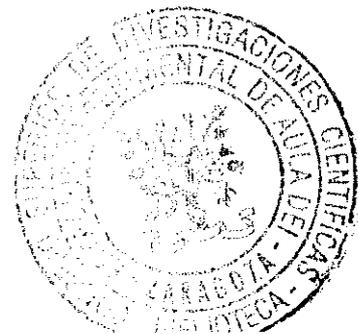
Al Dr. Udo W. Stephan del Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) en Gatersleben, Alemania por permitirme trabajar en su laboratorio y en especial a la Dra. Alexandra Herbig por introducirme en el mundo del 2-D y por su excelente disposición y ayuda durante mi estancia en Gatersleben.

Al Dr. Wolfgang Brüggemann y la Dra. Petra Moog de la Universität Heinrich Heine en Düsseldorf, Alemania por ayudarme en los aislamientos de membrana plasmática.

Al Dr. José Antonio González-Reyes del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba por su amistad y colaboración en la determinación de pureza de membrana plasmática por microscopía electrónica. Al Dr. Juan José Lucena del departamento de Química Agrícola de la Universidad Autónoma de Madrid por su disposición para la realización de la especiación de los complejos de Fe y a Felipe Yunta por su colaboración en la obtención de las estructuras.

Al Dr. Santos Susín por su disponibilidad y ayuda en los inicios de este trabajo.

A la Dra. M^a Ángeles Moreno del Departamento de Pomología de la Estación Experimental de Aula Dei por proporcionarnos las estaquillas de la variedad "Ademir" y por su ayuda en el proceso de enraizamiento.



De forma muy especial a mis compañeros de laboratorio (presentes y pasados) con los que he compartido no sólo trabajo sino también amistad, a los doctores Fermín Morales, Yolanda Gogorcena, Tatiana Zaharieva, Namachevayam Nedunchezian y Ramzi Belkhodja, los *predoctor* Ana Flor López y Ajmi Larbi y a Roberto Grasa, Paco Iturbe, Mohamed Zouari, Jamel Chatti, Carolina Fidalgo y Pilar García.

A todos los componentes del Departamento de Nutrición Vegetal de la Estación Experimental de Aula Dei: Manu, Mari Carmen, Kepa, Fernando, Iñaki, Gloria, Yoli, M^a Angeles, M^a Angeles, Pili, María, Alberto, Luis, María, Elena, Marian, Raquel, Carmen, Iñaki, José Javier, Inmaculada, Susana, Sandra, Marivi, Miguel, André, Tere, Concha, Carmen y Jesús.

Muy especialmente a Aurora Poc por brindarme su amistad y por supuesto por su excelente trabajo y colaboración en todo momento ante cualquier problema y a Carmen Pérez por compartir los buenos y no tan buenos momentos que he vivido en este tiempo.

Al resto del personal de la Estación Experimental Aula Dei que de alguna manera han colaborado en la realización de este trabajo.

A mis amigos, *al otro lado del espejo*, que durante este tiempo me han recordado que la vida es algo más que investigar.

A mi familia, por su apoyo y comprensión desde el primer día hasta el último. Este trabajo es un poco de todos.

A mi padre

A mi familia

ABREVIATURAS

2-D	dos dimensiones
ACC sintasa	aminociclopropano sintasa
ADH	alcohol deshidrogenasa
ADN	ácido desoxiribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
Ala (A)	aminoácido alanina
AOX	oxidasa alternativa
AP	ascorbato peroxidasa
APS	persulfato amónico
Arg (R)	aminoácido arginina
Asn (N)	aminoácido asparagina
Asp (D)	aminoácido aspártico
ATP	adenosina 5'-trifosfato
AVG	amonietoxivinilglicina
BPDS	ácido 4,7-difenil-1,10-batofenantrolin -disulfónico
BSA	seroalbúmina bovina
BTP	bis-tris-propano
c_f	concentración final
Cfl	clorofila
CHAPS	3-[(cholamido-propil)-aminodimetil]-1-propano sulfonato
cit c	citocromo c
DCCD	diciclohexil-carbodiimida
DDSA	ácido dodecenilsuccínico
DES	dietil-estilbestrol
DMP	2,4,6-tri-(dimetil-aminometil)-fenol
DQ	duroquinona
DTPA	ácido dietilentriamina-N, N, N', N'', N''' pentaacético
DTT	ditiotreitól
E°	potencial de oxidoreducción estándar
EDDHA	ácido etilendiamina-di-(o-hidroxi)-pentaacético
EDTA	ácido etilen-diamino-tetraacético
EE	error estándar
epi-HMA	ácido epi-hidroximugínico
FAD	dinucleótido de riboflavina y adenina
FC-R	reductasa férrica

FCN-R	reductasa de ferricianuro
FDH	formiato deshidrogenasa
FMN	riboflavina 3-monofosfato
GADPH	gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
Gln (Q)	aminoácido glutamina
GPI	glicosil-fosfatidil-inositol
Glu (E)	aminoácido glutámico
Gly (L)	aminoácido glicina
H ⁺	protón
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IEF	focalización por punto isoelectrico
I. integrada	intensidad x área
kDa	kilodalton
K _m	constante de Michaelis-Menten
K _s	constante de estabilidad
Leu (L)	aminoácido leucina
Lys (K)	aminoácido lisina
M	concentración molar
MA	ácido mugínico
MDA	monodehidroascorbato reductasa
MDH	malato deshidrogenasa
MES	ácido [2-(N-morfolino)-etanosulfónico]
MP	membrana plasmática
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
M _R	masa molecular aparente
NA	nicotianamina
NAD ⁺	dinucleótido de nicotianamida y adenina oxidado
NADH	dinucleótido de nicotianamida y adenina reducido
NADPH	2'-fosfonucleótido de nicotianamida y adenina reducido
NBT	azul de nitro-tetrazolio
OAA	oxalacetato
OH	ión hidroxilo
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PDTS	ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triacina-4',4''-disulfónico
PEG	polietilenglicol
PEPC	fosfoenol piruvato carboxilasa
PF	peso fresco
pI	punto isoelectrico

PMS	metosulfato de fenacina
PMSF	fluoruro de fenil metil sulfonilo
ppm	partes por millón
PR	puntas de raíz
p/v	relación peso volumen
PVDF	fluoruro de polivinilideno
PVP	polivinil pirrolidona
Rbfl	riboflavina
rpm	revoluciones por minuto
SDFP	sistema de doble fase de polímeros
SDS	sodio dodecil sulfato
SOD	superóxido dismutasa
SPAD	Soil-Plant Analysis Development
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N, N, N', N'-tetra-metilendiamina
Thr (T)	aminoácido treonina
TRIS	Tris-(hidroximetil)aminometano
Tyr (Y)	aminoácido tirosina
U	unidades de actividad
UQ	ubiquinona
Val (V)	aminoácido valina
VAZ	suma de violaxantina anteraxantina zeaxantina
V.h	voltio hora
V_{\max}	velocidad máxima
v/v	relación volumen/volumen

ÍNDICE GENERAL

	pág.
1.- Introducción	1
2.- Objetivos	43
3.- Materiales y Métodos	49
4.- Resultados	99
5.- Discusión	203
6.- Conclusiones	231
Bibliografía	235
Anexos	263
Publicaciones	291

INTRODUCCIÓN



1.- INTRODUCCIÓN

	pág.
1.1.- El hierro en el suelo	5
1.2.- El hierro en las plantas	8
1.3.- Agentes causantes de la deficiencia de Fe en las plantas	9
1.4.- La deficiencia de Fe o clorosis férrica	11
1.5.- Respuestas de las raíces de las plantas ante la deficiencia de Fe	13
1.5.1.- Estrategia II	14
1.5.2.- Estrategia I	17
1.5.2.1.- Cambios morfológicos en la raíz inducidos por la deficiencia de Fe	18
1.5.2.2.- Inducción de la capacidad reductasa	20
1.5.2.3.- Acidificación de la rizosfera	22
1.5.2.4.- Excreción de compuestos fenólicos, ácidos orgánicos y flavinas	24
1.5.2.5.- Otras respuestas bioquímicas	28
1.6.- Transporte de Fe	28
1.6.1.- Transporte de Fe(II) a través de la membrana plasmática de raíz	28

1.6.2.- Transporte de la raíz a la hoja	29
1.6.3.- Transporte al interior de las hojas	30
1.6.4.- Transporte al cloroplasto	31
1.7.- Regulación hoja/raíz	31
1.8.- La membrana plasmática de las plantas	32
1.8.1.- Descripción general	32
1.8.2.- Actividad redox de la membrana plasmática	35
1.8.2.1.- Flavinas	35
1.8.2.2.- Quinonas	36
1.8.2.3.- Citocromos tipo b	36
1.8.2.4.- NAD(P)H oxidoreductasas	37

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- El hierro en el suelo

El Fe es el microelemento más abundante en los suelos. Es el cuarto elemento en peso de la corteza terrestre después del oxígeno, el silicio y el aluminio, siendo su concentración media de un 3,2% (Murad y Fisher, 1988). En el suelo se encuentra como constituyente de diferentes minerales, ya sea bajo forma de óxidos o hidróxidos. En los suelos ricos en materia orgánica, una cantidad importante del Fe puede encontrarse como Fe(II). En la mayoría de los suelos bien aireados, el Fe se encuentra como Fe(III), aunque puede pasar a Fe(II) cuando las condiciones del suelo se vuelven más reductoras, como ocurre en caso de encharcamiento (Loeppert y Clarke, 1984). En estos suelos aireados, el Fe se encuentra como óxidos, hidróxidos o formas complejas en forma coloidal, estabilizado por la materia orgánica o adsorbido sobre las partículas arcillosas.

La cantidad de Fe soluble en el suelo no representa más que una pequeña parte del Fe total. Así, es frecuente que sea un nutriente deficitario para las plantas, especialmente en suelos alcalinos y calcáreos. Las formas solubles inorgánicas en solución son Fe^{2+} , Fe^{3+} , $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ y $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$. La concentración de Fe(III) total en solución varía con el pH, alcanzando un mínimo

entre 6,5 y 8,0 (Loué, 1986). Sin embargo, la solubilidad de Fe en el suelo está prácticamente controlada por la solubilidad de los óxidos hidratados de Fe(III) (Lindsay y Schwab, 1982). Por encima de pH 8 el ión predominante es $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$, mientras que de pH 7 a 9 las tres especies más abundantes son $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ y $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$ (Loué, 1986). Sin embargo, a estos valores de pH la totalidad de las especies solubles no sobrepasa una concentración de 10^{-10} M (Loeppert, 1986).

La absorción de Fe por las plantas se ve disminuida a un pH elevado, ya que la concentración de Fe(III) en solución es 1.000 veces menor por cada unidad que aumenta el pH. Así, a pH 7,8 las concentraciones de Fe(III) y de Fe(II) libre son de aproximadamente 10^{-21} M (Lindsay, 1972). Por otro lado, en el suelo hay complejos orgánicos solubles de Fe. Estos fenómenos de quelación son particularmente importantes, ya que mantienen al Fe en forma soluble, favoreciendo su movilidad y haciéndolo más asequible para las plantas (Römheld y Marschner, 1986). Para que la planta tenga una correcta nutrición férrica, el Fe total soluble en el suelo debería ser al menos del orden de 10^{-7} - 10^{-8} M (Loeppert, 1986). Como se observa en la Figura 1, a valores de pH del suelo por encima de 7, el Fe total soluble es muy inferior a este nivel mínimo.

Según Lindsay (1974) contenidos de quelatos muy bajos (del orden de 10^{-8} a 10^{-7} M) serían suficientes para un abastecimiento satisfactorio de Fe. Los agentes quelantes pueden provenir de la materia orgánica presente en el suelo o de excreciones, ya sea de las propias raíces de las plantas o de los microorganismos. Los compuestos de este tipo más importantes en el suelo son los ácidos fúlvicos y húmicos, aminoácidos, sideróforos, fitosideróforos, fenoles y ácidos orgánicos. El papel que desempeñan como agentes quelantes depende principalmente de su constante de estabilidad con el Fe y otros elementos, así como del pH. En el Cuadro 1 se muestran las constantes de estabilidad de algunos quelatos naturales y sintéticos con Fe(III) y Fe(II). En general, los quelatos de Fe(III) son más estables que los de Fe(II), aunque hay compuestos que forman quelatos más estables con el Fe(II), como los agentes quelantes sintéticos BPDS (Chaney *et al.*, 1972) y ferrozina (Olsen y Brown, 1980). La nicotianamina (NA) también quelata preferentemente Fe(II) (Benes *et al.*, 1983), aunque hay datos que muestran que la constante de formación del complejo Fe-NA podría ser más favorable para el Fe(III) ($10^{20,6}$) que para el Fe(II) ($10^{12,8}$, Hider *et al.*, 1997). Sin embargo, hasta la fecha no se han detectado complejos Fe(III)-NA en condiciones fisiológicas.

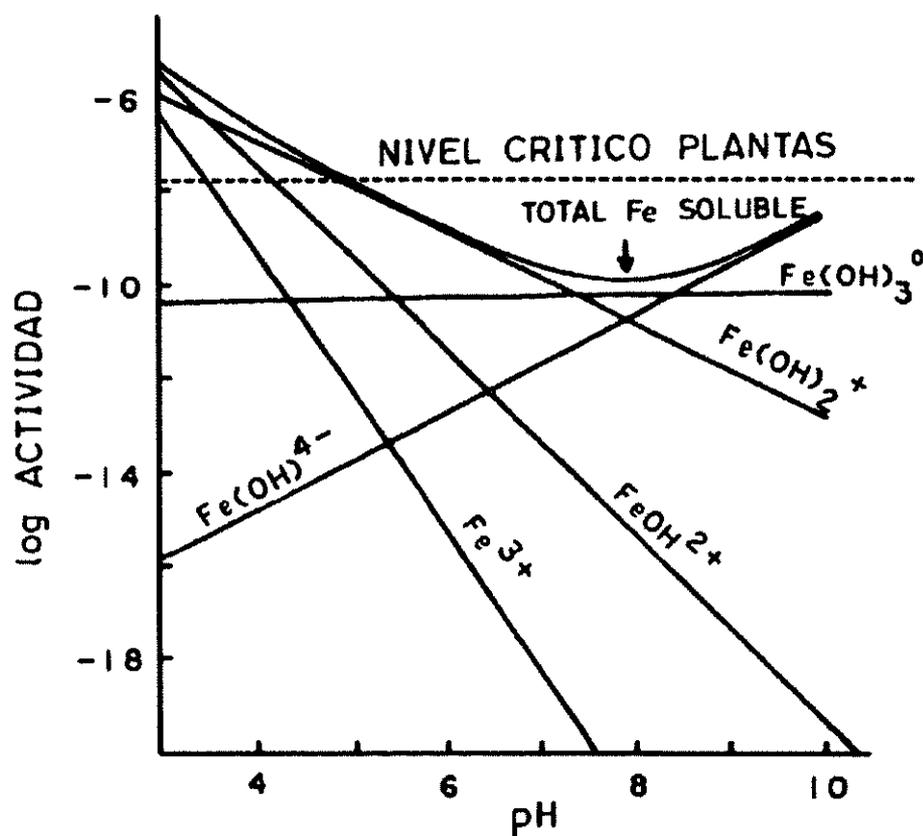


Figura 1: Diferentes especies de Fe inorgánico en solución, en función del pH (Römheld y Marschner, 1986)

Tipos de Quelatos		K_s	Referencia
Ácidos orgánicos	Fe(II)-citrato	$10^{4,4}$	Jolley <i>et al.</i> , 1987
	Fe(III)-citrato	$10^{11,4}$	Jolley <i>et al.</i> , 1987
Fitosideróforos	Fe(III)-ac. mugínico	$10^{18,1}$	Crowley <i>et al.</i> , 1987
	Fe(III)-ac. avénico	$10^{18,1}$	Römheld y Marschner, 1986
Sideróforos	Fe(II)- hidroxamatos	10^8	Allnutt y Bonner, 1987
	Fe(III)-hidroxamatos	10^{28}	Allnutt y Bonner, 1987
Nicotianamina	Fe(II)-NA	$10^{12,8}$	Hider <i>et al.</i> , 1997
	Fe(III)-NA	$10^{20,6}$	Hider <i>et al.</i> , 1997
Sintéticos	Fe(III)-EDTA	$10^{24,2}$	Römheld y Marschner, 1983
	Fe(III)-DTPA	$10^{28,6}$	Römheld y Marschner, 1983
	Fe(III)-EDDHA	$10^{33,9}$	Chaney, 1988

Cuadro 1: Constantes de estabilidad (K_s) de quelatos de Fe(II) y Fe(III)

La presencia de otros compuestos y elementos en el suelo también afecta a la solubilidad del Fe. Así, el bicarbonato y carbonato mantienen un pH elevado en el suelo, que disminuye la solubilidad del Fe. Por otra parte, el fosfato puede precipitar el Fe como fosfato férrico, disminuyendo el Fe soluble disponible (Kashirad y Marschner, 1974; Kolesch *et al.*, 1987a). El Ca(II) y Mn(II) forman también complejos con los agentes quelantes, preferentemente en suelos reducidos (Lindsay y Schwab, 1982), desplazando así al Fe. El NO_3^- puede también alcalinizar la rizosfera al ser absorbido, lo que produce la disminución de la solubilidad del Fe (Marschner y Römheld, 1983; Barak y Chen, 1984).

1.2.- El hierro en las plantas

El Fe es un microelemento esencial para las plantas, animales y otros organismos. En el año 1860 Julius von Sachs ya estableció que su presencia es fundamental en las plantas, aunque sólo es requerido en pequeñas cantidades (Marschner, 1995). Así, el Fe cumple los tres criterios propuestos por Arnon y Stout (1939) para ser considerado como un microelemento esencial para las plantas:

- a) En su ausencia la planta no puede completar su ciclo biológico
- b) Su función es específica y no puede ser sustituida por otro elemento
- c) Está implicado en el metabolismo de la planta

Desde un punto de vista químico el Fe es un elemento de transición caracterizado por su facilidad para cambiar de estado de oxidación de Fe(III) a Fe(II) y viceversa, y por su capacidad para formar complejos octaédricos con diversos ligandos. El potencial del sistema de Fe(III)/Fe(II) es bastante elevado en medio ácido ($E^\circ = 0,77 \text{ V}$), pero disminuye rápidamente al aumentar el pH, al estabilizarse el Fe(III) en forma de hidróxido. Dependiendo del ligando, el potencial redox varía ampliamente. Esta variabilidad es la que le confiere una especial importancia en los sistemas redox biológicos (Smith, 1984; Marschner, 1995). El Fe es un constituyente indispensable de gran número de enzimas y agentes redox que intervienen en algunas de las principales funciones del metabolismo de las plantas superiores. Así, el Fe actúa como cofactor en, al menos, 139 enzimas que catalizan reacciones bioquímicas únicas (Imsande, 1998). Entre las funciones en las que interviene están la fotosíntesis, la respiración, la fijación de nitrógeno (Clark, 1983) y la síntesis de ADN y hormonas (Briat y Lobréaux, 1997). Además, el Fe(II) libre puede producir radicales oxígeno e hidroxilo mediante la reacción de Haber Weiss y la reacción Fenton (Guerinot y Yi, 1994). Estos radicales son los principales responsables de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de la

membrana lipídica. Para prevenir el daño oxidativo, el Fe se incorpora habitualmente a estructuras complejas.

En las plantas, cerca del 63% del Fe de la hoja está asociado a proteínas y localizado mayoritariamente, un 80% del total, en los cloroplastos. Las proteínas asociadas al Fe se pueden agrupar en:

a) Proteínas con grupo hemo. Este conjunto lo integran proteínas como los citocromos, catalasas y peroxidasas y representan cerca del 9% del Fe en la hoja. Todos estos enzimas contienen un complejo hemo Fe-porfirina como grupo prostético. Los citocromos son constituyentes esenciales de los sistemas redox en cloroplastos, mitocondrias y en la cadena redox de la nitrito reductasa. Las catalasas facilitan la dismutación de H_2O_2 en H_2O y O_2 , jugando un papel importante asociadas a la superóxido dismutasa, y participando también en la fotorespiración y en la ruta del glicolato. Las peroxidasas también participan en reacciones de detoxificación del H_2O_2 . La actividad de muchos de estos enzimas es dependiente de la concentración de Fe en la planta.

b) Proteínas sin grupo hemo. Este conjunto incluye las denominadas proteínas Fe-S y representan cerca del 19% del Fe en la hoja. En estas proteínas el Fe está coordinado con el grupo tiol de la cisteína. La proteína más conocida de este grupo es la ferredoxina, que actúa como transmisora de electrones en un gran número de procesos metabólicos. Otro ejemplo son los isoenzimas de la superóxido dismutasa que contienen Fe en su grupo prostético. Este enzima detoxifica los radicales libres del anión superóxido formando H_2O_2 . La aconitasa es otra proteína Fe-S que cataliza la isomerización de citrato a isocitrato en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. El Fe de su grupo prostético es necesario para la estabilidad y actividad del enzima y también es responsable de la orientación espacial de los sustratos.

c) Fito ferritina. Se trata de una proteína de reserva de Fe, y representa aproximadamente un 35% del Fe en la hoja, llegando a contener hasta el 80% del Fe de los cloroplastos (Tiffin, 1972).

1.3.- Agentes causantes de la deficiencia de Fe en las plantas

La falta de Fe total en el suelo es un fenómeno poco frecuente y se limita a suelos arenosos, degradados o turbosos (Römheld y Marschner, 1986). La deficiencia de Fe más común es la que se produce en los suelos calcáreos y alcalinos, que se caracterizan por contenidos elevados en carbonato y Ca, y un pH elevado. En general, la deficiencia de Fe se puede inducir principalmente por

aquellos factores susceptibles de influir en el suministro, absorción, transporte o metabolismo del Fe. Dichos factores se pueden clasificar en varios grupos, atendiendo al proceso sobre el que actúan (Romera y de la Guardia, 1991):

a) Factores que afectan a la solubilidad y movilidad del Fe en el suelo. Las condiciones que favorecen una baja solubilidad del Fe en el suelo provocan clorosis; tal es el caso de un pH elevado, óxidos de Fe muy cristalinos, tamaño de partícula grande y baja cantidad de agentes quelantes (Loeppert, 1986). La materia orgánica proporciona agentes quelantes que mantienen el Fe en solución, pero también estimula la actividad microbiana, aumentando los niveles de CO_2 y consecuentemente los de HCO_3^- , que se puede considerar como un agente inductor de clorosis al mantener un pH elevado en el suelo e interactuar con la absorción del Fe. La salinidad también afecta la solubilidad del Fe, ya que los iones Na^+ pueden desplazar al Fe de los agentes quelantes (Award *et al.*, 1988). La toma de NO_3^- puede conducir a deficiencia de Fe (Smolders *et al.*, 1997) debido al cotransporte $\text{NO}_3^-/2\text{H}^+$ que produce un aumento del pH en el suelo. Este fenómeno se produce principalmente en suelos alcalinos donde, debido al alto pH, el amonio se nitrifica rápidamente. La deficiencia de Fe inducida por el nitrato puede adquirir gran importancia cuando éste es aplicado como fertilizante (Mengel, 1994).

b) Factores que afectan a la absorción del Fe por la planta. Existen diversos factores de tipo genético y la respuesta de las plantas ante la deficiencia de Fe varía para las distintas especies. Así, todas las plantas dicotiledóneas poseen capacidad reductora en sus raíces, pero con un grado de actividad muy diferente, incluso en cultivares de la misma especie (Römheld, 1987). Por otro lado la influencia del pH en la reducción del Fe por las raíces, y por lo tanto en la absorción, se ha puesto de manifiesto en diferentes especies, tales como girasol y tomate (Mengel, 1994), manzano (Ao *et al.*, 1985), *Vigna unguiculata* (Brüggemann *et al.*, 1993), remolacha (Susín *et al.*, 1996), guisante (Cohen *et al.*, 1997), trébol (Wei *et al.*, 1997) y viña (Brancadoro *et al.*, 1995). En todos estos trabajos se encontró una disminución en la reducción del Fe a pH alto.

c) Factores que afectan a la actividad del Fe dentro de la planta. A veces las hojas cloróticas tienen un mayor contenido total de Fe que las hojas verdes. Este fenómeno ha sido denominado como la *paradoja de la clorosis* (Römheld, 1997; Morales *et al.*, 1998) y se puede achacar a una inhibición en el crecimiento de las hojas cloróticas. Las altas concentraciones de Fe encontradas en hojas deficientes de frutales sugieren que debe estar acumulado en alguna parte de la hoja en una forma no utilizable (Marschner, 1995; Morales *et al.*, 1998), planteando interrogantes sobre su posible removilización. En algunas especies la aplicación de

ácido ascórbico o sulfúrico en las hojas produce el reverdecimiento de las mismas (Díez-Altare, 1959), al igual que cuando se trata con productos que inducen aumentos en la actividad de la ATPasa de membrana plasmática (Mengel y Geurtzen, 1988). Otros datos indican que la disminución del pH apoplástico de la hoja podría conducir a la removilización del Fe (Kolesch *et al.*, 1984; Mengel y Geurtzen, 1988).

d) El bicarbonato requiere una mención aparte como agente inductor de clorosis. Harley y Linder (1945) ya observaron la implicación del bicarbonato (HCO_3^-) en la inducción de la clorosis férrica. Además, factores que favorecen la formación de bicarbonato como la alta humedad del suelo, la compactación y el aporte de materia orgánica fresca, son también inductores de clorosis (Chaney *et al.*, 1984). Todavía no se comprenden del todo las bases fisiológicas de la deficiencia de Fe en plantas inducida por una concentración alta de bicarbonato (Loeppert y Hallmark, 1985; Mengel, 1994) pero no parecen deberse al alto pH *per se* (Alhendawi *et al.*, 1998). Se ha propuesto que el bicarbonato afecta principalmente al crecimiento y metabolismo de las raíces (Yang *et al.*, 1994), a la toma y transporte de Fe a la parte aérea (Alhendawi *et al.*, 1998) o a la disponibilidad fisiológica del Fe en las hojas debido a la alcalinización del apoplasto y citoplasma donde podría estar precipitado (Romera *et al.*, 1992b; Mengel, 1994). El bicarbonato absorbido a través de las raíces podría utilizarse en la síntesis de ácidos orgánicos, siendo fijado *in situ* por la PEPC, para dar oxalacetato, que es reducido a continuación para dar malato (Cramer *et al.*, 1993). Esto permitiría la asimilación de CO_2 también en las raíces. Por otro lado, la presencia de bicarbonato en la solución nutritiva durante el crecimiento de las plantas también disminuye la actividad de la reductasa férrica (Susín *et al.*, 1996). Otra posibilidad es que la reducción del Fe(III) en la hoja se vea afectada negativamente por el elevado pH al igual que ocurre con la reducción en la raíz.

1.4.- La deficiencia de Fe o clorosis férrica

Cuando las plantas están sometidas a deficiencia de Fe, desarrollan un amarilleamiento internerval en las hojas más jóvenes, fenómeno conocido como *clorosis férrica*. La deficiencia de Fe se ha descrito en un amplio espectro de plantas de interés agronómico, tales como judía, soja, coliflor, brócoli, col, remolacha azucarera, espinaca, maíz, tomate, pepino, pimiento, viña, frutales (manzano, melocotonero, peral, ciruelo, cerezo, almendro, olivo, cítricos, membrillero, albaricoquero, kiwi, etc.) e incluso en plantas ornamentales como el rosal o el narciso. En frutales, la clorosis férrica tiene importantes connotaciones económicas. Si la deficiencia no se corrige, el crecimiento de los árboles se ve

afectado, la floración es más débil y los frutos son menos numerosos y más pequeños. También ocurre la muerte precoz de los árboles, con una edad media de 14-16 años en melocotonero (Sanz *et al.*, 1992). Sólo en la cuenca del Ebro se ha estimado en 2.200 millones de pesetas/año el gasto que suponen los tratamientos correctores.

La clorosis férrica se debe al marcado descenso de la concentración de pigmentos fotosintéticos. El limbo adquiere un tono verde pálido, que puede evolucionar gradualmente a amarillo, quedando verdes las nerviaciones. En casos graves la hoja adquiere un color blanco marfil y puede llegar a manifestar necrosis (Chaney, 1984). Estos síntomas aparecen primero en las hojas más jóvenes, pudiendo afectar parcial o totalmente el área foliar y en casos extremos se puede generalizar a toda la planta (Chaney *et al.*, 1984). Cuando la clorosis es muy grave se produce un amarilleamiento general, necrosis de las hojas e incluso la muerte de la planta. Los síntomas desaparecen al aplicar compuestos de Fe, pero no de otros elementos. Hay otras deficiencias que también provocan amarilleamientos foliares, pero los síntomas visuales son diferentes. Así, las deficiencias de Mg y Mn también dan lugar a una falta de clorofila pero en las hojas más viejas. En la deficiencia de S aparece clorosis en las hojas jóvenes aunque los nervios también se ponen amarillos.

Hay que subrayar que la determinación del contenido total de Fe en las hojas es una medida que en muchos casos no se correlaciona bien con la deficiencia de Fe. En muchos cultivos en campo las hojas cloróticas presentan contenidos de Fe total mayores o iguales que los que presentan las hojas controles (Römheld 1997, Morales *et al.*, 1998). Se desconoce la causa de este fenómeno, que podría estar producido por la existencia de acervos de Fe no activos en la hoja.

La clorosis férrica se puede cuantificar mediante una clasificación visual como la propuesta por Byrne (1988):

- | |
|--|
| <p>Nivel 1 = hoja verde sana.</p> <p>Nivel 2 = hoja verde con zonas internervales ligeramente amarillas.</p> <p>Nivel 3 = hoja mayoritariamente amarilla con los nervios verdes.</p> <p>Nivel 4 = hoja completamente amarilla excepto el nervio central que permanece verde.</p> <p>Nivel 5 = hoja completamente amarilla.</p> |
|--|

Hoy en día el diagnóstico visual tiende a ser sustituido por la determinación del contenido de clorofila de las hojas, ya que existe una marcada correlación entre el contenido de clorofila y los síntomas visuales (Abadía, 1992; Morales *et al.*, 1994; Fodor *et al.*, 1995; Shi y Byrne, 1995).

El amarilleamiento característico de las hojas se debe a que la concentración de xantofilas en la hoja desciende menos que la de clorofila y β -caroteno (Terry, 1980). Las hojas verdes de la mayoría de las plantas presentan concentraciones superiores a $250 \mu\text{mol clorofila.m}^{-2}$ mientras que ya se consideran hojas deficientes aquellas con menos de $250 \mu\text{mol clorofila.m}^{-2}$, aunque pueden llegar hasta valores inferiores a $10 \mu\text{mol clorofila.m}^{-2}$ (Morales *et al.*, 1994). La clorofila se encuentra unida de forma no covalente a proteínas (apo-proteínas), formando complejos supramoleculares pigmento-proteína que son parte integral de la membrana tilacoidal (Bassi *et al.*, 1990; Fodor *et al.*, 1995). La deficiencia de Fe produce un descenso en la síntesis de proteínas cloroplásticas en las hojas (Lin y Stocking, 1978).

La deficiencia de Fe tiene mucho menos efecto en el crecimiento de la hoja, número de células por área o número de cloroplastos que en el tamaño de los cloroplastos y su contenido proteico (Terry, 1980). Sólo en el caso de una deficiencia severa de Fe se produce una disminución en el crecimiento de la hoja (Abbott, 1967). En las hojas cloróticas se reduce tanto el tamaño de los cloroplastos como el número de tilacoides por grana en el cloroplasto. Los acúmulos de almidón disminuyen o incluso desaparecen. Cuando la deficiencia es muy severa, los cloroplastos presentan forma esférica o ligeramente alargada con muy pocas lamelas y un estroma grande prácticamente sin grana (Spiller y Terry, 1980). La deficiencia de Fe no disminuye la actividad de enzimas fotosintéticos tales como: enzima málico, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, fructosa-1,6-bifosfatasa y PEP carboxilasa (Stocking, 1975; Taylor *et al.*, 1982) mientras que la actividad y cantidad total de la Rubisco disminuyen (Arulanatham *et al.*, 1990; Winder y Nishio, 1995).

1.5.- Respuestas de las raíces de las plantas ante la deficiencia de Fe

Ante la deficiencia de Fe las plantas pueden permanecer indiferentes (plantas no eficientes) o desarrollar mecanismos de adaptación para aumentar su capacidad de tomar Fe del suelo (plantas eficientes). Se han descrito dos estrategias distintas, que son utilizadas por las plantas eficientes, dependiendo de

su forma de adquirir el Fe: son la **Estrategia II** de las plantas gramíneas y la **Estrategia I** de las dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas.

1.5.1.- Estrategia II

Las gramíneas toman el Fe como Fe(III), formando un complejo con los fitosideróforos, agentes quelantes de Fe(III) de bajo peso molecular que se sintetizan y excretan específicamente por las raíces de las plantas para captar el Fe presente en el suelo (Takagi, 1976). Estos compuestos son del mismo tipo que los sideróforos que excretan los microorganismos con el mismo fin. El primer fitosideróforo se aisló de exudados de raíces de cebada por Takagi *et al.* (1984) y fue identificado como ácido mugínico (MA). Todos los fitosideróforos identificados hasta la fecha son aminoácidos análogos al MA y se denominan de forma colectiva fitosideróforos de la familia del ácido mugínico, o simplemente ácidos mugínicos. La estructura química de estos compuestos se muestra en la Figura 2.

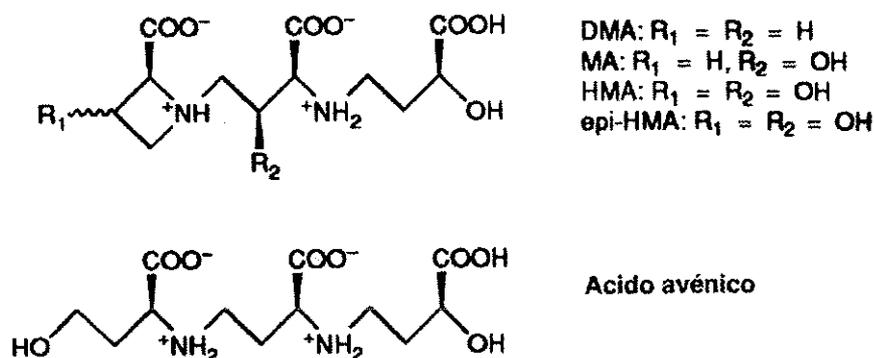


Figura 2: Estructura química de los fitosideróforos de la familia del ácido mugínico.

Cuando las plantas gramíneas sufren una deficiencia de Fe inducen la excreción de fitosideróforos, con aumentos de hasta 20 veces respecto a plantas control (Takagi *et al.*, 1984), llegando a concentraciones en el suelo de $1 \mu M$ (Romera y de la Guardia, 1991). La inducción se inhibe cuando se produce un aporte de Fe, mientras que las variaciones de pH no producen ningún efecto. Römheld y Marschner (1990) y Onyezili y Ross (1993) han mostrado la relación entre la excreción de fitosideróforos y la eficiencia o no eficiencia de las plantas ante la deficiencia de Fe. La excreción no sigue un ritmo constante, y presenta un máximo pocas horas después del inicio de la iluminación (Takagi *et al.*, 1984), aunque la síntesis de fitosideróforos se produce de forma constante durante todo el ciclo diurno (Walter *et al.*, 1995) o luz/oscuridad (Kawai *et al.*, 1993). En condiciones de deficiencia de Fe también aumenta la velocidad de absorción de los complejos

Fe(III)-fitosideróforo, lo que indica una mayor capacidad de transporte. Mori *et al.* (1991) han propuesto un mecanismo de cotransporte de la excreción de fitosideróforos acoplado a protones o iones potasio.

La toma de Fe por parte de las plantas gramíneas se realiza mediante la excreción de los fitosideróforos en las zonas subapicales de la raíz (Marschner *et al.*, 1987; Mori y Nishizawa, 1987). Un hecho importante dentro de esta estrategia es que los fitosideróforos se absorben enteros, no siendo necesaria la reducción previa del Fe en la membrana plasmática (Figura 3). El transporte del complejo al citoplasma de la célula se produce a través de un transportador de alta especificidad constitutivo de la membrana plasmática de las células de la raíz (Mori, 1998). El sistema es selectivo para el Fe ya que el transportador de la membrana plasmática tiene baja afinidad hacia los complejos formados por los fitosideróforos con otros metales tales como el Zn, Cu o Mn (Marschner *et al.*, 1989; Ma *et al.*, 1993). Ya dentro de la planta se produce la liberación del Fe y el fitosideróforo se degrada o vuelve a salir.

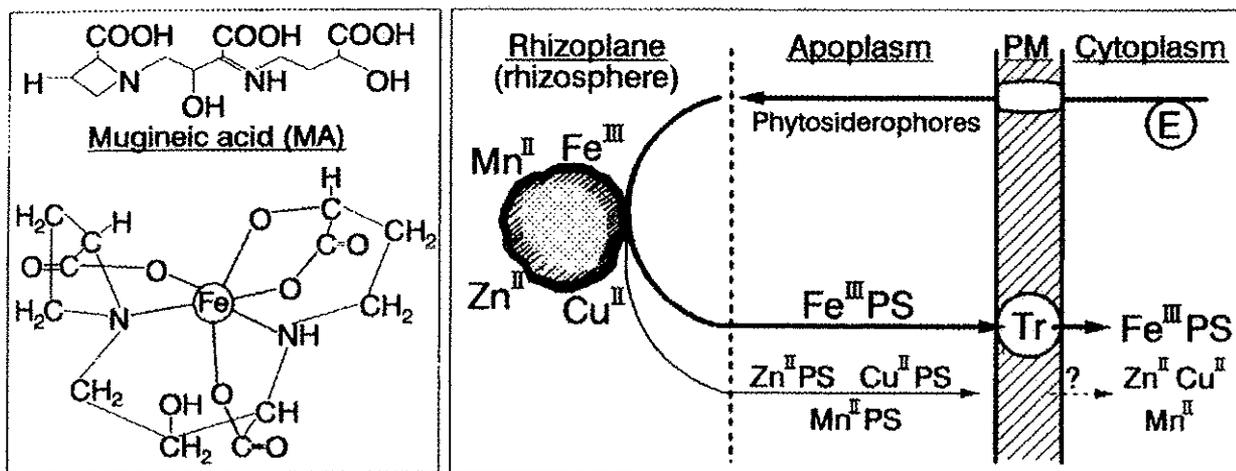


Figura 3: Mecanismo de absorción de Fe por las plantas gramíneas y estructura del ácido mugínico y su correspondiente complejo con el Fe (Marschner, 1995).

No se sabe mucho sobre el sistema de regulación de la síntesis de los fitosideróforos ni de los mecanismos implicados (Figura 4). El primer paso de la síntesis de los fitosideróforos requiere la combinación de tres moléculas de S-adenosil metionina para dar nicotianamina, potencial transportador de Fe(II) en la planta (Stephan y Scholz, 1993). La reacción está catalizada por la nicotianamina sintasa (Shojima *et al.*, 1990), enzima que aumenta su actividad en condiciones de deficiencia de Fe. Por otro lado, los estudios de expresión de genes no han

proporcionado datos concluyentes. Se han codificado dos ADN, *ids2* e *ids3* (de "iron deficiency specific"), que se acumulan específicamente en raíces de cebada en condiciones de deficiencia de Fe (Okumura *et al.*, 1994; Nakanishi *et al.*, 1993). Cada gen codifica una proteína muy similar a la 2-oxoglutarato dioxigenasa, por lo que se cree que están implicadas en la conversión del ácido deoximugínico a mugínico y del mugínico a epihidroximugínico, mediante una hidroxilación. Se han encontrado también dos variedades de maíz, los mutantes *ys1* e *ys3*, deficientes en la absorción de Fe. La mutación del *ys1* produce un defecto en el transporte del complejo Fe(III)-deoximugínico a través de la membrana mientras que la excreción de los fitosideróforos no se ve afectada (von Wiren *et al.*, 1994). La proteína afectada podría ser el propio transportador o un factor que regulase su síntesis. En el caso del mutante *ys3* se encuentra afectada la excreción de fitosideróforos a la rizosfera (Basso *et al.*, 1994). Otra aproximación para identificar el transportador del complejo Fe(III)-fitosideróforo se realizó al transformar con ADN_e de cebada la levadura mutante *ctr1*, incapaz de crecer en un medio deficiente en Fe. El clon SFD1 (de "Suppressor of Ferrous uptake Defect") permite a dicha levadura crecer cuando se le proporciona Fe(III)-citrato o Fe(III)-mugínico (Yamaguchi *et al.*, 1997). SDF1 no presenta similitudes con ninguna otra proteína de función conocida, ni se conoce el mecanismo por el que permite el crecimiento.

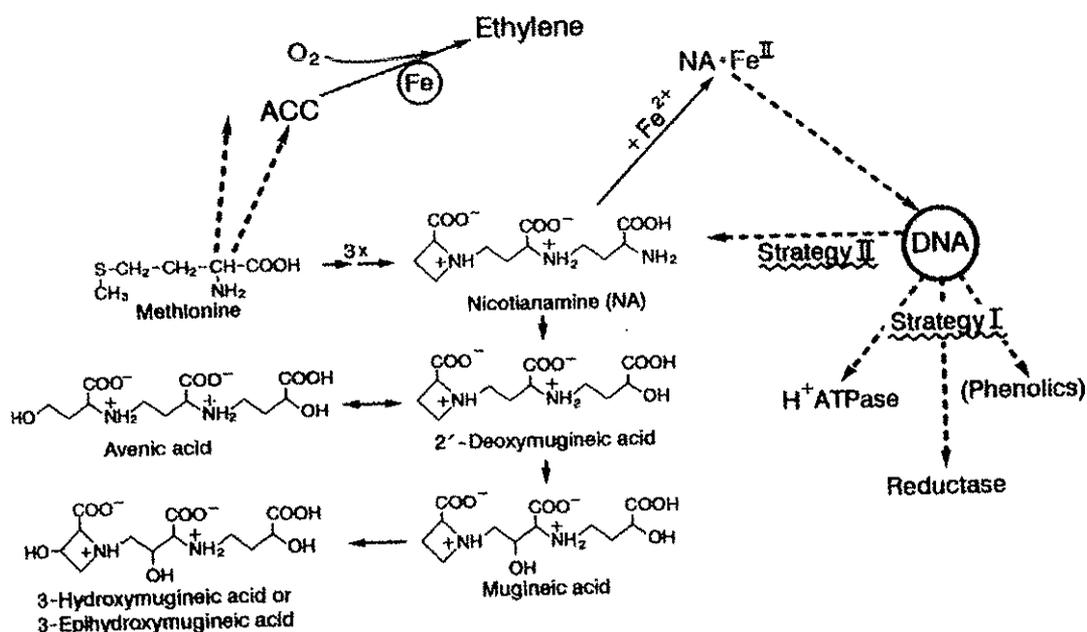


Figura 4: Ruta de biosíntesis de los fitosideróforos de la familia del ácido mugínico (Marschner, 1995).

1.5.2.- Estrategia I

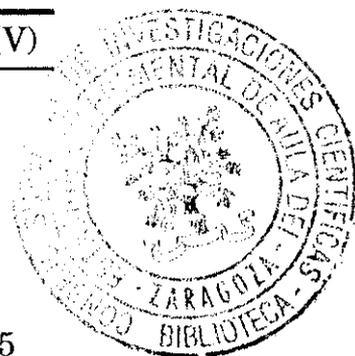
Las plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas tienen que reducir el Fe(III) (forma en la que se encuentra normalmente en el suelo) a Fe(II) como paso previo a la absorción (Chaney *et al.*, 1972). Esta reducción se realiza en la zona externa de la membrana plasmática gracias a una transferencia de electrones desde el NAD(P)H intracelular hacia el apoplasto a través de la membrana. La liberación de H⁺ por las raíces disminuye el pH de la rizosfera, favoreciendo la solubilidad y quelatación del Fe(III) y su reducción a Fe(II). Cuando las plantas dicotiledóneas están en condiciones de abundancia de Fe pueden absorber Fe(III), siendo la reducción de Fe un mecanismo para incrementar la absorción en condiciones de baja disponibilidad (Longnecker y Welch, 1986).

La reductasa de las plantas dicotiledóneas se encuentra localizada en la membrana plasmática de las zonas subapicales de las raíces, en especial de las más jóvenes (Brown, 1978; Sijmons y Bienfait, 1984; Landsberg, 1986). Se ha propuesto que se trata de un enzima transmembrana, con el sitio de unión al donador de electrones, NAD(P)H, en el lado citoplasmático y el sitio de unión a los quelatos de Fe en el lado apoplástico (Moog y Brüggemann, 1994). El dador de electrones sería el NADH (Buckhout *et al.*, 1989). El enzima no es selectivo, pudiendo reducir Mn(IV) y Cu(II) (Römheld y Marschner 1986; Welch *et al.*, 1993), muchos tipos de quelatos, incluidos los fitosideróforos (Römheld y Marschner, 1983; Sijmons y Bienfait 1984; Bienfait, 1987), y diferentes aceptores de electrones, como ferricianuro (Sijmons y Bienfait, 1984; Moog y Brüggemann, 1994).

	E_o' a pH 7,0 (V)
Fe(III)/Fe(II)	+ 0,77
Ferricianuro/Ferrocianuro	+ 0,36
Fe(III)-citrato/Fe(II)-citrato	+ 0,20
Fe(III)-EDTA/Fe(II)-EDTA	+ 0,13
Fe(III)-oxalato/Fe(II)-oxalato	- 0,01
Fe(III)-muginato/Fe(II)-muginato	- 0,10
Fe(III)-NA/Fe(II)-NA	- 0,18
Sideróforos	-0,34 a -0,75

Cuadro 2: Potenciales estándar de oxido-reducción de quelatos, complejos y ligandos de Fe.

Los valores de reducción dependen del tipo de quelato empleado, lo cual se asocia con su potencial de óxido reducción y con la constante de estabilidad del



quelato. Teóricamente todos aquellos sistemas redox con un potencial de óxido-reducción mayor de aproximadamente $-0,37$ V podrían ser reducidos por la reductasa de membrana plasmática (Bienfait, 1988a). Tal como se muestra en el Cuadro 2 la mayoría de los quelatos de Fe cumplen esta condición.

En la Figura 5 se muestra el modelo propuesto para la adquisición de Fe dentro de la Estrategia I. Los pasos serían los siguientes: a) adsorción de los quelatos de Fe(III) a la raíz; b) debilitamiento de los enlaces del quelato; c) reducción del Fe(III); d) disociación del quelato, quedando el agente quelante en el exterior; y e) unión del Fe(II) a un transportador de membrana.

La Estrategia I engloba varios fenómenos que afectan a la estructura, morfología y fisiología de las raíces, todos ellos encaminados a desarrollar mecanismos para aumentar la capacidad de absorción de Fe del suelo. Entre los fenómenos que afectan a la morfología y estructura de las raíces destacan el engrosamiento de las puntas de raíz, la diferenciación de las células de transferencia (Kramer *et al.*, 1980) y el aumento de los pelos radiculares (Landsberg, 1994). Los fenómenos que afectan a la fisiología de las raíces son: el aumento de la capacidad de reducción de quelatos de Fe(III) mediante la reductasa férrica unida a la membrana plasmática (Chaney *et al.*, 1972; Moog y Brüggemann, 1994), la acidificación de la rizosfera (Alcántara *et al.*, 1991; Rabotti y Zocchi, 1994) y la producción y excreción de compuestos fenólicos, ácidos orgánicos y flavinas (Susín *et al.*, 1993a; 1994).

1.5.2.1.- Cambios morfológicos en la raíz inducidos por la deficiencia de Fe

Muchas especies presentan cambios macro y microscópicos en la estructura radicular cuando se encuentran en condiciones de deficiencia de Fe. Los cambios macroscópicos incluyen la formación de pelos radiculares y el engrosamiento en las zonas subapicales (Welkie y Miller, 1993). Este engrosamiento de la raíces coincide con las zonas donde se produce tanto la reducción de Fe(III) (Bell *et al.*, 1988; Welch *et al.*, 1993) como la extrusión de H^+ (Alcántara *et al.*, 1991). Los cambios microscópicos incluyen la presencia de células de transferencia en la zona del engrosamiento, incrementando así la superficie de contacto entre la pared celular y el citoplasma (Welkie y Miller, 1993; Landsberg, 1994; Schmidt y Bartels, 1996). La ultraestructura de estas raíces revela las características de las células de transferencia: protuberancias en la pared celular más próxima al exterior, citoplasma denso con numerosas

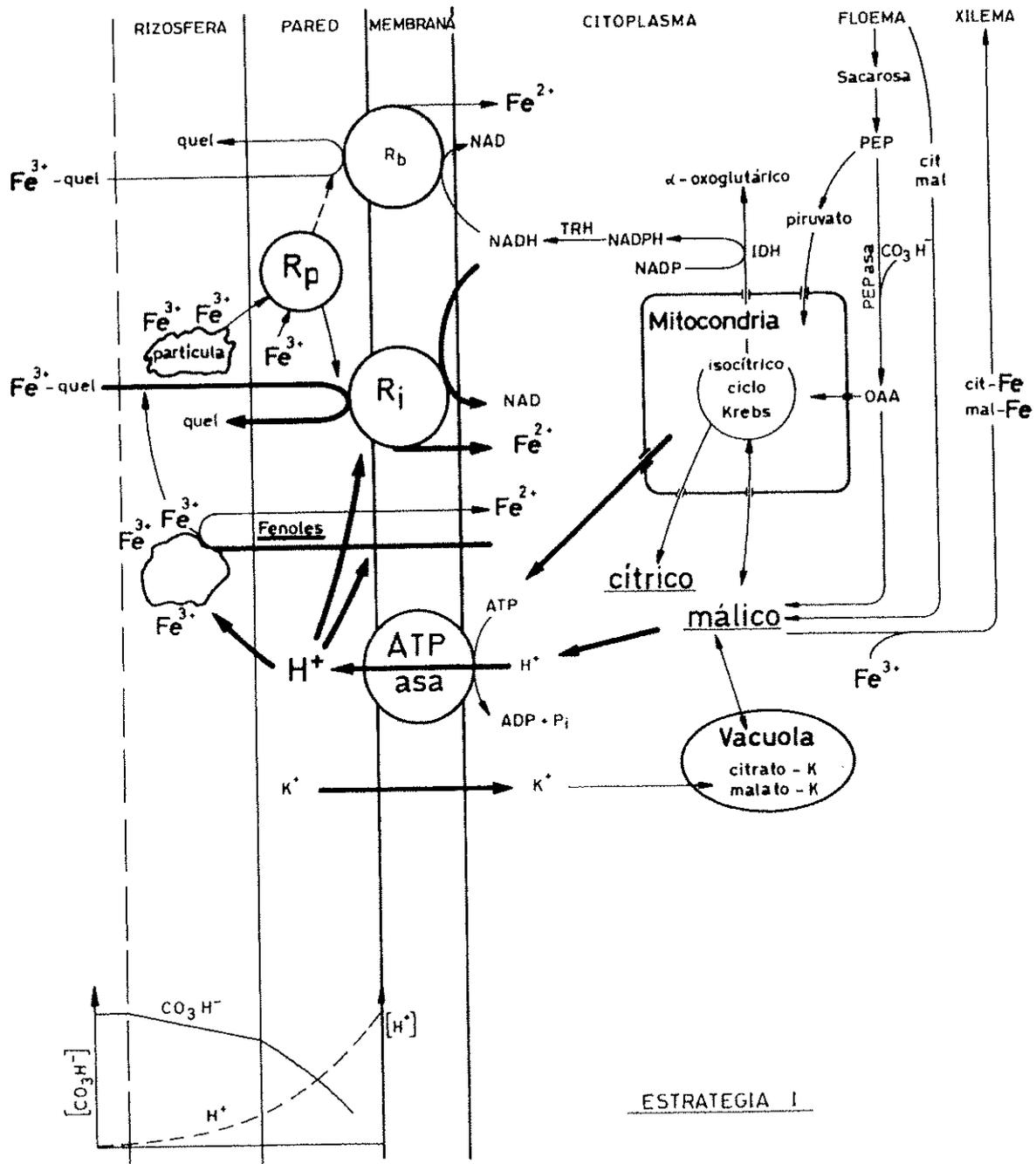


Figura 5: Esquema de los mecanismos implicados en la adquisición de Fe dentro de la Estrategia I (modificado de Römheld, 1987 y Bienfait, 1988a). R_b= reductasa base; R_i= reductasa inducible; PEP= fosfoenol piruvato; OAA= oxalacetato; PEPasa= fosfoenol piruvato carboxilasa; IDH= isocitrato deshidrogenasa; TRH= transhidrogenasa; quel= agente quelante.

mitocondrias y voluminosos proplastidios, con multitud de invaginaciones (Landsberg, 1994).

La función de las células de transferencia aún no ha sido determinada. Dichas células también aparecen en plantas sometidas a estrés salino (Kramer *et al.*, 1980). En general, estos cambios morfológicos permiten aumentar la superficie de contacto entre las células de la raíz y el medio. Su desarrollo coincide en el tiempo con la expresión de algunas respuestas de la planta a la deficiencia de Fe, pero se ha encontrado que la inducción de la actividad reductora de Fe en las raíces es a veces independiente de la formación de pelos radiculares y/o células de transferencia. Esto indicaría o bien una regulación diferente para ambas respuestas (Moog *et al.*, 1995) o que la formación de pelos radiculares y células de transferencia no forman parte de las respuestas específicas a la deficiencia de Fe (Chaney *et al.*, 1992). Por otro lado, la gran cantidad de mitocondrias existentes en estas células pone de manifiesto la actividad respiratoria existente, habiéndose propuesto como una posible función la de proporcionar la energía necesaria en el aumento de transporte iónico durante la extrusión de H^+ (Landsberg, 1984).

1.5.2.2.- Inducción de la capacidad reductasa

La capacidad de reducir Fe(III) del medio por las raíces de las plantas deficientes puede llegar a ser superior en 10-20 veces a los valores de las plantas control (Moog y Brüggemann, 1994; Susín *et al.*, 1996; Sueyoshi *et al.*, 1997). La reducción se localiza generalmente en la superficie de las partes subapicales de la raíz que muestran engrosamiento, así como en los pelos radiculares (Moog y Brüggemann, 1994). La reducción de Fe ocurre a nivel de la membrana plasmática, a través de un enzima específico (FC-R) capaz de reducir quelatos de Fe(III). Sin embargo, el mecanismo por el cual las raíces de las plantas eficientes con Estrategia I inducen la reducción de Fe(III) dista de estar completamente dilucidado. El enzima FC-R podría ser inducido *de novo* bajo deficiencia de Fe, o ser una proteína constitutiva que se activara en condiciones de deficiencia. Bienfait (1988a) propuso la existencia de dos reductasas de membrana: una reductasa base o estándar (R_n) constitutiva de la membrana plasmática de todas las plantas superiores y una reductasa inducible (R_i) también denominada "turbo". Ambas reductasas reducen Fe(III) acompañado con distintos agentes quelantes (Bienfait, 1988a; 1989). Sin embargo, existen datos que no apoyan la existencia de la turbo reductasa. Así, la actividad FC-R de preparaciones de membrana plasmática aisladas de plantas deficientes es solamente 2-3 veces superior al de las plantas control (Moog y Brüggemann, 1994; Susín *et al.*, 1996) y muestran valores similares de K_m (Brüggemann *et al.*, 1991; Holden *et al.*, 1991; Susín *et al.*, 1996), lo

que sugiere que se trata del mismo enzima. La gran inducción de la actividad que se observa en las plantas intactas se podría deber, bien a un aumento de la actividad producido por un aumento en la síntesis de la reductasa estándar, o bien a la intervención de algún cofactor que se pudiese perder en el aislamiento de la membrana plasmática.

El pH óptimo para la reducción de Fe(III) en raíz intacta, *in vivo*, está en torno a 5,5. En el caso de la remolacha a valores de pH mayores de 6,5 la actividad FC-R de las plantas deficientes desciende bruscamente hasta los valores que muestran las plantas control (Susín *et al.*, 1996). El pH óptimo para la reducción de Fe(III) en membrana plasmática aislada está entre 6,8-7,0 (Moog y Brüggemann, 1994; Susín *et al.*, 1996). La reducción de Fe varía con la concentración de quelato siguiendo una cinética de Michaelis-Menten (Bienfait *et al.*, 1983; Moog y Brüggemann, 1994; Susín *et al.*, 1996). La presencia de metales pesados como Ni y Cu afecta negativamente a la reducción (Alcántara *et al.*, 1994; Schmidt, 1997). La reducción se inhibe tras la adición a la solución nutritiva del inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida (Schmidt, 1995).

La resistencia a la deficiencia está a menudo correlacionada con la capacidad de reducir Fe por las raíces, aunque no se conocen demasiado bien los mecanismos de regulación del enzima. También parece necesaria la presencia de una pequeña cantidad de Fe en el medio para que se produzca la inducción del enzima FC-R en plantas de pepino (Romera *et al.*, 1996a, b), tomate (Zouari, 1996) y melocotonero (Gogorcena *et al.*, 1998). Sin embargo, la remolacha induce la actividad FC-R en ausencia total de Fe (Susín *et al.*, 1996). Se ha propuesto que la dependencia de Fe se deba a la relación de la actividad FC-R con el metabolismo del etileno (Romera y Alcántara, 1993; 1994; Romera *et al.*, 1996a, b). Uno de los pasos de la síntesis de etileno a partir de L-metionina es realizado por el enzima ACC oxidasa que requiere Fe para inducirse y se inhibe de forma competitiva con Co(II) (Dilley *et al.*, 1993). La inhibición de la biosíntesis del etileno con ácido amino oxiacético (AOA), aminoetoxivinilglicina (AVG), Co(II) o Ag(I) reduce de forma drástica el desarrollo de la actividad FC-R en plantas de pepino (Romera y Alcántara, 1993; 1994), tomate y guisante (Romera *et al.*, 1996a, b) en deficiencia de Fe. Al mismo tiempo, la adición de activadores de la síntesis de etileno a plantas cultivadas en condiciones control incrementa la actividad FC-R de las raíces (Romera y Alcántara, 1994).

Recientemente se ha mostrado que la deficiencia de Cu induce también la reductasa férrica de la membrana plasmática en plantas de guisante (Welch *et al.*, 1993), y se ha confirmado que se trata de la misma reductasa (Cohen *et al.*, 1997).

Deficiencias de K, Mg, Ca, Mn y Zn no producen ninguna inducción de la reductasa férrica (Cohen *et al.*, 1997).

La caracterización molecular de la FC-R no se ha llevado a cabo todavía, si bien existen diversos trabajos que han llevado a la asignación de algunos polipéptidos a dicho enzima. La solubilización de membrana plasmática de tomate permitió la separación de 4 bandas que presentaban actividad reductasa férrica con masas moleculares aparentes de 96, 70, 35 y 28 kDa (Holden *et al.*, 1991; 1992; Brüggemann *et al.*, 1993) y tres isoformas con pI de 5,5-6,2. La purificación de las proteínas solubilizadas permitió la separación de dos proteínas, una que sólo reducía KFeCN y otra que reducía KFeCN y quelatos de Fe(III) (Holden *et al.*, 1994). Esta última tenía un peso de 34 kDa y no estaba ni glicosilada ni contenía grupos hemo. Las proteínas aisladas de raíz de cebada y maíz presentan diferencias respecto a las anteriores. Para cebada se ha aislado una proteína con un peso de 205 kDa y pI de 7,4 (Moog y Brüggemann, 1994) con polipéptidos de 120, 106 y 96 kDa. En el caso de maíz se ha aislado una proteína con un peso de 210 kDa y polipéptidos de 46 y 28 kDa (Bagnaresi y Pupillo, 1995). El polipéptido de 46 kDa reduce Fe(III)-citrato y presenta un gran número de similitudes con la NADH-citocromo b_5 reductasa de mamíferos.

Hasta ahora no se han encontrado evidencias de síntesis *de novo* de una proteína de membrana involucrada en la actividad reductasa férrica en deficiencia de Fe. Todos estos datos corroborarían los datos cinéticos de que la actividad "turbo" reductasa sería debida a la sobreexpresión de la actividad reductasa férrica estándar (Bagnaresi y Pupillo, 1995; Brüggemann *et al.*, 1991). Sin embargo, hasta la fecha no se han podido clonar los correspondientes genes o ADN. Recientemente se ha aislado una familia de genes de *Arabidopsis thaliana* denominados genes *froh* (*froh a, b, c* y *d*) que codifican proteínas del tipo citocromo b, de la misma clase que las FRE1 y FRP1 de levadura y la gp91phox humana (Robinson *et al.*, 1997). El gen *froh c* aumenta su expresión considerablemente en condiciones de deficiencia de Fe. Se han identificado también dos mutantes de *Arabidopsis thaliana*, *frd₁* y *frd₃*, que muestran defectos en la reducción de Fe(III) (Yi y Guerinot, 1996). Dichos mutantes han mostrado que la capacidad de reducir quelatos de Cu(II) en el *frd₁* también se pierde cuando no se induce la reductasa férrica en condiciones de deficiencia (Yi y Guerinot, 1996).

1.5.2.3.- Acidificación de la rizosfera

Las plantas de Estrategia I deficientes en Fe suelen producir descensos en el pH de la solución en la que crecen (Welkie y Miller, 1993; Susín *et al.*, 1994). Tal

efecto se debe a la inducción de una bomba de protones dependiente de ATP situada en la membrana plasmática. La acidificación disminuye en presencia de inhibidores de la H⁺-ATPasa, tales como DES, DCCD (Römheld *et al.*, 1984), eritrosina y vanadato (Landsberg, 1986). La ATPasa de membrana plasmática ha sido caracterizada bioquímicamente (Sze, 1985; Serrano, 1989). El pH óptimo *in vitro* es de 6,6 (Michelet y Boutry, 1995) y la eficiencia termodinámica H⁺/ATPasa es igual a 1 (Rea y Sanders, 1987). La hidrólisis del ATP es dependiente de Mg y se produce a través de un fosfoenzima intermediario (Briskin, 1990). Los cationes alcalinos (K⁺>Rb⁺>Na⁺>Cs⁺>Li⁺) estimulan su actividad, mientras que los aniones no tienen ningún efecto. El tamaño molecular de la ATPasa es de 200-228 kDa, con una subunidad de 100 kDa que constituye la unidad mínima o subunidad catalítica del enzima. Existen un total de 6 dominios funcionales en el péptido de 100 kDa (Serrano, 1989). El lugar de unión del ATP para la formación del intermediario fosforilado está localizado en la zona central del enzima (dominios III, IV, V y VI) que es su región catalítica, mostrando una actividad quinasa que es la que provoca la fosforilación de un resto aspartato en el dominio II. La actividad fosfatasa está asociada al dominio I y se encarga de la defosforilación de dicho resto aspartato.

El mecanismo de funcionamiento pasa por la creación de un intermediario fosforilado, estable a pH ácido (Briskin, 1990) que requiere Mg(II) para su formación, siendo el complejo Mg-ATP el verdadero sustrato. El enzima pasa por dos conformaciones distintas denominadas E₁ y E₂, que se diferencian por su distinta sensibilidad a los ligandos de la reacción. Existe una amplia familia de genes de H⁺-ATPasa en *Arabidopsis thaliana*, al menos uno de los cuales, el *aha*₂, se regula en respuesta a la deficiencia de Fe (Fox y Guerinot, 1998).

La acidificación está localizada en las zonas subapicales de la raíz, diferenciándose de la acidificación generalizada a lo largo de toda la raíz que ocurre por la absorción preferente de cationes (Römheld *et al.*, 1984). Esta localización tiene una mayor efectividad, ya que incluso en suelos calcáreos, las raíces son capaces de acidificar su entorno hasta unos 2 mm de distancia (Schaller, 1987). De esta forma se aumenta la solubilidad de los compuestos de Fe en la zona próxima a los lugares de absorción. Es necesaria la presencia de una cantidad mínima de K⁺ para que se produzca la acidificación (Jolley y Brown, 1985). No se conoce la naturaleza de esta estimulación pero sí se sabe que no hay implicación de sales sódicas.

La relación entre la excreción de protones y la reductasa de Fe no está todavía muy clara. Bienfait (1996) propuso una ruta para conectar ambos

fenómenos que se desarrollaría en los siguientes pasos: la extrusión de protones estaría acoplada a la acumulación de citrato, este citrato se isomerizaría a isocitrato que llevaría a la reducción del NADP⁺ y a la formación de α -oxoglutarato. El NADPH obtenido donaría directa o indirectamente electrones a la FC-R de la membrana plasmática. Sin embargo, cuando se han realizado medidas simultáneas de ambos fenómenos en frutales, sólo se ha encontrado un descenso del pH significativo de la solución nutritiva en variedades de ciruelo, coincidiendo el máximo de actividad FC-R cuando la acidificación era mayor (Romera *et al.*, 1991). Se sabe que el Fe(II) afecta negativamente la extrusión de protones (Zocchi y Cocucci, 1990). Rabotti *et al.* (1995) proponen que la oxidación del NAD(P)H, necesaria para mantener el rápido aumento de la actividad FC-R, liberaría protones en el interior de la célula si sólo se transfieren los electrones a los aceptores externos, ayudando así a disminuir el pH citoplasmático y conduciendo a una progresiva activación de la ATPasa (Rubinstein y Stern, 1986; Marrè *et al.*, 1988). En cambio Wei *et al.* (1997) proponen la extrusión de H⁺ como un factor predominante frente a la actividad FC-R en la resistencia a la deficiencia de Fe de genotipos de trébol subterráneo. Por último, se ha determinado que ambos mecanismos se regulan de forma distinta en tres mutantes de *Arabidopsis thaliana*, ya que en condiciones de deficiencia de Fe no muestran inducción de la actividad FC-R pero sí son capaces de acidificar la rizosfera (Yi y Guerinot, 1996). En el mutante de guisante *dgl* el desacoplamiento de ambas respuestas indica que la señal de inducción de la reductasa no es responsable, o al menos no es esencial para la inducción de la excreción de protones (Grusak y Pezeshgi, 1996).

1.5.2.4.- Excreción de compuestos fenólicos, ácidos orgánicos y flavinas

Compuestos fenólicos

Las plantas con deficiencia de Fe producen y excretan diferentes compuestos de naturaleza fenólica (Brown y Ambler, 1973). Entre los compuestos identificados destaca el ácido caféico (Olsen *et al.*, 1981) que puede llegar a representar el 85% de los compuestos fenólicos excretados. Otros compuestos identificados son el ácido fenólico, el ácido clorogénico (Hether *et al.*, 1984) y el ácido p-cumárico. Todos ellos son posibles derivados de la fenilalanina (Olsen *et al.*, 1981). Al igual que la acidificación y la reducción de Fe, su liberación se localiza en las zonas subapicales de la raíz (Römheld y Marschner, 1981).

Al principio se les concedió a estos compuestos un papel como potenciales reductores, por su capacidad para reducir Fe. Además las raíces pueden convertir

el ácido p-cumárico (mal reductor) en ácido caféico (buen reductor) a través de un enzima hidrolasa (Olsen *et al.*, 1982). La capacidad reductora del ácido caféico es muy dependiente de pH, presentando un máximo a $\text{pH} < 3$ y descendiendo fuertemente para $\text{pH} > 3$ (Deiana *et al.*, 1995). Sin embargo, la adición de estos compuestos no afecta e incluso disminuye la actividad reductora de las raíces con Fe(III)-EDTA (Römheld y Marschner, 1983). Por otro lado, los compuestos fenólicos pueden quelatar Fe aunque formando complejos muy débiles (Marschner, 1995). Así, la excreción de compuestos fenólicos no justificaría el aumento de actividad reductora de las raíces de plantas deficientes (Welkie y Miller, 1993). Una función alternativa y no relacionada con la reducción de Fe fue propuesta por Sijmons *et al.* (1985) al relacionar la secreción de estos compuestos con la pérdida de suberina, recubrimiento protector de las células corticales de la raíz, que tienen las raíces deficientes en Fe. La mitad de la suberina la forman compuestos fenólicos, cuyo componente mayoritario es el ácido ferúlico, que unen la otra mitad lipídica de la suberina a la pared celular.

Ácidos orgánicos

En condiciones de deficiencia de Fe las plantas dicotiledóneas acumulan en las raíces y excretan ácidos orgánicos, principalmente citrato y malato (Brown, 1966; de Vos *et al.*, 1986; Brancadoro *et al.*, 1995). La acumulación de ácidos orgánicos también se produce en las hojas (Iljin, 1951; Palmer *et al.*, 1963; Landsberg, 1981). En el caso de las raíces, el incremento es simultáneo con la acidificación y se produce, sobre todo, en las zonas subapicales de la raíz (Jones y Darrah, 1995).

La causa de este aumento no parece estar todavía clara. Se ha relacionado con la extrusión de protones al medio (Landsberg, 1981; 1986; Rabotti *et al.*, 1995) y con el mecanismo "pH-stat" (Davies, 1973; 1986) mediante la fijación de CO_2 por las raíces. Sin embargo, no está todavía claro qué procesos preceden a cuáles (Bienfait, 1996). La estimulación de la bomba de protones necesitaría de la síntesis de ácidos orgánicos para compensar la alcalinización del citoplasma. En cambio, otros autores sugieren el proceso contrario, en el que la síntesis de ácidos orgánicos conduciría a una acidificación del citoplasma y a la inducción de la bomba de protones (Vos *et al.*, 1986). Sin embargo, se ha encontrado un aumento de ácidos orgánicos en plantas que no producen excreción de protones (Landsberg, 1981). También se ha implicado a los ácidos orgánicos en la formación de poder reductor, ya que tanto citrato como malato están implicados en reacciones conducentes a la producción de NADH y NADPH, tal como se muestra en la Figura 6.

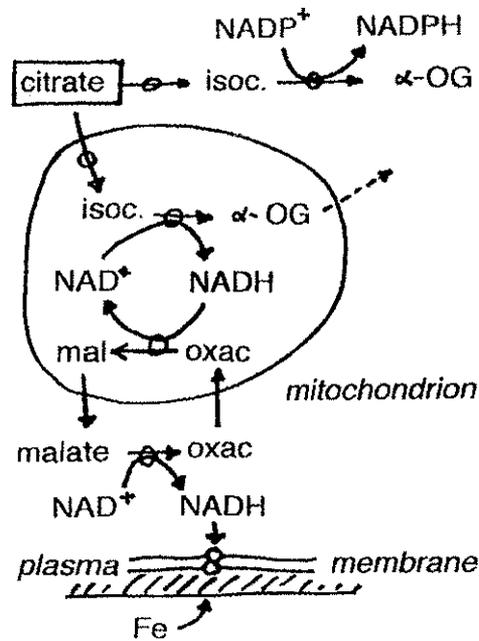


Figura 6: Reacciones que llevan a la obtención de poder reductor y en las que están implicados citrato y malato (Bienfait, 1996).

Landsberg (1981) y Miller *et al.* (1990) encontraron aumentos en la actividad PEPC de las raíces deficientes que han sido confirmados recientemente junto con un aumento generalizado de la actividad de los enzimas del ciclo de Krebs (López-Millán *et al.*, 1998). El carbono entraría al ciclo de Krebs por el aumento de la actividad PEPC, sin necesidad de pasar por la piruvato quinasa que actúa como paso limitante (Lance y Rustin, 1984). El aumento de fijación de CO₂ producido reduciría la demanda de CO₂ fijado por la fotosíntesis (Vance *et al.*, 1994) que se encuentra fuertemente afectada por la deficiencia de Fe (Abadía, 1992).

La excreción de ácidos orgánicos por las raíces se considera como un mecanismo general de solubilización y/o inmovilización de metales. Se produce no sólo como respuesta a la deficiencia de Fe sino también en la detoxificación de Al y Zn, en la absorción de P y Cd y en la deficiencia de Mn (Delhaize *et al.*, 1993; Dinkelaker *et al.*, 1989; Jones y Darrah, 1995; Senden *et al.*, 1995; Hoffland *et al.*, 1992; Hiltbrunner y Fluckiger, 1996). Tanto el malato como el citrato forman complejos muy estables con cationes metálicos en solución aunque la unión es muy dependiente del pH. Recientes estudios de Jones y Darrah (1994) y Gerke *et al.* (1994) indican que tanto el citrato como el malato podrían movilizar grandes cantidades de Fe del suelo, pudiendo ser absorbido por las plantas a través de la reductasa férrica de la membrana plasmática. Dentro de la célula se cree que el

citrato juega un papel importante en la translocación del Fe desde la raíz mediante la formación de un complejo con el Fe.

Flavinas

En condiciones de deficiencia de Fe algunas especies producen flavinas como parte de su mecanismo de respuesta (Welkie y Miller, 1993). La flavina mayoritaria es riboflavina (Kannan y Seshadri, 1988; Shinmachi *et al.*, 1994; 1995; Welkie, 1996) y en algunas plantas como remolacha y espinaca hay sulfatos de riboflavina (Susín *et al.*, 1993a; 1994). A pH alto las flavinas se acumulan en la zona subapical de la raíz (Susín *et al.*, 1993a) siendo excretadas al medio al disminuir el pH (Susín *et al.*, 1994). Estos compuestos pueden llegar a alcanzar concentraciones superiores a 1 μM en la raíz o en la rizosfera.

La función de estas especies químicas es todavía desconocida. La posibilidad de que actúen como agentes quelantes de Fe (Wallace, 1971) fue desechada por las pocas evidencias obtenidas en condiciones fisiológicas. La riboflavina tampoco es la causante de la solubilización del Fe_2O_3 que realizan las raíces *in vivo* (Shinmachi *et al.*, 1992). Se propuso que la riboflavina era oxidada al ser excretada a través de la membrana plasmática y contribuía a inducir los procesos de reducción de la raíz. Sin embargo, los intentos por conseguir que raíces de plantas deficientes redujeran riboflavina fueron negativos (Sijmons y Bienfait, 1983). Las flavinas podrían reducir directamente compuestos de Fe(III) en presencia de donadores electrónicos como NADH o NADPH. Debido a su naturaleza flavínica, se realizó una búsqueda, en plantas de tabaco deficientes, de un compuesto parecido a la flavodoxina que en algunas bacterias y algas en deficiencia de Fe sustituye a la ferredoxina (Huang *et al.*, 1992). Se encontraron descensos en la concentración de ferredoxina en hojas y aumentos en una proteína similar en raíces, pero ninguna evidencia de producción de flavodoxina. Por otro lado, los sulfatos de riboflavina pueden ejercer, una vez excretados, una acción antimicrobiana en las proximidades de la raíz, disminuyendo la posibilidad de que los microorganismos del entorno compitan con la planta en la adquisición de Fe(III) (Susín *et al.*, 1993a). Hasta el momento no se han encontrado pruebas de que estos compuestos estén relacionados con los mecanismos básicos que definen la Estrategia I. Sin embargo, se sabe que las plantas que producen flavinas como remolacha (Welkie y Miller, 1989; Susín *et al.*, 1993a; 1994), tabaco (Welkie y Miller, 1988), lechuga (Welkie y Miller, 1992), *Franseria dumosa* (Wallace, 1971), melón (Shinmachi *et al.*, 1995; Welkie, 1996), pepino (Shinmachi *et al.*, 1992; 1994; 1995) y alfalfa y pimiento (Shinmachi *et al.*, 1995) son muy eficientes en la toma de Fe (Welkie y Miller, 1993).

1.5.2.5.- Otras respuestas bioquímicas

Hasta la fecha se ha estudiado de forma extensa la fisiología de la absorción del Fe por las plantas (Marschner, 1995), aunque se sabe muy poco sobre la expresión y regulación de genes dependientes de Fe. Así, se ha señalado la variación de la actividad de enzimas relacionados con el metabolismo del carbono en las raíces de plantas sometidas a deficiencia de Fe (López-Millán *et al.*, 1998). En cambio, existen pocos datos que señalen la expresión de proteínas como respuesta a la deficiencia de Fe. Los estudios mediante electroforesis de dos dimensiones permiten establecer los perfiles de expresión de las proteínas en deficiencia de Fe. Herbik *et al.* (1996) señalaron un aumento en la concentración de algunos polipéptidos en las puntas de raíz de tomate deficiente en Fe con respecto a los controles. Además identificaron 3 polipéptidos, GADPH, FDH y AP, cuya expresión aumentó con la deficiencia. La inducción de la expresión de la FDH en condiciones de deficiencia de Fe ha sido confirmada en cebada (Suzuki *et al.*, 1998). Schmidt y Buckhout (1997) también señalaron el aumento en la expresión de siete polipéptidos en las raíces de tomate debido a la deficiencia de Fe.

1.6.- Transporte de Fe

1.6.1.- Transporte de Fe(II) a través de la membrana plasmática de raíz

Una vez que el Fe ha sido reducido se transporta a través de la membrana plasmática mediante transportadores específicos (Fox y Guerinot, 1998). Existe una sorprendente similitud entre la absorción de Fe por parte de las plantas dicotiledóneas y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Guerinot y Yi, 1994). En el caso de levaduras se han descrito dos transportadores de Fe(II), uno de alta y otro de baja afinidad. Sus genes han sido clonados recientemente disponiéndose también de mutantes que carecen de ellos (Askwith *et al.*, 1994; Dix *et al.*, 1994). Se ha conseguido clonar en *Arabidopsis* un transportador de Fe(II) *IRT1* (iron-regulated transported), usando el mutante doble de levadura *fet3* y *fet4*, correspondientes a los transportadores de alta y baja afinidad respectivamente (Eide *et al.*, 1996). Los transcritos de *IRT1* son detectados en las raíces, acumulándose en respuesta a la deficiencia de Fe. Además, el *IRT1* es un transportador específico para el Fe frente a otros metales que podrían actuar como sustratos. El transporte de Fe(II) no se ve muy afectado por otros iones metálicos como el Cu(I), Cu(II), Mn(II) y Zn(II), mientras que muestra una fuerte inhibición con el Cd(II). El posible papel de este transportador en el transporte de otros metales está todavía por determinar. En deficiencia de Fe se produce un aumento de la concentraciones de cationes metálicos en la planta. Este aumento

estaría regulado mediante la reducción de grupos sulfhidrilo en las proteínas implicadas en el transporte de cationes divalentes en la membrana plasmática (Welch *et al.*, 1993).

La importancia del *IRT1* radica en que es el primer gen correspondiente a un transportador aislado de plantas, y que ha permitido el descubrimiento de una familia de transportadores involucrados en el transporte de iones metálicos. Dicha familia se ha denominado ZIP (*ZRT/IRT-related-protein*) de la que se han aislado y caracterizado hasta la fecha tres miembros: *IRT1*, *ZRT1* y *ZRT2* que codifican transportadores de Zn en *Sacharomices cerevisiae* (Zhao y Eide, 1996a y b). Se han encontrado genes pertenecientes a esta familia en *Arabidopsis* (8), arroz (1), levadura (2), nemátodos (4), tripanosoma (1) y humanos (2). La familia de genes ZIP codifica proteínas de 309-476 aminoácidos, con 8 dominios transmembrana. Entre los dominios 3 y 4 poseen 4 repeticiones histidina-glicina, que constituyen potenciales lugares de unión a metales (Fox y Guerinot, 1998).

1.6.2.- Transporte de la raíz a la hoja

Los iones de Fe(II) libres son muy reactivos y potencialmente tóxicos debido a que pueden catalizar la transferencia de electrones a especies oxigenadas, para producir finalmente radicales libres hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) (Guerinot y Yi, 1994). Así, una vez que el Fe es absorbido hacia el citoplasma, debe estar unido a algún metabolito. Scholz *et al.* (1988) desarrollaron un modelo con el aminoácido no proteico nicotianamina. Se propuso que la nicotianamina actuaría como transportador de Fe(II) en el citoplasma, transfiriendo el Fe(II) desde el lugar de la reducción hasta el sensor que induciría la síntesis de los procesos de transporte en la célula. Una vez allí sería oxidado a Fe(III), de forma todavía desconocida, liberándose a la savia del xilema.

Aunque en principio se propuso al malato como transportador de Fe en la savia del xilema (Tiffin y Brown, 1962) trabajos posteriores sugirieron que el Fe se translocaba en la planta unido al citrato, en la forma de dicitrato férrico (Tiffin, 1966a; 1966b; 1970; Chaney, 1989). Sin embargo, también se han encontrado en el exudado de xilema complejos de Fe con otros ácidos orgánicos, como malato y malonato (Brown, 1963; Chaney, 1989), e incluso, con otros tipos de sustancias orgánicas (Cataldo *et al.*, 1988). El transporte de Fe formando complejo con el malato se vería favorecido cuando los niveles de citrato fueran insuficientes (Chaney *et al.*, 1989). Los complejos para el transporte de Fe podrían variar con la edad de las plantas y en situaciones de estrés, ya que la composición relativa de compuestos orgánicos en la savia del xilema varía. De cualquier forma, citrato y

malato son dos de los ácidos orgánicos más abundantes en el exudado del xilema (Cataldo *et al.*, 1988; López-Millán *et al.*, 1997).

El Fe tiene una movilidad intermedia en el floema (Marschner, 1995), debido principalmente a su alta afinidad por el fosfato, el anión inorgánico más abundante en él y con el que forma el fosfato férrico, altamente insoluble (Hill, 1980). Stephan y Scholz (1993) señalaron la importancia de la nicotianamina en el transporte de Fe en el floema al impedir su precipitación por el pH alcalino.

1.6.3.- Transporte al interior de las hojas

Hay evidencias que señalan la posibilidad de existencia de otros pasos limitantes para el transporte de Fe en el interior de la planta. Una vez que el Fe alcanza las hojas, este debe ser reducido a Fe(II) para facilitar su entrada en las células (Mengel y Geurtzen, 1986; Jolley *et al.*, 1987; Kolesch *et al.*, 1987b). Sin embargo, el lugar donde ocurre esta reducción no es conocido. Jolley *et al.* (1987) consideran que el Fe(III) puede ser reducido por un efecto directo de la luz (fotorreducción). Así, se ha propuesto que el Fe(III)-citrato podría ser fotorreducido *in vivo* en la hoja por la luz ultravioleta y/o azul, dado que la citada reacción se puede producir *in vitro* (Bienfait y Scheffers, 1992). Por otro lado, se ha sugerido que la nitrito reductasa podría desempeñar algún papel en la nutrición del Fe, al poder catalizar la reducción de Fe(III)-citrato y Fe(III)-fitosideróforo (Redinbaugh y Campbell, 1983; Campbell y Redinbaugh, 1984; Smarrelli y Castignetti, 1988). El mayor inconveniente de esta hipótesis es que generalmente la nitrito reductasa está localizada en el citoplasma, y no se podría explicar entonces el paso del Fe(III)-citrato a través de la membrana plasmática de las células de las hojas. Mengel y Geurtzen (1986), por analogía con la reductasa férrica de raíz, sugirieron que la reducción tendría lugar en la membrana plasmática de las células de las hojas, próximas a los vasos del xilema. El pH alcalino en el apoplasto provocarían una inhibición de la reducción y por lo tanto deficiencia de Fe, aún con contenidos suficientes de Fe en hojas. Hay estudios de la actividad reductora de la membrana plasmática de hojas con ferricianuro como aceptor (Askerlund *et al.*, 1991) y se ha comprobado la existencia de una reductasa férrica localizada en el mesófilo, capaz de reducir Fe(III)-citrato en hojas deficientes y controles de *Vigna unguiculata* (Brüggemann *et al.*, 1993). La existencia de la reductasa se ha confirmado en girasol (de la Guardia y Alcántara, 1996) utilizando como sustrato Fe(III)-EDTA.

1.6.4.- Transporte al cloroplasto

El cloroplasto es el destino de una gran parte del Fe en la planta (Terry y Abadía, 1986). Recientemente se ha comenzado la caracterización del transporte de Fe hacia el interior del cloroplasto a través de la envoltura del mismo (Bughio *et al.*, 1997a; 1997b; Mori, 1998). El transporte al interior del cloroplasto es dependiente de luz (Bughio *et al.*, 1997a; Mori, 1998). Estudios con cloroplastos aislados de plantas de cebada control y con Fe(III)-epiHMA (Bughio *et al.*, 1997b) sugieren que el transporte está regulado por dos mecanismos distintos: una reductasa de Fe(III) y un mecanismo desconocido, similar al de la Estrategia II. El transporte no parece estar mediado por ATP ni por un flujo de H⁺, y es dependiente de pH, con un máximo a pH 8,0. La presencia de metales pesados en el medio (Zn, Cu, Ni, Mn, ó Cd) no tiene ningún efecto sobre el transporte.

Una vez que el Fe alcanza su destino final, si no va a ser utilizado, es necesario que sea acumulado en una forma no tóxica y soluble, y que posteriormente pueda ser liberado según las necesidades metabólicas de la planta. Esta función la realiza una proteína multimérica denominada ferritina (Briat, 1996; Briat y Lobreáux, 1997).

1.7.- Regulación hoja/raíz

Las plantas ponen en marcha mecanismos de respuesta adecuados cuando les falta Fe, lo que sugiere la existencia de sistemas que regulen la puesta en marcha y el cese de las respuestas. Normalmente, las respuestas se manifiestan antes de que las hojas presenten síntomas aparentes de clorosis y en función del nivel de la disponibilidad de Fe de la planta (Römheld y Marschner, 1986; Maas *et al.*, 1988). Por otra parte, si los mecanismos no se inhibieran cuando la planta hubiera adquirido suficiente Fe, ésta podría seguir absorbiendo Fe hasta cantidades tóxicas, como ocurre con los mutantes *brz* (*bronze*) y *dgl* (*degenerative*) de guisante y *chln* (*chloronerva*) de tomate.

Las primeras hipótesis señalaron que la raíz por sí misma era capaz de detectar la falta de Fe y poner en marcha las respuestas (Bienfait *et al.*, 1987; Bienfait, 1988b; Wei *et al.*, 1997). Estudios mediante injertos recíprocos con variedades eficientes e ineficientes (Brown *et al.*, 1971; Kolesch *et al.*, 1987b; Römheld, 1987) mostraron que sólo las plantas cuyas raíces correspondían a especies ineficientes presentaban clorosis. En cambio, Welkie y Miller (1988) señalaron que la capacidad de extrusión de H⁺ dependía de la parte aérea injertada. Así, parece que la raíz es la determinante de la tolerancia a la clorosis, aunque la

parte aérea también podría jugar algún papel. No obstante, el que la tolerancia a la clorosis esté determinada fundamentalmente por la raíz, no implica necesariamente que la señal que desencadena las respuestas provenga únicamente de la misma (Romera y de la Guardia, 1991).

Recientemente Grusak (1995) ha mostrado una modulación de la actividad de la reductasa férrica de guisante a lo largo de la vida de la planta. Dicho efecto estaba regulado internamente e implicaba la transmisión de una señal móvil, desde las zonas reproductivas del tallo hasta las raíces, a través del floema. Estudios posteriores con los mutantes de guisante *dgl* y *brz* en condiciones control y de deficiencia de Fe (Grusak y Pezeshgi, 1996) ratificaron la existencia de un factor interno de regulación para la reductasa férrica. Mediante injertos demostraron que el origen de la señal estaba en la parte aérea y llegaba a las raíces a través del floema. Esta comunicación tallo-raíz ("shoot-to-root") ya había sido señalada por otros autores proponiendo que la señal fuera una hormona (Landsberg, 1984; Bienfait *et al.*, 1987; Romera *et al.*, 1992a) o el propio Fe al ser recirculado (Maas *et al.*, 1988; Bienfait, 1989). Sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado relacionar ninguna actividad con la señal de regulación, ni saber si la regulación se produce a través de una proteína sintetizada *de novo* o a la activación de una proteína ya existente.

1.8.- La membrana plasmática de las plantas

1.8.1.- Descripción general

Las células vegetales están formadas por orgánulos y sistemas de membranas, entre los que destacan los cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas, aparato de Golgi, tonoplasto, retículo endoplasmático, una variedad más o menos bien definida de pequeñas vesículas y el núcleo, todo ello embebido en el citoplasma y encerrado por la membrana plasmática, que está rodeada a su vez por la pared celular (Figura 7). La pared celular es relativamente rígida, confiriendo a la célula estabilidad y protección frente al daño mecánico. La membrana plasmática facilita una composición regulada del medio interno, mediante el intercambio de metabolitos con el resto del organismo que le rodea, lo que facilita el metabolismo intracelular.

Los componentes mayoritarios de la membrana plasmática son lípidos (40-60% en peso), proteínas (30-40% en peso) y carbohidratos (10-20% en peso; Larsson y Møller, 1990). Presenta un espesor de entre 9 y 11 nm, tanto *in vivo* como *in vitro*, menor que el de otras membranas vegetales. Su densidad se sitúa

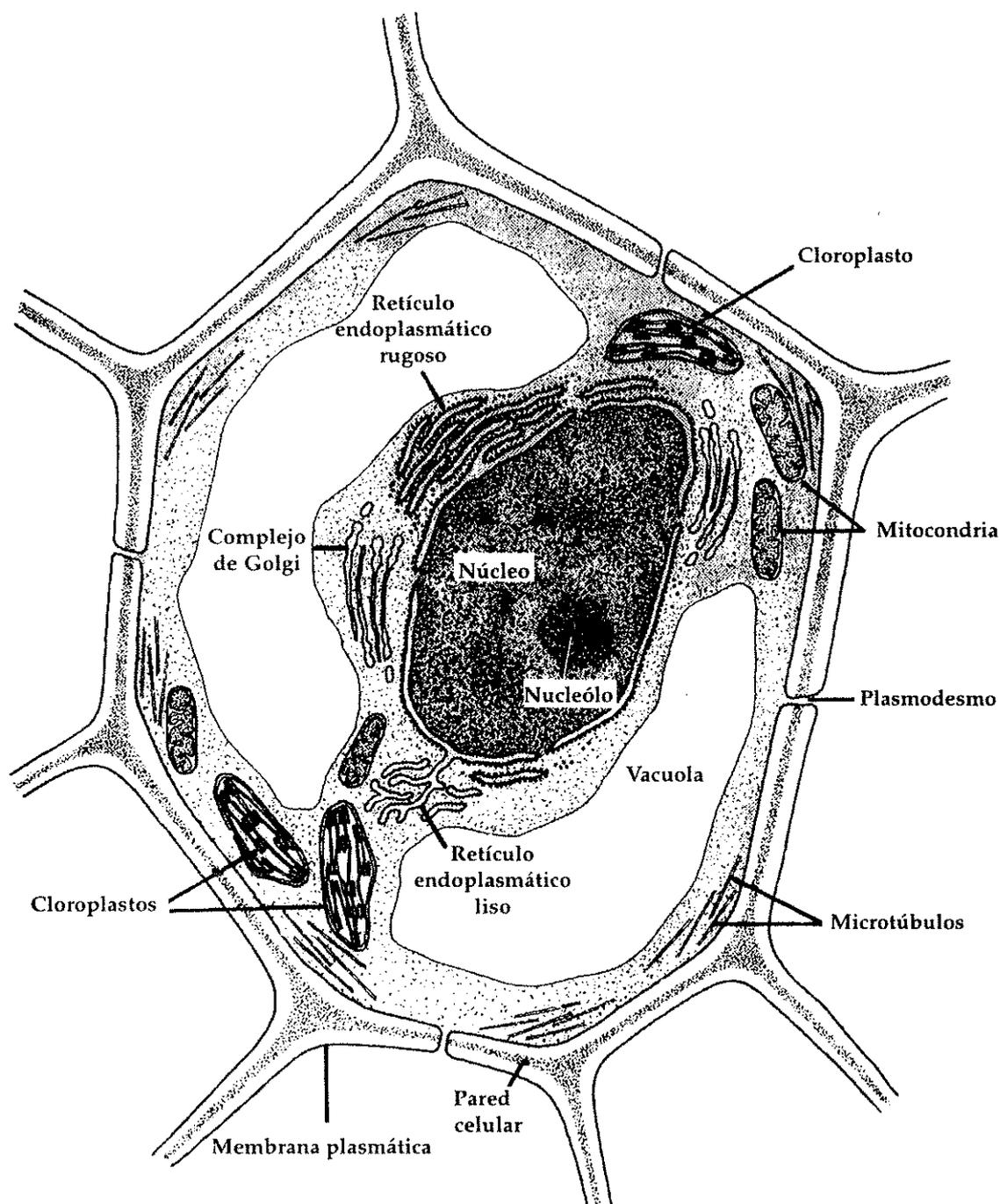
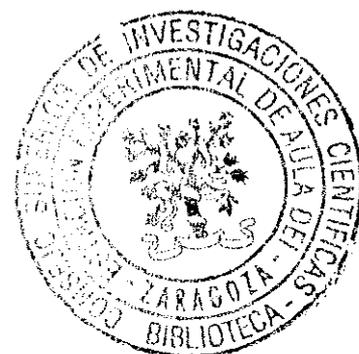


Figura 7: Esquema de una célula vegetal.



hacia la mitad del rango de densidad característico de las membranas vegetales, siendo de 1,10-1,24 g.mL⁻¹. Considerando que la membrana plasmática tiene un alto contenido en carbohidratos y que la densidad depende del contenido relativo de proteínas (1,35 g.mL⁻¹), lípidos (1,0 g.mL⁻¹), carbohidratos (1,6 g.mL⁻¹) y agua (1,0 g.mL⁻¹), la membrana plasmática debería tener una baja relación proteína-lípidos si se compara a membranas vegetales de densidad parecida.

La membrana plasmática tiene carga neta negativa a pH neutro. Aunque no se conoce en qué proporción contribuyen las proteínas, lípidos y carbohidratos a este valor medio, se sabe que alrededor de un 10% de los fosfolípidos de las membranas están cargados negativamente. La carga negativa proporciona un potencial de superficie negativo cuyo valor depende tanto del número de cargas negativas como de la concentración de cationes en el medio que rodea la membrana.

La composición lipídica de la membrana plasmática controla su permeabilidad y eficacia como barrera (Douglas y Walker, 1984). Los lípidos mayoritarios de la membrana plasmática son esteroides, glicolípidos y fosfolípidos. El glicolípido mayoritario es el glucocerebrósido, aunque también hay pequeñas cantidades de monogalactosil-diacil-glicerido (MGDG) y digalactosil-diacil-glicerido (DGDG). La fosfatidil-colina (PC) y fosfatidil-etanolamina (PE) son los fosfolípidos mayoritarios junto con el ácido fosfatídico (PA). Los esteroides libres representan el componente mayoritario de la composición lipídica total. Los más abundantes en la membrana plasmática de plantas son sitosterol, campesterol y estigmasterol, variando su composición en los distintos órganos. Los ácidos grasos mayoritarios son palmítico (16:0), linoleico (18:2) y linolénico (18:3). La composición de ácidos grasos y, en particular, el grado de insaturación de los mismos proporciona información sobre la fluidez de la membrana.

Alteraciones en la composición lipídica de la membrana plasmática pueden producir a su vez alteraciones en su permeabilidad y características de intercambio. Estas modificaciones se han encontrado en plantas que crecen bajo distintos estreses medioambientales. Así, existen datos de cambios en la composición fosfolipídica debido a bajas temperaturas (Lynch y Steponkus, 1987; Lurie *et al.*, 1994), envejecimiento (Stallaert y Geuns, 1994), salinidad (Douglas y Walker, 1984) o sequía (Navari-Izzo *et al.*, 1993), variación del contenido de esteroides en salinidad (Mansour *et al.*, 1994), o un aumento en el grado de insaturación de los ácidos grasos de plantas sometidas a estrés salino (Zenoff *et al.*, 1994). Estos cambios suponen una respuesta de las células al estrés, que podrían llevar a variaciones en la actividad de los enzimas unidos a la membrana

(Hernández y Cooke, 1997). Sin embargo, a pesar de las diferencias encontradas en la composición lipídica de la membrana plasmática dependiendo de su procedencia, los enzimas situados en ella pueden realizar sus funciones sin cambios aparentes en la actividad.

1.8.2.- Actividad redox de la membrana plasmática

Lundegardh (1945) sugirió que en la membrana plasmática tenían lugar procesos fisiológicos relacionados con el transporte de electrones. Sin embargo, no fue hasta 30 años más tarde cuando se tuvieron los primeros datos de la presencia de componentes redox, dependientes de luz, en la membrana plasmática de plantas (Brain *et al.*, 1977). Actualmente la disponibilidad de preparaciones de membrana plasmática altamente purificada (Larsson, 1985; Morré *et al.*, 1994) está permitiendo la caracterización de dichos componentes redox. El trabajo hecho hasta la fecha permite señalar posibles actividades enzimáticas y constituyentes localizados en la membrana plasmática (Figura 8).

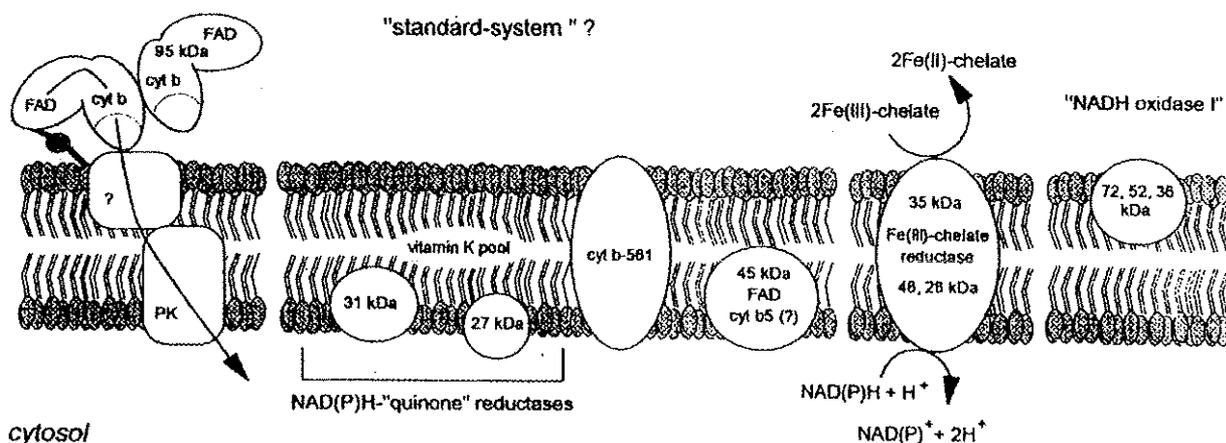


Figura 8: Actividades NAD(P)H oxidoreductasas y constituyentes redox identificados por estudios *in vitro* y sus posibles sitios de unión a la membrana. La existencia de los sistemas depende del material de partida y su función (Lüthje *et al.*, 1997).

Entre los compuestos redox identificados en la membrana plasmática de plantas superiores están compuestos de bajo peso molecular como flavinas, citocromos y quinonas, así como distintas NAD(P)H oxidoreductasas.

1.8.2.1.- Flavinas

Se han detectado flavinas en la membrana plasmática de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas mediante espectroscopía de fluorescencia. La

concentración de flavinas unidas no-covalentemente varía entre 0,2 y 0,5 nmol.(mg proteína)⁻¹ para herbáceas (Jesaitis *et al.*, 1977; Ramírez *et al.*, 1984) y 2,5 nmol. (mg proteína)⁻¹ para soja (Barr *et al.*, 1986). La flavina mayoritaria en la membrana plasmática del tejido apical de judía es FMN (Van Gestelen *et al.*, 1996), mientras que la membrana plasmática de raíz de maíz contiene cantidades iguales de FMN y FAD (Lüthje *et al.*, 1998). Las flavinas son cofactores de los enzimas de tipo flavoproteína. Las flavoproteínas se localizan preferentemente en las cadenas de transporte de electrones pudiendo recibir ya sea dos e⁻ de los nucleótidos de piridina o bien uno solo de las quinonas o citocromos. Tanto la presencia de flavinas como la de sus inhibidores afecta a las actividades enzimáticas de la membrana plasmática (Luster y Buckhout, 1989; Asard *et al.*, 1994), lo que sugiere la presencia de flavoproteínas en los procesos redox de la misma. Hasta la fecha se han identificado 5 enzimas redox situados en la membrana plasmática que tienen o podrían tener flavinas como cofactores (Bérczi *et al.*, 1998; Bérczi y Møller, 1998).

1.8.2.2.- Quinonas

Las quinonas son transportadores móviles en las biomembranas que transfieren un solo e⁻. No hay evidencias directas de la presencia de ubiquinona, característica de membrana plasmática de animales. En la membrana plasmática de las plantas, aunque existen datos que sugieren que componentes de la membrana plasmática de plantas transfieren electrones a quinonas. Se ha encontrado una naftoquinona en la membrana plasmática del hipocotilo de soja y un compuesto análogo a la vitamina K₁ en la membrana plasmática de raíces de maíz (Lüthje *et al.*, 1997). La actividad redox de la membrana plasmática se ve afectada, *in vivo* e *in vitro*, por vitaminas tipo K y sus antagonistas (Döring *et al.*, 1992; Lüthje *et al.*, 1992), aunque su función en la membrana plasmática no está todavía clara. Una posibilidad es que pudieran actuar eliminando los radicales libres que podrían afectar a la bicapa lipídica.

1.8.2.3.- Citocromos tipo b

Los citocromos son proteínas cuyo centro activo lo constituye un grupo hemo. Jesaitis *et al.* (1977) mostraron las primeras evidencias de la presencia de citocromos de tipo b en la membrana plasmática. Estos se distinguen del citocromo b₅ microsomal y de los de mitocondrias por sus propiedades espectrales (el espectro del compuesto reducido menos el del oxidado presenta un máximo a 559-562 nm) y por su incapacidad para ser reducidos por NADH. La reducción efectiva del citocromo b de la membrana plasmática sólo se consigue por reducción

química directa con ácido ascórbico o ditionito y con iluminación con luz actínica azul. En la actualidad se han identificado citocromos tipo b en la membrana plasmática de una gran variedad de plantas superiores (Asard *et al.*, 1994), aunque todavía no se ha conseguido el aislamiento de ninguno. La cantidad total de citocromo b varía entre 0,1-0,5 nmol citocromo.(mg proteína)⁻¹ que constituye un 60-80% del contenido total de citocromos (Asard *et al.*, 1994). Se distinguen tres tipos de citocromo b en la membrana plasmática, uno de ellos de alto potencial y dos más de bajo potencial.

1.8.2.4.- NAD(P)H oxidoreductasas

Las oxidoreductasas son enzimas que utilizan dos moléculas distintas como sustratos. Un sustrato, denominado dador de e⁻, que se oxida y un segundo, denominado aceptor de e⁻, que se reduce. La mayoría de las oxidoreductasas asociadas a la membrana plasmática utilizan NAD(P)H como dador de electrones. Como aceptores de electrones existe una gran variedad de compuestos que se pueden dividir en 4 grupos según Bérczi y Asard (1995), tal y como se muestra en el Cuadro 3.

	Nombre	Componentes
Grupo I	Aceptores de e ⁻ artificiales	ferricianuro (KFeCN) hexacloroiridato (IV) hexabromoiridato (IV)
Grupo II	Aceptores de e ⁻ con Fe	citocromo c Fe(III)-EDTA Fe(III)-citrato Fe(III)-malato, etc
Grupo III	Aceptores de e ⁻ sin Fe	quinonas compuestos con metales de transición
Grupo IV	Oxígeno	O ₂

Cuadro 3: Clasificación de los aceptores de electrones de las oxidoreductasas presentes en la membrana plasmática de plantas superiores (Bérczi y Asard, 1995).

ORasa	M _R (kDa)	Dador e ⁻	Aceptor e ⁻	Cofactor
NADH-Oxidasa I ¹	36, 52, 72	NADH	oxígeno	-
NADPH-Quinona oxidoreductasa ²	27	NADPH>NADH	KFeCN > juglona > DQ > cit c	FMN
NAD(P)H-Quinona oxidoreductasa ³	24	NADPH>NADH	juglona > UQ > KFeCN > DQ	-
NADH-dehidrogenasa ^{4,5}	27	NADPH>NADH	ubiquinona	n. t.
	31	NADH> NADPH	KFeCN > cit c > Fe(III)-quelato	n. t.
NADH-Fe(III)-citrato oxidoreductasa ⁶	35	NADH	Fe(III)-citrato	sin grupo hemo
NADH-monodehidro-ascorbato oxidoreductasa ^{7,8}	45	NADH>NADPH	KFeCN	FAD

Cuadro 4: Características de las oxidoreductasas aisladas de membrana plasmática (modificado de Berzci y Asard, 1995) ¹Brightman *et al.* (1988); ²Luster y Buckhout (1989); ³Trost *et al.* (1997); ⁴Serrano *et al.* (1994a); ⁵Serrano *et al.* (1994b); ⁶Holden (1992); ⁷Berzci *et al.* (1995); ⁸Berzci y Møller (1998). n. t. = no tiene.

Durante los últimos años se ha logrado la purificación y caracterización de una gran cantidad de oxidoreductasas de membrana plasmática de distintos tejidos. En el Cuadro 4 se muestran las características de algunas de las oxidoreductasas purificadas hasta la fecha.

NADH oxidasas

Hasta la fecha se han identificado dos NADH oxidasas unidas a la membrana plasmática, la NADH oxidasa I y la NADH oxidasa II. La NADH oxidasa I (insensible al CN⁻), tiene un peso molecular de 200 kDa con subunidades de 72, 52 y 36 kDa (Brightmann *et al.*, 1988). El sitio de unión se encuentra localizado en el lado apoplástico de la membrana plasmática (Morré y Brightmann, 1991), aunque en presencia de detergentes se observa un aumento de la actividad (Pupillo *et al.*, 1986). Se ha propuesto que la actividad NADH oxidasa I esté relacionada con la regulación del crecimiento (Morré *et al.*, 1995a, b). La NADH oxidasa II es una peroxidasa, que también se encuentra asociada al lado

apoplástico de la membrana plasmática (Rubinstein y Luster, 1993; Qiu *et al.*, 1995). Se ha propuesto que la función de la NADH oxidasa II es la inducción de la polimerización de los monómeros de la pared celular, debido a la producción de H_2O_2 (Vianello y Macri, 1989) o a la reducción de Fe.

NAD(P)H-quinona reductasa

Han sido identificadas dos actividades distintas, denominadas deshidrogenasa I y II. La deshidrogenasa I aislada de membrana plasmática de maíz (Luster y Buckhout, 1989) y cebolla (Serrano *et al.*, 1994a y b; 1995) tiene un peso molecular de 27 kDa y un pI de 6,0. Puede aceptar e^- tanto de NADH como de NADPH, reduciendo KFeCN, quinonas o citocromo c. La actividad se estimula en presencia de FMN. Se cree que su función está relacionada con la formación de superóxidos dependiente de NAD(P)H a pH bajo (Vianello y Macri, 1989; Pinton *et al.*, 1994). La deshidrogenasa II tiene un peso molecular de 31 kDa (Serrano *et al.*, 1994a y b) y un pI de 8,0. Es específica para NADH y reduce KFeCN>citocromo c>juglona>Fe(III)-quelato (Serrano *et al.*, 1995). Ambas actividades enzimáticas se encuentran localizadas en el lado citoplasmático de la membrana plasmática (Córdoba *et al.*, 1995). Una segunda NAD(P)H-quinona reductasa, con un peso molecular aparente de 24 kDa, fue aislada de la membrana plasmática de hipocotilo de calabacín (Trost *et al.*, 1997).

NADH-monodehidroascorbato reductasa

El enzima NADH-ferricianuro oxidoreductasa aislado de membrana plasmática de hojas de remolacha (Bérczi *et al.*, 1995) ha sido identificado como la NADH-monodehidroascorbato reductasa (Bérczi y Møller, 1998). Se trata de un enzima con un peso molecular de 160 kDa, con una subunidad de 45 kDa que forma un tetrámero. Presenta tres puntos isoeléctricos comprendidos entre 5,3 y 5,6. El enzima tiene una molécula de FAD como cofactor por cada subunidad. La actividad ferricianuro reductasa es específica para el β -NADH. También es capaz de reducir Fe(III)-EDTA, citocromo c, oxígeno y duroquinona (Bérczi *et al.*, 1995). El enzima está fuertemente asociado al lado citoplasmático de la membrana plasmática. Se ha propuesto que la MDA-reductasa podría tener un papel en la reducción de ascorbato tanto en el lado citosólico como en el apoplástico de la membrana (Bérczi y Møller, 1998).

NAD(P)H-nitrato reductasa

Aunque la nitrato reductasa es considerado un enzima citosólico en las células vegetales (Oaks y Hirel, 1985), se ha comprobado mediante

inmunomarcaje que entre el 1 y 5% de la actividad nitrato reductasa de la célula está unida a la membrana plasmática (Ward *et al.*, 1989). Sin embargo, la actividad medida en membranas aisladas es muy baja como para contribuir a procesos metabólicos (Chen y Wang, 1995). Se ha demostrado la existencia de una nitrato reductasa asociada a la membrana plasmática en algas (Stöhr *et al.*, 1993; 1995). Se trata de una proteína con un grupo glicosil-fosfatidil-inositol que está anclada a la superficie externa de la membrana plasmática de *Chlorella sacchrophila* (Stöhr *et al.*, 1995). Kunze *et al.* (1997) verificaron la presencia de una GPI-nitrato reductasa unida a la membrana plasmática en las hojas de plantas superiores. Hasta la fecha se ha establecido la existencia de nitrato reductasa unida a la membrana plasmática en hojas y raíces. La nitrato reductasa correspondiente a las hojas sólo acepta electrones de NADH y su monómero tiene un peso molecular de 96 kDa. La nitrato reductasa correspondiente a las raíces también acepta electrones de succinato (Stöhr y Ulrich, 1997; Stöhr, 1998) y su monómero tiene un peso molecular de 63 kDa (Stöhr, 1998).

Por último, cabe destacar que a pesar de la heterogeneidad existente entre las oxidoreductasas aisladas, existen algunas similitudes destacables. Así, las proteínas de 27 kDa aisladas de raíz de cebolla (NADH deshidrogenasa) y maíz (NAD(P)H-quinona oxidoreductasa) muestran actividades específicas similares, junto con una preferencia similar respecto a los sustratos. Ambas enzimas son sensibles a los antagonistas de grupos sulfhidrilo y su K_m respecto a NADH muestra valores similares (5-15 μ M). Por otro lado, la proteína de 45 kDa (NADH-monodehidroascorbato reductasa) aislada de membrana plasmática de hojas de espinaca muestra similitudes con la citocromo b_5 reductasa de mitocondria y posiblemente es idéntica a la proteína de 43 kDa, también de hojas de espinaca, identificada como citocromo b_5 reductasa mediante anticuerpos (Askerlund *et al.*, 1991). Por último, varias oxidoreductasas de membrana plasmática aisladas muestran pesos moleculares entre 36-39 kDa. Queda por determinar si estas proteínas son enzimas idénticos o relacionados entre sí. La aproximación más indicada para conseguirlo es mediante la caracterización completa de las propiedades enzimáticas, la disponibilidad de anticuerpos y los datos referentes a la secuencia de aminoácidos.

Otra aproximación al estudio de las proteínas de la membrana plasmática es mediante electroforesis de dos dimensiones (2-D). El estudio de las proteínas de la membrana mediante electroforesis de 2-D permite separar un gran número de polipéptidos y obtener perfiles de expresión de proteínas. Aunque esta técnica ha

sido utilizada ampliamente para caracterizar proteínas de membrana de animales, su uso para la membrana plasmática de las plantas ha sido mucho menor. Estudios mediante electroforesis de 2-D han señalado la inducción en la expresión de polipéptidos en casos de estrés salino (Hurkman *et al.*, 1988), y deficiencias de sulfato y fosfato (Hawkesford y Belcher, 1991), nitrato (Ageorges *et al.*, 1996) y Fe (Thoiron *et al.* 1997), y también tras exposición al ozono (Tokarska-Schlattner *et al.*, 1997). Por último, también se ha señalado la variabilidad en la expresión de algunos polipéptidos dependiendo de la edad de la planta (Masson y Rossignol, 1995) o de la situación de la hoja (Frommer *et al.*, 1994). La complementación de esta técnica con la secuenciación de polipéptidos abre una vía para la identificación de las proteínas de la membrana plasmática.

OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS

Como ya se ha explicado en la Introducción, la importancia del estudio de la deficiencia de Fe reside sobre todo en el factor económico. La clorosis férrica afecta a especies de plantas de interés agrónomico y muy especialmente a los árboles frutales.

En este trabajo se han estudiado diversos mecanismos de respuesta de las plantas a la deficiencia de Fe, tomando principalmente como material de estudio la planta modelo *Beta vulgaris* L.

Los objetivos globales de este trabajo fueron tres:

1.- Caracterización de la actividad de la reductasa férrica (FC-R) de membrana plasmática de hoja en relación con la deficiencia de Fe

La mayor parte de los estudios sobre la inducción de las respuestas de las plantas a la deficiencia de Fe se han centrado en la caracterización y regulación de

la reductasa férrica de la membrana plasmática de las raíces (Moog y Brüggemann, 1994). Sin embargo, la toma de Fe por las raíces no es el único paso limitante en la absorción y disponibilidad del Fe por las plantas. Así, una vez que el Fe llega a las células de la raíz, tiene que atravesar diferentes sistemas de membrana entre los que se incluyen la membrana plasmática de las células de las hojas y de los cloroplastos. Sin embargo, no se disponen de muchos datos ni sobre las características de este transporte interno del Fe ni de cómo está afectado en situaciones de deficiencia de Fe. Brüggemann *et al.* (1993) mostraron la existencia de una reductasa férrica en la membrana plasmática de hojas de *Vigna unguiculata* en condiciones de suficiencia de Fe. También se ha señalado la existencia de una reductasa férrica asociada a la membrana del mesófilo en *Vigna unguiculata* (Brüggemann *et al.*, 1993) y *Heliantus annuus* (de la Guardia y Alcántara, 1996) en condiciones de suficiencia y deficiencia de Fe.

2.- Determinación de la composición polipeptídica de la membrana plasmática de hojas en condiciones de deficiencia de Fe

Para que las plantas puedan crecer en condiciones de estrés es muy importante que se adapten a las variaciones medioambientales a través de la regulación de la actividad de los enzimas y de la expresión de los genes de proteínas de membrana.

Se dispone de muy poca información de las proteínas que constituyen la membrana plasmática de las plantas, habiéndose clonado menos de un 10% del total (Sussman, 1994). En el caso de la reductasa férrica asociada a la membrana plasmática, Bienfait (1988a) propuso la existencia de dos sistemas distintos: la reductasa "Standard", constitutiva de la membrana plasmática de todas las plantas, y la reductasa "Turbo", que se induciría en condiciones de deficiencia de Fe. Sin embargo, hasta la fecha no se ha encontrado confirmación de la síntesis de un enzima bioquímicamente distinto, ni se ha caracterizado inequívocamente ninguna de estas reductasas.

La determinación de los perfiles de expresión de las proteínas se puede realizar mediante electroforesis de dos dimensiones (2-D), que permite separar un gran número de polipéptidos.

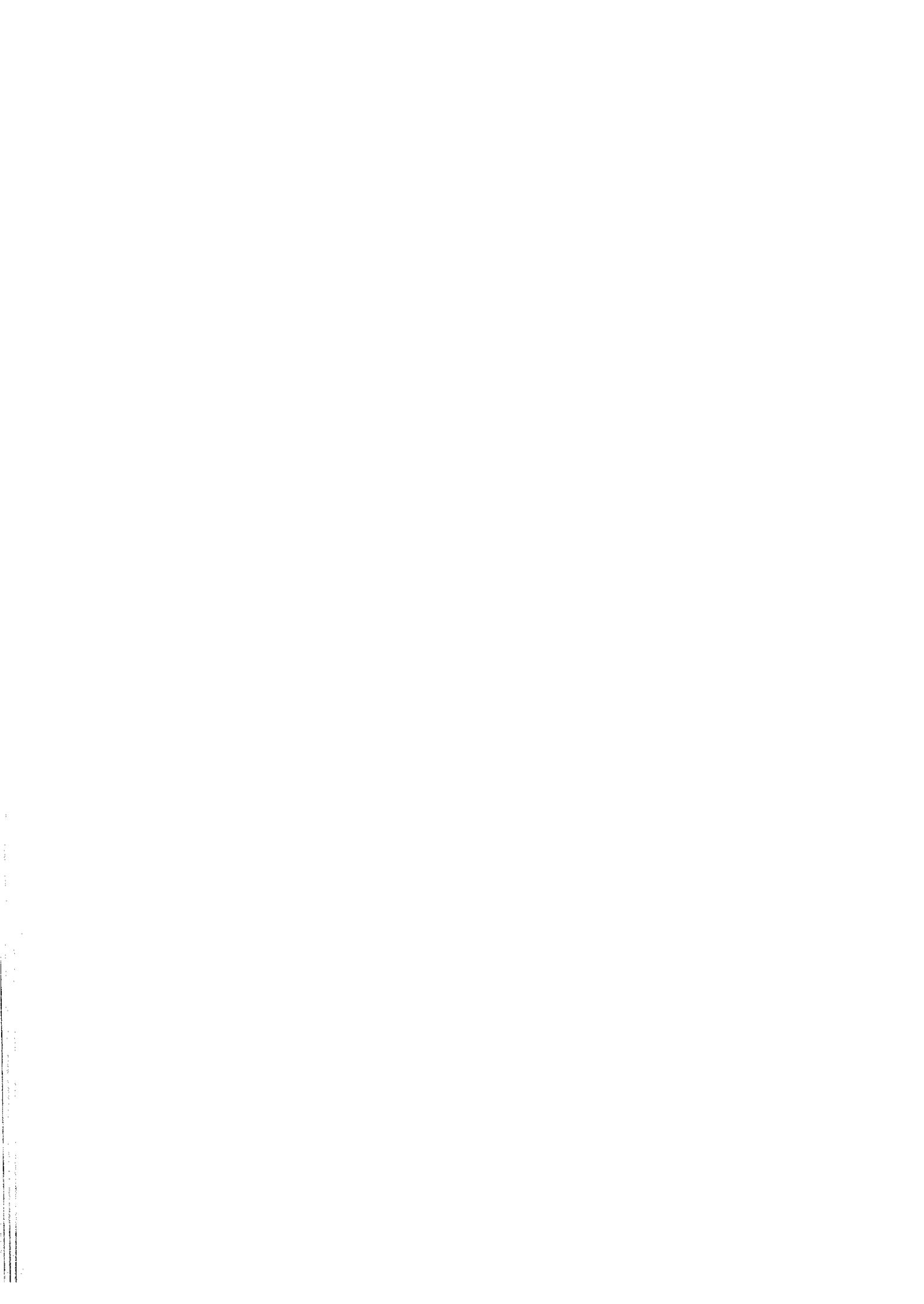
3.- Determinación de la composición polipeptídica de las puntas de raíz en condiciones de deficiencia de Fe

Mientras que las respuestas a la deficiencia de Fe en plantas de Estrategia I, inducción de la reductasa férrica y acidificación de la rizosfera, se encuentran bastante bien caracterizadas (Moog y Brüggemann, 1994; Alcántara *et al.*, 1991; Rabotti y Zocchi, 1994), se sabe muy poco de los mecanismos de inducción de estas señales y de la expresión y regulación de los genes dependientes de Fe. En cambio, en plantas que presentan la Estrategia II se han identificado genes específicos inducidos en deficiencia de Fe (*ids*) (Okumura *et al.*, 1991; 1994; Nakanishi *et al.*, 1993) encontrándose también aumentos en la actividad de los enzimas nicotianamina sintasa (Higuchi *et al.*, 1994) y nicotianamina aminotransferasa (Kanazawa *et al.*, 1994).

Existen evidencias de que la respuesta a la deficiencia de Fe consistente en el aumento de la actividad reductasa férrica podría estar mediada no solamente por proteínas de membrana, sino que también podría haber implicados cofactores citoplasmáticos (Susín *et al.*, 1996). Por ello, se ha estudiado también la composición polipeptídica total de las puntas de raíz.



*MATERIALES
Y MÉTODOS*



3.- MATERIALES Y MÉTODOS

	pág
3.1.- Material vegetal	55
3.2.- Cultivo hidropónico	56
3.2.1.- Soluciones nutritivas madre	56
3.2.2.- Cultivo hidropónico de remolacha	57
3.2.3.- Cultivo hidropónico de árboles frutales	57
3.3.- Medidas de clorofila	58
3.3.1.- Medida de clorofila por espectrofotometría	58
3.3.2.- Medidor de clorofila SPAD-502 (Minolta)	59
3.4.- Aislamiento de membrana plasmática de hojas de remolacha	60
3.4.1.- Aislamiento y purificación de membrana plasmática de hojas	61
3.4.1.1.- Protocolo de aislamiento	61
3.4.1.2.- Medios	62
3.4.2.- Cuantificación de proteína de las preparaciones de membrana plasmática	64
3.4.3.- Determinación de la pureza de la preparación de membrana plasmática	65

3.4.3.1.- ATPasa sensible a vanadato	65
3.4.3.2.- Medidas de contaminantes: mitocondrias	66
3.4.3.3.- Medidas de contaminantes: tonoplasto	67
3.4.3.4.- Estimación de la pureza mediante microscopía electrónica	67
3.5.- Aislamiento y purificación de mitocondrias de remolacha	69
3.5.1.- Aislamiento de mitocondrias de hojas	70
3.5.2.- Aislamiento de mitocondrias de raíz	70
3.6.- Estudio de la actividad FC-R en hojas de remolacha	71
3.6.1.- Actividad FC-R en membrana plasmática	71
3.6.1.1.- Dependencia del sustrato	71
3.6.1.1.a.- Fe(III)-EDTA	71
3.6.1.1.b.- KFeCN	72
3.6.1.1.c.- Otros quelatos de Fe(III)	72
3.6.1.2.- Cinéticas de la actividad reductasa	72
3.6.1.3.- Medida del pH óptimo de la actividad FC-R	73
3.6.1.4.- Actividad FC-R en condiciones de anaerobiosis	73
3.6.1.5.- Latencia de la actividad FC-R	73
3.6.1.6.- Actividad FC-R en un medio similar al apoplasto	74
3.6.1.7.- Actividad FC-R en presencia de flavinas	74
3.6.2.- Actividad FC-R en cloroplastos	74
3.6.3.- Actividad FC-R en protoplastos	75
3.6.4.- Especiación y estructura de los quelatos de Fe	77
3.7.- Análisis polipeptídico mediante electroforesis	79
3.7.1.- Puntas de raíz de remolacha	79
3.7.1.1.- Preparación de la muestra	79
3.7.1.1.a.- Extracción con tricina.	79
3.7.1.1.b.- Extracción con SDS	79
3.7.1.1.c.- Extracción con fenol	80
3.7.1.2.- Cuantificación de las proteínas	81
3.7.1.3.- Electroforesis en una dimensión	82
3.7.1.4.- Electroforesis en dos dimensiones	83
3.7.1.4.a.- Primera dimensión: IEF (isoelectroenfoque) desnaturizante	83
3.7.1.4.b.- Segunda dimensión: SDS-PAGE	85
3.7.1.4.c.- Tinción de los geles.	87
3.7.1.5.- Determinación de actividad enzimática en los geles	88

3.7.2.- Membrana plasmática de hojas de remolacha	89
3.7.2.1.- Preparación de la muestra.	89
3.7.2.2.- Cuantificación de proteínas	89
3.7.2.3.- Electroforesis en dos dimensiones	89
3.7.2.3.a.- Primera dimensión: IEF desnaturalizante	89
3.7.2.3.b.- Segunda dimensión	90
3.7.2.3.c.- Tinción de los geles	90
3.7.3.- Mitocondrias de remolacha	90
3.7.3.1.- Preparación de la muestra	90
3.7.3.2.- Electroforesis en dos dimensiones	91
3.7.3.2.a.- Primera dimensión: IEF desnaturalizante	91
3.7.3.2.b.- Segunda dimensión: SDS-PAGE	91
3.7.3.2.c.- Tinción de los geles	92
3.7.4.- Análisis de los geles	92
3.8.- Identificación de los polipéptidos	92
3.8.1.- Transferencia de proteínas y secuenciación del amino terminal	92
3.8.2.- Inmunología	93
3.9.- Respuestas de frutales ante la deficiencia	95
3.9.1. Actividad FC-R	95
3.9.1.1.- Actividad FC-R en planta entera <i>in vivo</i>	95
3.9.1.2.- Actividad FC-R en puntas de raíz	95
3.9.1.3.- Localización de la actividad FC-R	96
3.9.2.- Acidificación del medio	96
3.9.2.1.- Variación del pH en la solución nutritiva	96
3.9.2.2.- Localización de la disminución del pH	96
3.9.3.- Análisis de macro y micronutrientes en hojas	97

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Material vegetal

Las semillas de remolacha (*Beta vulgaris* L.) que se han utilizado en este trabajo corresponden al híbrido Monohil obtenidas por Hilleshög, Landskröna, Suecia.

Para los estudios con árboles frutales se utilizó "Ademir" (híbrido de melocotonero, *Prunus persica* L. y ciruelo, *Prunus domestica* L). Las plantas fueron proporcionadas por el Departamento de Pomología de la Estación Experimental de Aula Dei y enraizadas como estaquillas. El enraizamiento se realizó sumergiendo las estaquillas de unos 20 cm, por el extremo más cercano al tallo, durante 5 min en una disolución de ácido β -indolbutírico de 500 ppm. Se dejó que se secasen al aire y se aplicó una mezcla con fungicida (Captan 10%, polvos de talco 90%) por el extremo a enraizar. Se estaquillaron en macetas, que contenían una mezcla al 50% de arena de río lavada y turba, compactando bien. Se regaron, y se dejaron en lugar húmedo y sombrío durante 5 meses hasta el comienzo de los experimentos.

3.2.- Cultivo hidropónico

Todas las plantas utilizadas en este trabajo se cultivaron en medio hidropónico y cámara de cultivo, con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. La temperatura se mantuvo a 25 °C, la humedad relativa al 80% y la intensidad luminosa entre 350-400 $\mu\text{mol fotones.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

3.2.1.- Soluciones nutritivas madre

Solución 1

	Stock			Concentración final en 1/2 Hoagland	
	Peso Molecular	Molaridad (M)	g/L	mM	ppm (mg/L)
KNO ₃	101,11	0,5	50,55	2,5	97,8 K, 35 N
MgSO ₄ .7H ₂ O	246,50	0,2	49,30	1,0	24,3 Mg, 32 Na
KH ₂ PO ₄	136,09	0,2	27,22	1,0	39,1 K, 31 P
NaCl*	58,5	0,1	5,85	0,5	11,5 Na, 17,7 Cl

*este producto no se añadió en el caso de cultivo de frutales

Solución 2

	Stock			Concentración final en 1/2 Hoagland	
	Peso Molecular	Molaridad (M)	g/L	mM	ppm (mg/L)
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236,15	1	236,15	2,5	100 Ca, 70 N

Solución de microelementos

	Stock			Concentración final en 1/2 Hoagland	
	Peso Molecular	Molaridad (M)	g/L	μM	ppm (mg/L)
MnCl ₂ .4H ₂ O	197,94	9,14	1,81	4,6	0,25 Mn, 0,33 Cl
H ₃ BO ₃	61,81	46,3	2,83	23,2	0,25 B
Na ₂ MoO ₄	205,94	0,12	0,025	0,06	0,06 Mo
ZnSO ₄ .7H ₂ O	136,38	0,8	0,23	0,4	0,026 Zn, 0,013 S
CuSO ₄	159,55	0,37	0,06	0,185	0,012 Cu, 0,006 S

El Fe se añadió como el complejo NaFe(III)-EDTA de Sigma.

3.2.2.- Cultivo hidropónico de remolacha

Las soluciones nutritivas utilizadas en el cultivo hidropónico de las plantas de remolacha fueron:

	Solución germinación (1 L) (1/4 Hoagland)	Solución bandejas (35 L) (3/8 Hoagland)	Solución cubos (20 L) (1/2 Hoagland)	
Solución 1	5 mL	175 mL	100 mL	
Solución 2	2,5 mL	87,5 mL	50 mL	
Microelementos	0,5 mL	17,5 mL	10 mL	
			+Fe	-Fe
NaFe(III)-EDTA	-	0,663 g	0,379 g	-
NaOH 1N	-	-	-	20 mL
CaCO ₃	-	-	-	20 g
Ajuste pH	5,5	5,5	5,5	-

El cultivo de las plantas de remolacha se desarrolló de la siguiente manera: las semillas pildoradas se lavaron con H₂O destilada en agitación con el fungicida Benomilo-50 [N-(2,6-dimetilfenil) N-(fenilacetil) DL alalinato de metilo] al 0,1% (Aragonesas Agro, S. A.). Se realizaron lavados hasta la pérdida del color azul de la cápsula de las semillas. Las semillas se pusieron en vermiculita, regándose con solución nutritiva 1/4 Hoagland sin Fe. Las semillas se mantuvieron en la cámara de cultivo, en oscuridad, hasta la aparición de las primeras plántulas a los 4-6 días. Pasadas dos semanas del inicio de la germinación, las plántulas se traspasaron a las bandejas de cultivo. Las bandejas contenían aproximadamente 50 plántulas en 35 L de solución nutritiva 3/8 Hoagland. Las plantas se mantuvieron durante 2 semanas en estas bandejas. Pasado este tiempo se transplantaron a cubos (4 plantas/20 L) que contenían solución nutritiva 1/2 Hoagland con 0 ó 45 µM de NaFe(III)-EDTA. Para imitar lo mejor posible las condiciones naturales de la deficiencia de Fe se incrementó el pH de la solución nutritiva de las plantas sin Fe hasta 7,7 (Susín, 1994a) mediante la adición de NaOH 1 mM y CaCO₃ 1g.L⁻¹ (Young y Terry, 1982).

En las experiencias en las que se ha utilizado una adición de Fe, a plantas deficientes, se añadió el Fe (45 µM) después de 15 días en deficiencia.

3.2.3.- Cultivo hidropónico de árboles frutales

Para el cultivo hidropónico de los árboles frutales se utilizaron las mismas soluciones nutritivas madre que en el caso de la remolacha, eliminando el NaCl de

la solución 1. Se pusieron 4 plantas/20 L solución nutritiva. Debido a su origen, se cambió el proceso de adaptación al cultivo hidropónico de los frutales. Así, el medio nutritivo inicial fue 1/16 Hoagland, y contenía 12,5 mL de solución 1, 6,25 mL de solución 2, 20 mL de microelementos, con 10 μ M de Fe(III)-EDTA y a pH 5,5. Los medios utilizados, y la secuencia de adaptación fueron como sigue:

	Solución 1/16 Hoagland (20 L)	Solución 1/8 Hoagland (20 L)	Solución 1/4 Hoagland (20L)
Solución 1	12,5 mL	25 mL	50 mL
Solución 2	6,25 mL	12,5 mL	25 mL
Microelementos	10 mL	10 mL	10 mL
NaFe(III)-EDTA	10 μ M	10 μ M	10 μ M
Ajuste pH	5,5	5,5	5,5
Tiempo	1 semana	1 semana	2 semanas

Al cabo de las cuatro semanas y para obtener material control y deficiente en Fe se utilizaron dos tratamientos (1 y 2 respectivamente). Las soluciones se cambiaron cada 15 días, y el aporte de Fe se realizó cada 7 días.

	Tratamiento 1 (20 L)	Tratamiento 2 (20 L)
Solución 1	100 mL	100 mL
Solución 2	50 mL	50 mL
Microelementos	20 mL	20 mL
NaFe(III)-EDTA	30 μ M	1 μ M
pH	5,5	-

3.3.- Medidas de clorofila

Todas las determinaciones de clorofila en hoja han sido realizadas mediante medidas con SPAD (ver 3.3.2). Para obtener los valores de clorofila correspondientes a dichas medidas se han hecho curvas de calibración comparando con determinaciones espectrofotométricas.

3.3.1.- Medida de clorofila por espectrofotometría

Para realizar las medidas de concentración de clorofila en hoja por espectrofotometría se tomó una superficie de hoja conocida (1-2 cm²) y se trituró en un mortero con un poco de ascorbato y acetona al 100%. Se filtró con un filtro Millipore de 5 μ m para eliminar el depósito de ascorbato y los restos vegetales, y se

llevó a un volumen conocido (entre 2 y 5 mL) con acetona pura (Abadía y Abadía, 1993).

La estimación de la concentración de clorofila se realizó midiendo la absorbancia a 661,6 y 644,8 nm y aplicando las ecuaciones descritas por Lichtenthaler (1987). La concentración se obtiene en $\mu\text{g Cfl.mL}^{-1}$.

$$\begin{cases} \text{Clorofila a} = 11,24 \times A_{661,6} - 2,04 \times A_{644,8} \\ \text{Clorofila b} = 20,13 \times A_{644,8} - 4,19 \times A_{661,6} \end{cases}$$

También se determinó la clorofila total en cloroplastos y protoplastos aislados de hojas de remolacha. Se extrajo la clorofila con acetona al 80%, se centrifugó para eliminar los restos de membranas y se midió la absorbancia a 663 y 645 nm. La cuantificación se realizó aplicando los coeficientes de MacKinney (1941).

$$\mu\text{g Cfl.mL}^{-1} = 8,02 \times A_{663} + 20,2 \times A_{645}$$

3.3.2.- Medidor de clorofila SPAD-502 (Minolta)

El medidor de clorofila SPAD-502 (Soil-Plant Analisis Development) de la casa Minolta permite estimar la concentración de clorofila de las hojas mediante métodos no destructivos. El SPAD realiza estas medidas de forma directa basándose en la determinación de la intensidad de luz transmitida a través de la hoja, que se puede relacionar con la concentración de clorofila por medio de la correspondiente calibración. El sistema de medida se basa en dos diodos, uno rojo (zona donde la absorción es alta y no se ve afectada por los carotenoides) con una emisión máxima a 650 nm, y el otro en el infrarrojo (donde la absorción es pequeña) con una emisión a 950 nm. El área de medida es de sólo 2 mm x 3 mm y las muestras pueden tener hasta 1,2 mm de espesor. Hay que realizar siempre una curva de calibración para poder estimar la cantidad de clorofila total a partir de las medidas de SPAD. Las calibraciones obtenidas dependen tanto del material como de la época del año en la que se realiza la medida en el caso de materiales crecidos en campo. La relación entre ambos valores no es lineal, ya que la señal de SPAD se satura a altas concentraciones de clorofila. Por otro lado, para concentraciones bajas de clorofila las medidas de SPAD pueden llegar a ser cero. En todo caso, en un amplio intervalo la lectura por SPAD da una buena estimación del contenido de clorofila de la hoja.

Para realizar la correlación se toman áreas conocidas de hojas que se leen con el SPAD. A continuación se extraen los pigmentos y se determina la

concentración de clorofila tal como se describe en el apartado 3.3.1. La curva de calibración se obtiene relacionando el valor de SPAD de cada muestra con la concentración de clorofila calculada para la misma muestra. Para remolacha cultivada en medio hidropónico y cámara de cultivo y peral y melocotonero en condiciones de campo se obtiene una representación de tipo logarítmico como la mostrada en la Figura 9 ($r^2 = 0,95$).

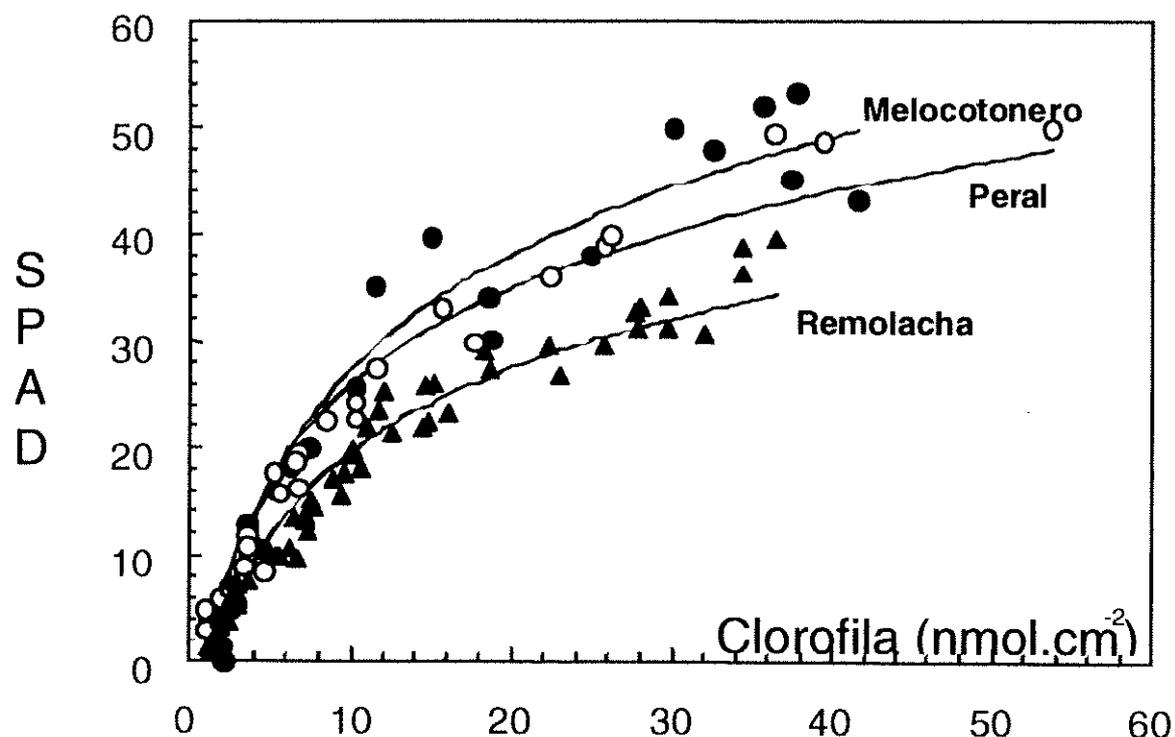


Figura 9: Correlación de los valores de lectura con el SPAD y la concentración de clorofila total por área (medida con la ecuación de Lichtenthaler, 1987) en remolacha cultivada en cámara de cultivo y peral y melocotonero en condiciones de campo.

En general se realizaron 8-10 medidas con SPAD a lo largo de toda el área de la hoja, tomando como valor final el valor medio. La concentración de clorofila correspondiente se obtuvo por extrapolación con la curva de calibrado obtenida en las condiciones de cultivo utilizadas (Figura 9).

3.4.- Aislamiento de membrana plasmática de hojas de remolacha

Para el aislamiento y purificación de membrana plasmática se ha utilizado la técnica de centrifugación diferencial en un sistema acuoso de partición en doble fase (Larsson, 1985; Palmgren *et al.*, 1990). Este método se basa en la

inmiscibilidad del dextrano T-500 y el polietilenglicol (PEG) 3350 cuando se encuentran en determinadas concentraciones. La membrana plasmática se concentra en la fase formada por PEG, mientras el resto de membranas celulares se concentran en la fase de dextrano. La separación se produce por las características de superficie, tamaño y densidad de la membrana plasmática (Albertson, 1971). Mediante la partición en doble fase se obtienen mayoritariamente vesículas con una orientación celular natural ("right-side out"), con el lado citoplasmático en el interior de la vesícula (Larsson *et al.*, 1984).

3.4.1.- Aislamiento y purificación de membrana plasmática de hojas

3.4.1.1.- Protocolo de aislamiento

Como material de partida para el aislamiento se utilizaron hojas de plantas de remolacha crecidas en condiciones control (concentración de clorofila por encima de $250 \mu\text{mol.m}^{-2}$), de deficiencia moderada de Fe (concentración de clorofila entre $70\text{--}100 \mu\text{mol.m}^{-2}$) y de deficiencia severa de Fe (por debajo de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}$).

Se recogieron las hojas sobre hielo, se pesaron y se cortaron en trozos pequeños. Se homogeneizaron en medio A (ver 3.4.1.2) con una relación 1 g hoja/6 mL medio con un triturador de cocina Osterizer (recipiente de 1 L) a máxima velocidad, tres veces durante 20 s. El extracto crudo se filtró a través de 2 capas de Miracloth (Calbiochem). El filtrado se recogió y se centrifugó a 10.000 g (10.000 rpm , rotor SS-34) durante 10 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Se recogió el sobrenadante, centrifugándose de nuevo a 40.000 g (20.000 rpm , rotor SS-34) durante 60 min. Se recogió el precipitado, en adelante denominado fracción microsomal, y que contenía una mezcla de membranas celulares.

La fracción microsomal se resuspendió en 4 mL de medio B (ver 3.4.1.2), y se colocó sobre el sistema de doble fase de polímeros (SDFP, ver 3.4.1.2) hasta alcanzar todo un peso final de 30 g (tubos PPCO, copolímero de polipropileno, de 50 mL NALGENE™). El sistema de fases se mezcló mediante inversión del tubo y se centrifugó durante 10 min a 1.200 g (3.500 rpm , rotor SS-34). Se separaron dos fases: la superior, FS, compuesta fundamentalmente por PEG y la inferior, FI, compuesta por dextrano. La membrana plasmática se desplaza mayoritariamente a la fase superior (Figura 10). La fase inferior, que contiene la mayoría de las membranas celulares, se mezcló con fase superior limpia (obtenida del stock, ver 3.4.1.2), repitiéndose el proceso de mezcla y centrifugación, y separándose la fase inferior (FI_1) de la superior (FS_1). Se juntaron las dos fases superiores obtenidas, FS y FS_1 , y se mezclaron con la fase inferior limpia, repitiéndose el proceso de mezcla y

centrifugación. Se separaron dos fases: la superior, MP, que contenía membrana plasmática de alta pureza y la inferior, FI₂. Para controlar el proceso de purificación se recogieron las fases MP, FI₁ y FI₂. Dichas fases se diluyeron 5 veces en medio C (ver 3.4.1.2) para eliminar los polímeros y evitar que interfirieran en los ensayos enzimáticos, centrifugándose a 40.000 g (20.000 rpm, rotor SS-34) durante 60 min. Los precipitados se resuspendieron en medio C con PMSF 0,5 mM y leupeptina 20 μM, guardándose a -80 °C.

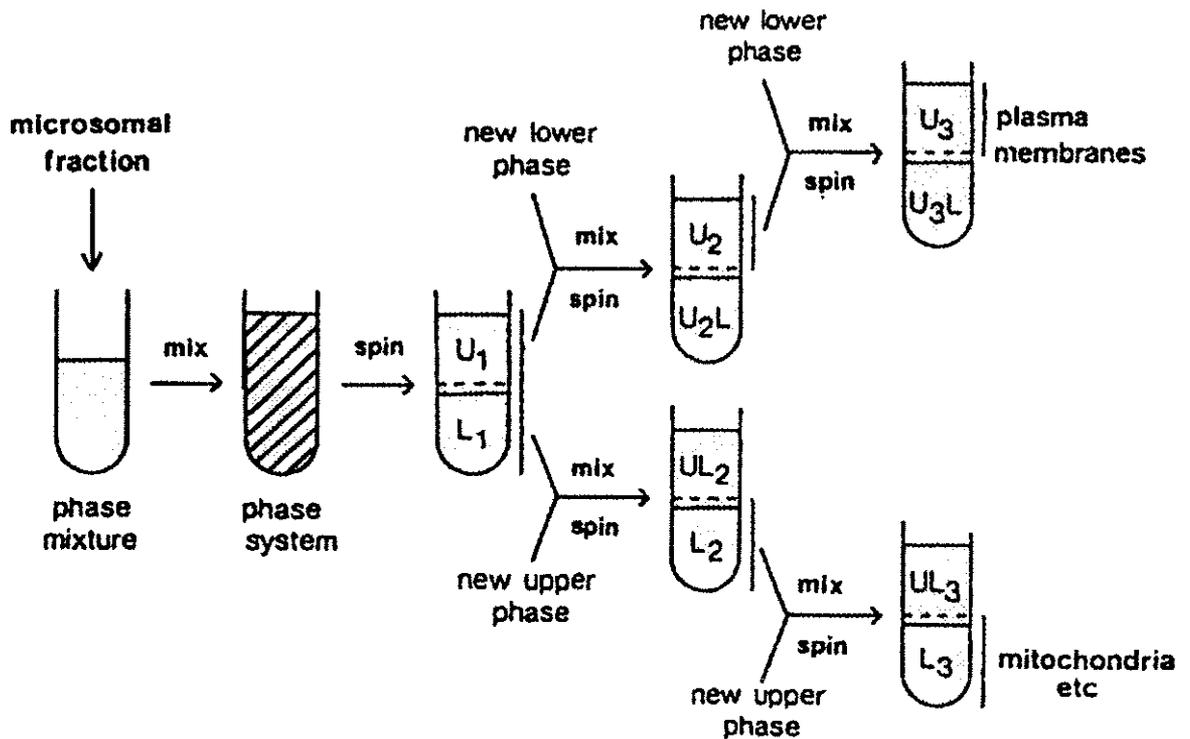


Figura 10: Esquema de los pasos de purificación de membrana plasmática mediante un sistema acuoso de partición en doble fase (Larsson, 1985).

3.4.1.2.- Medios

Aislamiento

Medio A (medio de homogeneización)

tampón Hepes-KOH pH 7,5	50 mM
sacarosa	330 mM
DTT	1 mM
ácido ascórbico	2 mM
PMSF	0,5 mM
PVP	5% (p/v)
BSA	0,1% (p/v)
leupeptina	20 μM

Los componentes del medio A proporcionan la máxima protección a las proteínas de membrana. El DTT protege los grupos sulfhidrilo. El PMSF inhibe las proteasas liberadas durante la homogeneización, mientras que la BSA actúa como sustrato alternativo para las mismas. El PVP inactiva los grupos fenólicos, y por último el ácido ascórbico evita la oxidación.

Medio B

tampón fosfato pH 7,8	5 mM
sacarosa	330 mM
KCl	5 mM
DTT	6 mM

Medio C

tampón MOPS-BTP pH 7,0	10 mM
sacarosa	250 mM
EDTA	3 mM

Purificación

El dextrano es un compuesto muy higroscópico. Para realizar las disoluciones de dextrano al 20% (p/v) se pesaron 25 g (dextrano T-500) que se disolvieron en 100 ml de agua ultrapura con agitación baja. Una vez disuelto se pesó 1 g de la disolución que se desecó en estufa a 50-60 °C. Una vez desecada la disolución se obtuvo su concentración exacta por diferencia de peso, ajustándose entonces a un valor del 20% (p/v).

Sistema de doble fase de polímeros SDFP (sobre el que se carga la fracción microsomal)

	Peso añadido	Concentración final en la doble fase
tampón fosfato 100 mM pH 7,8	1,13 g	5 mM
dextrano 20% (p/v)	9,75 g	6,5%
PEG 40% (p/v)	4,87 g	6,5%
KCl 100 mM	1,13 g	5 mM
sacarosa 2 M	3,71 g	330 mM
H ₂ O ultrapura*	1,91 g	
peso total	22,5 g	

* Agua tipo 1-grado reactivo, obtenida con un aparato MilliQ de Waters.

Stock de doble fase de polímeros (para purificar las diferentes fases)

	Peso añadido	Concentración final en la doble fase
tampón fosfato 100 mM pH 7,8	10 g	5 mM
dextrano 20%(p/v)	65 g	6,5%
PEG 40% (p/v)	32,5 g	6,5%
KCl 100 mM	10 g	5 mM
sacarosa 2 M	33 g	330 mM
H ₂ O ultrapura	49,5 g	
peso total	200 g	

La mezcla se agitó fuertemente en un embudo de decantación, dejándose a 4 °C durante 12 h. Se separaron las dos fases, cada una enriquecida en un polímero diferente y se congelaron a -20 °C.

3.4.2.- Cuantificación de proteína de las preparaciones de membrana plasmática

Las proteínas en las preparaciones de membrana plasmática se cuantificaron siguiendo el método de Markwell *et al.* (1981) a partir del método original de Lowry *et al.* (1951).

Solución A

Na ₂ CO ₃	2% (p/v)
NaOH	0,4% (p/v)
tartrato sódico	0,16% (p/v)
SDS	1% (p/v)

Solución B

CuSO ₄ .5H ₂ O	4% (p/v)
--------------------------------------	----------

Preparar justo en el momento de usar

Solución C= solución A: solución B (100:1; v/v)
Solución D= reactivo Folin-Ciocalteau: H ₂ O ultrapura (1:1; v/v)

A un volumen de hasta 100 µL de muestra o patrón (normalmente entre 4-10 µL de muestra) se añadieron 3 mL de solución C y se llevaron hasta un volumen final de 4 mL con agua ultrapura, dejándose a temperatura ambiente durante 10 min. Se añadieron 300 µL de solución D, agitando fuertemente. Después de 45 min, se midió la absorbancia a 730 nm, frente a un blanco. Como estándar se utilizó seroalbúmina bovina (BSA) diluida en el tampón de muestra a partir de una disolución madre de 1 mg.mL⁻¹ (intervalo de 0,05 a 1 mg.mL⁻¹). Se utilizaron dos diluciones diferentes de cada muestra, cada una por duplicado.

3.4.3.- Determinación de la pureza de la preparación de membrana plasmática

La determinación de la pureza de las membranas obtenidas se realizó mediante medidas enzimáticas. Se utilizaron como marcadores de membrana plasmática la ATPasa sensible a vanadato y la microscopía electrónica. Para otras membranas se utilizaron la citocromo c-oxidasa (membrana mitocondrial) y la ATPasa sensible a nitrato (tonoplasto).

3.4.3.1.- ATPasa sensible a vanadato

La actividad de la ATPasa sensible a vanadato se determinó según Larsson y Møller (1990). Se añade azida, molibdato y nitrato para inhibir las ATPasas de mitocondria y tilacoide, las fosfatasas ácidas y la ATPasa de tonoplasto respectivamente. El pH de la reacción (6,5) es más bajo que el pH óptimo de las ATPasas de mitocondria y tilacoide (pH 7-8) y más alto que el de las fosfatasas ácidas (pH 4-5). El detergente permite exponer el lado activo del enzima, que queda en el interior de las vesículas obtenidas. El DTT y el EDTA estabilizan la actividad ATPasa al proteger los grupos sulfhidrilo. Además, el EDTA disminuye el ruido de fondo de la reacción al acomplejar cationes divalentes que podrían interferir.

Medio A

tampón MES-BTP, pH 6,5	50 mM
MgSO ₄	4 mM
KNO ₃	50 mM
NaN ₃	1 mM
Na ₂ MoO ₄	0,1 mM
sacarosa	330 mM
EDTA	0,1 mM
DTT	1 mM
Tritón X-100	0,05% (p/v)
ATP	3 mM (para iniciar la reacción)

Medio B

ácido ascórbico	3% (p/v)
SDS	1% (p/v)
HCl	0,5 M

15 min antes de la medida se añade 1 mL de molibdato amónico (NH₄)₆Mo₇O₂₄ al 8% (p/v) por cada 10 mL de medio B.

Medio C

citrato sódico	2% (p/v)
NaAsO ₂	2% (p/v)
ácido acético	2% (p/v)

Primero se disuelven las sales en H₂O y luego se añade el ácido acético.

El volumen de reacción por muestra es de 120 μ L de medio A (sin ATP). A este volumen se le añade una alícuota de preparación de membrana plasmática (2-25 μ g de proteína). La reacción se inicia al añadir ATP (3 mM) y se mantiene durante 20 min a 37 °C. Se prepararon blancos independientes sin Mg, con ortovanadato (0,4 mM, preparado inmediatamente antes del ensayo) y sin Tritón X-100. La reacción se para mediante la adición de 1 mL de medio B frío, dejando las muestras en hielo al menos durante 10 min.

La determinación de la actividad se realiza mediante la valoración del fósforo (P_i) liberado, midiendo el complejo formado con el molibdato. El exceso de molibdato se elimina por formación de un complejo en presencia de 1,5 mL de medio C. Las muestras se incuban a 37 °C, midiéndose la absorbancia a 850 nm pasados 30 min. Los valores de absorbancia se mantienen estables entre 25 y 60 min. La recta patrón se realizó con KH_2PO_4 2 mM (0-1 mM)

Este ensayo se realizó con fracciones recién obtenidas de membrana plasmática (MP), fracción microsomal, FI_1 y FI_2 para comprobar cada aislamiento.

3.4.3.2.- Medidas de contaminantes: mitocondrias

El mayor contaminante que puede aparecer en el aislamiento de membrana plasmática es la membrana mitocondrial. La presencia de este contaminante se determina con uno de los pocos marcadores específicos dentro de la célula, el enzima citocromo c-oxidasa que se encuentra en la membrana interna de la mitocondria. La medida de la actividad se realizó según Jesaitis *et al.* (1977). Las concentraciones finales del medio de reacción fueron:

tampón Tris-acetato, pH 7,4	50 mM
citocromo c	0,045 mM
Tritón X-100	0,05% (p/v)

Antes de preparar el medio se reduce el citocromo c con 1 μ L de ditionito sódico 1 M y se añade una alícuota de preparación de membrana plasmática equivalente a 10-50 μ g de proteína, con un volumen final de 1 mL. Se midieron los cambios en la absorbancia a 550 nm debidos a la oxidación del citocromo c. Las medidas se realizaron con fracciones de membrana plasmática y fracción microsomal.

3.4.3.3.- Medidas de contaminantes: tonoplasto

La presencia de membrana de tonoplasto se detecta mediante la actividad ATPasa sensible a nitrato. Las concentraciones finales del medio de reacción fueron:

Medio A

tampón Tris-Mes pH 6,1	50 mM
sacarosa	225 mM
Tritón X-100	0,04% (p/v)
MgCl ₂	2 mM
KNO ₃	50 mM
ATP	2 mM (para iniciar la reacción)

Medio B

(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	3,6 mM
H ₂ SO ₄	340 mM

Medio C

ácido ascórbico	15 mM
SnCl ₂	4 mM
H ₂ SO ₄	300 mM

Se toman entre 2-8 µg de membrana. La reacción se inicia añadiendo el ATP para un volumen total de 0,5 mL de medio A, y se mantiene durante 30 min a 37 °C. Para parar la reacción se añaden 3,5 mL de medio B. Después de 10 min a temperatura ambiente se realiza la cuantificación del P_i liberado, añadiendo 1 mL de medio C y dejándolo a 37 °C durante 30 min. Al cabo de este tiempo se mide la absorbancia a 680 nm. La recta patrón se realiza con KH₂PO₄ (0-1 mM). Las medidas se realizaron con fracciones de MP, fracción microsomal y FI₁.

3.4.3.4.- Estimación de la pureza mediante microscopía electrónica

La pureza de las fracciones también se determinó mediante microscopía electrónica, aplicando un método de contraste específico para la membrana plasmática (Larsson y Møller, 1990). Se analizaron fracciones microsomaes (previa a la purificación) y de membrana plasmática (tras la purificación). El proceso se llevó a cabo en tubos Eppendorf a 4 °C y consta de cuatro pasos que se detallan a continuación.

Fijación y deshidratación

La fijación se realiza manteniendo la muestra en glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato sódico 0,1 M a pH 6,8 durante 24 h y a 4 °C. Tras varios lavados con el tampón cacodilato, las muestras se fijan con OsO₄ al 1% en el mismo

tampón durante 1 h y a 4 °C. La fijación se completa lavando varias veces, primero con el tampón y posteriormente con H₂O destilada. La deshidratación se lleva a cabo de forma sucesiva en etanol del 30, 50, 70, 90 y 100%. Cada paso es de 20-30 min, repitiendo el último 3 veces.

Inclusión

El medio de inclusión utilizado fue Epon (Polaron Eq. Ltd. Watford, U. K.) que consta de cuatro componentes (DDSA, MNA, DMP-30 y EPON 812). Se preparan en primer lugar las dos soluciones que se detallan a continuación:

	<u>Solución A:</u>	DDSA	12,5 mL
		EPON 812	7,75 mL
	<u>Solución B:</u>	MNA	14,8 mL
		EPON 812	16,5 mL

Estas soluciones se agitan por separado durante 20 min, tras lo cual se mezclan, añadiendo 0,9 mL de acelerador (DMP-30). El Epon así preparado se mantiene en agitación durante 30 min.

Para una mejor penetración, la resina se aplica disuelta en óxido de propileno. La inclusión se realizó como sigue:

	óxido de propileno	2 x 20-30 min
	óxido de propileno:Epon (2:1, v/v)	2-3 h
	óxido de propileno:Epon (1:1, v/v)	2-3 h
	óxido de propileno:Epon (1:2, v/v)	2-3 h
	Epon	12-24 h
	Epon	2-3 h

Tras estos pasos, los tubos Eppendorf se introducen en una estufa a 65 °C durante 24-48 h, hasta la total polimerización de la resina.

Corte

Los bloques se cortan con una cuchilla de diamante (Diatome, Suiza) en un ultramicrotomo Ultracut (Reichert, Alemania). Las secciones (40-60 nm de grosor) se montan en rejillas de níquel.

Contraste

El contraste de la membrana plasmática se realiza según el método descrito por Roland *et al.* (1972). Con esta técnica es posible apreciar las vesículas de

membrana plasmática teñidas de negro o gris oscuro. Sin embargo, los fundamentos químicos del proceso no se conocen bien todavía.

Incubación rejillas	ácido peryódico 1% (p/v)	30 min
Lavado 1	H ₂ O destilada	5 x 2 min
Incubación cortes	ácido fosfotúngstico 1% ácido crómico 10%	35 min
Lavado 2	H ₂ O destilada	5 x 2 min

La visualización de las rejillas se hizo en un microscopio electrónico Phillips CM12 (Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Córdoba). Para tomar las fotografías de los cortes se utilizaron placas Kodak de 6,6 x 9 cm. La pureza de la membrana plasmática se estima tomando al menos 20 placas de cada fracción (a 11.000 aumentos). Todas las placas se amplían a los mismos aumentos (aproximadamente a 33.000), en papel fotográfico de 19 x 24 cm, a los que se aplica un análisis de intersecciones (Weibel, 1979). Sobre cada fotografía se aplicó una transparencia, con líneas paralelas separadas entre sí 1 cm, y a continuación se contabiliza el número de intersecciones de dichas líneas con todas las vesículas incluidas en la imagen (I_t), así como el número de intersecciones con vesículas de membrana plasmática (I_{mp}). La pureza (P), en %, se obtiene aplicando la fórmula :

$$P = (I_{mp}/I_t)/100$$

Se estima la pureza para cada fotografía y posteriormente se realiza la media para cada fracción.

3.5.- Aislamiento y purificación de mitocondrias de remolacha

El aislamiento de mitocondrias se realizó sobre tres tipos distintos de tejido de remolacha: hojas, raíces y raíz de reserva. Las mitocondrias de todos los tejidos se aislaron según Boutry y Briquet (1982), utilizando un gradiente discontinuo de Percoll.



3.5.1.- Aislamiento de mitocondrias de hojas

Tampón de homogeneización

tampón Tris-HCl pH 7,6	50 mM
sacarosa	0,4 M
KH ₂ PO ₄	10 mM
EGTA	1 mM
β-mercaptoetanol	5 mM
BSA	0,4% (p/v)
PVP	0,1% (p/v)

Medio B

manitol	0,4 M
KH ₂ PO ₄ pH 7,2	10 mM

Se homogeneiza el tejido en el tampón, con una relación 25 g tejido/100 mL tampón, en un triturador de cocina Osterizer a velocidad media, durante 5 s tres veces. El extracto crudo se filtra a través de una capa de gasa. El filtrado se centrifuga a 4.000 g (5.000 rpm, rotor GSA) durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se centrifuga de nuevo a 16.300 g (10.000 rpm, rotor GSA) durante 15 min. El precipitado se resuspende en Medio B.

Se introduce la muestra resuspendida en la parte superior de un gradiente de Percoll y se centrifuga a 220 g (1.500 rpm, rotor SS-34) durante 25 min. Se recoge la banda que contiene las mitocondrias en la interfase entre las zonas de 24 y 50% Percoll. La banda se diluye 5-6 veces en medio B y se centrifuga a 10.000 g (10.000 rpm, rotor SS-34) durante 10 min. Las mitocondrias se guardan a -20 °C.

Gradiente de Percoll

	H ₂ O ultrapura	Medio C*	Percoll	Vol. final	Vol. usado para el gradiente
13,5%	7,3 mL	10 mL	2,7 mL	20 mL	2 vol
24%	7,8 mL	15 mL	7,2 mL	30 mL	4 vol
50%	-	10 mL	10 mL	20 mL	1 vol

* Medio C = Tris 10 mM pH 7,2, sacarosa 0,5 M

3.5.2.- Aislamiento de mitocondrias de raíz

Para el aislamiento de mitocondrias de raíz y raíz de reserva se siguió inicialmente el mismo protocolo, que el utilizado para las mitocondrias de hoja, aunque se varió la composición del gradiente de Percoll.

Gradiente de Percoll

	H ₂ O ultrapura	Medio C*	Percoll	Vol. final	Vol. usado para el gradiente
13,5%	7,3 mL	10 mL	2,7 mL	20 mL	2 vol
20%	9 mL	15 mL	6 mL	30 mL	4 vol
50%	-	10 mL	10 mL	20 mL	1 vol

* Medio C = Tris 10 mM pH 7,2, sacarosa 0,5 M

Debido a que no se obtenían mitocondrias de raíces se realizaron modificaciones sobre este método. Se añadió 0,5 mL de PMSF al 10% (disuelto en etanol) en 250 mL de tampón. La rotura del tejido se realizó en un mortero. La primera centrifugación se hizo a una velocidad algo más baja, 2.000 g (3.500 rpm, rotor GSA) durante 10 minutos. El manitol se sustituyó por sacarosa en el tampón de resuspensión.

3.6.- Estudio de la actividad FC-R en hojas de remolacha

3.6.1.- Actividad FC-R en membrana plasmática

3.6.1.1.- Dependencia del sustrato

3.6.1.1.a.- Fe(III)-EDTA

La capacidad de reducción de Fe(III)-EDTA por la membrana se midió por la formación del complejo Fe(II)-batofenantrolina disulfato ($\text{Fe}^{2+}[\text{BPDS}]_3^{4-}$) (Bienfait *et al.*, 1983). Se siguió el método descrito por Susín *et al.* (1996) eliminándose el EDTA del medio de reacción por problemas de interferencia con el ensayo. Las concentraciones en el medio de reacción fueron:

tampón MOPS-BTP pH 6,8	15 mM
sacarosa	250 mM
MgCl ₂	5 mM
Tritón X-100	0,02% (p/v)
BPDS	600 μM
NADH	500 μM
Fe(III)-EDTA	500 μM (para iniciar la reacción)

Se añadieron entre 5-7 μg de membrana purificada para un volumen total de reacción de 1 mL. La reacción se inició con la adición de Fe(III)-EDTA, desarrollándose entre 10-20 min a temperatura ambiente y oscuridad. Para estimar el Fe reducido se midió la absorbancia a 535 nm en un espectrofotómetro Shimadzu 2101-PC con una rendija de 1 nm. Se aplicó un coeficiente de extinción de

22,14 mM⁻¹.cm⁻¹. Las medidas se hicieron por triplicado y con blancos sin muestra para eliminar la reducción inespecífica.

3.6.1.1.b.- KFeCN

Se siguió el método general descrito por Palmgren *et al.* (1990).

tampón MOPS-BTP pH 6,8	15 mM
sacarosa	250 mM
Tritón X-100	0,02%(p/v)
NADH	500 μM
KFeCN	500 μM (para iniciar la reacción)

Se siguió el mismo procedimiento que con Fe(III)-EDTA, iniciándose la reacción al añadir el KFeCN. Se midió el descenso de la absorbancia a 420 nm debido a la reducción del ferricianuro a ferrocianuro. Se utilizó un coeficiente de extinción de 1,02 mM⁻¹.cm⁻¹. Las medidas se hicieron por triplicado y con blancos sin muestra para eliminar la reducción inespecífica.

3.6.1.1.c.- Otros quelatos de Fe(III)

Se caracterizó la actividad reductasa en presencia de Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato, descritos como transportadores de Fe en la planta (Tiffin, 1970).

Los complejos Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato se prepararon añadiendo una disolución lo más concentrada posible de FeCl₃ (c_f en el complejo 25 mM) gota a gota, a una disolución también lo más concentrada posible del ácido correspondiente, a pH 6,0 para citrato y 6,5 para malato. Al final de la adición de FeCl₃ se volvió a comprobar el pH. La concentración final del ácido dependió de la relación Fe : ácido deseada.

Para medir la reducción se siguió el mismo protocolo que para Fe(III)-EDTA. Las relaciones utilizadas fueron de 1 : 1 a 1 : 500 para Fe(III)-citrato y de 1 : 2 a 1 : 50 para Fe(III)-malato.

3.6.1.2.- Cinéticas de la actividad reductasa

Se variaron las concentraciones de los quelatos de Fe entre 25-1.000 μM. Estas medidas se realizaron para Fe(III)-EDTA, Fe(III)-citrato, Fe(III)-malato y KFeCN. También se realizó la cinética variando la concentración de NADH y NADPH entre 25-1.000 μM. La determinación de las constantes cinéticas se llevó a cabo mediante un ajuste de tipo Eadie-Hofstee.

3.6.1.3.- Medida del pH óptimo de la actividad FC-R

Se estudió el pH al que se produce la máxima actividad para cada uno de los quelatos de Fe utilizados: Fe(III)-EDTA, Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato. Los protocolos fueron los descritos anteriormente, variando el tampón, para obtener el pH deseado en un intervalo entre 5,0 y 8,0. Los tampones utilizados fueron:

fosfato 15 mM	pH 5,0
MES-KOH 15 mM	pH 5,5-6,5
MOPS-BTP 15 mM	pH 7,0-8,0

3.6.1.4.- Actividad FC-R en condiciones de anaerobiosis

Se caracterizó la influencia del oxígeno en la actividad FC-R de la membrana plasmática. Los medidas en condiciones anaeróbicas se realizaron en el mismo medio de reacción (ver 3.6.1.1.a) añadiendo 42 U.mL⁻¹ de glucosa oxidasa (Grado II, Boehringer Mannheim), 10 mM de glucosa y 50 µg.mL⁻¹ de catalasa ("beef liver", Boehringer Mannheim) (Brüggemann y Moog, 1989). Estas medidas se realizaron con Fe(III)-EDTA, Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato.

3.6.1.5.- Latencia de la actividad FC-R

Los estudios de latencia permiten determinar la situación de los lugares aceptor y donador de electrones del sistema enzimático que reduce Fe, y el lado de la membrana en el que se encuentra localizado. Se utilizaron Tritón X-100 (detergente iónico) y Brij 58 (detergente no-iónico). El grado de latencia se determina por comparación de la actividad enzimática en presencia y ausencia de detergente, calculándose mediante la ecuación: [(actividad con detergente)-(actividad sin detergente)] x 100/(actividad con detergente). Las concentraciones finales de los detergentes fueron 0,05% (p/v) para Brij 58 y 0,02% (p/v) para Tritón X-100.

La existencia de vesículas intactas se comprobó mediante la variación de pH inducida por la bomba de protones (Palmgren y Sommarin, 1989; Palmgren, 1990). Las concentraciones en el medio de reacción fueron:

MOPS-BTP pH 6,8	10 mM
KCl	140 mM
EDTA	1 mM
BSA	1 mg/mL
naranja de acridina	20 µM
ATP	2 mM
MgCl ₂	4 mM

La reacción se inició añadiendo 50 µg de membrana plasmática a 1 mL de medio de reacción, midiéndose la variación de la absorbancia a 495 nm a lo largo del tiempo.

3.6.1.6.- Actividad FC-R en un medio similar al apoplasto

Para determinar la actividad FC-R en condiciones lo más parecidas al entorno de la membrana plasmática en la planta, se realizaron medidas de actividad FC-R en un medio similar al apoplasto. Dicho medio contenía (en mM): K⁺ 10; Ca²⁺ 2,15; Mg²⁺ 0,68; Na⁺ 0,1; NO₃⁻ 14,64; Cl⁻ 0,82; SO₄²⁻ 0,48; H₂PO₄⁻ 0,34. El medio se tamponó a pH 6,8 con Mes-KOH 15 mM. Se siguió el protocolo descrito en 3.6.1.1.a, eliminando el MgCl₂ del medio de reacción por encontrarse ya añadido en el medio. Las medidas se realizaron con Fe(III)-EDTA y Fe(III)-citrato.

3.6.1.7.- Actividad FC-R en presencia de flavinas

Se estudió la influencia de las flavinas en la actividad reductasa de la membrana plasmática. Las flavinas elegidas fueron FMN, FAD y riboflavina, cuyas concentraciones en hoja varían como consecuencia de la deficiencia de Fe (Susín *et al.*, 1993b). Se utilizó el mismo medio de reacción ya descrito anteriormente y se añadieron las flavinas con una concentración final de 50 µM. Se realizaron medidas para Fe(III)-EDTA y Fe(III)-citrato. Se hicieron medidas con blancos sin muestra para eliminar la reducción inespecífica.

3.6.2.- Actividad FC-R en cloroplastos

Los cloroplastos se aislaron siguiendo el método descrito por Nedunchezian y Kulandaivelu (1991). Todo el proceso se lleva a cabo a 4 °C.

Medio A

sorbitol	330 mM
Na ₄ P ₂ O ₇	10 mM
MgCl ₂	10 mM
KCl	5 mM
ácido ascórbico	5 mM
tampón Mes-KOH pH 6,5	20 mM

Medio B

tricina pH 7,0	10 mM
sacarosa	600 mM

Se homogeneizan las hojas en medio A (100 mL/20 g hojas) en un triturador Osterizer a baja velocidad (3 x 5 s). Se filtra el homogeneizado con 4 capas de Miracloth y se centrifuga a 6.400 g (8.000 rpm, rotor SS-34) durante 6 min,

resuspendiendo el precipitado en medio A. Los cloroplastos intactos se purifican en un gradiente de sacarosa (1 mg.mL⁻¹ de cloroplastos en 25 mL de gradiente) de 25, 34 y 51% (en tricina 10 mM pH 7,0), que se centrifuga a 4.300 g en un rotor flotante (5.000 rpm, SW 41Ti, Beckman L8-70M Ultracentrifuge) durante 10 min y un grado bajo de aceleración. Se recoge la banda situada en la interfase entre las capas de 34 y 51% de sacarosa, y se diluye con un volumen igual de medio B. Se centrifuga para depositar los cloroplastos, que se resuspenden en el medio B.

La actividad reductasa se mide con un protocolo adaptado a partir del de membrana plasmática descrito en el apartado 3.6.1.1.a.

Medio de reacción

tricina pH 7,0	10 mM
sacarosa	600 mM
BPDS	600 μM
Fe(III)-EDTA	500 μM (para iniciar la reacción)

Se añaden 12 μg de cloroplastos para un volumen de reacción de 4 mL. La reacción se inicia con la adición del Fe(III)-EDTA y se desarrolla entre 30-60 min. Se midió el espectro de absorción entre 400-700 nm. El Fe reducido se estimó por la absorbancia a 535 nm ($\epsilon = 22,14 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). También se realizaron medidas en presencia de 500 μM NADH. Las medidas se hicieron por duplicado y con blancos sin Fe(III)-EDTA y sin muestra.

Las medidas de dependencia de pH se realizaron en el intervalo 5,5 a 7,5. Los tampones utilizados fueron MES-KOH 10 mM (5,5-6,5) y tricina 10 mM (7,0-7,5).

3.6.3.- Actividad FC-R en protoplastos

Se desarrolló un método de aislamiento que permite obtener de forma rápida protoplastos de hojas de plantas control y deficientes en Fe a partir del mesófilo, mediante incubación con celulasa y pectinasa (Kanai y Edwards, 1973).

Se parte de unos 2 g de mesófilo cortado en trozos de aproximadamente 1 cm², obtenidos tras eliminar manualmente la epidermis abaxial. Los fragmentos de mesófilo se colocan en una placa Petri con 100 mL del medio de incubación, dejándose durante 15 h a 25 °C con agitación y en la oscuridad. Se utilizan medios de incubación con concentraciones distintas de celulasa (E.C. 3.2.1.4 de *Penicillium funiculosom*, Sigma) y pectinasa (Macerase^R pectinase de *Rhizopus* sp., Calbiochem) para las hojas control y deficientes. La concentración de enzimas para las hojas control es algo menor, ya que a concentraciones más altas se

obtienen protoplastos muy degradados. Se determinaron las concentraciones óptimas de enzima para cada material.

Medio de incubación (-Fe)	Medio de incubación (+Fe)
celulasa 2% (p/v)	celulasa 1,2% (p/v)
pectinasa 0,1% (p/v)	pectinasa 0,08% (p/v)
	sorbitol 0,5 M
	PVP 5% (p/v)
	BSA 0,2% (p/v)
	DTT 2 mM
	CaCl ₂ 1mM
	tampón MES-KOH 2mM pH 5,6

Tras la incubación, se filtra a través de una malla de nylon (Scrynel NYHC, Polylabo, Francia) con un tamaño de poro de 150 µm. El tejido no digerido se lava con medio de homogeneización fresco sin enzimas. El filtrado se centrifuga a 100 g (920 rpm, rotor SS-34) durante 10 min, recogiendo el precipitado que contiene los protoplastos. Este precipitado se lava tres veces con medio de homogeneización sin enzimas ni DTT para eliminar el DTT del medio, ya que interfiere con las medidas de reducción de Fe.

La purificación de los protoplastos se realiza mediante una separación por densidad (Vanková y Bornman, 1987). En un tubo de vidrio Corex se ponen 9 mL de sacarosa 1 M y se depositan encima 4 mL de la suspensión de protoplastos (en sorbitol 0,5 M). La separación se realiza por centrifugación a 50 g (650 rpm, rotor SS-34) durante 5 min. Los protoplastos intactos permanecen en la interfase entre las dos capas, mientras que el resto de membranas pasan a la fase inferior.

El estado final de los protoplastos se comprobó por microscopía óptica utilizando como colorante Evans Blue al 0,25% disuelto en medio de incubación sin enzimas. Dicho colorante entra por difusión a través de los poros de las membranas. Si el protoplasto está intacto su interior aparece transparente, mientras que si está roto aparece de color azul.

La cuantificación de la clorofila total de los protoplastos se realizó tal y como se describe en el apartado 3.3.1. Los pigmentos fotosintéticos presentes en los protoplastos se determinaron por HPLC según el método de de las Rivas *et al.* (1989).

La capacidad de reducción de Fe se determinó por la formación del complejo Fe(II)-PDTS tal y como se ha descrito para membrana plasmática (apartado

3.6.1.1.a) con un medio de reacción modificado. Para los protoplastos se ha utilizado un medio lo más parecido posible al apoplasto de remolacha (López-Millán *et al.*, 1997). Este medio, que se denominó solución apoplasto, tenía la siguiente composición (en mM): Mg^{2+} 2,5; Cl^- 6,5; Na^+ 1; NH_4^+ 1; NO_3^- 3,5 mM; K^+ 15; SO_4^{2-} 0,5; PO_4^{3-} 5 y se tamponó a pH 5,5 con Mes-KOH 10 mM.

Medio de reacción

solución apoplasto, pH 5,5	
sorbitol	0,5 M
$CaCl_2$	0,5 mM
$KHCO_3$	1,5 mM
PDS	400 μ M
Fe(III)-EDTA	400 μ M (para iniciar la reacción)

Se añadió una muestra conteniendo entre 1-3 μ g clorofila para un volumen total de reacción de 1 mL. La reacción se inició con el Fe(III)-EDTA, desarrollándose durante 30-60 min a temperatura ambiente. La reacción se realizó tanto en oscuridad como bajo iluminación de luz roja. Para estimar el Fe reducido se midió la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro Shimadzu 2101-PC con una rendija de 1 nm. Se aplicó un coeficiente de extinción de 27,9 $mM^{-1}.cm^{-1}$. Las medidas se hicieron por triplicado y con blancos sin muestra para eliminar la reducción inespecífica.

Se estudió la dependencia de la actividad FC-R en función del pH del medio en un intervalo de pH entre 5,0-7,5, con los mismos tampones que los utilizados para membrana plasmática. Las cinéticas se realizaron con concentraciones de Fe(III)-EDTA entre 25 y 1.000 μ M, tal como se describe para la membrana plasmática.

3.6.4.- Especiación y estructura de los quelatos de Fe

Se realizó la especiación de los complejos de Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato en las distintas condiciones de ensayo en que se realizaron medidas de actividad FC-R. La especiación se estimó con ayuda del programa MINTEQA2 (Allison *et al.*, 1991). Los valores de las constantes para Fe(III)-citrato se corrigieron para un valor de fuerza iónica cero usando los coeficientes gamma obtenidos con la ecuación de Davies. Las constantes de estabilidad utilizadas para el Fe(III)-citrato fueron:

Compuesto	log K
Fe(III)	
[FeCit] ⁰	13,43
[FeCitH] ⁺¹	20,18
[FeCitOH] ⁻¹	21,83
[FeCit ₂] ⁻³	31,63
[Fe ₂ Cit ₂ (OH) ₂] ⁻²	47,94
Fe(II)	
[FeCitOH] ⁰	9,90
[FeCit] ⁻¹	5,68
citrato	
[CitH] ⁻²	6,39
[CitH ₂] ⁻¹	11,15
[CitH ₃] ⁰	14,28

Para el caso de Fe(III)-malato fue necesario calcular las constantes de los complejos ya que no existían datos en la bibliografía. Las constantes de formación de los complejos, así como la protonación del ácido málico se estudió mediante el método propuesto por Martell y Motekaitis (1992) en colaboración con el Dr. Juan José Lucena del Departamento de Química Agrícola de la Universidad Autónoma de Madrid. Se realizaron titulaciones de pH con ácido málico (Merck, 10, 1 y 0,1 mM) o con diferentes relaciones de Fe : malato (1:1, 1:5, 1:10 y 1:25). Los experimentos se hicieron con un titulador automático (721 Net Titrino, Metrohn) y el programa TiNET 2.1. Se comprobó la cantidad total de Fe mediante espectroscopía de absorción atómica. Las constantes de estabilidad se calcularon con los programas PKAS y BEST (Martell y Motekaitis, 1992) y se extrapolaron a fuerza iónica cero con la ecuación de Davies. La posibilidad de precipitación del Fe no fue considerada en los cálculos ya que no se observó precipitación en los ensayos de reducción. Las constantes obtenidas fueron:

Compuesto	log K
Fe(III)	
[FeMal] ⁺¹	7,84
[FeMalOH] ⁰	3,72
malato	
[MalH] ⁺¹	5,00
[MalH ₂] ⁰	8,32

Los cálculos se realizaron, tanto para Fe(III)-citrato como para Fe(III)-malato, para valores diferentes de pH y considerando condiciones aeróbicas ($pe+pH > 15$).

La obtención de las estructuras se realizó con el programa Hiperchem versión 3.0 para Windows.

3.7.- Análisis polipeptídico mediante electroforesis

3.7.1.- Puntas de raíz de remolacha

3.7.1.1.- Preparación de la muestra

Tras 15-20 días del tratamiento de deficiencia de Fe, se recogieron puntas de raíz (0,5-1 cm) de las plantas. Las muestras se congelaron en N₂ líquido y se guardaron a -80 °C. Se probaron tres métodos de extracción de proteína (con sus correspondientes métodos de solubilización) para encontrar el más adecuado al tipo de muestras utilizado. Para cada extracción se mezcló material procedente de distintas plantas.

3.7.1.1.a.- Extracción con tricina.

Se utilizó un tampón de homogeneización compuesto por 50 mM de tampón Tricina a pH 7,8 y PVP 5% (p/v). Se machacaron aproximadamente 50 mg de puntas de raíz en un homogeneizador Eppendorf con 1 mL de tampón. Se centrifugó a 14.300 g (12.000 rpm, rotor SS-34) durante 15 min. Se recogió el sobrenadante, guardándose a -80 °C. Para cargar las muestras en el gel, se precipitaron las proteínas en acetona 80% y PVP 1% (p/v), dejándose durante 24 h a -20 °C. Se centrifugó a 10.000 g (10.000 rpm, rotor SS-34) y el precipitado se resuspendió en el tampón de solubilización.

Tampón de solubilización (relación A:B:C de 3:1:4 en volumen)

- A: 1 mL β -mercaptoetanol, 0,1 g SDS, 5,5 g urea
- B: 200 μ L CHAPS 10% (p/v), 20 μ L anfolitos 5-8, 5,5 g urea
- C: 2 mL CHAPS 10% (p/v), 200 μ L anfolitos 5-8

3.7.1.1.b.- Extracción con SDS

Se siguió el método descrito por Granier (1988) con el tampón de solubilización descrito por Herbik *et al.* (1996).

Tampón de homogeneización

SDS	4% (p/v)
β-mercaptoetanol	5% (v/v)
sacarosa	5% (p/v)
PVP	0,5% (p/v)

Se machacaron puntas de raíz en un mortero con N₂ líquido hasta obtener un polvo compacto. Aproximadamente 100 mg de este polvo se disolvieron en 2 mL de tampón de homogeneización. Los extractos se hirvieron durante 3 min. Se centrifugó a 29.400 g (17.200 rpm, rotor SS-34) durante 15 min, recogiendo el sobrenadante que se volvió a centrifugar a la misma velocidad durante 10 min. Las proteínas se precipitaron en acetona 80% (v/v) con β-mercaptoetanol al 0,07% (v/v), dejándose a -20 °C al menos 1 h. Se centrifugó a 29.400 g (17.200 rpm, rotor SS-34) durante 10 min, se secó el precipitado al vacío y se resuspendió en el tampón de solubilización.

Tampón de solubilización

tampón Tris/HCl pH 7,8	100 mM
SDS	2,5% (p/v)
glicerol	20% (p/v)
β-mercaptoetanol	5% (v/v)

3.7.1.1.c.- Extracción con fenol

Se siguió el método descrito por Meyer *et al.* (1988) con el tampón de solubilización de la muestra descrito por Herbik *et al.* (1996).

Preparación de la solución de fenol

Antes de realizar la extracción es necesario preparar la solución de fenol, ya que la solución comercial utilizada (Aqua-Roti-Phenol, Roth) se encuentra a un pH muy ácido. Para ello se satura la solución con Tris a pH 8,0 mezclando 96 mL de la solución comercial de fenol con 100 mL de Tris/HCl 1 M pH 8,0, y agitando durante 2 min en botella de vidrio opaca. Se pasa la mezcla a un embudo de decantación, donde se separan dos fases y se recoge la inferior. Se repite el proceso de separación con 100 mL de Tris/HCl 1 M pH 8,0. A la segunda fase inferior se añade un volumen igual de Tris/HCl pH 8,0 más diluido (0,1 M). En este último paso se recogen las dos fases separadas, añadiendo a cada una β-mercaptoetanol 5 mM. Las soluciones preparadas se pueden utilizar pasados 4 meses guardadas a 4 °C.

Solución A (fase inferior)= 0,1 M fenol-Tris (saturada con fenol)
Solución B (fase superior)= 0,1 M Tris-fenol (saturada con Tris)

Extracción de la muestra

Se machacaron puntas de raíz en un mortero con N₂ líquido hasta obtener un polvo compacto. Aproximadamente 500 mg de este polvo se disolvieron en 6 mL de Solución A (0,1 M fenol-Tris). La mezcla se mantuvo en agitación (agitador magnético) durante 30 min a 4 °C. A continuación se centrifugó a 5.000 g (7.100 rpm, rotor SS-34), recogiendo la fase inferior. Se añadió a esta fase un volumen igual de Solución B, repitiendo el proceso de agitación y centrifugación y volviendo a recoger la fase inferior. A un volumen de esta fase se añadieron 4 volúmenes de acetato amónico 0,1 M en metanol frío manteniéndose al menos 4 h a -20 °C. Para recuperar las proteínas se centrifugó a 5.000 g (7.100 rpm, rotor SS-34) durante 15 min. El precipitado se lavó con metanol frío hasta la desaparición del olor a fenol. Los extractos se resuspendieron en tampón de solubilización, se hirvieron a 100 °C durante 3 min y se sonicaron durante 30 s (Sonicator^R XL, Heat Systems).

Tampón de solubilización

tampón Tris/HCl pH 7,8	100 mM
SDS	2,5% (p/v)
glicerol	20% (p/v)
β-mercaptoetanol	5% (v/v)

3.7.1.2.- Cuantificación de las proteínas

Las proteínas se han cuantificado sólo en la extracción con fenol, ya que éste fue el método elegido para la continuación del trabajo. Los tampones de solubilización utilizados contenían concentraciones altas de SDS y β-mercaptoetanol, incompatibles con cualquier método de cuantificación. Así pues, antes de cuantificar se realizó un paso previo de precipitación para eliminar cualquier posible interferencia. Se añadió TCA al 12% a una alícuota de muestra (1:1, v/v), manteniéndose a 4 °C al menos 1 h. A continuación, se centrifugó a 7.200 g (10.000 rpm, Microcentrifuge Force 7, Denver Instrument Company) durante 15 min. El precipitado se lavó dos veces con TCA al 6%, resuspendiéndose en 100 µL de H₂O ultrapura.

La medida de proteína se realizó con el sistema DC Protein System Assay (Bio-Rad, ref. 500-0116), basado en el método de Lowry *et al.* (1951).

Reactivo A= NaOH, tartrato sódico y sulfato de cobre
Reactivo B= reactivo de Folin

Se mezclan 100 µL conteniendo la muestra o patrón con 0,5 mL de reactivo A, agitándose en Vórtex. Se añaden 4 mL de reactivo B, agitándose en Vórtex inmediatamente. Se deja 15 min y se mide la absorbancia a 750 nm frente al

blanco. Como estándar se utiliza seroalbúmina bovina (BSA) diluída en H₂O ultrapura a partir de una disolución madre de 1 mg.mL⁻¹ (0,05-1 mg.mL⁻¹). Se utilizan tres diluciones diferentes de cada muestra.

3.7.1.3.- Electroforesis en una dimensión

La electroforesis en una dimensión se realizó en geles de poliacrilamida del 12,5% según el método de Laemmli (1970). Las dimensiones de los geles fueron de 160 x 175 mm con 0,75 mm de grosor. Los geles de separación y concentración se prepararon de la siguiente manera:

	Gel Separación (12,5 % acrilamida)	Gel Concentración (7,2% acrilamida)
acrilamida:bisacrilamida (30:0,8)*	15 mL	1,8 mL
Tris-HCl 3,0 M pH 8,8	4,5 mL	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	1,8 mL
SDS 10%	360 µl	75 µl
H ₂ O ultrapura	15,87 mL	3,825 mL
APS 10%	270 µl	37,5 µl
TEMED	18 µl	7,5 µl

* (% p/v)

Antes de añadir la mezcla del gel de concentración, se añadió alcohol isopropílico para polimerizar el gel de separación.

Las muestras se solubilizaron con el tampón de Laemmli (1970) con una relación 3 muestra: 1 tampón (v/v). Se cargaron 35 µg proteína/pocillo.

Tampón de Laemmli (para solubilización)

Tris-HCl pH 6,8	62,5 mM
β-mercaptoetanol	2% (v/v)
SDS	2,5% (p/v)
glicerol	20% (p/v)
azul de bromofenol	trazas

Tampón de electroforesis (x 10)

	g.L ⁻¹	Concentración final
Tris	30,3	0,25 mM
Glicina	144	1,92 M
SDS	10	1%

La electroforesis se mantuvo a una corriente constante de 40 mA, unas 5 h, hasta que el frente de azul de bromofenol salió del gel. Se utilizó la estándar de peso molecular de Biorad (Molecular Weight SDS-PAGE Standard, Low and High range) compuesta por:

miosina	200 kDa
β -galactosidasa	116,25 kDa
fosforilasa b	97,4 kDa
BSA	66,2 kDa
ovoalbúmina	45 kDa
anhidrasa carbónica	31 kDa
inhibidor de tripsina	21,5 kDa
lisozima	14,4 kDa

Los geles se tiñeron con azul de Coomassie durante 2 horas, y posteriormente se efectuaron dos lavados hasta que el fondo del gel apareció sin color.

Solución de teñido

azul de Coomassie R-250	0,25% (p/v)
metanol	45% (v/v)
ácido acético	9% (v/v)

Solución de lavado

metanol	25% (v/v)
ácido acético	8% (v/v)

3.7.1.4.- Electroforesis en dos dimensiones

La electroforesis en dos dimensiones se realizó según O'Farrell (1974) con las modificaciones introducidas por Herbig *et al.* (1996).

3.7.1.4.a.- Primera dimensión: IEF (isoelectroenfoque) desnaturalizante

La electroforesis de IEF se realizó en tubos de vidrio (150 mm x 3 mm, Pharmacia Biotech). Para evitar la formación de artefactos, los tubos se hirvieron en HCl 0,1 M durante 5 min, y después se lavaron en etanol.

Gel IEF

urea	8,25 g
acrilamida:bisacrilamida (28,38:1,62)*	2,0 mL
Tritón X-100 10%	3,0 mL
anfolitos Pharmacia, rango pH 5-8	0,6 mL
anfolitos Pharmacia, rango pH 3,5-10	0,15 mL
H ₂ O ultrapura	3,0 mL
TEMED	20 µL
APS 10%	25 µL
* (% p/v)	

Se cerraron los tubos por uno de los extremos con membrana de diálisis (Spectra/Por^R Membrane de 50 kDa de corte, Spectrum) y se sumergieron en 3 mL de urea 8 M. Se añadió la mezcla de acrilamida a los tubos y se cubrió cada tubo con 50 µL de urea 8 M para facilitar la polimerización. Tras una hora se cambió la urea por 20 µL del tampón de prefocalización y 5 µL de H₂O ultrapura, dejándose en reposo durante 2 h más.

Para la prefocalización se retiró la solución que quedaba sobre el gel polimerizado y se añadieron a cada tubo 20 µL de tampón de prefocalización, completando el volumen del tubo con el tampón superior (NaOH 20 mM). Se realizó una prefocalización de 1 h hasta alcanzar un voltaje de 750 V (InvestigatorTM 2-D Electrophoresis). Los tampones de electroforesis utilizados fueron ácido fosfórico 10 mM como tampón inferior y NaOH 20 mM como tampón superior. Ambos tampones se desgasificaron al vacío.

	Tampón de prefocalización
urea	9,5 M
Tritón X-100	10% (p/v)
anfolitos, rango pH 5-8	1,6% (v/v)
anfolitos, rango pH 3,5-10	0,4% (v/v)
β-mercaptoetanol	5% (v/v)

Después de realizada la prefocalización, se cargaron las muestras. En un tubo Eppendorf conteniendo 50 mg de urea, 3,5 µL de anfolitos (pH 3,5-10) y 25 µL de Tritón X-100 al 30% se añadió la muestra. El volumen de muestra fue siempre de 65 µL (conteniendo 50 µg de proteína para geles analíticos y 250 µg para geles preparativos). El contenido del Eppendorf se homogeneizó por agitación en un agitador Vórtex, se añadió 2 µL de azul de bromofenol (0,1% en etanol al 20%) y se cargó en el tubo. Sobre la muestra se colocaron 20 µL de overlay K (urea 9 M, 0,8%

anfolitos, rango pH 5-8, 0,2% anfolitos, rango pH 3,5-10) y se completó el volumen del tubo con tampón superior. La focalización se mantuvo durante 16 h a 750 V y 30 min a 1.500 V (13.500 V.h). Se utilizaron los estándares de peso molecular para geles de 2-D SDS-PAGE de Bio-Rad, compuestos por:

Proteína	M _R (kDa)	pI
conalbumina tipo I	76	6,0; 6,3; 6,6
seroalbúmina	66,2	5,0; 5,1; 5,2
actina	43	5,47; 5,5; 5,53
gliceraldehido 3-P deshidrogenasa	36	8,3; 8,5
anhidrasa carbónica	31	5,9; 6,0
inhibidor de tripsina	21,5	4,5
mioglobina	17,5	7,0

Una vez terminada la focalización, se sacaron los geles de los tubos y se mantuvieron 10 min con ligera agitación en el tampón de equilibración. Los geles se pueden guardar en este último tampón a -20 °C.

Tampón de equilibración

Tris-HCl pH 6,8	62,5 mM
SDS	12% (p/v)
glicerol	10% (p/v)
β-mercaptoetanol	5% (v/v)

El intervalo de pH obtenido en el IEF se comprobó mediante medidas de pH a lo largo del gel. Para hacer las medidas, tras terminar la primera dimensión, se tomó un gel y se cortó en trozos de 1 cm de longitud. Cada trozo se equilibró en 1 mL de H₂O ultrapura, agitándolo con Vórtex. Tras 1 h, se midió el pH de la solución en equilibrio con el gel con un pHmetro.

3.7.1.4.b.- Segunda dimensión: SDS-PAGE

La segunda dimensión se realizó según Laemmli (1970) en geles desnaturalizantes (160 mm x 180 mm con un grosor de 1,5 mm). Se han realizado pruebas con geles de 10, 12,5 y 15% de acrilamida y geles con gradiente de acrilamida 10-20%.

Geles de separación con concentración de acrilamida constante

1 gel	10%	12,5%	15%
acrilamida:bisacrilamida (30:0,8)*	10 mL	12,5 mL	15 mL
Tris-HCl 3 M, pH 8,8	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL
SDS 10%	300 µL	300 µL	300 µL
H ₂ O ultrapura	15,725 mL	13,225 mL	10,725 mL
APS 10%	225 µL	225 µL	225 µL
TEMED	15 µL	15 µL	15 µL

*(% p/v)

Geles de separación con gradiente de acrilamida entre 10-20%.

2 geles	20 %	10 %
sacarosa	1 g	-
acrilamida:bisacrilamida (30:0,8)*	6,6 mL	10 mL
Tris-HCl 2 M, pH 8,8	2 mL	6 mL
SDS 10%	100 µL	300 µL
H ₂ O ultrapura	hasta 10 mL	hasta 30 mL

*(% p/v)

A la hora de la polimerización se añadió

APS 10%	25 µL	75 µL
TEMED	4 µL	12 µL

El gradiente se formó al mezclar de forma progresiva la solución al 10% (22,5 mL) sobre la solución del 20% (9 mL) con un formador de gradientes.

En ambos casos, con o sin gradiente, se añadió alcohol isopropílico a la parte superior, dejándolo polimerizar durante 30 min. Antes de añadir el gel de concentración se retira cualquier traza de alcohol.

Gel de concentración (5,4% acrilamida)

	2 geles	4 geles
acrilamida:bisacrilamida (30:0,8)*	3,6 mL	7,2 mL
Tris-HCl 3 M, pH 8,8	3,6 mL	7,2 mL
SDS 10%	200 µL	300 µL
H ₂ O ultrapura	hasta 20 mL	hasta 30 mL
APS 10%	75 µL	150 µL
TEMED	15 µL	30 µL

*(%p/v)

Se añadió alcohol isopropílico a la parte superior, dejándolo polimerizar.

La conexión entre el gel de primera dimensión y el de segunda dimensión se realizó con agarosa (SERVA, Ref. 11404).

Solución para agarosa

agarosa	0,5% (p/v)
Tris/HCl pH 6,8	50 mM
SDS	0,1% (p/v)

La electroforesis en segunda dimensión se realizó en el sistema SE600 de Hoefer y se mantuvo durante 6 h a una corriente constante de 30 mA/gel.

3.7.1.4.c.- Tinción de los geles.

Tinción con nitrato de plata

Los geles analíticos (50 µg de proteína) se tiñeron con nitrato de plata, siguiendo el método descrito por Jungblut y Seifert (1990).

Fijación	metanol 30% ácido acético 10%	Toda la noche
Solución tiosulfato	etanol 30% Na ₂ CO ₃ 0,5 M glutaraldehído 0,5% Na ₂ S ₂ O ₃ 0,2%	1 hora
Lavado 1	H ₂ O ultrapura	4 x 15 minutos
Solución plata	AgNO ₃ 0,1% formaldehído 0,01%	20 minutos
Lavado 2	H ₂ O ultrapura	1 minuto
Desarrollo	Na ₂ CO ₃ 2,5% formaldehído 0,01%	hasta aparición de los puntos
Parada	EDTA 50 mM	

Tinción con azul de Coomasie

Los geles preparativos (250 µg de proteína) se tiñeron con azul de Coomasie. Para la tinción con Coomasie se utilizaron las siguientes disoluciones.

Solución de teñido (2 horas)

azul de Coomasie R-250	0,2%
metanol	30%
ácido acético	7%

Solución de lavado

metanol	30%
ácido acético	7%

3.7.1.5.- Determinación de actividad enzimática en los geles

Se realizaron medidas de la actividad FDH (formiato deshidrogenasa) y ADH (alcohol deshidrogenasa) en hojas y puntas de raíz de plantas de remolacha en condiciones control y de deficiencia de Fe.

Para la extracción de la muestra, se utilizó una relación 200 µg de material fresco/100 µL de tampón (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, glicerol 18%, β-mercaptoetanol 0,5%). La extracción se realizó mediante rotura mecánica en un Eppendorf, centrifugándose a continuación durante 10 min a 15.000 g (13.000 rpm, centrífuga Sigma-202MK). El sobrenadante se recogió, guardándose a -20 °C.

Se realizó una electroforesis no desnaturalizante, en el sistema Mini Protean II de Bio-Rad, con un gel de 0,75 mm de grosor.

	Gel de separación	Gel de concentración
acrilamida:bisacrilamida 30:0,8*	2 mL	0,75 mL
Tris 3 M pH 8,8	2,5 mL	-
Tris 1,5 M pH 6,8	-	1,25 mL
H ₂ O	hasta 20 mL	hasta 5 mL
APS 10% (p/v)	150 µL	50 µL
TEMED	10 µL	5 µL

* (% p/v)

La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 80 V durante 3 h a 4 °C. Tras terminar la electroforesis, el gel se equilibró a temperatura ambiente, durante 5-10 min, en tampón A (Tris-HCl 0,2 M pH 8, EGTA 0,04% (p/v)). Una vez equilibrado el gel, la actividad de FDH o ADH se detectó con la aparición de bandas coloreadas al tratar con una de las siguientes soluciones:

	FDH	ADH
tampón A	17,5 mL	17,5 mL
formiato 1 M	1,5 mL	-
etanol puro	-	1,5 mL
MgCl ₂ 0,5 M	-	100 µL
NAD ⁺ 1% (p/v)	0.5 mL	0,5 mL
azul de nitro-tetrazolio (NBT) 1% (p/v)	150 µL	150 µL
metosulfato de fenacina (PMS) 1% (p/v)	250 µL	250 µL

La coloración comienza a aparecer tras 30 minutos a 37 °C.

3.7.2.- Membrana plasmática de hojas de remolacha

3.7.2.1.- Preparación de la muestra.

Las proteínas totales de la membrana plasmática se extrajeron según el método descrito por Rémy y Ambard-Bretteville (1987) con ligeras variaciones. Se precipitaron las membranas, aisladas como se describe en el apartado 3.4.1, en acetona al 80% (v/v) conteniendo PVP 1% (p/v) y β -mercaptoetanol 0,07% (v/v) con una relación 1 mg de membrana/5 mL de solución, dejándolo toda la noche a -20 °C. Las proteínas se recuperaron por centrifugación a 14.300 g (12.000 rpm, rotor SS-34) durante 15 min, resuspendiéndose en el tampón de solubilización de las puntas de raíz (Herbik *et al.*, 1996) sustituyendo el Tritón X-100 por CHAPS al 10%. Se utilizó este detergente porque disminuye el ruido de fondo y las líneas de arrastre en los geles de membrana plasmática, y mejora la solubilización de la muestra.

3.7.2.2.- Cuantificación de proteínas

La cuantificación se realizó con el sistema DC Protein System Assay (Bio-Rad) basado en el método de Lowry *et al.* (1951) tal como se ha descrito en el apartado 3.7.1.2.

3.7.2.3.- Electroforesis en dos dimensiones

3.7.2.3.a.- Primera dimensión: IEF desnaturalizante

La electroforesis en primera dimensión IEF se realizó tal como se ha descrito para puntas de raíz (apartado 3.7.1.4.a) con ligeras variaciones.

Gel IEF

urea	9,25 g
acrilamida:bisacrilamida (24,76:1,24)*	2,45 mL
CHAPS 10% (p/v)	3,5 mL
anfolitos, rango pH 5-8	0,578 mL
anfolitos, rango pH 3,5-10	0,123 mL
H ₂ O ultrapura	3,85 mL
APS 10% (p/v)	35 μ L
TEMED	25 μ L

El tampón de prefocalización, overlay K y tampón de muestra fueron los mismos cambiando el Tritón X-100 por CHAPS. Se cargaron 100 μ g de proteína en cada gel.

3.7.2.3.b.- Segunda dimensión

Se utilizaron solamente geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12,5%. Se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.7.1.4.b.

3.7.2.3.c.- Tinción de los geles

Los geles se tiñeron con nitrato de plata según el protocolo descrito en el apartado 3.7.1.4.c.

3.7.3.- Mitocondrias de remolacha

3.7.3.1.- Preparación de la muestra

En las mitocondrias se han diferenciado proteínas totales por un lado y proteínas solubles e insolubles por otro.

Las proteínas totales se obtuvieron según Rémy y Ambard-Bretteville (1987). Las proteínas se precipitaron en acetona al 80% (v/v), dejándose 2 h a -20°C . Se centrifugó a 15.000 g (13.000 rpm, centrífuga Sigma-202MK) durante 15 min, resuspendiéndose el precipitado en el tampón de resuspensión.

Tampón de resuspensión (5 mL)

urea	1,38 g
CHAPS 10% (p/v)	500 μL
H ₂ O	980 μL
anfolitos, Pharmacia rango pH 5-8	70 μL
anfolitos, Pharmacia rango pH 3,5-10	30 μL
β -mercaptoetanol	50 μL

Para obtener las proteínas solubles e insolubles se realizó un choque osmótico previo a la precipitación con acetona. La solución utilizada para la resuspensión fue Tris 50 mM pH 8,0 con 1% de β -mercaptoetanol (v/v), con tres ciclos de congelación/descongelación en N₂ líquido. Se centrifugó a 120.000 g (60.000 rpm, ultracentrífuga Beckman TL-100, rotor TLA-100) durante 15 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$. Se separaron las proteínas solubles (sobrenadante) de las insolubles (precipitado). El precipitado se resuspendió en la solución de Tris 50 mM pH 8,0. Las dos preparaciones de proteínas se precipitaron con acetona al 80% (v/v), siguiendo el mismo proceso de resuspensión que para las proteínas totales.

3.7.3.2.- Electroforesis en dos dimensiones

Las electroforesis de dos dimensiones se realizaron con los sistemas Mini Protean II de Bio-Rad o SE600 de Hoefer, siguiendo el método de Rémy y Ambard-Bretteville (1987).

3.7.3.2.a.- Primera dimensión: IEF desnaturalizante

La mezcla para la polimerización del gel para IEF estaba formada por:

Gel IEF

urea	1,38 g
CHAPS 10% (p/v)	500 μ l
acrilamida:bisacrilamida (30:1,6)*	380 μ l
H ₂ O ultrapura	600 μ l
anfolitos, Pharmacia rango pH 5-8	70 μ l
anfolitos, Pharmacia rango pH 3,5-10	30 μ l
APS 10% (p/v)	5 μ l
TEMED	5 μ l
* (% p/v)	

Los tampones de electroforesis utilizados fueron ácido fosfórico 10 mM como tampón inferior y NaOH 20 mM como tampón superior. Se cargó la muestra directamente en el tampón de resuspensión, y se cubrió con 5 μ L de urea 3 M, completando el volumen del tubo con el tampón superior. No se realizó prefocalización. Se focalizó hasta 3.600 V.h (1 min 400 V, 10 min 600 V y 800 V el resto del tiempo) para los geles del sistema mini y hasta 8.000 V.h (10 min 300 V y 500 V el resto del tiempo) para los geles del sistema Hoefer. Una vez acabada la focalización los geles se equilibraron durante 10 min en el tampón de equilibración descrito en el apartado 3.7.1.4.a.

3.7.3.2.b.- Segunda dimensión: SDS-PAGE

La conexión entre los geles de la primera y segunda dimensión se realizó por contacto directo entre los geles. Para la segunda dimensión se utilizaron geles desnaturalizantes de poli(acrilamida) al 12% como los descritos en el apartado 2.7.1.4.b. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 140 V durante 1h (geles 80 mm x 10 mm, 1 mm grosor) ó 4 h (geles 160 mm x 180 mm, 1 mm grosor).

3.7.3.2.c.- Tinción de los geles

Los geles se tiñeron con azul de Coomasie (apartado 3.7.1.4.c) o con nitrato de plata según Heukeshoven y Dernik (1985).

Fijación	etanol 40% (v/v) ácido acético 10% (v/v)	toda la noche
Lavado 1	etanol 10% (v/v)	2 x 10 min
Lavado 2	H ₂ O ultrapura	2 x 10 min
Solución Tiosulfato	KFeCN 0,15% (p/v) Na tiosulfato 0,3% (p/v) Na ₂ CO ₃ 0,05% (p/v)	2 min
Lavado 3	H ₂ O ultrapura	1 lavado rápido 3 x 10 min
Solución Ag	AgNO ₃ 0,2% (p/v)	20 min
Lavado 4	H ₂ O ultrapura	3 min
Desarrollo 1	Na ₂ CO ₃ 2,5% (p/v)	5 min
Desarrollo 2	Na ₂ CO ₃ 2,5% (p/v) formaldehido (50 µl.100 mL ⁻¹)	aparición puntos
Parada	etanol 10% (v/v) ácido acético 5% (v/v)	

3.7.4.- Análisis de los geles

Los geles se analizaron mediante el sistema de análisis de imagen Bioimage (actualmente de Genomic Solutions).

3.8.- Identificación de los polipéptidos

3.8.1.- Transferencia de proteínas y secuenciación del amino terminal

Transferencia

Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon-P^{sq}, Millipore), con un tamaño de poro de 0,1 µm, y una superficie de 15 x 15 cm. La transferencia se hizo según Towbin *et al.* (1979) en un aparato TE42 de Hoefer-Pharmacia. El tampón de transferencia estaba formado por:

	g.L ⁻¹	Concentración final
Tris	3,03 g	25 mM
glicina	14,4 g	192 mM
metanol	50 mL	5%

Como tratamiento anterior a la transferencia se sumergió la membrana en metanol y a continuación se lavó en H₂O ultrapura (la membrana es muy hidrófoba y no se mojaría si se pusiera directamente en H₂O). Se incubaron la membrana y el gel durante 15 min en el tampón de transferencia. La transferencia se hizo durante 18 h a una corriente constante de 100 mA.

Tinción de las membranas

Para la localización de los polipéptidos, las membranas se tiñeron con el método de Eckerskorn y Lottspeich (1993).

	Solución de teñido	Solución de lavado
metanol	40%	40%
ácido acético	10%	10%
azul de Coomasie R-250	0,15%	-

La tinción se realizó durante 10 min, manteniendo la parte que había estado en contacto con el gel hacia arriba. Se realizaron tres lavados de 30 min y por último se lavó con H₂O ultrapura (2 x 15 min) para eliminar totalmente la glicina, ya que interfiere con la secuenciación. Las membranas se guardaron a -20 °C.

Secuenciación del amino terminal y búsqueda de homologías

Se cortó sobre la membrana el punto correspondiente al polipéptido elegido para secuenciar. La secuenciación se realizó con un secuenciador gaseoso (LF 3400 Beckman) siguiendo un procedimiento estándar (Herbik *et al.*, 1996). La búsqueda de homologías se realizó en la base de datos Swiss Prot (Pearson y Lipman, 1988).

3.8.2.- Inmunología

La electroforesis de dos dimensiones se realizó con el sistema Mini Protean II Bio-Rad según el método de Rémy y Ambard-Bretteville (1987) descrito en el apartado 3.7.3.2.a. Se cargaron 25 µg de proteínas de los extractos de puntas de raíz.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Protran^R, Schleicher & Schuell) según Towbin *et al.* (1979), tal y como se ha descrito en el apartado 3.8.1. Se utilizaron anticuerpos contra la formiato deshidrogenasa (FDH), ATPasa de la membrana mitocondrial y el sitio de fosforilación de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC). El protocolo seguido para la localización fue el siguiente:

Saturación	Tris 20 mM NaCl 0,9% (p/v) BSA 5% (p/v)	45 min temperatura ambiente
Lavado 1	Tris 20 mM NaCl 0,9% BSA 0,1%	3 x 10 min temperatura ambiente
Incubación anticuerpo	1/1000 PEPC 1/2000 ATPasa 1/4000 FDH	2 h temperatura ambiente
Lavado 2	Tris 20 mM NaCl 0,9% BSA 0,1%	3 x 10 min temperatura ambiente
Incubación segundo anticuerpo	1/2000 peroxidasa	45 min temperatura ambiente
Lavado 3	Tris 20 mM NaCl 0,9% BSA 0,1%	2 x 10 min
Lavado 4	Tris 20 mM NaCl 0,9%	2 x 5 min

Los anticuerpos utilizados son todos de conejo. El anticuerpo de PEPC es específico para el lugar de fosforilación del enzima. En todos los casos, el segundo anticuerpo utilizado se encontraba conjugado con una peroxidasa (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Horseradish Peroxidase Conjugate, de Bio-Rad), que fue la reacción que se utilizó para la identificación. El revelado de la actividad peroxidasa se realizó con el siguiente tampón:

(Tris 20 mM, NaCl 0,9%) x 2	8,5 mL
4-cloronaftol	9 mg.mL ⁻¹ etanol
H ₂ O ultrapura	hasta 17 mL
H ₂ O ₂	50 µl

La presencia del anticuerpo se detectó por la aparición de puntos de color violeta. La coloración se paró con H₂O destilada.

3.9.- Respuestas de frutales ante la deficiencia

3.9.1. Actividad FC-R

3.9.1.1.- Actividad FC-R en planta entera *in vivo*

Al igual que para la reducción de Fe por la membrana plasmática en hojas de remolacha, se siguió la formación del complejo Fe(II)-BPDS (Bienfait *et al.*, 1983) según los métodos descritos por Romera *et al.* (1991) y Susín *et al.* (1996).

Medio de reacción

tampón MES-KOH 10 mM pH 5 BPDS 300 μ M Solución nutritiva sin microelementos ni Fe Fe(III)-EDTA 500 μ M (para iniciar la reacción)

Se lavaron las plantas durante 1 h con H₂O o EDTA 500 μ M y se pasó cada planta a un recipiente opaco conteniendo 200 mL de medio de reacción, manteniendo la aireación constante. La reacción se inició con la adición de 500 μ M Fe(III)-EDTA, tomándose alícuotas del medio a tiempos determinados. El pH del medio de reacción se comprobó al inicio y final del experimento. Se midió la absorbancia a 535 nm en un espectrofotómetro Shimadzu 2101-PC con una rendija de 1 nm. Se aplicó un coeficiente de extinción de 22,14 mM⁻¹.cm⁻¹. Las medidas se hicieron por triplicado en plantas diferentes. Se descontó la reducción inespecífica midiéndola con el medio de reacción sin las plantas. El crecimiento de las raíces a lo largo del tratamiento se determinó como volumen. Al final del experimento se cortaron las raíces y se pesaron, correlacionando así el volumen con el peso de raíz.

3.9.1.2.- Actividad FC-R en puntas de raíz

Se decidió realizar medidas de actividad FC-R sólo en las puntas de raíz debido a la heterogeneidad y variabilidad del sistema radicular de los frutales cultivados en medio hidropónico. La actividad reductora de Fe se encuentra mayoritariamente localizada en esta zona de las raíces (Marschner, 1995; Romera *et al.*, 1991).

Medio de reacción

solución nutritiva sin microelementos ni Fe pH 5 BPDS 300 μ M Fe(III)-EDTA 400 μ M (para iniciar la reacción)

Se lavaron las puntas de raíz (1-3 puntas, aproximadamente 1 mg de peso fresco) en 1 mL de solución nutritiva (sin microelementos ni Fe) durante 20 min. A continuación se secaron cuidadosamente sobre un papel de filtro y se pasaron a un Eppendorf que contenía medio de reacción. La reacción se inició al añadir 400 μM Fe(III)-EDTA para un volumen final de 1 mL, dejándose en oscuridad entre 10-20 min. Se centrifugaron los tubos y se midió la absorbancia a 535 nm como en el apartado anterior. Se utilizaron blancos sin muestra para eliminar la reducción inespecífica.

3.9.1.3.- Localización de la actividad FC-R

La actividad FC-R se visualizó por la formación del complejo estable de color rojo Fe(II)-BPDS (Marschner *et al.*, 1982). El medio utilizado fue:

0,25% agar
tampón MES-KOH 5 mM pH 5,0
Fe(III)-EDTA 100 μM
BPDS 500 μM
solución nutritiva sin microelementos ni Fe

Se calentó el agar en la solución nutritiva para disolverlo. Se dejó enfriar la solución hasta una temperatura en la que el agar se mantuviera fluido (unos 35 °C), y se disolvieron el resto de los reactivos. Se introdujeron las muestras de raíz en la disolución en una placa de Petri forrada con papel de aluminio, y se dejó entre 10-30 min en oscuridad.

3.9.2.- Acidificación del medio

3.9.2.1.- Variación del pH en la solución nutritiva

Se midió directamente el pH de la solución nutritiva con un pHmetro (HI 9025 Microcomputer pHmeter, Hanna Instruments). Sólo se realizaron medidas en la solución nutritiva de las plantas con una concentración de 1 μM Fe, ya que el pH de la solución de 30 μM Fe se mantuvo constante de forma artificial a un valor de 5,5.

3.9.2.2.- Localización de la disminución del pH

La localización de la zona de la raíz donde se produce la extrusión de los protones y por lo tanto una disminución del pH, se realizó en medio sólido con el método descrito por Romera *et al.* (1991). El sistema es el mismo que para la localización de la reducción pero utilizando como indicador de pH púrpura de bromocresol, que toma una coloración púrpura para $\text{pH} > 6,8$ y amarilla para

pH<5,2. El pH se ajustó a 6,0, quedando un medio transparente que permitía observar con nitidez los cambios de pH en ambos sentidos. El medio de reacción estaba compuesto por:

|| 0,25% agar
|| púrpura de bromocresol 0,3 mM
|| solución nutritiva sin microelementos ni Fe, pH 6,0

Se calentó el agar en la solución nutritiva para disolverlo. Se dejó enfriar la solución hasta una temperatura en que el agar se mantuviera fluido (unos 35 °C), y se disolvieron el resto de los reactivos. Se introdujeron las muestras de raíz en la disolución en una placa de Petri, dejándolo entre 10-30 min.

3.9.3.- Análisis de macro y micronutrientes en hojas

Se siguieron los métodos estándar descritos en Abadía *et al.* (1985; 1989). Se lavaron las hojas, aclarándolas con abundante H₂O destilada. Se despeciolaron y se secaron en estufa a 60 °C. Los procedimientos seguidos para medir la concentración de los nutrientes cumplen la normativa de la AOAC, 1990 (Association of Official Analytical Chemists). El fósforo (P) se analizó espectroscópicamente por la formación de un complejo de vanadato y molibdato en presencia de ácido fosfórico. El potasio (K) se midió por espectroscopía de emisión de llama y el calcio (Ca), magnesio (Mg), hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu) y cinc (Zn) se midieron por espectrometría de absorción atómica en un aparato Unicam 929 AA Spectrometer.

RESULTADOS

4.- RESULTADOS

	pág
4.1.- Respuestas inducidas por la deficiencia de Fe en hojas de remolacha	103
4.1.1.- Reductasa férrica en la membrana plasmática de hoja	103
4.1.1.1.- Optimización del aislamiento de membrana plasmática de hoja	103
4.1.1.2.- Caracterización y comprobación de la pureza de la membrana plasmática	106
4.1.1.3.- Caracterización de la reductasa férrica de membrana plasmática	108
4.1.1.3.a.- Dependencia del pH	109
4.1.1.3.b.- Variación de la actividad con la relación Fe : quelato	110
4.1.1.3.c.- Cinéticas de la actividad reductasa férrica	113
4.1.1.3.d.- Reducción de Fe en condiciones de anaerobiosis	123
4.1.1.3.e.- Efecto de los detergentes Tritón X-100 y Brij 58 en la reducción de Fe	125
4.1.1.3.f.- Reducción en un medio análogo al apoplasto	134
4.1.1.3.g.- Reducción de Fe en presencia de flavinas	135
4.1.1.4.- Reductasa férrica en condiciones de deficiencia severa	138
4.1.1.5.- Especiación de los complejos y su relación con la actividad reductasa	139
4.1.1.5.a.- Fe(III)-citrato	140

4.1.1.5.b.- Fe(III)-malato	146
4.1.1.5.c.- Estructura de los complejos	152
4.1.2.- Reductasa férrica en cloroplastos	153
4.1.3.- Reductasa férrica en protoplastos	153
4.1.3.1.- Aislamiento de protoplastos	153
4.1.3.2.- Caracterización de la reductasa férrica en los protoplastos	157
4.2.- Variación de los patrones polipeptídicos inducida por la deficiencia de Fe	163
4.2.1.- Puntas de raíz	163
4.2.1.1.- Obtención de la muestra	163
4.2.1.2.- Geles monodimensionales SDS-PAGE	165
4.2.1.3.- Geles de dos dimensiones	165
4.2.1.3.a.- Comparación de perfiles polipeptídicos en condiciones control y con deficiencia de Fe	166
4.2.1.3.b.- Expresión de polipéptidos tras la adición de Fe	173
4.2.1.4.- Identificación de polipéptidos	179
4.2.1.4.a.- Secuenciación del amino terminal	179
4.2.1.4.b.- Inmunoidentificación de los polipéptidos	181
4.2.2.- Membrana plasmática: geles bidimensionales	183
4.2.3.- Identificación de polipéptidos comunes de puntas y membrana plasmática	188
4.2.4.- Mitocondrias	189
4.2.4.1.- Mitocondrias de hojas	189
4.2.4.2.- Mitocondrias de raíces	191
4.3.- Respuestas de frutales ante la deficiencia de Fe	193
4.3.1.- Adaptación al cultivo hidropónico	193
4.3.2.- Reducción de Fe	197
4.3.2.1.- Reducción en planta entera <i>in vivo</i>	197
4.3.2.2.- Reducción en puntas de raíz	198
4.3.2.3.- Localización de la reducción	199
4.3.3.- Acidificación del medio	199
4.3.3.1.- Variación del pH de la solución nutritiva	199
4.3.3.2.- Localización de la disminución del pH	201
4.3.4.- Análisis de macro y microelementos en hojas	201

4.- RESULTADOS

4.1.- Respuestas inducidas por la deficiencia de Fe en hojas de remolacha

4.1.1.- Reductasa férrica en la membrana plasmática de hoja

4.1.1.1.- Optimización del aislamiento de membrana plasmática de hoja

El aislamiento de membrana plasmática de hojas se realizó mediante separación en un sistema de doble fase de polímeros (Larsson, 1985). En primer lugar se utilizó el protocolo de aislamiento descrito por Larsson *et al.* (1988) para hojas de remolacha. Cuando se añade una preparación conteniendo distintas membranas celulares a un sistema de doble fase de polímeros, éstas se distribuyen en función de sus propiedades de superficie (Albertson, 1971). Así, la membrana plasmática se concentra preferentemente en la fase superior, rica en PEG, mientras que el resto de las membranas lo hacen en la fase inferior, rica en dextrano. Hay que buscar las condiciones idóneas que faciliten esta distribución, lo que se consigue cambiando la concentración tanto de los polímeros como de las sales en el medio de aislamiento. Cerca del punto crítico de separación, con una

concentración de los polímeros de 5,5%, todas las membranas se dirigen a la fase superior. A medida que aumenta la concentración de los polímeros, las membranas se empiezan a dirigir hacia la fase inferior. Esto es debido a la naturaleza hidrófoba/hidrófila de las membranas (se asume que la fase superior es más hidrófoba al aumentar la concentración). La adición de sales, por su parte, produce una diferencia de cargas entre ambas fases.

Para optimizar la purificación se realizaron separaciones variando la concentración final de los polímeros en el sistema de doble fase (de 5,7 a 6,7%), manteniendo constante la concentración salina (5 mM de KCl). También se varió la concentración de KCl (de 2 a 20 mM), manteniendo constante la concentración de polímeros (6,5%). Se determinó tanto la cantidad de membrana plasmática obtenida como la pureza de las fracciones correspondientes a las fases finales superior e inferior. Los resultados se muestran en los Cuadros 5 y 6.

muestra	mg proteína	actividad ATPasa (MP)	inhibición ATPasa (%)	tonoplasto	mitocondria
F. microsomal	21,42 mg	327		60	103
5,7%					
Fase superior	2,54 mg	103	33%	42	249
Fase inferior	0,21 mg	13		83	2667
6,0%					
Fase superior	0,54 mg	155	14%	0	51
Fase inferior	1,43 mg	63		93	1512
6,2%					
Fase superior	0,84 mg	328	42%	0	8
Fase inferior	0,95 mg	150		143	1716
6,7%					
Fase superior	0,49 mg	432	52%	0	0
Fase inferior	0,52 mg	14		77	240

Cuadro 5: Determinación de las cantidades y pureza del material obtenido en la separación de doble fase de polímeros cuando se varió la concentración final de los polímeros manteniendo constante la de KCl (5 mM). Se partió de 70 g de hojas. La fracción microsomal se dividió en cuatro alícuotas. La contaminación por membrana de tonoplasto se determinó por la actividad ATPasa en presencia de NO_3^- . La contaminación por membrana mitocondrial se determinó por la actividad citocromo c-oxidasa. Todas las actividades se expresaron en $\text{nmol} \cdot (\text{mg proteína})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

La pureza de la fase superior se mide como actividad ATPasa, teniendo en cuenta que la inhibición de la ATPasa de membrana plasmática debería ser de 30-70% con una concentración de 50 μM vanadato. La pureza de la membrana

plasmática en la fase superior aumentó al aumentar la concentración de los polímeros en la doble fase (Cuadro 5). En cambio, para el enzima marcador de membrana del tonoplasto (ATPasa sensible a nitrato) la actividad en la fase superior disminuye cuando aumenta la concentración de polímero. Para el marcador mitocondrial ocurre algo similar. Así, la membrana plasmática de mayor pureza se consigue a las concentraciones de los polímeros más altas dentro del rango de inmiscibilidad.

muestra	mg proteína	actividad ATPasa (MP)	inhibición ATPasa (%)	tonoplasto	mitocondria
F. microsomal	32,46	79		13	165
2 mM					
Fase superior	0,93 mg	265	30%	48	28
Fase inferior	1,65 mg	127		9	1051
5 mM					
Fase superior	0,89 mg	256	30%	43	10
Fase inferior	1,88 mg	192		22	1168
10 mM					
Fase superior	0,51 mg	111	37%	27	22
Fase inferior	1,82 mg	77		48	855
20 mM					
Fase superior	0,26 mg	40	58%	26	7
Fase inferior	1,98 mg	93		57	874

Cuadro 6: Determinación de las cantidades y pureza del material obtenido en la separación de doble fase de polímeros cuando se varió la concentración de KCl manteniendo constante la de los polímeros (6,5%). Se partió de 74 g de hojas. La fracción microsomal se dividió en cuatro alícuotas. La contaminación por membrana de tonoplasto se determinó por la actividad ATPasa en presencia de NO_3^- . La contaminación por membrana mitocondrial se determinó por la actividad citocromo c-oxidasa. Todas las actividades se expresaron en $\text{nmol} \cdot (\text{mg proteína})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Por otra parte, se apreció que cuanto mayor es la concentración de KCl en el sistema de doble fase, mayor es la selectividad de la separación, pero se obtiene peor rendimiento (Cuadro 6). Esto se vió claramente con 20 mM de KCl, que daba una inhibición del 58%, lo que indicaría una selectividad muy alta, con muy bajos valores para la actividad ATPasa inhibida por vanadato y la cantidad de material recogido. La actividad relativa de los enzimas marcadores de contaminación (tonoplasto y mitocondria) en la fase superior mejora al aumentar la concentración de KCl en el sistema de doble fase. De dichos resultados se deduce que es necesario una concentración alta de polímeros para conseguir membranas suficientemente

puras (Cuadro 5) y concentraciones no muy altas de KCl (Cuadro 6) para obtener buenos rendimientos.

Así, para el aislamiento de la membrana plasmática de las hojas de remolacha utilizadas en este trabajo se decidió modificar las condiciones descritas por Larsson *et al.* (1988), aumentando la concentración de polímeros de 6,2 a 6,5% y manteniendo la de KCl en 5 mM.

4.1.1.2.- Caracterización y comprobación de la pureza de la membrana plasmática

Se aisló membrana plasmática de hojas de plantas de remolacha cultivadas en condiciones control (+Fe) con una concentración de clorofila de 250 $\mu\text{mol.m}^{-2}$, y de deficiencia (-Fe) con una concentración de clorofila entre 70-100 $\mu\text{mol.m}^{-2}$. Generalmente, los rendimientos medios obtenidos una vez estandarizado el método fueron, para un peso inicial de 60 g de hojas, de aproximadamente 50 mg de proteína en la fracción microsomal y de entre 7 y 8,5 mg de proteína para la membrana plasmática. El Cuadro 7 muestra los niveles de recuperación de la membrana plasmática a lo largo de la purificación para plantas control y deficientes en Fe.

	Proteína		Actividad ATPasa
	$\mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$	mg	nmol Pi.(mg proteína) $^{-1}.\text{min}^{-1}$
Plantas control			
Homogeneizado	7,4	2130	-
Precipitado 1	17,1	246	-
Sobrenadante 2	6,0	1570	-
Fracción microsomal	11,4	49	109 \pm 17
MP	7,5	7,0	286 \pm 27 (2,6)
FI ₁	12,4	25	56 \pm 12 (0,5)
FI ₂	4,4	1,8	83 \pm 23 (0,8)
Plantas deficientes en Fe			
Homogeneizado	6,6	1880	-
Precipitado 1	7,6	109	-
Sobrenadante 2	5,8	1520	-
Fracción microsomal	12,2	48	134 \pm 23
MP	8,7	8,5	337 \pm 49 (2,5)
FI ₁	12,4	26	37 \pm 18 (0,3)
FI ₂	4,6	2,1	65 \pm 17 (0,5)

Cuadro 7: Purificación de la membrana plasmática de hojas de plantas de remolacha cultivadas en condiciones control y de deficiencia de Fe. Se midió la cantidad de proteína y la actividad ATPasa (enzima marcador de MP) presentes en cada paso de purificación. Entre paréntesis se muestra el enriquecimiento en la doble fase de polímeros respecto a la actividad de la fracción microsomal.

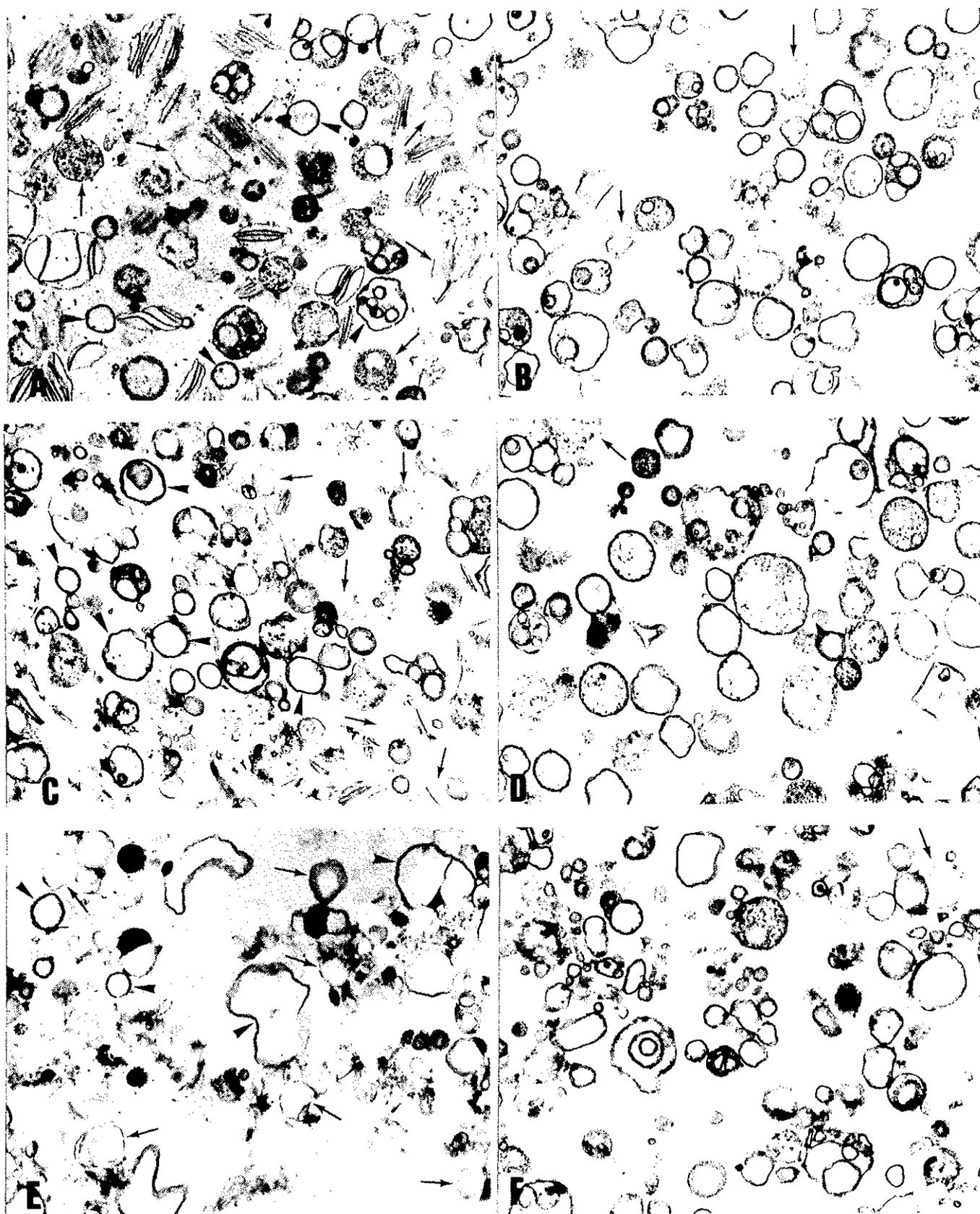


Figura 11: Microscopía electrónica de preparaciones de fracción microsomal (A, C y E) y membrana plasmática (B, D, F) de hojas control (A, B), con deficiencia moderada (C y D) y deficiencia severa (E y F). Las vesículas teñidas (membrana plasmática) se marcan con puntas de flecha. Las vesículas sin teñir (contaminantes) se marcan con flechas (35.000 aumentos).

Una vez conseguido el aislamiento de membrana plasmática de hojas el siguiente paso fue comprobar la pureza de las preparaciones, para su posterior utilización en las determinaciones de este trabajo.

La fracción correspondiente a la membrana plasmática contenía un 72-81% del total de la actividad específica de ATPasa sensible al vanadato en el sistema de doble fase. Dicha actividad mostró un enriquecimiento de 2,6 y 2,5 veces en la fracción correspondiente a la membrana plasmática respecto a las correspondientes fracciones microsomales para los aislamientos de hojas control y deficientes en Fe respectivamente (Cuadro 7). La latencia de la actividad ATPasa en preparaciones de membrana plasmática recién aisladas fue de un 73% para las plantas control y de un 79% para las plantas deficientes en Fe, lo que indica que las vesículas obtenidas se encontraban mayoritariamente en la orientación celular natural ("right-side-out"; Larsson *et al.*, 1984). Se sabe que la membrana mitocondrial es el contaminante mayoritario en este tipo de aislamiento. En nuestro caso, la contaminación mitocondrial encontrada fue menor del 4% para las plantas control y del 6% para las deficientes en Fe.

La determinación de la pureza de la membrana plasmática se ratificó por un análisis mediante microscopía electrónica, utilizando la tinción específica para membrana plasmática descrita por Roland *et al.* (1972). Con esta tinción la doble capa lipídica de la membrana plasmática queda teñida de negro o gris oscuro por la acción del ácido fosfotúngstico, mientras que la doble capa lipídica de las membranas correspondientes a otros orgánulos celulares no se colorea (Figura 11). El análisis mostró que la membrana plasmática era un $30,2 \pm 4,7\%$ y $38,4 \pm 4,1\%$ de la fracción microsomal de hojas control y deficientes en Fe respectivamente, mientras que en las preparaciones finales de la membrana plasmática representaba un $95,2 \pm 1,9\%$ y $94,3 \pm 1,8\%$ del total en hojas control y deficientes en Fe respectivamente (Figura 11a, b, c y d).

4.1.1.3.- Caracterización de la reductasa férrica de membrana plasmática

La caracterización de la reducción de Fe por la membrana plasmática se realizó con NADH como donador de electrones y Fe(III)-EDTA, Fe(III)-citrato, Fe(III)-malato y KFeCN como aceptores de electrones. En un estudio previo con preparaciones de membrana plasmática de raíz de remolacha se habían establecido como condiciones óptimas para la medida de la reductasa férrica un pH de 6,8 y una concentración de Fe de 500 μM (Susín *et al.*, 1996). Las actividades específicas obtenidas en dichas condiciones para las preparaciones de membrana

plasmática de hoja de remolacha en condiciones control y deficientes en Fe se muestran en el Cuadro 8

	+Fe	-Fe	-Fe/+Fe
Fe(III)-EDTA	111 ± 8	144 ± 10	1,3
KFeCN	928 ± 70	1401 ± 161	1,5
Fe : Citrato 1 : 5	96 ± 11	121 ± 10	1,3
Fe : Malato 1 : 25	83 ± 9	123 ± 8	1,5

Cuadro 8: Actividad de la reductasa férrica de membrana plasmática de hojas en presencia de distintos complejos de Fe. La concentración de los complejos de Fe fue de 500 μ M. La actividad se midió a pH 6,8. Las actividades se expresan como nmol Fe reducido.(mg proteína)⁻¹.min⁻¹ y son la media de 6 medidas \pm EE.

Independientemente del complejo de Fe utilizado como aceptor, se obtuvo un aumento de la actividad de las preparaciones deficientes en Fe respecto a las controles. Este aumento fue de 1,5 veces para el Fe(III)-malato y KFeCN y de 1,3 veces para Fe(III)-EDTA y Fe(III)-citrato. La mayor actividad se obtuvo con el aceptor no fisiológico KFeCN. Las actividades con Fe(III)-EDTA, Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato fueron del mismo orden, y aproximadamente 10 veces menores a las obtenidas con KFeCN. El Fe(III)-EDTA presentó una mayor actividad que Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato tanto en preparaciones control como deficientes, con una diferencia de 14-25% para los controles y 16% para las deficientes. Comparando Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato, posibles transportadores de Fe dentro de la planta, el Fe(III)-citrato presentó una actividad algo más alta en condiciones control, mientras que en deficiencia de Fe las actividades de ambos son prácticamente iguales.

4.1.1.3.a.- Dependencia del pH

Como cualquier actividad enzimática, la actividad reductora de Fe depende del pH al que se realice el ensayo. Por ello, se ha estudiado la reducción de Fe con tres sustratos (Fe(III)-EDTA, Fe(III)-malato y Fe(III)-citrato) en un intervalo de pH de 5,0 a 8,0.

La dependencia del pH de la actividad Fe(III)-EDTA reductasa de membrana plasmática se muestra en la Figura 12. Se obtuvo un perfil de pH similar para las membranas de hojas control y deficientes en Fe, siendo siempre mayores los valores para las membranas de hojas deficientes. El máximo de actividad se encontró a un pH de 6,8 en ambos casos.

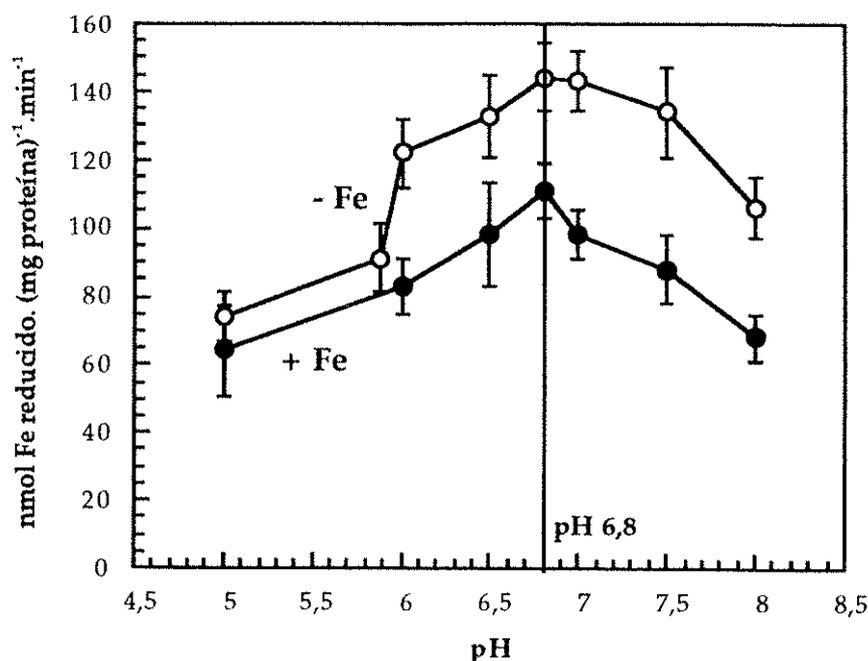


Figura 12: Variación de la actividad Fe(III)-EDTA reductasa de la membrana plasmática de hojas en función del pH. Las actividades son la media de 6 medidas \pm EE.

La dependencia de la actividad reductasa en función del pH para los complejos de Fe : citrato (relación 1 : 5) y Fe : malato (relación 1 : 25) se muestra en las Figuras 13 y 14 respectivamente. Las variaciones de la actividad reductasa de las membranas control y deficientes fueron similares en todos los casos, presentando máximos cercanos a 6,8, tal y como se encontró para el Fe(III)-EDTA. En el caso de membranas deficientes el máximo para Fe(III)-malato fue para un pH ligeramente más ácido (6,5). También para Fe(III)-malato la diferencia de actividad entre controles y deficientes a valores de pH bajos (5,0-6,0) era mayor que a valores de pH más altos (6,5-8,0).

4.1.1.3.b.- Variación de la actividad con la relación Fe : quelato

Se sabe que en condiciones de deficiencia de Fe la concentración de aniones orgánicos en el apoplasto aumenta. Los aniones que presentan un mayor aumento son citrato y malato (López-Millán *et al.*, 1997), dos aniones capaces de formar complejos moleculares con el Fe. El aumento de citrato y malato provoca un cambio en la relación Fe : aniones orgánicos que podría producir cambios en la actividad reductasa. Por esta razón, se ha estudiado la variación de la actividad reductasa en función de la relación Fe : anión para Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato.

Para el Fe(III)-citrato se variaron las relaciones de 1 : 1 a 1 : 500. Se hicieron dos series de determinaciones, una con una concentración 500 μ M del complejo, y otra con una concentración de 100 μ M del complejo. La razón para

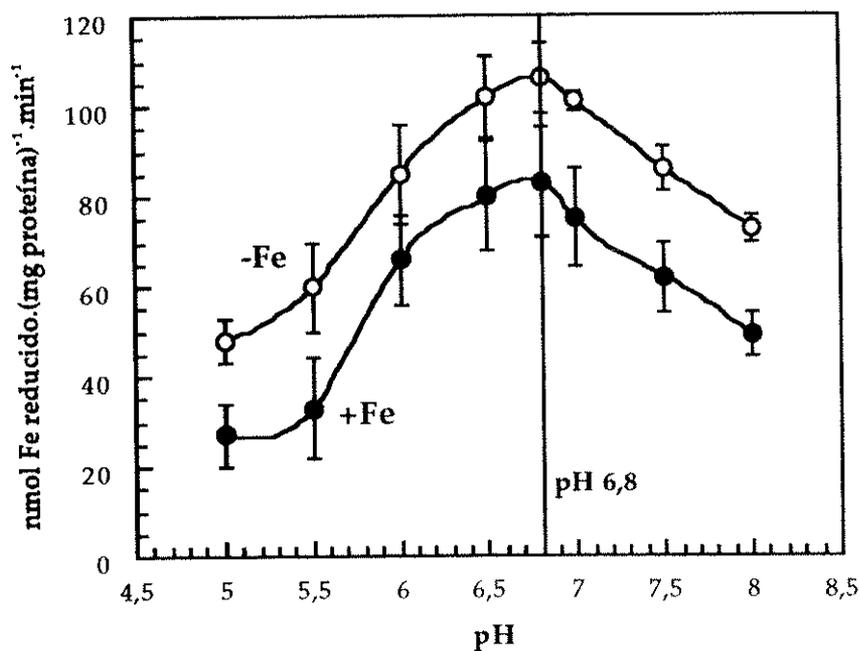


Figura 13: Variación de la actividad FC-R de la membrana plasmática de hojas con Fe : citrato (relación 1 : 5) en función del pH. Las actividades son la media de 3 medidas \pm EE.

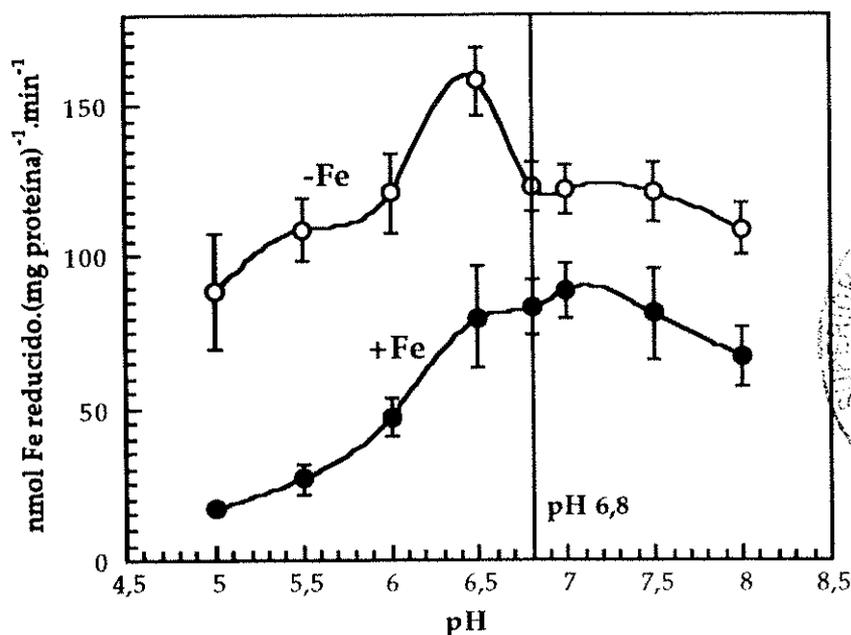


Figura 14: Variación de la actividad FC-R de la membrana plasmática de hojas con Fe : malato (relación 1 : 25) en función del pH. Las actividades son la media de 3 medidas \pm EE.

utilizar estas dos concentraciones fue que con 500 μM de Fe no se puede obtener la relación 1 : 500 por problemas de solubilidad.

La actividad reductasa depende de la relación Fe : citrato presente en el medio de reacción (Figura 15). El máximo de actividad fue para una relación Fe : citrato de 1 : 5, tanto para las membranas de plantas control como de las deficientes en Fe. Para valores superiores de dicha relación la actividad reductasa disminuyó. En estudios previos (Holden *et al.*, 1991) se habían señalado aumentos de la actividad reductasa al aumentar la relación Fe : citrato.

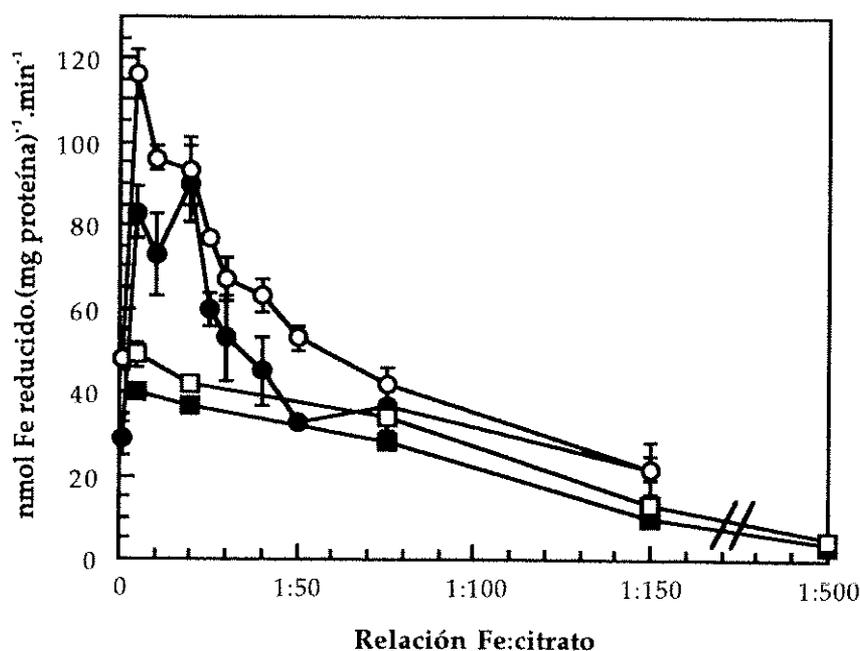


Figura 15: Actividad reductasa férrica en función de la relación Fe : citrato y su concentración. Actividad para las plantas control (●, ■) y deficientes (○, □) a una concentración de 500 μM Fe (●, ○) o 100 μM (■, □). La actividad se midió a pH 6,8. Las actividades son la media de 3 medidas \pm EE.

La actividad reductasa férrica en función de la relación Fe : malato se determinó variando las relaciones entre 1 : 2 y 1 : 50 con una concentración del complejo de 500 μM . El perfil de la actividad reductasa férrica en función de la relación Fe : malato resultó completamente diferente al obtenido con Fe : citrato (Figura 16). Así, se observó un fuerte aumento de la actividad reductasa a medida que aumentaba la relación Fe : malato, hasta una relación de 1 : 15. A partir de dicho valor la actividad reductasa sólo aumentó ligeramente.

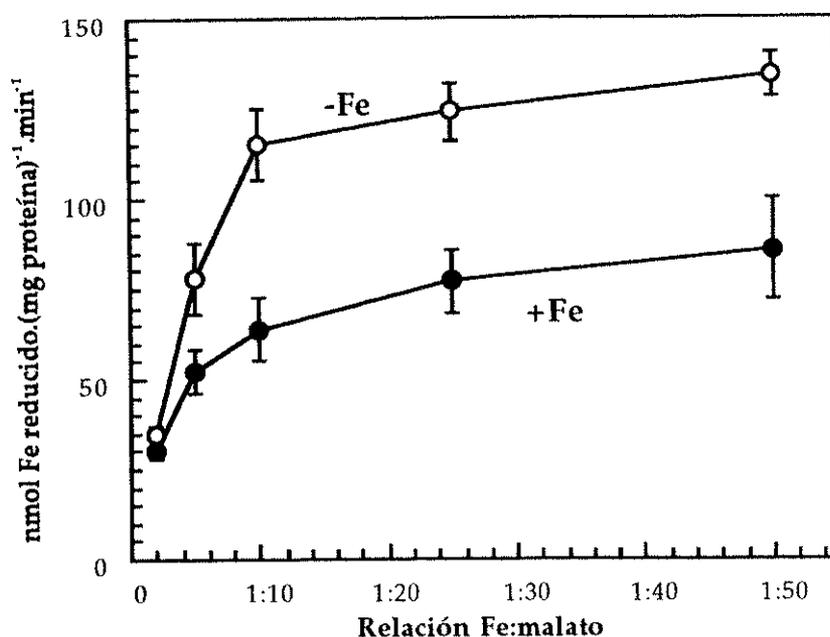


Figura 16: Actividad reductasa férrica en función de la relación Fe : malato. La concentración del complejo fue de 500 μM . La actividad se midió a pH 6,8. Las actividades son la media de 3 medidas \pm EE.

4.1.1.3.c.- Cinéticas de la actividad reductasa férrica

En general, la reducción de Fe(III) depende de la concentración de los distintos complejos de Fe(III) (Figuras 17, 19, 21, 23, 25 y 27). La actividad se saturaba a una concentración de quelato de Fe de aproximadamente 500 μM . En todos los casos la actividad encontrada en membrana plasmática de plantas deficientes en Fe fue mayor que la encontrada en los controles. Las cinéticas obtenidas para todos los complejos fueron del tipo Michaelis-Menten (Figuras 18, 20, 22, 24, 26 y 28). A partir de las gráficas citadas se determinaron los valores cinéticos (K_m y V_{max}) de la actividad reductasa férrica con los complejos de Fe utilizados (Fe(III)-EDTA, KFeCN, Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato; Cuadro 9).

Para Fe(III)-EDTA los valores de K_m fueron de 103 ± 19 y 122 ± 19 μM para las preparaciones control y deficiente respectivamente. La velocidad máxima fue superior para las membranas deficientes que para los controles (relación -Fe/+Fe de 1,5) con unos valores de 175 ± 19 y 114 ± 15 nmol Fe reducido.(mg proteína) $^{-1}$.min $^{-1}$ respectivamente.

En el caso de KFeCN se ha encontrado una gran actividad en membrana plasmática tanto de plantas controles como de deficientes (Figura 19). En el caso de plantas deficientes dicha actividad alcanza valores superiores a 1.300 nmol Fe reducido.(mg proteína) $^{-1}$.min $^{-1}$. El KFeCN tiene un potencial redox muy bajo lo que

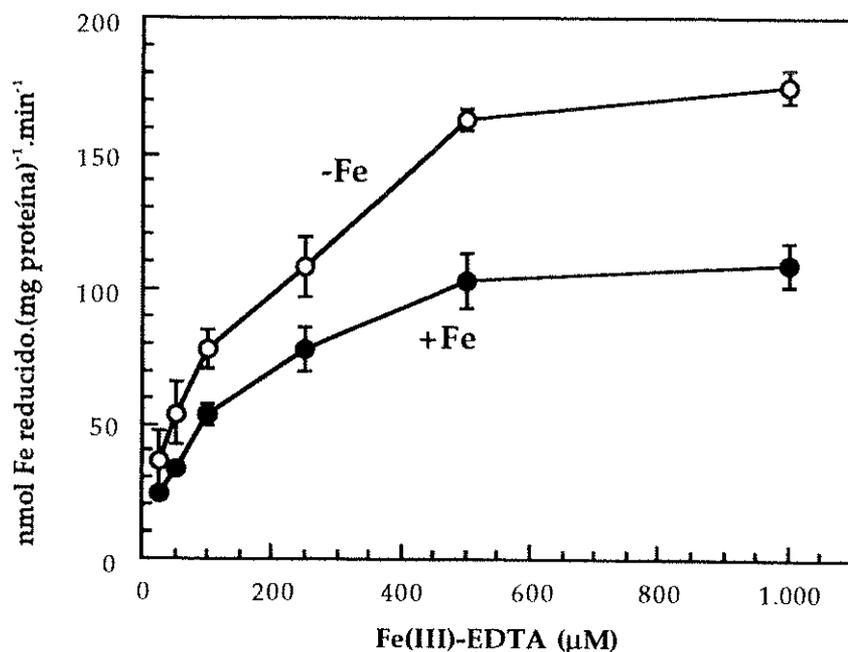


Figura 17: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con concentraciones de Fe(III)-EDTA. La concentración del complejo fue de 500 μM. La actividad se midió a pH 6,8. Las actividades son la media de 6 medidas ± EE.

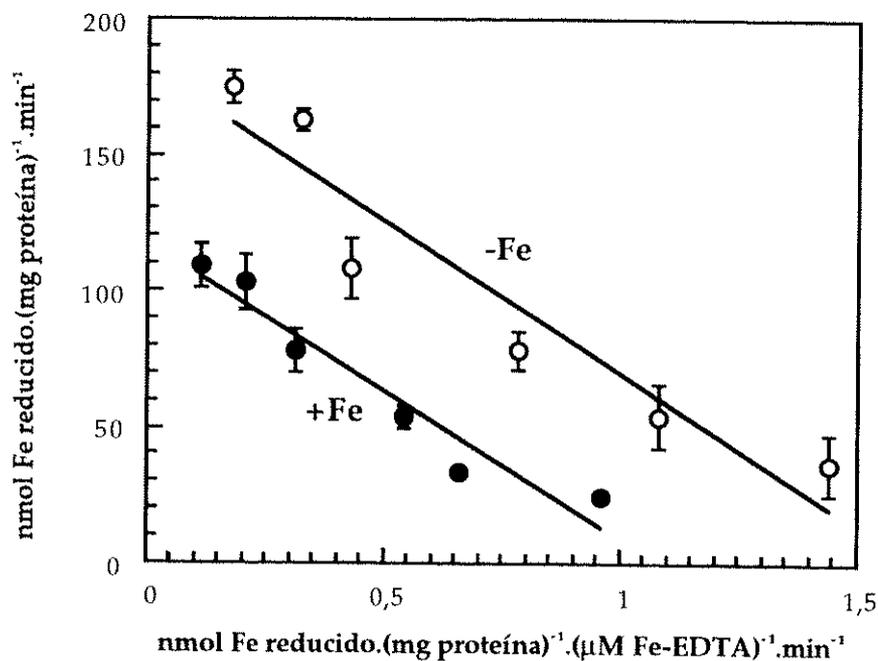


Figura 18: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con diferentes concentraciones de Fe(III)-EDTA (Figura 17). Las actividades son la media de 6 medidas ± EE.

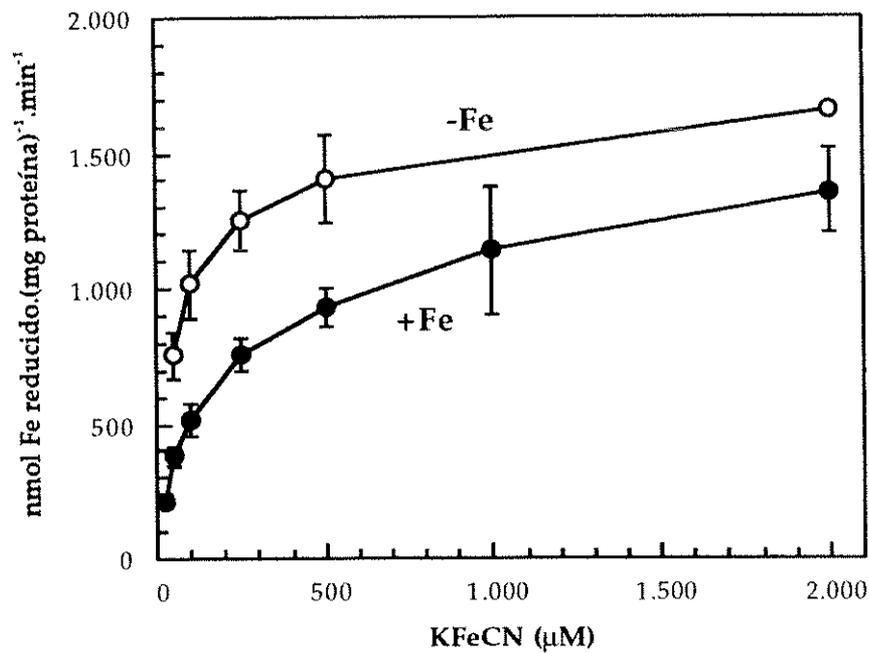


Figura 19: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con concentraciones de KFeCN. La concentración del complejo fue de 500 μM. La actividad se midió a pH 6,8. Las actividades son la media de 6 medidas ± EE.

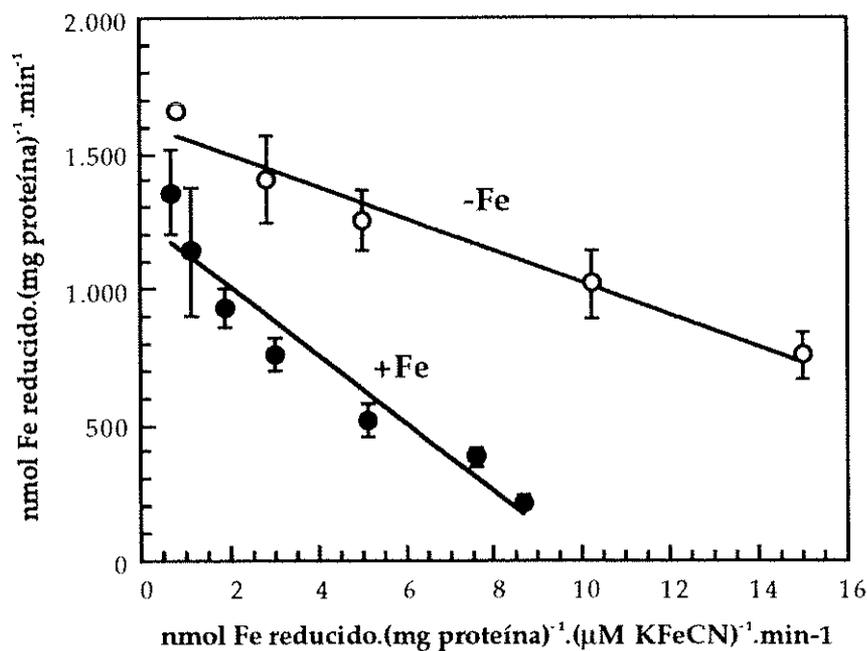


Figura 20: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con diferentes concentraciones de KFeCN (Figura 19). Las actividades son la media de 6 medidas ± EE.

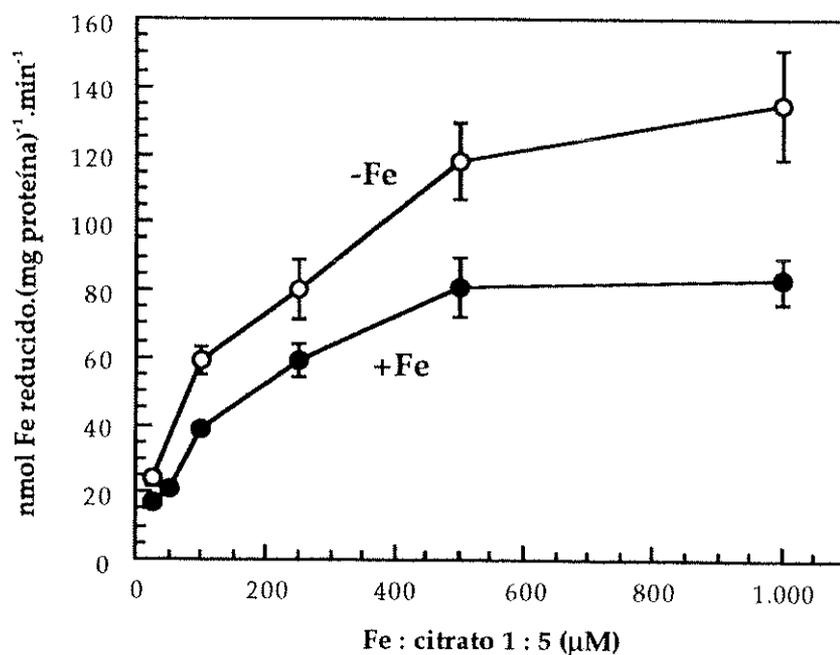


Figura 21: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con diferentes concentraciones del complejo Fe : citrato (relación 1 : 5). La actividad se midió a pH 6,8. Las actividades son la media de 6 medidas \pm EE.

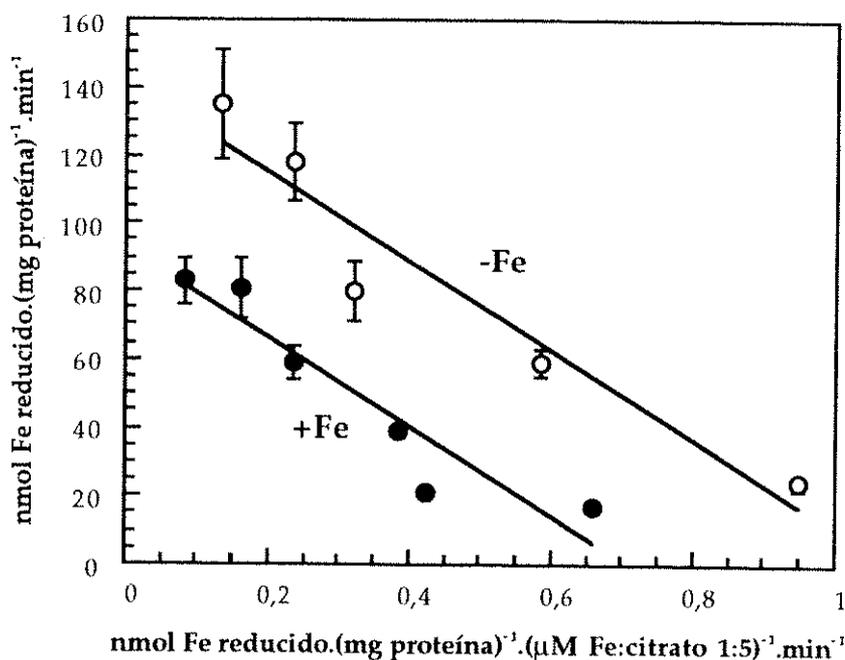


Figura 22: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con diferentes concentraciones del complejo Fe : citrato (relación 1 : 5) (Figura 21). Las actividades son la media de 6 medidas \pm EE.

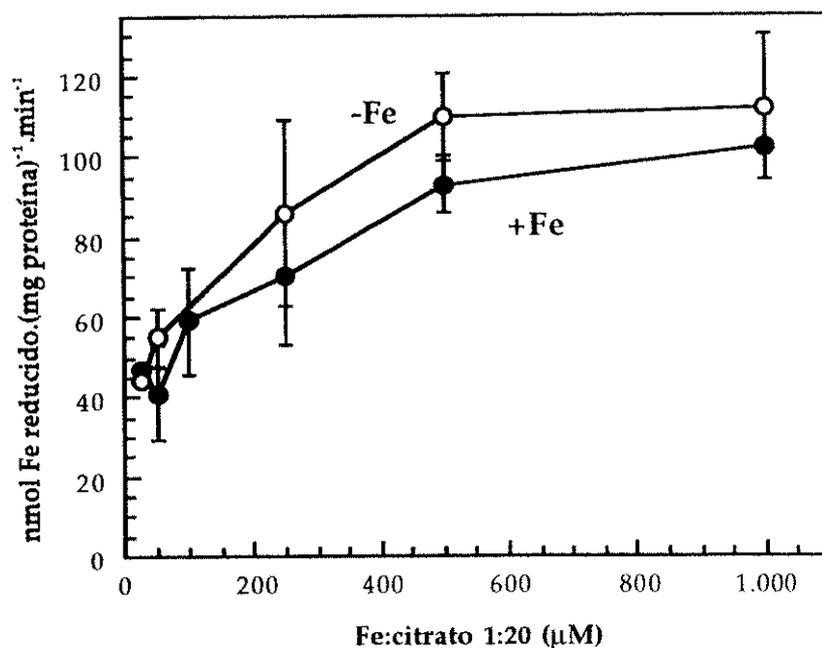


Figura 23: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con diferentes concentraciones del complejo Fe : citrato (relación 1 : 20). La actividad se midió a pH 6,8. Las actividades son la media de 2 medidas \pm EE.

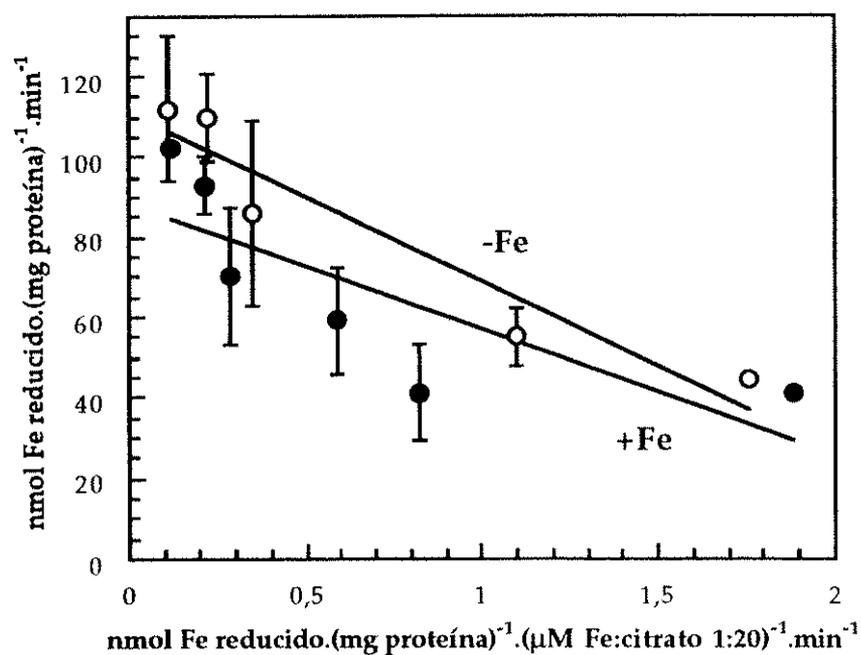


Figura 24: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con diferentes concentraciones del complejo Fe : citrato (relación 1 : 20) (Figura 23). Las actividades son la media de 2 medidas \pm EE.

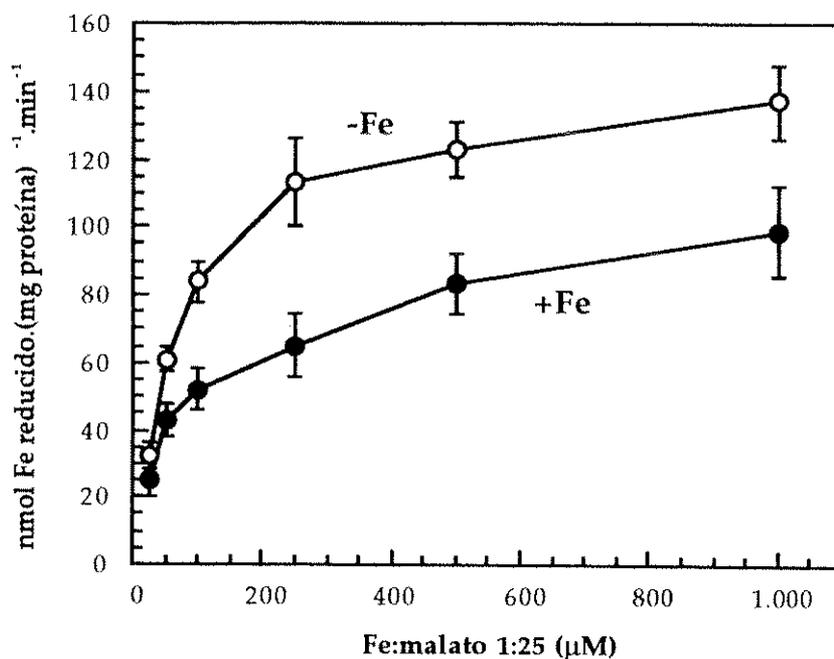


Figura 25: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con diferentes concentraciones del complejo Fe : malato (relación 1 : 25). La actividad se midió a pH 6,8. Las actividades son la media de 6 medidas \pm EE.

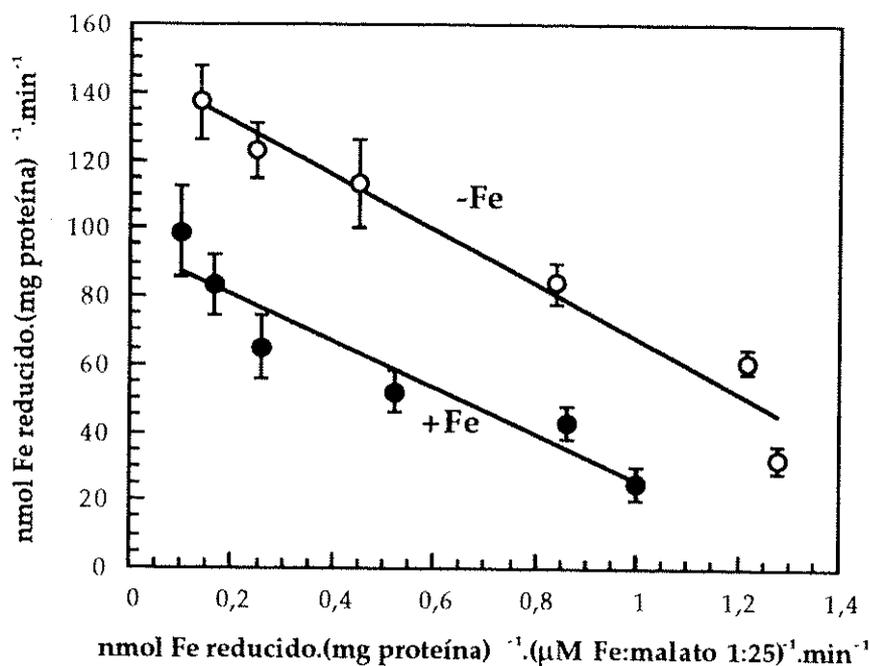


Figura 26: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con diferentes concentraciones del complejo Fe : malato (relación 1 : 25) (Figura 25). Las actividades son la media de 6 medidas \pm EE.

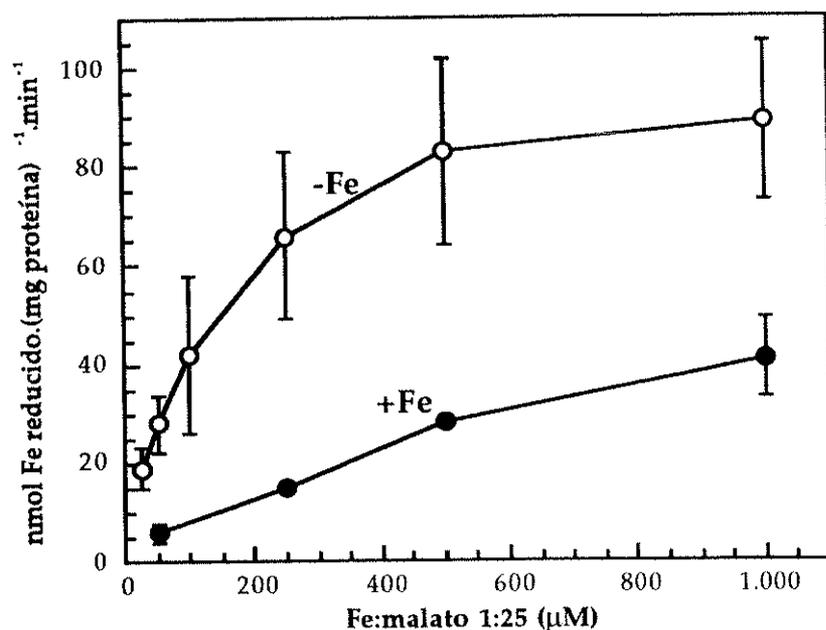


Figura 27: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con diferentes concentraciones del complejo Fe : malato (relación 1 : 25). La actividad se midió a pH 5,5. Las actividades son la media de 6 medidas \pm EE.

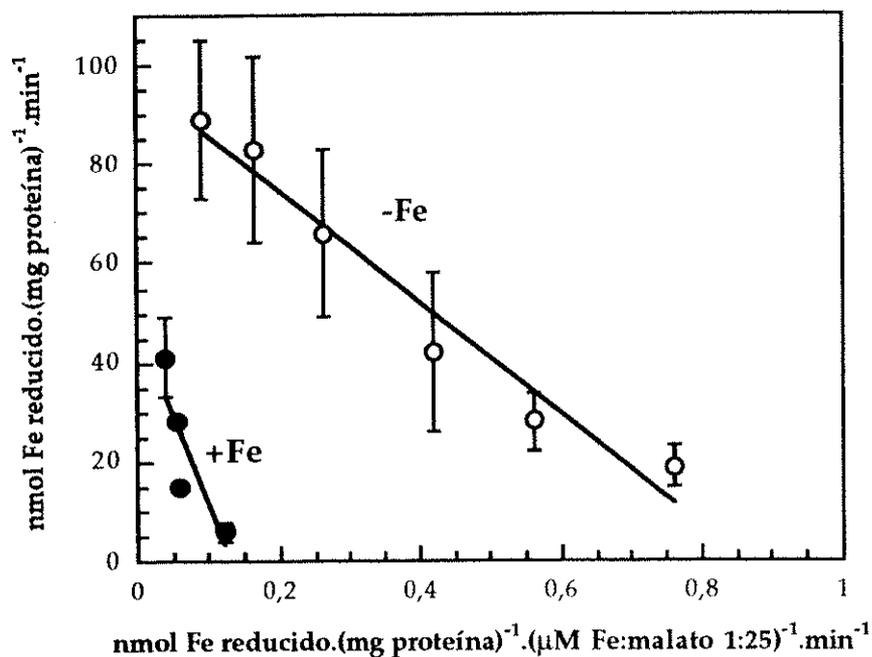


Figura 28: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con diferentes concentraciones del complejo Fe : malato (relación 1 : 25) (Figura 27). Las actividades son la media de 6 medidas \pm EE.

hace que sea un excelente aceptor de electrones y que las actividades resultantes sean muy altas en comparación con otros complejos de Fe. Los valores de las constantes cinéticas mostraron una tendencia similar a la obtenida con Fe(III)-EDTA. Así, los valores de la constante de Michaelis-Menten, K_m , fueron similares para las membranas de hojas control y deficiente con valores de 119 ± 47 y 135 ± 1 μM respectivamente. El aumento de la velocidad máxima en las preparaciones de hojas deficientes fue 1,3 veces superior a la de los controles, con valores de 1.357 ± 7 y 1.086 ± 286 $\text{nmol Fe reducido} \cdot (\text{mg proteína})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ respectivamente.

La cinética para el Fe(III)-citrato se ha estudiado con dos relaciones diferentes Fe : citrato, de 1 : 5 y 1 : 20 (Figuras 21 y 23). Cuando se utilizó Fe : citrato con una relación 1 : 5 los valores de K_m fueron 170 ± 14 y 157 ± 11 μM para membranas de hojas control y deficientes respectivamente. La velocidad máxima se incrementó en 1,4 veces en las preparaciones de membrana plasmática de las plantas deficientes (101 ± 2 y 142 ± 12 $\text{nmol Fe reducido} \cdot (\text{mg proteína})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para controles y deficientes respectivamente). Los valores de las constantes cinéticas para Fe : citrato a una relación 1 : 20 mantenían la misma tendencia que para la relación 1 : 5, si bien en este caso los valores de K_m fueron algo más bajos, 38 ± 4 y 46 ± 17 μM para las membranas de hojas control y deficientes en Fe respectivamente. Los valores de V_{max} obtenidos fueron 88 ± 1 y 113 ± 26 $\text{nmol Fe reducido} \cdot (\text{mg proteína})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para las membranas de hojas control y deficientes respectivamente, ofreciendo una relación -Fe/+Fe de 1,3.

La cinética para Fe : malato (relación 1 : 25) se midió a dos valores de pH, 6,8 y 5,5 (Figuras 25 y 27). La razón para ello fue que la diferencia de la actividad reductasa para las membranas de hojas control y deficientes en el caso de este complejo era mucho más acusada a pH 5,5 que a pH 6,8 (Figura 14). Así, a pH 5,5 se ha encontrado una actividad baja en ambos materiales, siendo muy reducida para el caso de las plantas control, en las que incluso a concentraciones bajas del complejo (menores de 50 μM) no fue posible medir actividad neta (Figura 27). Los valores de las constantes cinéticas mantuvieron la misma tendencia que para Fe(III)-EDTA y Fe(III)-citrato. Los valores de K_m a pH 6,8 fueron muy similares para membranas control y deficientes (66 ± 3 y 73 ± 2 μM respectivamente). Los valores de V_{max} obtenidos fueron 86 ± 11 y 144 ± 11 $\text{nmol Fe reducido} \cdot (\text{mg proteína})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para las membranas control y deficientes respectivamente. La relación -Fe/+Fe encontrada fue de 1,7, siendo la más elevada de todas las encontradas. Las K_m encontradas a 5,5 fueron mucho mayores, con valores de 637 ± 180 y 147 ± 49 μM para las membranas de hojas control y deficiente respectivamente. Los valores obtenidos para las V_{max} fueron 63 ± 10 y 103 ± 23 $\text{nmol Fe reducido} \cdot (\text{mg}$

proteína)⁻¹.min⁻¹ para las membranas de hojas control y deficiente respectivamente proporcionando una relación -Fe/+Fe de 1,6.

	K_m μM		V_{\max} nmol Fe red.(mg proteína) ⁻¹ .min ⁻¹	
	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe
Fe(III)-EDTA	103 ± 19	122 ± 19 (1,2)	114 ± 15	175 ± 19 (1,5)
KFeCN	119 ± 47	135 ± 1 (1,1)	1.086 ± 286	1.357 ± 7 (1,3)
Fe:citrato 1:5	170 ± 14	157 ± 11 (0,9)	101 ± 2	142 ± 12 (1,4)
Fe:citrato 1:20	38 ± 4	46 ± 17 (1,2)	88 ± 1	113 ± 26 (1,3)
Fe:malato 1:25	66 ± 3	73 ± 2 (1,1)	86 ± 11	144 ± 11 (1,7)
pH 6,8				
Fe:malato 1:25	637 ± 180	147 ± 49 (0,2)	63 ± 10	103 ± 23 (1,6)
pH 5,5				

Cuadro 9: Valores de las constantes cinéticas para las preparaciones de membrana plasmática de hojas control y deficientes en Fe con distintos complejos de Fe como sustratos. Entre paréntesis se muestra la relación -Fe/+Fe.

Cinética con NADH

Se realizaron también estudios de los cambios en la actividad reductasa con la concentración del donador de electrones NADH, utilizando como aceptor el Fe(III)-EDTA (Figura 29). La reacción se saturó a aproximadamente 500 μM NADH. Para todas las concentraciones utilizadas de donador (25-1.000 μM NADH) los valores de actividad de las plantas control fueron menores que los de las deficientes. Se obtuvieron cinéticas del tipo Michaelis-Menten (Figura 30). Los valores de las constantes cinéticas con NADH siguieron la misma tendencia que los obtenidos anteriormente para los complejos de Fe. Los valores de K_m fueron similares para las membranas control y deficiente (161 ± 11 y 157 ± 11 μM respectivamente). La V_{\max} presentó una relación -Fe/+Fe de 1,5 con valores de 139 ± 12 y 213 ± 17 nmol Fe reducido.(mg proteína)⁻¹.min⁻¹ para las membranas control y deficiente respectivamente.

Se hizo un estudio semejante utilizando NADPH como donador de electrones, obteniéndose valores de actividad mucho más bajos (unos 20 nmol Fe reducido.(mg proteína)⁻¹.min⁻¹ como máximo) que los encontrados con NADH (Figura 29, línea discontinua).

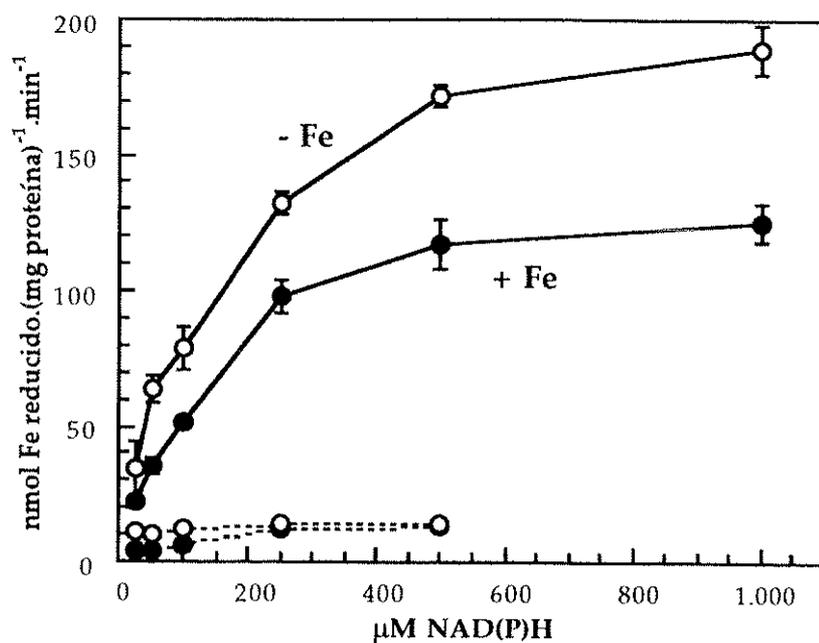


Figura 29: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con diferentes concentraciones de NADH con Fe(III)-EDTA 500 μM como aceptor de electrones. Las líneas discontinuas corresponden a la actividad de las membranas control y deficiente en función de la concentración de NADPH. La actividad se midió a pH 6,8. Las actividades son la media de 6 medidas \pm EE.

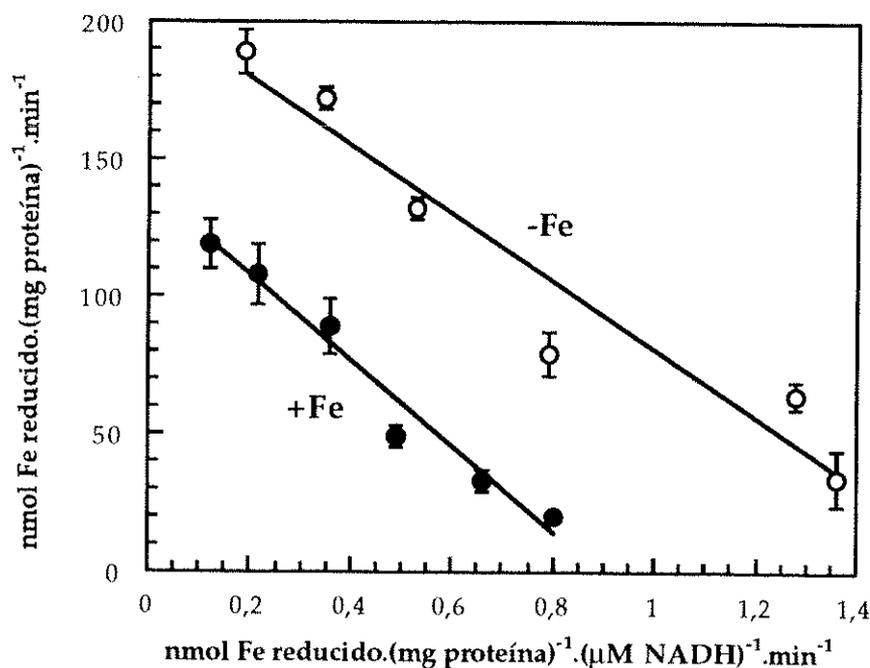


Figura 30: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con diferentes concentraciones de NADH (Figura 29). Las actividades son la media de 6 medidas \pm EE.

4.1.1.3.d.- Reducción de Fe en condiciones de anaerobiosis

Brüggemann y Moog (1989) habían descrito que la actividad reductora de Fe de la membrana plasmática aumenta cuando la reducción se realiza en condiciones de anaerobiosis. Por esta razón se estudió la influencia del oxígeno en la reducción de Fe.

En primer lugar se midió el perfil de dependencia de pH en condiciones de anaerobiosis utilizando Fe(III)-EDTA como sustrato (Figura 31). Se obtuvo un aumento de actividad significativo respecto a la medida en aerobiosis (valores máximos menores de $150 \text{ nmol} \cdot (\text{mg proteína})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ en aerobiosis (Figura 12) y entre 220 y 280 $\text{nmol} \cdot (\text{mg proteína})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para plantas control y deficientes respectivamente, medidas en anaerobiosis). El perfil de dependencia de pH fue similar en presencia o ausencia de O_2 , mostrando siempre un máximo alrededor de pH 6,8.

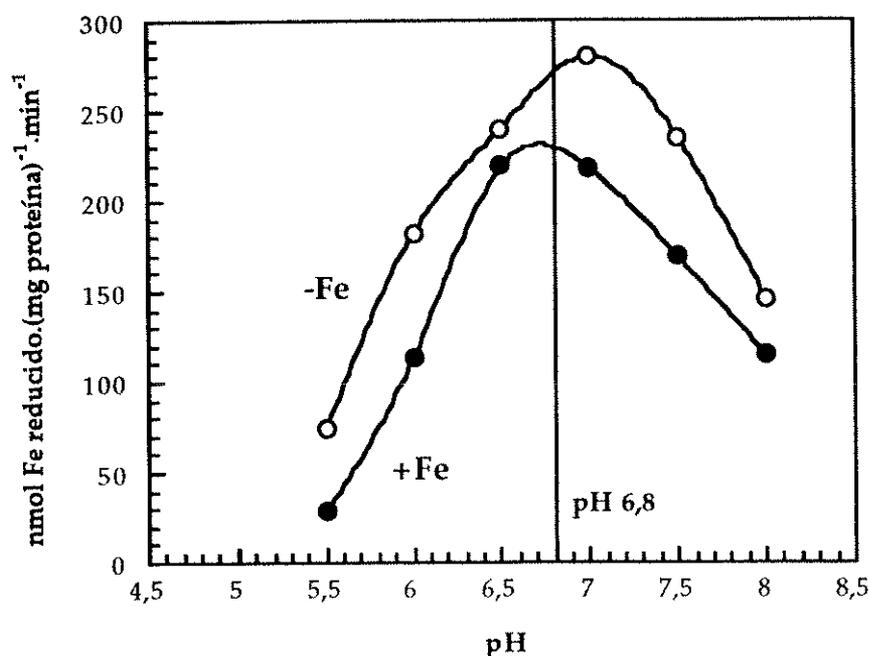


Figura 31: Variación de la actividad Fe(III)-EDTA reductasa de la membrana plasmática de hojas en función del pH y en condiciones de anaerobiosis.

Se midió también la actividad en condiciones de anaerobiosis en función de la relación Fe : citrato, con una concentración de $500 \mu\text{M}$ Fe y a pH 6,8 (Figura 32). Comparando los resultados obtenidos con los mostrados para condiciones de aerobiosis (Figura 15) se observó un aumento muy ligero (no significativo) de la actividad. Al igual que se observó en presencia de oxígeno, al aumentar la relación Fe : citrato hay un descenso pronunciado de la actividad reductasa.

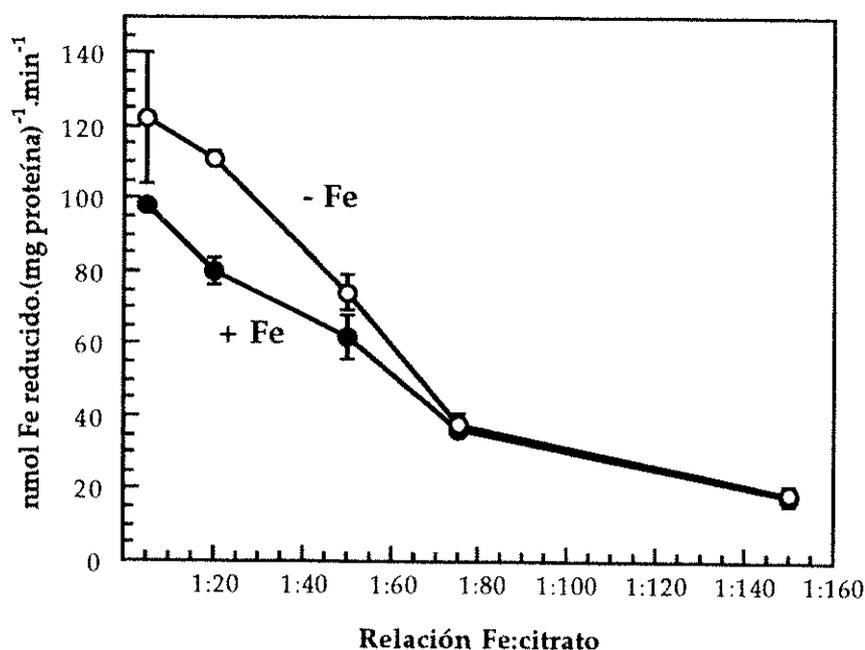


Figura 32: Actividad reductasa férrica de la membrana plasmática en condiciones de anaerobiosis y en función de la relación Fe : citrato para las membranas control y deficientes. La actividad se midió a pH 6,8. Las actividades son la media de 3 medidas \pm EE.

Por último, y ya que se ha visto que las diferencias encontradas entre plantas control y deficientes son semejantes en presencia y en ausencia de O_2 , se estudiaron las tasas de reducción en unas condiciones determinadas (pH 6,8 y concentración de sustrato $500 \mu M$ Fe) utilizando Fe(III)-EDTA, Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato. En los dos últimos casos, la relación Fe : quelato utilizada fue aquella con la que se habían encontrado las mayores tasas de reducción. Los resultados se muestran en el Cuadro 10.

	Control (+Fe)		Deficiente (-Fe)	
	+ O_2	- O_2	+ O_2	- O_2
Fe(III)-EDTA	111 ± 8	169 ± 6 (152%)	144 ± 10	215 ± 13 (149%)
Fe : citrato 1 : 5	96 ± 11	102 ± 12 (106%)	121 ± 10	126 ± 10 (104%)
Fe : malato 1 : 25	83 ± 9	148 ± 2 (192%)	123 ± 8	210 ± 14 (171%)

Cuadro 10: Actividad reductasa férrica en condiciones de anaerobiosis para preparaciones de membrana plasmática de hojas control y deficientes. Entre paréntesis se indica el porcentaje de variación respecto a la actividad en el medio estándar. Las actividades se expresan como $nmol$ Fe reducido.(mg proteína)⁻¹.min⁻¹ y son la media de 5 medidas \pm EE.

Como ya se ha observado en ensayos anteriores, las actividades de las preparaciones deficientes en Fe fueron mayores que las de las preparaciones

control, tanto en el caso de aerobiosis como de anaerobiosis, aunque en ningún caso el aumento fue estadísticamente significativo. La ausencia de O_2 en el medio de reacción produjo un aumento de la actividad tanto para plantas control como deficientes, que fue distinto para cada uno de los complejos. Tanto para plantas control como deficientes en Fe el mayor aumento de la actividad se observó con Fe(III)-malato (92 y 71%) seguido de Fe(III)-EDTA (52 y 49%), mientras que para el Fe(III)-citrato el aumento fue muy pequeño (6 y 4%).

4.1.1.3.e.- Efecto de los detergentes Tritón X-100 y Brij 58 en la reducción de Fe

El aislamiento basado en el método de separación en un sistema de doble fase permite obtener un porcentaje mayoritario de vesículas cerradas en una orientación celular natural, con el lado citoplasmático orientado hacia el interior ("right-side-out"). Un porcentaje menor de las vesículas aparece en orientación inversa ("inside out"). El enzima FC-R ha sido descrito como un enzima transmembrana, con el lugar de unión al NADH (donador de electrones) hacia el citoplasma y el lugar de unión al complejo de Fe (aceptor de electrones) hacia el exterior de la célula (Moog y Brüggemann, 1994). En ausencia de detergente estas membranas deberían dar una actividad baja, ya que el NADH añadido en el ensayo no puede acceder al interior de las vesículas. Por esta razón, las medidas de actividad se realizan en presencia del detergente iónico Tritón X-100, que permite abrir la vesícula, exponiendo así al medio ambos lados de la membrana, y facilitando el acceso a la misma tanto del donador como del aceptor de electrones. Además de Tritón X-100, también se ha utilizado el detergente no iónico Brij 58. Este detergente permite obtener un 100% de vesículas cerradas con una orientación inversa (lado citoplasmático hacia el exterior) a partir de vesículas de orientación celular natural (Johansson *et al.*, 1995).

Los estudios se han realizado con los dos detergentes citados, utilizando como sustrato Fe(III)-EDTA (500 μ M) y a pH 6,8. Los resultados obtenidos tanto para las actividades de reducción como para la latencia de la reductasa férrica en el caso de Tritón X-100 se muestran en el Cuadro 11. Se observó un fuerte aumento de la reducción en presencia de Tritón X-100 en los dos tipos de membrana, llegando a valores mayores en el caso de plantas deficientes (139 frente a 99 nmol Fe reducido.(mg proteína)⁻¹.min⁻¹). Los valores obtenidos indicaron una latencia del 90 y 83% para las membranas de plantas control y deficientes respectivamente. Estos porcentajes son similares a los descritos por Susín *et al.* (1996) para membrana plasmática de raíces. Al igual que en raíces, la latencia de la membrana plasmática de hojas control es mayor que la de las deficientes.

	+Fe	-Fe
Sin detergente	10 ± 2	23 ± 2
Tritón X-100 0,02%	99 ± 10	139 ± 9
Latencia	90%	83%

Cuadro 11: Latencia de la actividad reductasa Fe(III)-EDTA en preparaciones de membrana plasmática. La actividad se expresó en nmol Fe reducido.(mg proteína)⁻¹.min⁻¹.

Antes de caracterizar la reductasa en presencia de Brij 58, se determinó la concentración óptima de detergente a utilizar en este tipo de medidas. Johansson *et al.* (1995) obtuvieron un 100% de vesículas de orientación inversa utilizando una concentración de Brij 58 del 0,05%. En nuestro caso se estudió en primer lugar el comportamiento de la actividad reductasa con un intervalo de concentraciones de Brij 58 entre 0 y 0,1% (0, 0,025, 0,05 y 0,1%; Figura 33). La actividad reductasa aumentó considerablemente para una concentración de Brij 58 de 0,025%, para dar valores algo inferiores con concentraciones de 0,05 y 0,1%.

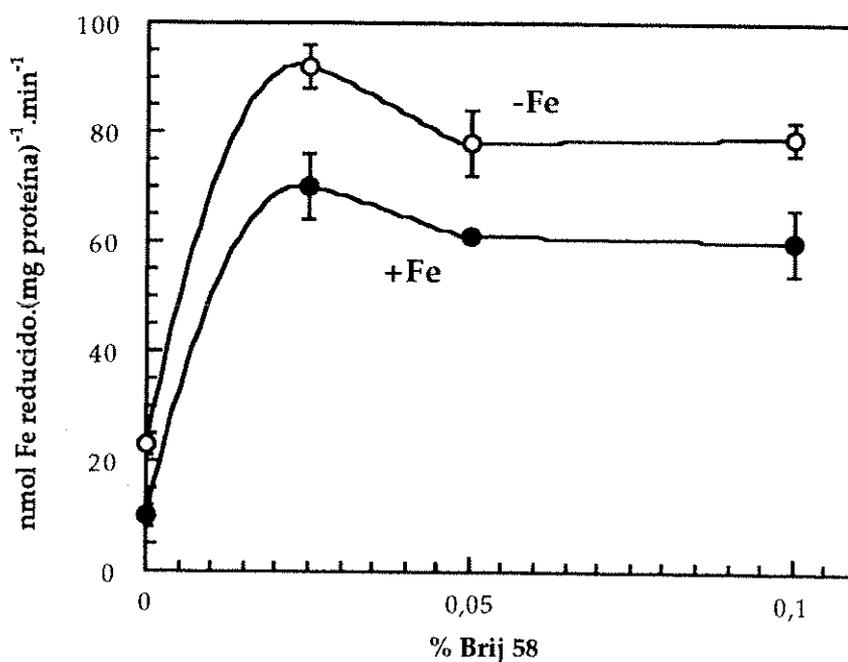


Figura 33: Variación de la actividad reductasa férrica en función de la concentración del detergente no iónico Brij 58 en el intervalo de concentración del detergente entre 0 y 0,1%.

Por otra parte, se estudió el porcentaje de vesículas cerradas para distintas concentraciones de Brij 58 (0, 0,015, 0,025, 0,05 y 0,1%; Figura 34). Para ello se midió la formación de un gradiente de pH por la bomba de protones presente en la membrana plasmática, utilizando como indicador de pH el colorante naranja de

acridina (apartado 3.6.1.5 de Materiales y Métodos). Así, sólo las vesículas con orientación inversa son capaces de formar el gradiente. Como se puede ver en la Figura 34, a medida que aumentó la concentración de Brij 58 en el medio aumentó también la proporción de vesículas cerradas en orientación inversa. A partir de una concentración de detergente de 0,05% se podría considerar que el 100% de las vesículas estaban cerradas con una orientación inversa. Los porcentajes de vesículas cerradas fueron similares para las membranas de hojas control y deficientes. De los resultados obtenidos para actividad reductasa (Figura 33) y porcentaje de vesículas cerradas (Figura 34) cabe deducir que a partir de 0,05% de Brij 58 las concentraciones serían adecuadas para el estudio de la latencia.

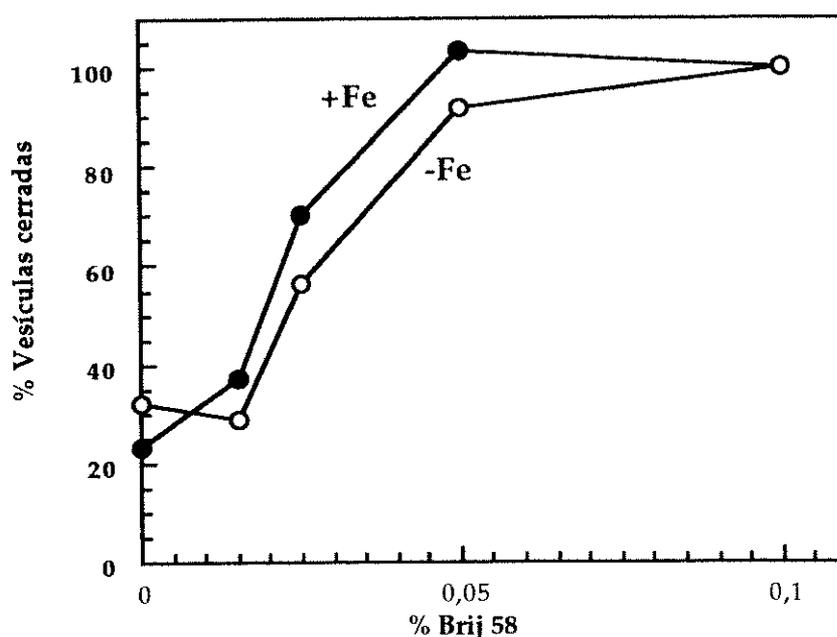


Figura 34: Porcentaje de vesículas de membrana plasmática cerradas en orientación inversa en presencia de distintas concentraciones de Brij 58. La cuantificación de las vesículas cerradas en orientación inversa se determinó como $\Delta\text{Abs}_{495} \cdot (\text{mg proteína})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. El porcentaje se realizó en función de la cuantificación al 0,1%.

Los resultados obtenidos tanto para las actividades de reducción como para la latencia de la reductasa férrica en el caso de Brij 58 se muestran en el Cuadro 12. Se observa, como en el caso de Tritón X-100, que las actividades aumentan al añadir el detergente. Las latencias obtenidas para las preparaciones de membrana plasmática con Brij 58 resultaron algo más bajas que las obtenidas con Tritón X-100, con unos valores de 84% y 71% para las membranas de plantas control y deficiente respectivamente.

	+Fe	-Fe
Sin detergente	10 ± 2	23 ± 2
Brij 58 0,05%	61 ± 1	78 ± 6
Latencia	84%	71%

Cuadro 12: Actividad reductasa y latencia de la actividad reductasa férrica. La actividad se expresó en nmol Fe reducido.(mg proteína)⁻¹.min⁻¹.

En el Cuadro 13 se pueden comparar las medidas de la actividad reductasa férrica con los distintos detergentes. El máximo de actividad se obtuvo siempre en presencia de Tritón X-100. La actividad de la reductasa férrica en presencia de Brij 58 fue un 62% (control) y un 56% (plantas deficientes) de la actividad máxima. La presencia simultánea de ambos detergentes en el medio de reacción aumentó la actividad hasta un 78-74% (en control y deficiente respectivamente) de la actividad máxima. En los tres estudios realizados en presencia de detergentes (Tritón X-100, Brij 58 y Tritón + Brij añadidos simultáneamente) se obtuvo una relación -Fe/+Fe muy similar, indicando que tanto las membranas control como deficientes se comportan de la misma manera independientemente del detergente utilizado.

	+Fe	-Fe	-Fe/+Fe
Sin detergente	10 (10%)	23 (17%)	2,3
Tritón X-100 0,02%	99 (100%)	139 (100%)	1,4
Brij 58 0,05%	61 (62%)	78 (56%)	1,3
Tritón X-100 + Brij 58 (simultáneamente)	77 (78%)	103 (74%)	1,3

Cuadro 13: Variación de la actividad reductasa férrica con Tritón X-100 y Brij 58. La actividad se expresó en nmol Fe reducido.(mg proteína)⁻¹.min⁻¹. El porcentaje se expresó respecto a la actividad obtenida con Tritón X-100.

El estudio del porcentaje de vesículas cerradas en orientación inversa en las mismas condiciones se muestra en el Cuadro 14. El mayor porcentaje se obtuvo en presencia de Brij 58 tanto para preparaciones control como deficientes, considerándose que correspondía al 100% de vesículas cerradas de forma inversa. La formación de gradiente en presencia de Tritón X-100 era mínima. La presencia de ambos detergentes (añadidos simultáneamente) en el medio de reacción disminuyó el porcentaje de vesículas cerradas, respecto a Brij 58 (75 y 87% para preparaciones control y deficientes en Fe respectivamente).

El máximo de actividad reductasa con Tritón X-100 se correspondió con el mínimo en el porcentaje de vesículas cerradas en orientación inversa, tanto en las

membranas control como en las deficientes en Fe (Cuadros 13 y 14). La presencia de ambos detergentes juntos en el medio de reacción disminuyó el porcentaje de vesículas cerradas y aumentó la actividad reductasa respecto al Brij 58. La relación entre vesículas cerradas y actividad reductasa mostró características semejantes en preparaciones control y deficientes en Fe.

	+Fe	-Fe
Sin detergente	22% (23)	33% (32)
Tritón X-100 0,02%	11% (11)	7% (6)
Brij 58 0,05%	100% (103)	100% (92)
Tritón X-100 + Brij 58 (simultáneamente)	75% (77)	87% (80)

Cuadro 14: Porcentaje de vesículas cerradas en orientación inversa dependiendo del tipo de detergente presente en el medio de reacción. El porcentaje se expresó respecto a la actividad obtenida con Brij 58 0,05%. Entre paréntesis se indica la cuantificación del gradiente de protones expresado como $\Delta\text{Abs}_{495} \cdot (\text{mg proteína})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Por otro lado, se comprobó que en ausencia de NADH no se producía reducción de Fe (Cuadro 15), descartando un posible efecto inespecífico del Brij 58 sobre la reducción de Fe. Tampoco se encontraron grandes cambios en las medidas si el NADH se adicionaba antes o después de añadir el Brij 58 (Cuadro 15) desechando así un posible efecto de almacenamiento de NADH en el interior de las membranas al ser reorientadas.

	+Fe	-Fe
Brij 58	61 ± 1	78 ± 6
Sin NADH	n. d.	n. d.
NADH tras Brij 58	63	69

Cuadro 15: Dependencia de NADH de la actividad de reductasa férrica en presencia de Brij 58. La actividad se expresó en nmol Fe reducido. $(\text{mg proteína})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Como ya hemos visto, la presencia simultánea de los dos detergentes aumentó los valores de reductasa con respecto a Brij 58, pero sin alcanzar los niveles observados para Tritón X-100. Para caracterizar la interacción de ambos detergentes, se estudió la influencia ejercida al adicionar uno de ellos a una preparación que contenía el otro detergente. Así, la adición de Tritón X-100 en una preparación con Brij 58 no tuvo ningún efecto sobre el gradiente de pH (Figura 35), mientras que la adición de Brij 58 sobre una preparación con Tritón X-100 producía una pequeña formación de vesículas cerradas (Figura 36) ya que se observó un descenso de la absorbancia a 495 nm.

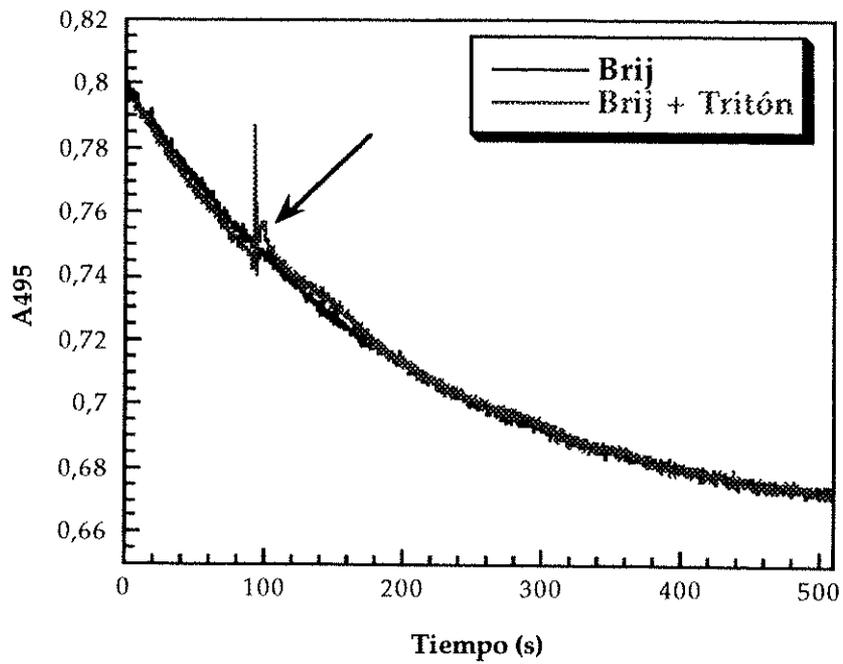


Figura 35: Efecto sobre el gradiente de pH mediado por la membrana plasmática en presencia del detergente Brij 58 y al adicionar Tritón X-100. La flecha indica la adición de Tritón X-100 al 0,02% (p/v).

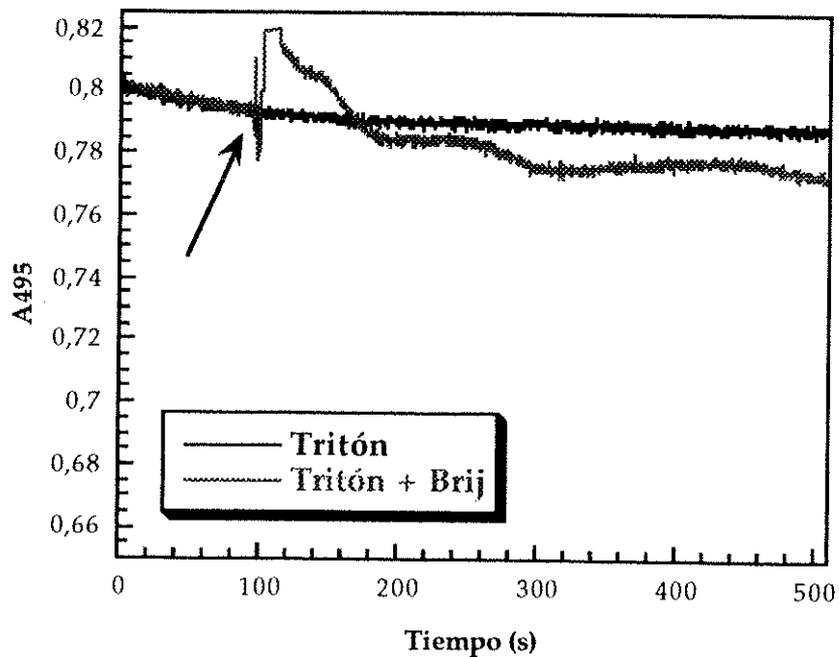


Figura 36: Efecto sobre el gradiente de pH mediado por la membrana plasmática en presencia de Tritón X-100 y al adicionar Brij 58. La flecha indica la adición de Brij 58 al 0,05% (p/v).

Para comprobar si el Brij 58 producía alguna modificación sobre el enzima se realizó una caracterización cinética, variando la concentración de Fe(III)-EDTA en presencia de Brij 58 al 0,05%. La reacción no se saturó hasta una concentración de 1.500 μM de Fe(III)-EDTA (Figura 37). Se obtuvo una cinética del tipo Michaelis-Menten (Figura 38). El valor de V_{max} obtenido con Brij 58 coincidió con el valor de V_{max} de la cinética en presencia de Tritón X-100 (Cuadro 16). En cambio, las K_m fueron muy diferentes, ya que en presencia de Brij 58 mostraron valores bastante más altos (457 y 527 para control y deficiente frente a 103 y 122 en el caso de Tritón X-100, Cuadro 16). Este aumento en los valores de K_m indicaría un descenso de la afinidad por el sustrato en presencia de Brij 58. Las relaciones $-Fe/+Fe$ obtenidas tanto para V_{max} como para K_m en presencia de Brij 58 fueron similares a las obtenidas en presencia de Tritón X-100 (Cuadro 16).

	Control (+Fe)		Deficiente (-Fe)	
	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m
Tritón X-100	114 \pm 15	103 \pm 19	175 \pm 15 (1,5)	122 \pm 19 (1,2)
Brij 58	112	457	162 (1,4)	527 (1,2)

Cuadro 16: Valores de K_m y V_{max} para la actividad reductasa férrica de membrana plasmática de hojas control (+Fe) y deficientes (-Fe) en presencia de los detergentes Brij 58 y Tritón X-100. K_m se expresa en μM y V_{max} en $\text{nmol Fe reducido} \cdot (\text{mg proteína})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Entre paréntesis se indica la relación $-Fe/+Fe$.

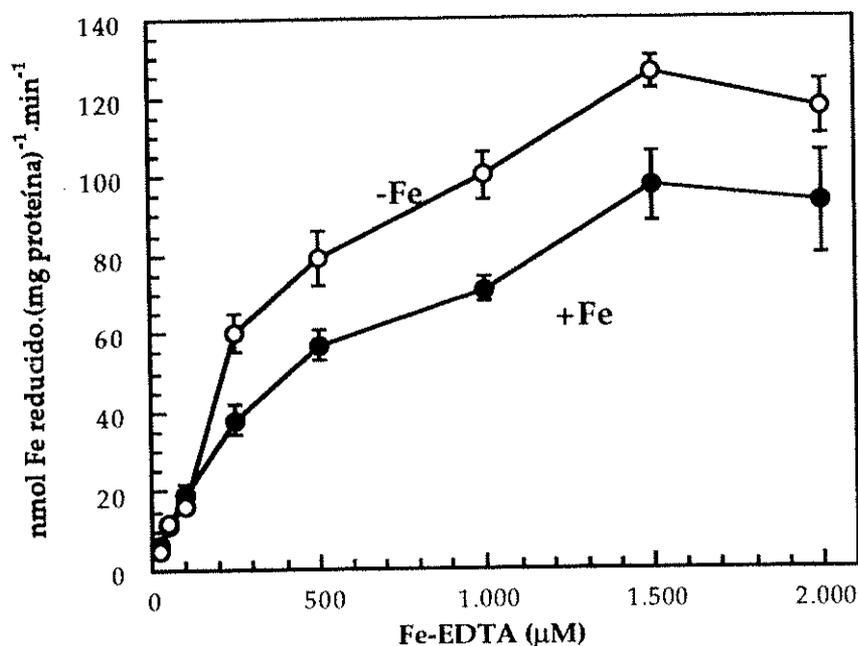


Figura 37: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con diferentes concentraciones de Fe(III)-EDTA en presencia del detergente Brij 58. La actividad se midió a pH 6,8. Las actividades son la media de 3 medidas \pm EE.

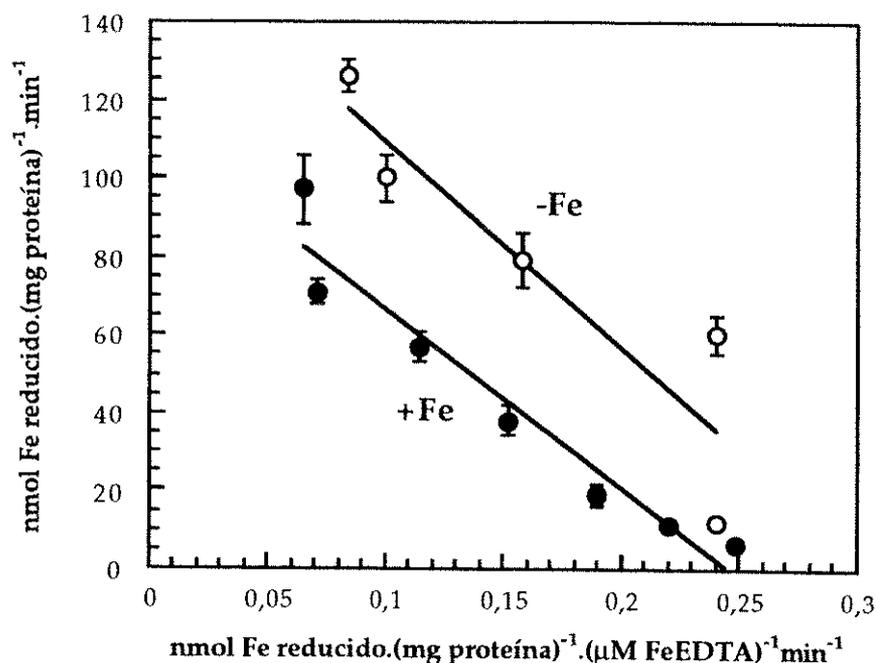


Figura 38: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con diferentes concentraciones de Fe(III)-EDTA (Figura 37). Las actividades son la media de 3 medidas \pm EE.

Por último, se exploró la posible existencia de dos componentes en la actividad reductasa férrica: un componente *trans* (aceptor y dador de e^- a distintos lados de la membrana) y un componente *cis* (aceptor y dador en el lado citoplasmático de la membrana). Las actividades obtenidas en presencia de Brij 58 podrían así deberse al componente *cis* del lado citoplasmático (vesículas cerradas con orientación inversa), mientras que las obtenidas con Tritón X-100 corresponderían a la suma de ambos componentes. La actividad del componente *trans* se obtendría, según este planteamiento, restando la actividad obtenida con Brij 58 de la obtenida con Tritón X-100. En la Figura 39 se muestra la cinética resultante de dicha operación, que se ajustó a una cinética de Michaelis-Menten (Figura 40). Los valores cinéticos obtenidos muestran velocidades máximas de aproximadamente un 40% respecto a las obtenidas con Tritón X-100, mientras que la relación $-Fe/+Fe$ muestra un valor superior a los obtenidos para los dos detergentes individuales (1,9 frente a 1,5 para Tritón y 1,4 para Brij; Cuadro 17). Los valores de K_m para el hipotético componente *trans* son menores, lo que indicaría una mayor afinidad del sustrato. La relación $-Fe/+Fe$ para K_m dió un valor de 1,1, similar a los valores encontrados para los detergentes estudiados individualmente.

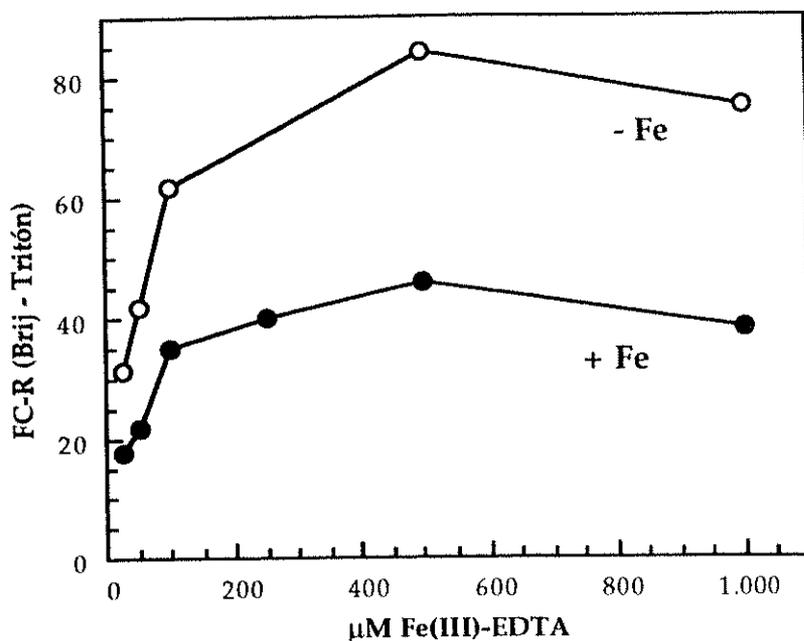


Figura 39: Actividad reductasa de Fe con diferentes concentraciones de Fe(III)-EDTA del hipotético componente *trans* de la membrana plasmática de hojas. La actividad se midió a pH 6,8. Las actividades son la media de 3 medidas \pm EE.

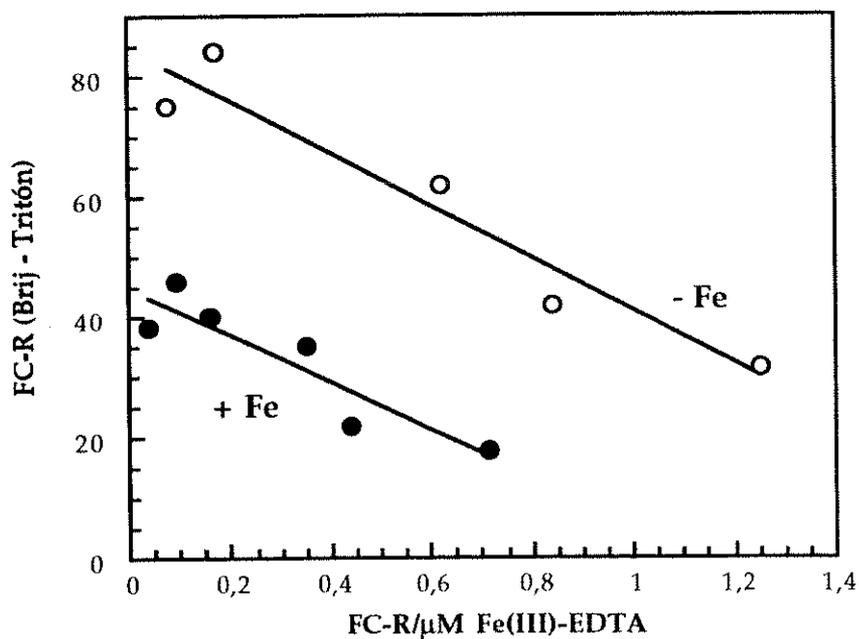


Figura 40: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con diferentes concentraciones de Fe(III)-EDTA (Figura 39). Las actividades son la media de 3 medidas \pm EE.

	K_m	V_{max}
Control (+Fe)	39	45
Deficiente (-Fe)	44 (1,1)	85 (1,9)

Cuadro 17: Valores de K_m y V_{max} para la actividad reductasa férrica del *hipotético componente trans* de la membrana plasmática de hojas control (+Fe) y deficientes (-Fe). K_m se expresa en μM y V_{max} en $nmol\ Fe\ reducido.(mg\ proteína)^{-1}.min^{-1}$. Entre paréntesis se indica la relación -Fe/+Fe.

4.1.1.3.f.- Reducción en un medio análogo al apoplasto

Se estudió la reducción de Fe por la membrana plasmática en un medio de reacción análogo al apoplasto de las plantas en cuanto a su composición iónica. Este medio análogo al apoplasto se diseñó a partir de diferentes valores de apoplasto y savia del xilema aparecidos en la bibliografía en distintas especies: guisante, espinaca, girasol, colza y tomate (Speer y Kaiser, 1991; Lohaus *et al.*, 1995; Dannel *et al.*, 1995; Husted y Schjoerring, 1995; Bialczyk y Lechowsky, 1995). Se podría considerar que ésta sería una medida más cercana a las condiciones fisiológicas. Las medidas se realizaron con Fe(III)-EDTA y Fe : citrato (relaciones 1 : 5 y 1 : 20) con una concentración 500 μM de Fe y a pH 6,8. Tal como se muestra en el Cuadro 18, la actividad reductasa férrica en un medio análogo al apoplasto aumentó ligeramente con Fe(III)-EDTA y Fe : citrato 1 : 20, aunque no de manera estadísticamente significativa. Para ambos complejos, el incremento de actividad fue ligeramente superior para las membranas control que para las deficientes. Además, se encontró que el efecto dependía de la relación Fe : citrato utilizada. Mientras para una relación 1 : 20 se producía un ligero aumento, para una relación 1 : 5 la actividad en el medio análogo al apoplasto descendió significativamente (Cuadro 18). Este descenso en la actividad reductasa fue mayor para las membranas control (31%), que para las membranas deficientes (20%).

	Control (+Fe)		Deficiente (-Fe)	
	Estándar	Apoplasto	Estándar	Apoplasto
Fe(III)-EDTA	111 \pm 8	119 \pm 28 (107%)	144 \pm 10	150 \pm 27 (104%)
Fe : citrato 1 : 5	96 \pm 11	66 \pm 11 (69%)	121 \pm 10	97 \pm 1 (80%)
Fe : citrato 1 : 20	102 \pm 2	107 \pm 2 (105%)	126 \pm 27	128 \pm 25 (102%)

Cuadro 18: Actividad reductasa férrica en un medio análogo al apoplasto para membranas de hojas control y deficientes. Entre paréntesis se indica el porcentaje de variación respecto a la actividad en el medio estándar. Las actividades se expresan como $nmol\ Fe\ reducido.(mg\ proteína)^{-1}.min^{-1}$ y son la media de 5 medidas \pm EE.

Para estudiar la diferencia de comportamiento de la actividad reductasa en un medio análogo al apoplasto, en función de la relación Fe : citrato, se realizó la especiación de estos complejos en el medio de reacción utilizado en estas medidas. Los resultados se muestran en el Cuadro 19. La especie mayoritaria, para ambas relaciones Fe : citrato, es $(\text{FeCit}_2)^3$ llegando a representar prácticamente el 100% de los complejos Fe(III)-citrato formados. Los compuestos Mg-citrato, y Ca-citrato muestran concentraciones altas. La concentración de Mg-citrato es superior para la relación Fe : citrato relación 1 : 5 que para la 1 : 20 (0,374 y 0,048 μM respectivamente), mientras que la concentración de Ca-citrato es parecida para ambas relaciones (0,124 y 0,188 μM para Fe : citrato 1 : 5 y 1 : 20 respectivamente).

	$[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^2$	$(\text{FeOHCit})^1$	$(\text{FeCit}_2)^3$	FeCit total
Fe : citrato 1 : 5	$2,01 \cdot 10^{-6}$	$7,51 \cdot 10^{-4}$	0,475	0,476
Fe : citrato 1 : 20	$9,19 \cdot 10^{-8}$	$1,45 \cdot 10^{-4}$	0,499	0,499

	Mg-citrato	Ca-citrato
Fe : citrato 1 : 5	0,374	0,124
Fe : citrato 1 : 20	0,048	0,188

Cuadro 19: Concentración de las especies mayoritarias del complejo Fe : citrato a una relación de 1 : 5 y 1 : 20 en el medio de reacción análogo al apoplasto y a pH 6,8. La concentración de las especies se expresa en μM .

4.1.1.3.g.- Reducción de Fe en presencia de flavinas

En raíces de remolacha *in vivo* la deficiencia de Fe produce un aumento (inducción) de 18 veces en la capacidad reductasa, mientras que en la membrana plasmática aislada de las mismas raíces la inducción es sólo de dos veces (Susín *et al.*, 1996) y en membrana plasmática de hojas de sólo 1,5 veces (Cuadro 8). Para explicar estas discrepancias se ha sugerido la pérdida de un cofactor durante el aislamiento de la membrana plasmática (Susín *et al.*, 1996). La deficiencia de Fe aumenta la concentración de algunas flavinas en las hojas de remolacha (Susín *et al.*, 1993b), por lo que estos compuestos son posibles candidatos a desempeñar dicho papel. Las flavinas mayoritarias son riboflavina (Rbfl), FAD y FMN, siendo Rbfl la que presenta un mayor aumento. Otras flavinas, como los sulfatos de riboflavina que se encuentran en las raíces de plantas de remolacha deficientes en Fe (Susín *et al.*, 1993a), no están presentes en la hoja.

Para estudiar la influencia de las flavinas cómo posibles cofactores de la reductasa férrica se realizaron medidas de reducción de Fe en presencia de Rbfl, FAD y FMN a una concentración en el medio de reacción de 50 μ M. Las medidas se realizaron a pH 6,8, utilizando Fe(III)-EDTA y Fe : citrato (relación 1 : 5) como aceptores de electrones.

En todos los casos, la presencia de flavinas aumentó la actividad reductasa férrica de membranas control y deficientes en Fe (Figuras 41 y 42). Para Fe(III)-EDTA (Figura 41) el mayor porcentaje de aumento, tanto para membranas control como deficientes se encontró con FAD (155 y 42%), seguido de FMN (76 y 19%) y Rbfl (55 y 12%). La relación $-Fe/+Fe$ para cada una de las flavinas utilizadas fue 1,5 para Rbfl, 1,4 para FMN y 1,2 para FAD. En cambio, para Fe(III)-citrato y membranas deficientes (Figura 42) el mayor aumento se encontró para Rbfl (67%) seguido de FAD (41%) y FMN (34%) mientras que para las membranas control (Figura 42) el orden fue FMN (65%), Rbfl (64%) y FAD (51%) aunque con aumentos muy similares. Las relaciones $-Fe/+Fe$ obtenidas con Fe(III)-citrato fueron 1,6 para Rbfl, 1,5 para FAD y 1,3 para FMN. Hay que destacar que las flavinas por sí solas tienen una alta capacidad de reducción. En el Cuadro 20 se muestra la capacidad de reducción de las flavinas para los sustratos de Fe utilizados y en ausencia de membrana plasmática (dichas actividades se restaron de la actividad final de membrana plasmática para obtener los datos de las Figuras 41 y 42). La capacidad de reducir Fe por las flavinas fue siempre mayor con Fe(III)-EDTA que con Fe(III)-citrato. Por otra parte, de las tres flavinas utilizadas fue la Rbfl la que presentó mayor capacidad de reducción, tanto con Fe(III)-EDTA como Fe(III)-citrato. La flavina FAD presentó la menor actividad con Fe(III)-EDTA, mientras que el FMN no fue capaz de reducir Fe(III)-citrato.

	Fe(III)-EDTA Fe : citrato 1 : 5	
FMN	1,32	n. d.
FAD	0,659	0,419
Rbfl	1,44	0,956

Cuadro 20: Capacidad de reducción de Fe por las flavinas. La actividad se expresa en μ mol Fe reducido. (μ mol flavina)⁻¹.h⁻¹. (n. d. = no detectable).

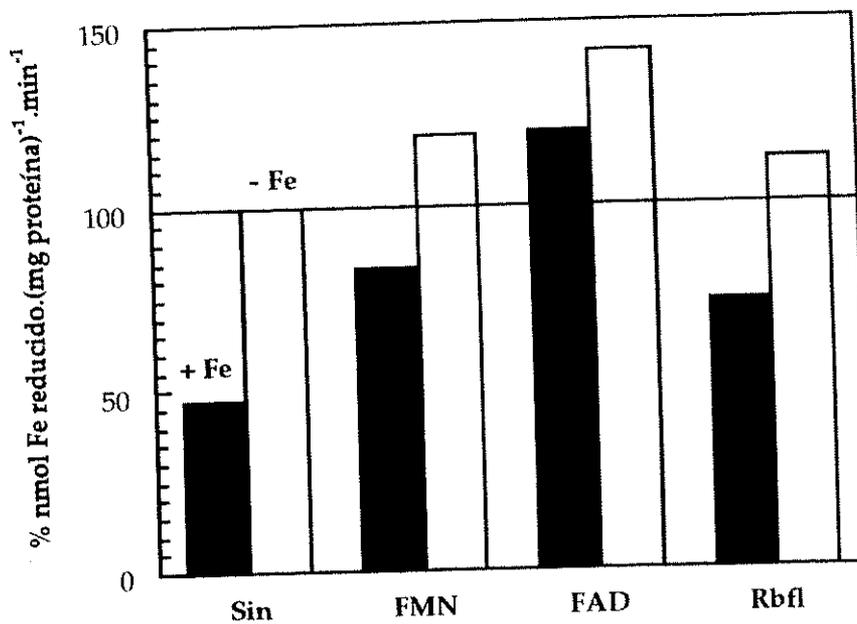


Figura 41: Actividad reductasa férrica de preparaciones de membrana plasmática de hojas control y deficientes a pH 6,8, en presencia de flavinas a una concentración 50 μM , con Fe(III)-EDTA 500 μM . Los porcentajes se expresan tomando como 100% la actividad de las membranas deficientes en ausencia de flavinas, que fue 108 nmol Fe reducido.(mg proteína)⁻¹.min⁻¹.

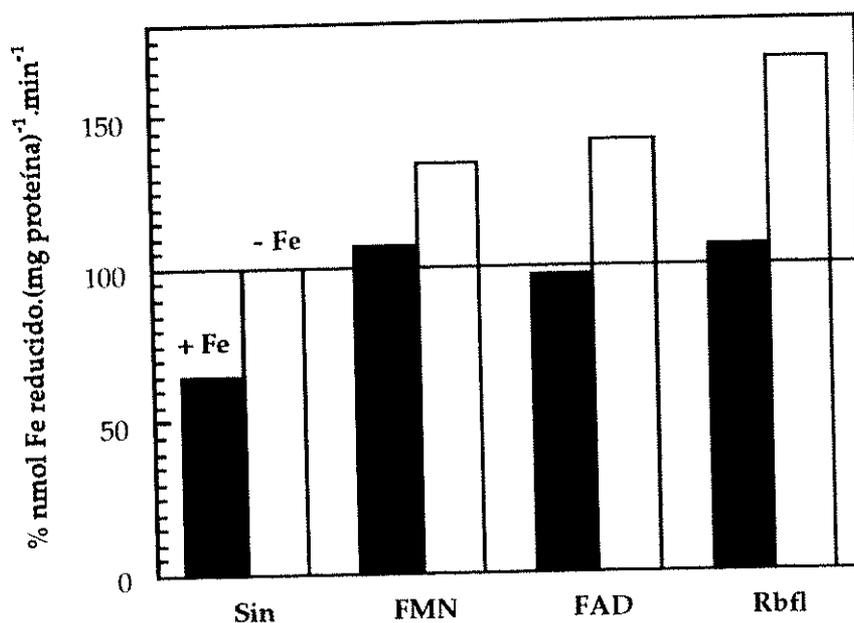


Figura 42: Actividad reductasa férrica de preparaciones de membrana plasmática de hojas control y deficiente a pH 6,8, en presencia de flavinas a una concentración 50 μM , con 500 μM Fe : citrato (relación 1 : 5). Los porcentajes se expresan tomando como 100% la actividad de las membranas deficientes en ausencia de flavinas, que fue 116 nmol Fe reducido.(mg proteína)⁻¹.min⁻¹.

4.1.1.4.- Reductasa férrica en condiciones de deficiencia severa

A lo largo de todo el trabajo se ha venido considerando como material deficiente en Fe las hojas con un contenido de clorofila entre 70 y 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}$. Sin embargo, también se realizaron aislamientos de membrana plasmática de hojas que presentaban una clorosis más severa, con una concentración de clorofila menor de 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}$. A concentraciones de clorofila tan bajas las hojas muestran una gran degradación estructural (Spiller y Terry, 1980) que afecta principalmente al aparato fotosintético.

Los niveles de recuperación de membrana plasmática a lo largo de la purificación fueron similares a los obtenidos para las membranas control y deficientes mostrados en el Cuadro 7. La actividad de estas membranas a pH 6,8 y 500 μM Fe(III)-EDTA fue de 103 nmol Fe reducido.(mg proteína) $^{-1}$.min $^{-1}$, más cercana a la actividad de las membranas de hojas control que a las de hojas deficientes (111 y 144 nmol Fe reducido.(mg proteína) $^{-1}$.min $^{-1}$ respectivamente) (Cuadro 21). Los valores de las constantes cinéticas con Fe(III)-EDTA, KFeCN y NADH se muestran también en el Cuadro 21.

	Actividad	NADH		Fe(III)-EDTA		KFeCN	
		K_m	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
+Fe	111	162	139	103	114	99	1188
-Fe	144	157	213	122	175	126	1421
-Fe extrema (Fe*)	103	103	124	147	153	155	1211
-Fe*/+Fe	0,93	0,64	0,89	1,43	1,34	1,57	1,02
-Fe*/-Fe	0,72	0,66	0,58	1,20	0,87	1,23	0,85

Cuadro 21: Valores de las constantes cinéticas de la reductasa férrica de membrana plasmática de hojas con distintas concentraciones de clorofila. K_m se expresa en μM . V_{max} se expresa en nmol Fe reducido.(mg proteína) $^{-1}$.min $^{-1}$. La actividad reductasa férrica se midió a pH 6,8 y 500 μM Fe(III)-EDTA o KFeCN. Los valores son la media de 6 medidas \pm EE. Fe* corresponde a la membrana plasmática aislada de hojas con deficiencia severa.

El valor de K_m obtenido con NADH para membranas de hojas con deficiencia severa fue menor que para membranas control o con deficiencia intermedia, lo que podría indicar una mayor afinidad para el NADH. Las membranas con deficiencia severa tienen una V_{max} para NADH menor incluso que las membranas control. Las constantes cinéticas para Fe(III)-EDTA y KFeCN se comportan de una manera similar. El valor de K_m para el quelato de Fe en las membranas con deficiencia severa fue superior tanto al de las membranas control (1,4 y 1,6 veces para

Fe(III)-EDTA y KFeCN respectivamente) como al de las membranas de hojas con deficiencia moderada (1,2 veces para Fe(III)-EDTA y KFeCN). Para los valores de V_{max} , el valor obtenido fue intermedio entre los valores de las membranas control y moderadamente deficientes (Cuadro 21).

La dependencia de la actividad respecto al pH se muestra en la Figura 43. El perfil fue semejante al encontrado para las membranas control y deficientes (Figura 43, líneas sin símbolos), con el máximo de actividad a pH 6,8. Los valores de actividad para cada pH eran superiores a los de las membranas control, aunque estaban más próximos a los de éstas que a los de las deficientes intermedias.

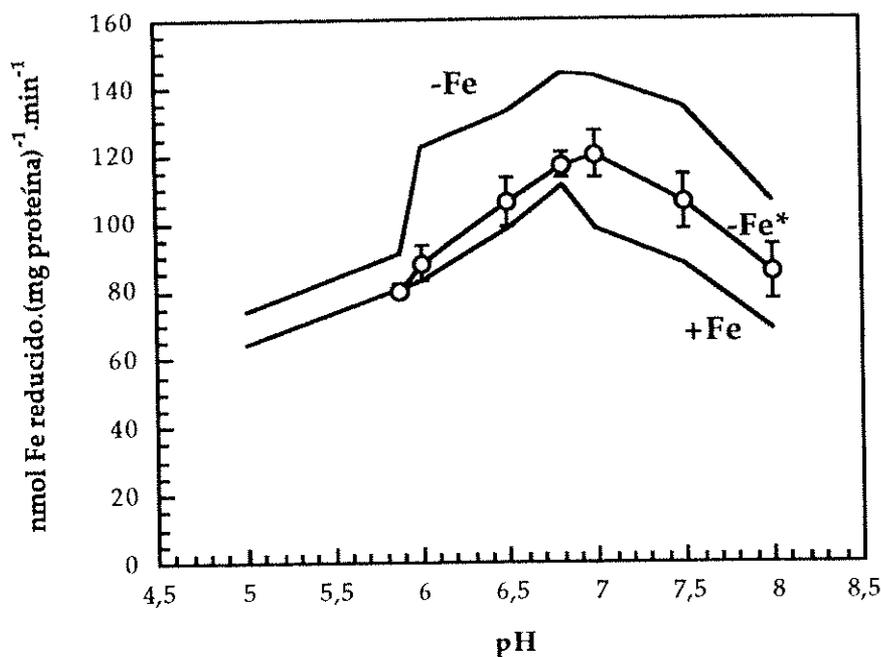


Figura 43: Actividad de la reductasa férrica de membrana plasmática aislada de hojas con deficiencia severa de Fe en función del pH. La concentración de Fe(III)-EDTA fue 500 μ M. Los valores son la media de 2 medidas \pm EE.

4.1.1.5.- Especiación de los complejos y su relación con la actividad reductasa

Se realizó un análisis de las especies mayoritarias de los complejos de Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato para cada una de las condiciones utilizadas para las medidas de actividad. Este análisis se realizó con el programa MINTEQA2 (Allison *et al.*, 1991). Posteriormente se correlacionó la concentración de las especies mayoritarias con los valores de actividad obtenidos.

4.1.1.5.a.- Fe(III)-citrato

Las especies mayoritarias para el Fe(III)-citrato fueron tres, $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$, $[\text{FeOHCit}]^{-1}$ y $[\text{FeCit}_2]^{-3}$, en todas las condiciones utilizadas en los distintos estudios realizados (dependencia de pH, relación Fe : citrato y concentración de complejo).

Especiación en función del pH del medio

Las concentraciones de cada una de las tres especies mayoritarias se muestran en el Cuadro 22. Tanto en este cuadro como en los siguientes dentro de este mismo apartado, las concentraciones de las especies se presentan en μM , al igual que la cantidad total de complejo. Además se ofrecen entre paréntesis los porcentajes de cada especie sobre la cantidad total de Fe (500 μM). Se puede observar que la concentración total de complejo Fe(III)-citrato disminuyó a medida que aumentó el pH. A pH 5,0 más de la mitad del complejo Fe(III)-citrato se encuentra como $[\text{FeCit}_2]^{-3}$, mientras que las otras dos especies, $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$ y $[\text{FeOHCit}]^{-1}$, no representan más del 30% del Fe total. A medida que aumenta el pH, aumenta considerablemente la concentración de $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$ y también ligeramente la concentración de $[\text{FeOHCit}]^{-1}$. Dichas especies llegan a representar a pH 8,0 unos porcentajes de 41 y 17% del Fe total respectivamente. Simultáneamente, la concentración de $[\text{FeCit}_2]^{-3}$ disminuye hasta hacerse muy pequeña a pH 8,0 (1% del Fe total).

	$[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$	$[\text{FeOHCit}]^{-1}$	$[\text{FeCit}_2]^{-3}$	Fe(III)-citrato total
5,0	78 (16%)	51 (10%)	292 (59%)	421 (84%)
5,5	88 (18%)	54 (11%)	271 (54%)	413 (83%)
6,0	123 (25%)	63 (13%)	190 (38%)	376 (75%)
6,5	165 (33%)	74 (15%)	96 (19%)	335 (67%)
6,8	183 (37%)	78 (16%)	56 (11%)	316 (63%)
7,0	192 (38%)	80 (16%)	37 (8%)	308 (62%)
7,5	203 (41%)	92 (18%)	13 (3%)	308 (62%)
8,0	207 (41%)	83 (17%)	4 (1%)	294 (59%)

Cuadro 22: Concentración de las especies mayoritarias para el Fe : citrato (relación 1 : 5 y 500 μM) dependiendo del pH. La concentración de las especies se expresa en μM . Entre paréntesis se indica el porcentaje respecto a la concentración total de Fe.

En la Figura 44 se compara la concentración de las distintas especies con la actividad reductasa férrica en función del pH. Se puede observar que dicha actividad aumentó al aumentar las concentraciones de las especies $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$ y $[\text{FeOHCit}]^{-1}$ hasta un pH de 6,8, mientras que la concentración de $[\text{FeCit}_2]^{-3}$ iba

descendiendo en el mismo intervalo. A partir de este pH, aumentos en las concentraciones de las especies mayoritarias están acompañadas de disminuciones de la actividad reductasa.

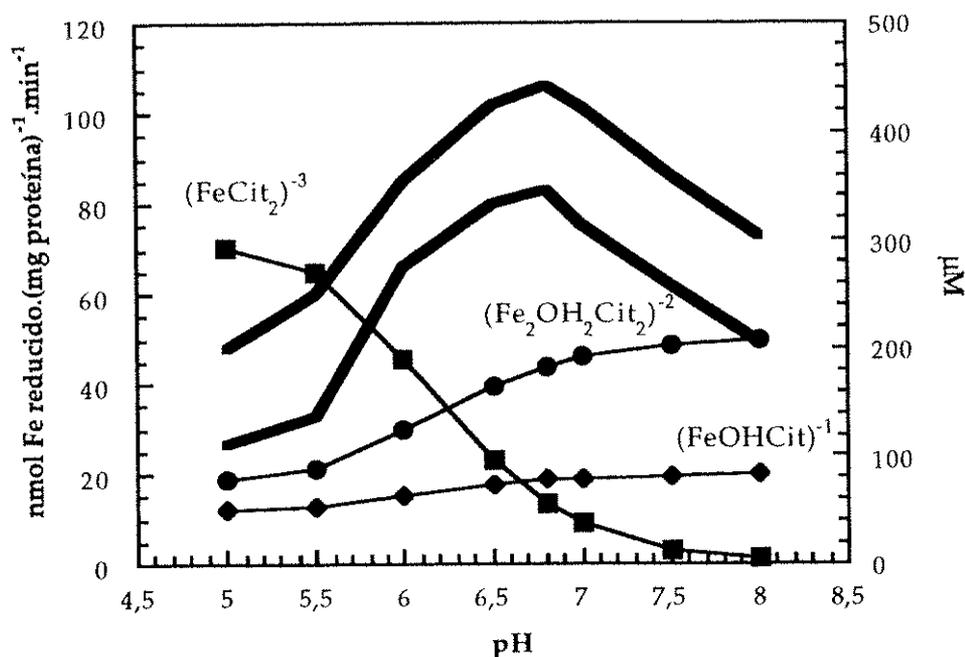


Figura 44: Comparación de las concentraciones de las especies Fe : citrato (relación 1 : 5 y 500 µM) con las actividades de la reductasa férrica en función del pH. Las líneas de trazo grueso representan los valores de la actividad reductasa férrica medida en las mismas condiciones.

Especiación en función de la relación Fe : citrato

Los cambios en las concentraciones de las especies mayoritarias dependiendo de la relación Fe : citrato se muestran en el Cuadro 23. Se puede observar que la concentración total de especies (obtenida como suma de las especies mayoritarias) aumentó al incrementar la relación Fe : citrato. La concentración de la especie $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$ resultó ser la mayoritaria a relaciones bajas de Fe : citrato (42% del Fe total), mientras que en estas condiciones la concentración de la especie $[\text{FeCit}_2]^{-3}$ era prácticamente nula. A medida que aumentó la relación Fe : citrato se produjo una disminución progresiva en la concentración de las especies $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$ y $[\text{FeOHCit}]^{-1}$, que fueron ya muy bajas para relaciones 1 : 150 (1 y 2% del total respectivamente). En cambio, la concentración de la especie $[\text{FeCit}_2]^{-3}$ aumentó progresivamente a medida que aumentaba la relación Fe : citrato, hasta llegar a un 96% del Fe total para la relación 1 : 150.

	$[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$	$[\text{FeOHCit}]^{-1}$	$[\text{FeCit}_2]^{-3}$	Fe(III)-citrato total
1 : 1	208 (42%)	84 (17%)	0 (0%)	292 (59%)
1 : 5	183 (37%)	78 (16%)	56 (11%)	316 (63%)
1 : 10	150 (30%)	69 (14%)	131 (26%)	350 (70%)
1 : 20	94 (19%)	53 (11%)	258 (52%)	406 (81%)
1 : 25	75 (15%)	47 (9%)	303 (61%)	425 (85%)
1 : 30	61 (12%)	42 (8%)	337 (68%)	439 (88%)
1 : 40	41 (8%)	34 (7%)	384 (77%)	459 (92%)
1 : 50	26 (6%)	28 (6%)	413 (83%)	471 (94%)
1 : 75	15 (3%)	20 (4%)	450 (90%)	485 (97%)
1 : 150	4 (1%)	10 (2%)	481 (96%)	496 (99%)

Cuadro 23: Concentración de las especies Fe(III)-citrato (500 μM) dependiendo de la relación Fe : citrato a pH 6,8. La concentración de las especies se expresa en μM . Entre paréntesis se indica el porcentaje respecto a la concentración de Fe.

Los cambios en las concentraciones de las diversas especies comparados con la actividad reductasa se muestran en la Figura 45. La disminución de la actividad reductasa férrica al aumentar la relación Fe : citrato iba acompañada de una disminución de las especies $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$ y $[\text{FeOHCit}]^{-1}$. Se observa, pues, que la actividad y las concentraciones de las dos especies varían en el mismo sentido. Por el contrario, la concentración de la especie $[\text{FeCit}_2]^{-3}$ aumentó al aumentar la relación Fe : citrato.

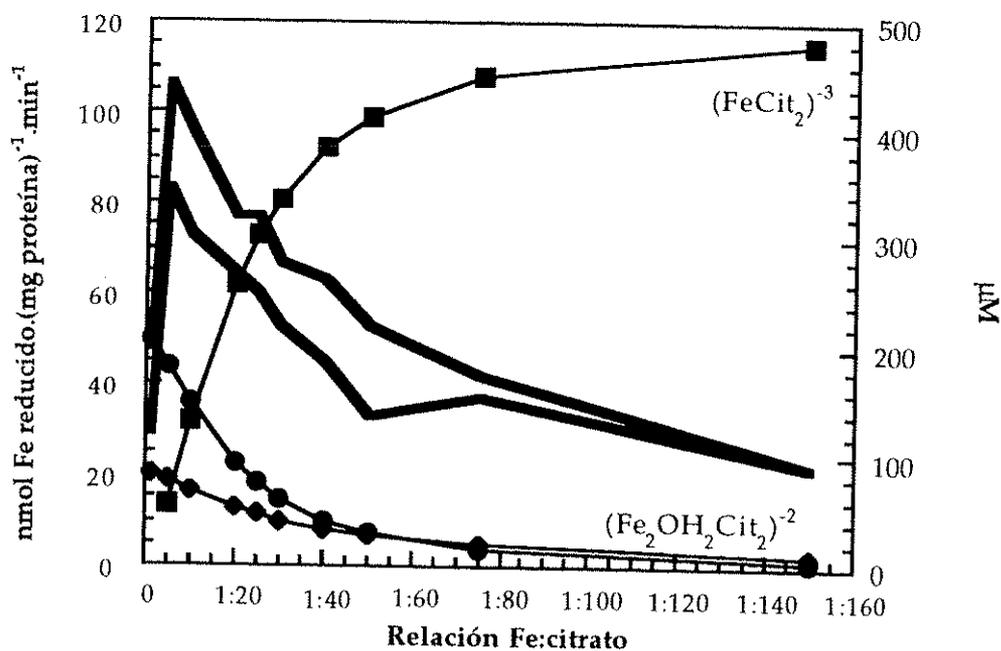


Figura 45: Comparación de las concentraciones de las especies Fe(III)-citrato (500 μM) con las actividades de la reductasa férrica en función de la relación Fe : citrato a pH 6,8. Las líneas de trazo grueso representan los valores de la actividad reductasa férrica medida en las mismas condiciones.

Especiación en función de la concentración del complejo Fe : citrato (1 : 5)

Las concentraciones de las tres especies mayoritarias del complejo Fe : citrato (1 : 5) en función de su concentración en el medio de reacción se muestran en el Cuadro 24. La concentración de todas las especies aumentó, como era de esperar, a medida que aumentaba la concentración de Fe y citrato en el medio de reacción, si bien el porcentaje con respecto al Fe total mostró comportamientos diferentes para cada especie. A concentraciones bajas de Fe(III)-citrato la especie mayoritaria fue $[\text{FeOHCit}]^{-1}$ (54% del Fe total) mientras que la especie $[\text{FeCit}_2]^{-3}$ fue muy minoritaria (2%). A medida que aumentó la concentración de Fe el porcentaje de la especie $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$ fue aumentando, llegando a convertirse en la especie mayoritaria (36%) para una concentración de Fe de 1.000 μM . A esta concentración el porcentaje de la especie $[\text{FeCit}_2]^{-3}$ aumentó hasta un 17% del total, mientras que el de $[\text{FeOHCit}]^{-1}$ disminuyó hasta 11%.

Fe	$[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$	$[\text{FeOHCit}]^{-1}$	$[\text{FeCit}_2]^{-3}$	Fe(III)-citrato total
25	6 (22%)	14 (54%)	0,4 (2%)	20 (80%)
50	14 (27%)	21 (43%)	1 (3%)	36 (72%)
100	32 (32%)	33 (33%)	4 (4%)	68 (68%)
250	88 (35%)	54 (22%)	18 (7%)	160 (64%)
500	183 (37%)	78 (16%)	56 (11%)	317 (63%)
1.000	360 (36%)	108 (11%)	174 (17%)	641 (64%)

Cuadro 24: Concentración de las especies mayoritarias del complejo Fe : citrato (relación 1 : 5) dependiendo de la concentración del complejo a pH 6,8. La concentración de las especies se expresa en μM . Entre paréntesis se indica el porcentaje respecto a la concentración total de Fe.

En la Figura 46 se compara el comportamiento de la concentración de las especies y de la actividad reductasa. Como ya se ha visto en el Cuadro 24, la concentración de las tres especies aumentó con el incremento de la concentración inicial de complejo. Sin embargo, la concentraciones de al menos dos de las especies ($[\text{FeCit}_2]^{-3}$ y $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$) siguieron aumentando después de que la actividad reductasa ya se había saturado.

Especiación en función de la concentración del complejo Fe : citrato (1 : 20)

Las concentraciones de las especies mayoritarias en función de la concentración inicial en el medio de reacción del complejo Fe : citrato (1 : 20) se muestran en el Cuadro 25. Al igual que con la relación 1 : 5, la concentración de todas las especies aumentó al aumentar la concentración de Fe : citrato en el medio de reacción. La especie mayoritaria a concentraciones bajas del complejo fue

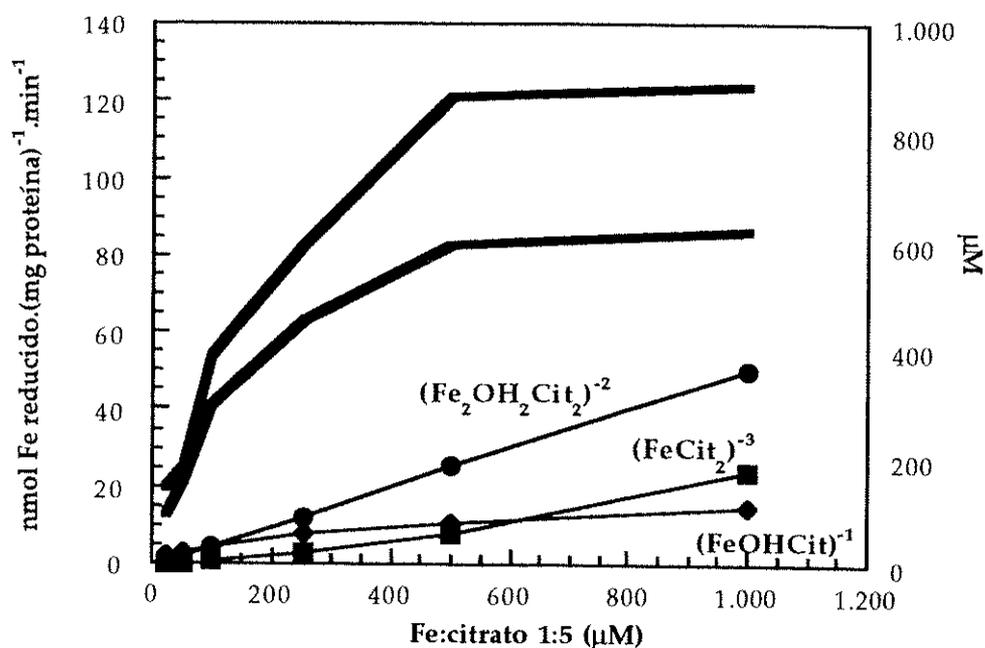


Figura 46: Comparación de las concentraciones de las especies mayoritarias del complejo Fe : citrato (relación 1 : 5) con la actividad dependiendo de la concentración del complejo a pH 6,8. Las líneas de trazo grueso representan los valores de la actividad reductasa férrica medida en las mismas condiciones.

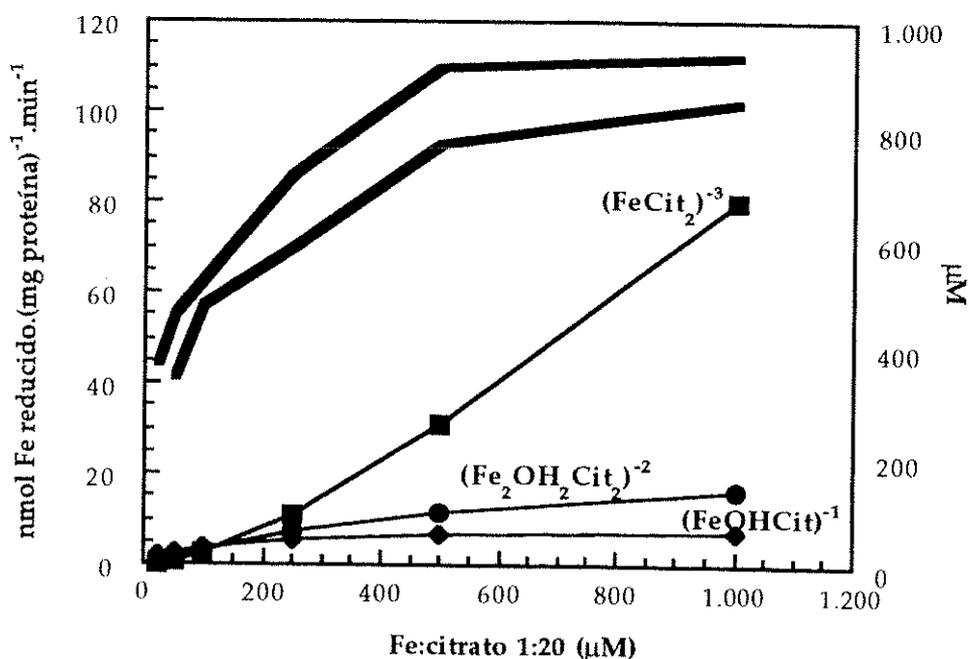


Figura 47: Comparación de las concentraciones de las especies mayoritarias del complejo Fe : citrato (relación 1 : 20) con la actividad reductasa férrica en función de la concentración del complejo a pH 6,8. Las líneas de trazo grueso representan los valores de la actividad reductasa férrica medida en las mismas condiciones.

$[\text{FeOHCit}]^{-1}$, con un 52% del Fe total. La concentración de esta especie disminuyó a medida que aumentaba la concentración del complejo, hasta llegar a un 6% para 1.000 μM Fe. La especie $[\text{FeCit}_2]^{-3}$ mostró el comportamiento contrario, pasando de ser la especie minoritaria a concentraciones bajas de Fe (8%) a ser la mayoritaria a concentraciones altas (67%). La especie $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$ mostró un comportamiento totalmente diferente, ya que su porcentaje aumentó desde 20% (25 μM Fe) hasta alcanzar un máximo de 26% (100 μM Fe), para a continuación descender hasta un 14% (1.000 μM Fe).

	$[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$	$[\text{FeOHCit}]^{-1}$	$[\text{FeCit}_2]^{-3}$	Fe(III)-citrato total
25	5 (20%)	13 (52%)	2 (8%)	20 (80%)
50	12 (24%)	20 (40%)	6 (13%)	38 (76%)
100	26 (26%)	29 (29%)	20 (20%)	74 (74%)
250	59 (24%)	43 (17%)	89 (36%)	191 (76%)
500	94 (19%)	53 (11%)	258 (52%)	406 (81%)
1.000	136 (14%)	61 (6%)	667 (67%)	864 (86%)

Cuadro 25: Concentración de las especies mayoritarias de Fe : citrato 1 : 20 a pH 6,8 dependiendo de la concentración de Fe(III)-citrato. La concentración de las especies se expresa en μM . Entre paréntesis se indica el porcentaje respecto a la concentración total de Fe.

En la Figura 47 se compara el comportamiento de la concentración de las distintas especies con el de la actividad reductasa. La concentración de las especies $[\text{FeCit}_2]^{-3}$ y $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$ aumentó con el incremento de la concentración inicial de complejo, de manera similar a como aumentaron las actividades. Sin embargo, la concentración de la especie $[\text{FeCit}_2]^{-3}$ siguió aumentando cuando la reductasa ya había saturado.

Cinéticas en función de las concentraciones estimadas de las distintas especies

Como se ha visto en los Cuadros 24 y 25, la concentración total de Fe(III)-citrato estimada para el medio de ensayo fue realmente menor que la teórica considerada anteriormente para el cálculo de las constantes cinéticas (apartado 4.1.1.3.c, ver Cuadro 9). Por esta razón se han recalculado los valores de las constantes cinéticas teniendo en cuenta las concentraciones estimadas para las distintas especies (Cuadro 26). Utilizando esta aproximación para el Fe : citrato (relación 1 : 5), los valores de K_m disminuyeron ligeramente respecto a los obtenidos anteriormente. Los valores obtenidos fueron 140 y 141 μM , para la membrana plasmática control y deficiente en Fe respectivamente (Cuadro 26), frente a los estimados anteriormente de 170 y 157 μM (Cuadro 9). Los valores de V_{max} se

mantuvieron dentro del mismo orden. Las relaciones -Fe/+Fe para los valores de K_m no variaron de forma significativa.

En el caso de Fe : citrato (relación 1 : 20), el valor de K_m disminuyó para las membranas deficientes en Fe (34 frente a 46 μM) y aumentó para las membranas control (61 frente a 38 μM). Los valores de V_{max} se mantuvieron dentro del mismo orden. La relación -Fe/+Fe para los valores de K_m disminuyó hasta 0,6 (frente a la relación 1,2 estimada previamente).

	K_m μM		V_{max} nmol Fe red.(mg proteína) ⁻¹ .min ⁻¹	
	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe
Fe : citrato 1 : 5	140	141 (1,0)	113	155 (1,4)
Fe : citrato 1 : 20	61	34 (0,6)	104	112 (1,1)

Cuadro 26: Valores de las constantes cinéticas de membranas control y deficientes en Fe al variar la concentración del complejo Fe : citrato (relaciones 1 : 5 y 1 : 20), considerando la concentración total de complejos obtenida mediante el programa MINTEQA2. Entre paréntesis se indica la relación -Fe/+Fe.

Para intentar clarificar la influencia de cada especie en la reductasa de la membrana plasmática de hoja se comprobó el tipo de cinéticas que mostraban considerando por separado la concentración de cada especie y calculando, si era posible, los correspondientes valores de K_m . Esta aproximación asume que la actividad se debe solamente a una especie en cada caso. Evidentemente, esta es una posición muy extrema cuyos resultados deben ser extrapolados con mucha precaución. Así, la actividad reductasa mostró una cinética del tipo Michaelis-Menten con las especies $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$ y $[\text{FeCit}_2]^{-3}$, tanto para una relación 1 : 5 como 1 : 20. Para la especie $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$ los valores de K_m fueron 38 y 34 μM (relación 1: 5) y de 21 y 14 μM (relación 1 : 20) para membranas control y deficientes respectivamente. Para la especie $[\text{FeCit}_2]^{-3}$ los valores de K_m fueron de 4 y 5 μM (relación 1 : 5) y de 8 y 6 μM (relación 1 : 20) para membranas control y deficientes en Fe respectivamente. La especie $[\text{FeOHCit}]^{-1}$ mostró una cinética de saturación a una relación 1 : 5 pero no fue posible realizar un buen ajuste. Para una relación 1 : 20 dicha especie no mostró una cinética de saturación.

4.1.1.5.b.- Fe(III)-malato

Las especies mayoritarias del complejo Fe(III)-malato fueron dos, $[\text{FeOHMal}]^0$ y $[\text{FeMal}]^{+1}$, para todas las condiciones utilizadas a lo largo de este trabajo (dependiendo de pH, relación Fe : malato y concentración de complejo).

Especiación en función del pH del medio

Las concentraciones de las especies mayoritarias de Fe : malato (relación 1 : 25) en función del pH del medio de reacción se muestran en el Cuadro 27. El primer hecho destacable es la fuerte dependencia de la concentración total de complejos con respecto al pH. El porcentaje de Fe formando complejo con el malato desciende fuertemente al aumentar el pH hasta representar solamente un 2% a pH 8,0. La concentración de las dos especies, $[\text{FeOHMal}]^0$ y $[\text{FeMal}]^{+1}$, descendió a medida que aumentaba el pH en el rango 5,0-8,0.

	$[\text{FeMal}]^{+1}$	$[\text{FeOHMal}]^0$	Fe(III)-malato total
5,0	67 (13%)	427 (85%)	494 (99%)
5,5	23 (5%)	463 (93%)	486 (97%)
6,0	7 (1%)	453 (91%)	460 (92%)
6,5	2 (0,4%)	387 (77%)	389 (78%)
6,8	0,8 (0,16%)	308 (62%)	309 (62%)
7,0	0,4 (0,08%)	240 (48%)	240 (48%)
7,5	0,04 (0,01%)	78 (16%)	78 (16%)
8,0	0,002 (0,0004%)	11 (2%)	11 (2,2%)

Cuadro 27: Concentración de las especies mayoritarias de Fe : malato (relación 1 : 25 y 500 μM) dependiendo del pH. La concentración de las especies se expresa en μM . Entre paréntesis se indica el porcentaje respecto a la concentración total de Fe.

La comparación de la concentración de las especies con la actividad reductasa se muestra en la Figura 48. La concentración de la especie $[\text{FeMal}]^{+1}$ es muy minoritaria, y no parece estar relacionada con la actividad reductasa.

Especiación en función de la relación Fe : malato

Las concentraciones de las especies mayoritarias Fe(III)-malato en función de la relación Fe : malato se muestran en el Cuadro 28. En este caso, la concentración total de los complejos de Fe(III)-malato presentes en el medio de reacción aumentó al aumentar la relación Fe : malato. La especie mayoritaria fue siempre $[\text{FeOHMal}]^0$, aumentando tanto su concentración como su porcentaje respecto al Fe total al aumentar la relación Fe : malato. La especie $[\text{FeOHMal}]^0$ fue siempre más del 99% de los complejos formados.

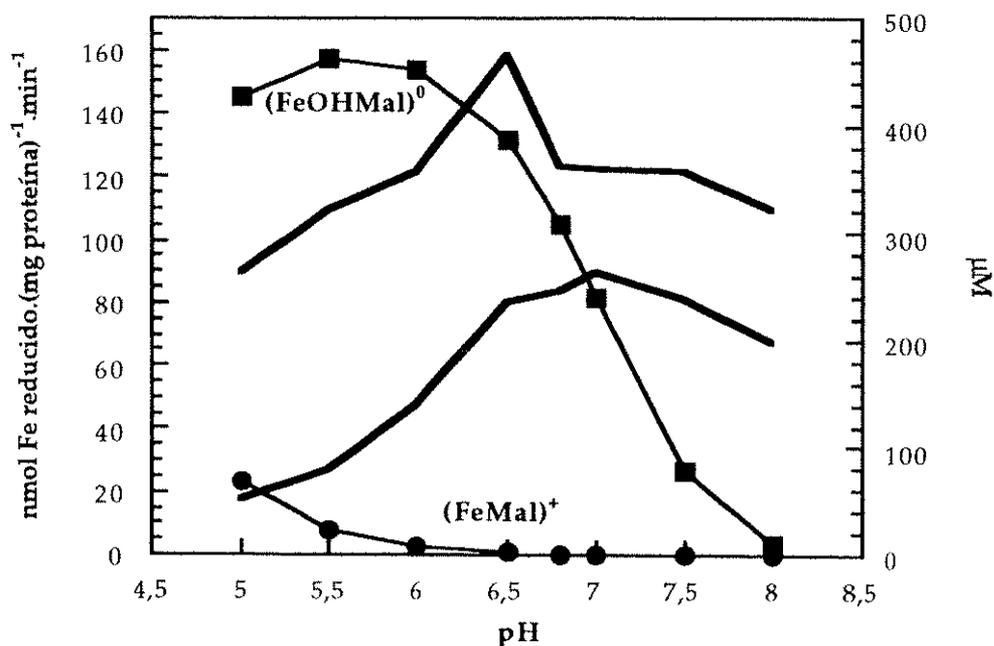


Figura 48: Comparación de la concentración de las especies mayoritarias de Fe : malato (relación 1 : 25 y 500 μM) con la actividad de la reductasa férrica en función del pH. Las líneas de trazo grueso representan los valores de la actividad reductasa férrica medida en las mismas condiciones.

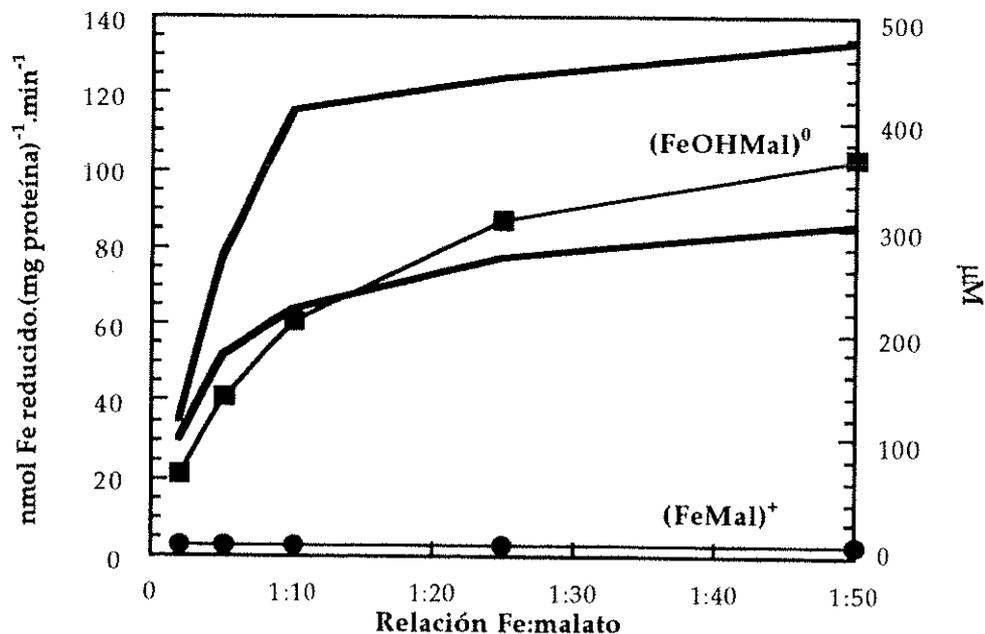


Figura 49: Comparación de la concentración de las especies mayoritarias del complejo Fe(III)-malato (500 μM) con la actividad de la reductasa férrica en función de la relación Fe : malato a pH 6,8. Las líneas de trazo grueso representan los valores de la actividad reductasa férrica medida en las mismas condiciones.

	[FeMal] ⁺¹	[FeOHMal] ⁰	Fe(III)-malato total
1 : 2	0,2 (0,03%)	68 (14%)	68 (14%)
1 : 5	0,3 (0,07%)	139 (28%)	139 (28%)
1 : 10	0,5 (0,10%)	211 (42%)	211 (42%)
1 : 25	0,8 (0,16%)	308 (62%)	309 (62%)
1 : 50	1,0 (0,19%)	365 (73%)	366 (73%)

Cuadro 28: Concentración de las especies mayoritarias del complejo Fe(III)-malato (500 µM) dependiendo de la relación Fe : malato y a pH 6,8. La concentración de las especies se expresa en µM. Entre paréntesis se indica el porcentaje respecto a la concentración total de Fe.

La comparación de la concentración de las especies con la actividad reductasa se muestra en la Figura 49. El aumento de la concentración de [FeMal]⁺¹ resultó tan pequeño en comparación con el de la especie [FeOHMal]⁰ que no parece tener relación con la actividad reductasa férrica.

Especiación en función de la concentración del complejo Fe : malato (1 : 25) a pH 6,8

Las concentraciones de las especies mayoritarias de Fe : malato (relación 1 : 25) a pH 6,8 en función de la concentración final del complejo en el medio de reacción se muestran en el Cuadro 29. Al igual que en el apartado anterior, la concentración de la especie [FeOHMal]⁰ aumentó al aumentar la concentración de Fe(III)-malato en el medio de reacción. Esta especie fue siempre más del 99% del total de los complejos formados.

	[FeMal] ⁺¹	[FeOHMal] ⁰	Fe(III)-malato total
25	0,01 (0,02%)	2 (10%)	2 (8%)
50	0,02 (0,04%)	9 (17%)	9 (18%)
100	0,07 (0,07%)	29 (29%)	29 (29%)
250	0,3 (0,1%)	119 (48%)	119 (48%)
500	0,8 (0,2%)	308 (62%)	309 (62%)
1.000	2,0 (0,2%)	728 (73%)	730 (73%)

Cuadro 29: Concentración de las especies mayoritarias del complejo Fe : malato (relación 1 : 25) dependiendo de la concentración del complejo a pH 6,8. La concentración de las especies se expresa en µM. Entre paréntesis se indica el porcentaje respecto a la concentración total del complejo.

En la Figura 50 se compara la concentración de las especies con la actividad FC-R.



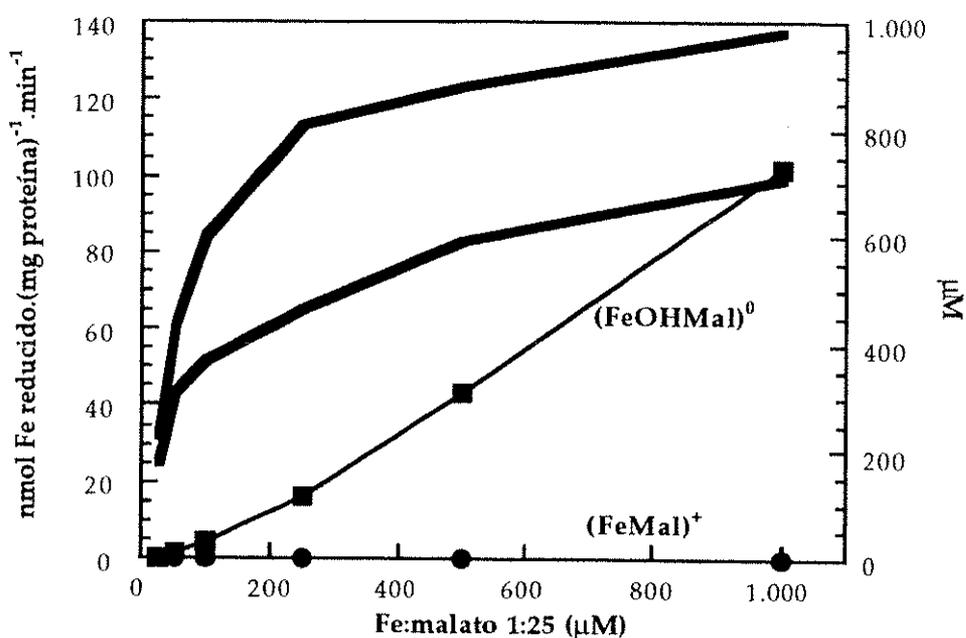


Figura 50: Comparación de la concentración de las especies mayoritarias del complejo Fe : malato (relación 1 : 25) con la actividad de la reductasa férrica en función de la concentración del complejo a pH 6,8. Las líneas de trazo grueso representan los valores de la actividad reductasa férrica medida en las mismas condiciones.

Especiación en función de la concentración del complejo Fe : malato (1 : 25) a pH 5,5

Las concentraciones de las especies mayoritarias de Fe : malato (relación 1 : 25) a pH 5,5 en función de la concentración final del complejo en el medio de reacción se muestran en el Cuadro 30. La concentración total de complejos formados fue mayor que en el caso de la cinética a pH 6,8. El comportamiento de las dos especies fue similar a ambos valores de pH, aunque la concentración de cada una de las especies fue mayor a pH 5,5. La especie $[\text{FeOHMal}]^0$ fue siempre muy mayoritaria.

	$[\text{FeMal}]^{+1}$	$[\text{FeOHMal}]^0$	Fe(III)-malato total
25	1 (3%)	16 (66%)	17 (68%)
50	2 (4%)	39 (77%)	41 (82%)
100	4 (4%)	85 (85%)	89 (89%)
250	11 (4%)	226 (90%)	237 (95%)
500	23 (5%)	463 (93%)	486 (97%)
1.000	49 (5%)	934 (93%)	983 (98%)

Cuadro 30: Concentración de las especies mayoritarias del complejo Fe : malato (relación 1 : 25) en el medio de reacción dependiendo de la concentración del complejo a pH 5,5. La concentración de las especies se expresa en μM . Entre paréntesis se indica el porcentaje respecto a la concentración total de Fe.

La comparación de la concentración de las especies y la actividad FC-R (Figura 51) mostró el mismo perfil que a pH 6,8, con un porcentaje mayoritario de la especie $[\text{FeOHMal}]^0$.

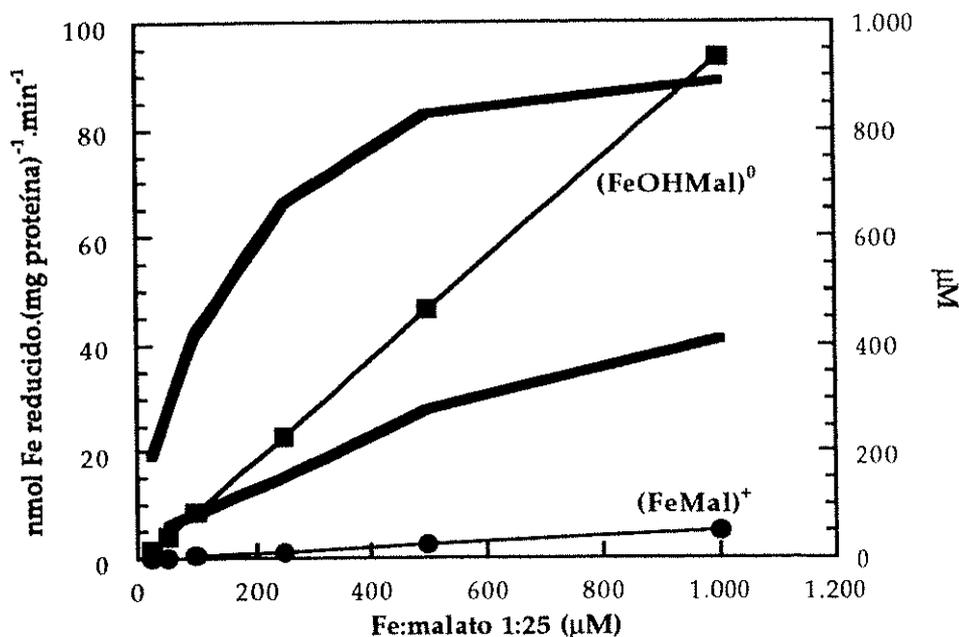


Figura 51: Comparación de la concentración de las especies mayoritarias del complejo Fe : malato (relación 1 : 25) con la actividad de la reductasa férrica en función de la concentración del complejo a pH 5,5. Las líneas de trazo grueso representan los valores de la actividad reductasa férrica medida en las mismas condiciones.

Cinéticas en función de la concentración real de complejo

Al igual que en el caso del Fe(III)-citrato, la concentración total de complejos Fe(III)-malato estimada en el medio de reacción es menor que la concentración teóricamente añadida. En el Cuadro 31 se muestran los valores de las constantes cinéticas calculados teniendo en cuenta la concentración total estimada de complejos en el medio de reacción. Con esta forma de cálculo y a pH 6,8 los valores de K_m disminuyeron considerablemente respecto a los obtenidos previamente (ver Cuadro 9), dando valores próximos a 6 y 8 μM para las membranas control y deficientes respectivamente, frente a los inicialmente calculados de 66 y 73 μM . La relación de los valores de K_m para las membranas deficientes y controles fue de 1,3.

Por último, a pH 5,5 los valores de K_m disminuyeron respecto a los obtenidos anteriormente tanto para las membranas control como deficientes (268 y 72 μM respectivamente frente a los inicialmente estimados de 637 y 147 μM). La relación de los valores de K_m para las membranas deficientes y controles fue de 0,3.

	K_m μM		V_{max} $\text{nmol Fe red.}(\text{mg proteína})^{-1}.\text{min}^{-1}$	
	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe
Fe : malato 1 : 25 pH 6,8	5,8	7,5 (1,3)	79	122 (1,5)
Fe : malato 1 : 25 pH 5,5	268	72 (0,3)	43	88 (2,0)

Cuadro 31: Valores de las constantes cinéticas de membranas control y deficientes en Fe al variar la concentración del complejo Fe(III)-malato (relación 1:25) a valores de pH 6,8 y 5,5, considerando la concentración total de los complejos obtenida mediante el programa MINTEQA2. Entre paréntesis se indica la relación -Fe/+Fe.

Se comprobó el tipo de cinética considerando las especies mayoritarias individualmente. Tanto con la especie $[\text{FeOHMal}]^0$ como con la $[\text{FeMal}]^{+1}$ se obtienen cinéticas tipo Michaelis-Menten. Para la especie $[\text{FeOHMal}]^0$, que representa más del 99% del complejo en estas condiciones, los valores de K_m fueron 6 y 7 μM (pH 6,8) y 255 y 69 μM (pH 5,5) para las membranas control y deficientes en Fe respectivamente. Para la especie $[\text{FeMal}]^{+1}$ los valores aparentes de K_m fueron 14 y 19 nM (pH 6,8) y 12 y 3 μM (pH 5,5) para membranas control y deficientes en Fe respectivamente. Hay que tener en cuenta que los valores de concentración de esta especie son muy bajos, lo que hace que los valores de K_m obtenidos sean tan pequeños. Cabe destacar que, en general, los ajustes de Eadie-Hofstee para las membranas deficientes en Fe son siempre mejores que los de las membranas control.

4.1.1.5.c.- Estructura de los complejos

Para completar la caracterización de la reductasa férrica con los complejos de Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato utilizados, se estudiaron las distintas posibilidades para la estructura de cada una de las especies mayoritarias. Las estructuras se diseñaron con el programa Hiperchem (1993) versión 3.0 para Windows. De cada especie se ha tomado como más favorable aquella estructura que presentaba una menor energía de formación (ver Anexo II).

4.1.2.- Reductasa férrica en cloroplastos

Se estudió la posible existencia de actividad reductasa en cloroplastos aislados. Los experimentos de reducción se desarrollaron sólo con cloroplastos de hojas control de remolacha. Para ello, se aislaron los cloroplastos en un gradiente de sacarosa.

Los valores de actividad reductasa obtenidos fueron 14 y 0-3 nmol Fe reducido.(mg Cfl)⁻¹.min⁻¹ en presencia y ausencia de NADH, respectivamente. Se intentó obtener la dependencia de pH de la actividad reductasa, medida en el rango 5,5-7,5, pero sólo se obtuvieron tasas de reducción medibles para pH 7,0 y 7,5 con valores de 14 y 26 nmol Fe reducido.(mg Cfl)⁻¹.min⁻¹. A valores de pH menores la tasa de reducción no fue cuantificable.

4.1.3.- Reductasa férrica en protoplastos

4.1.3.1.- Aislamiento de protoplastos

La composición original del medio de incubación utilizado era sorbitol 0,5 M, celulosa 4% (p/v), pectinasa 0,2 % (p/v), DTT 2 mM, CaCl₂ 1 mM y Mes-KOH 2 mM, con un pH 5,6. La incubación se desarrolló durante 2 h a 25 °C, con luz blanca de 50 µmol quanta.m⁻².s⁻¹. Este protocolo estándar sólo permitió obtener protoplastos intactos de hojas control.

La adición de PVP y BSA, ya usados rutinariamente en el aislamiento de membrana plasmática de hojas y raíces (Susín *et al.*, 1996; ver Materiales y Métodos 3.4.1.2), permitió la obtención de protoplastos tanto de hojas control como de hojas deficientes en Fe. Las concentraciones utilizadas fueron 5% de PVP (p/v) y 0,2% de BSA (p/v).

Para aumentar los rendimientos del aislamiento de protoplastos se aumentó el tiempo de incubación, pasando de 2 a 15 h. La incubación se realizó a temperatura ambiente y en oscuridad. El aumento en el tiempo de incubación obligó a variar las concentraciones de los enzimas. La concentración óptima de los enzimas para las hojas deficientes en Fe se estableció en 2% de celulosa y 0,1% de pectinasa, ambos en p/v (Figura 52b). Para las hojas control fue necesario disminuir estas concentraciones, ya que resultaban muy agresivas, obteniéndose protoplastos en mal estado (Figura 52c). Así, las concentraciones de enzimas para el aislamiento de protoplastos de las hojas control fueron de 1,2% de celulosa y 0,08% de pectinasa (Figura 52a).

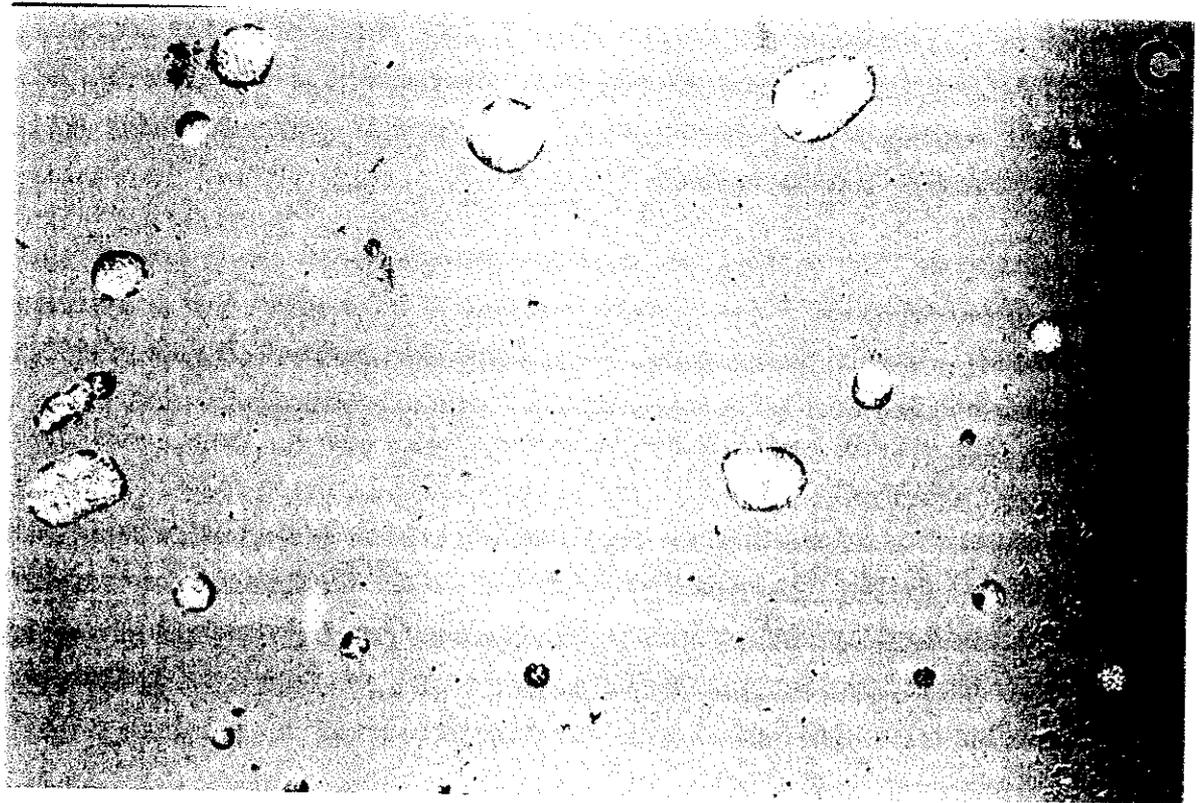
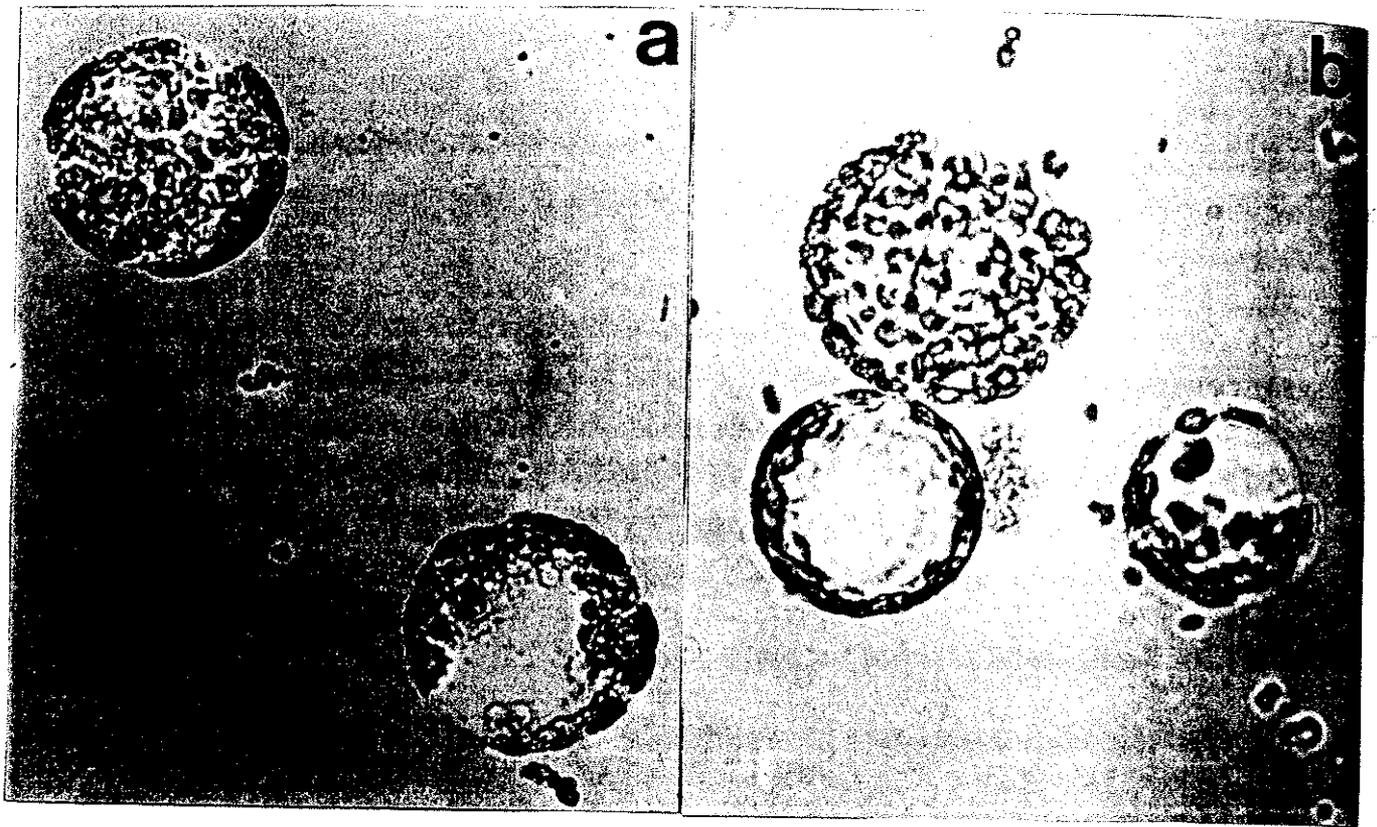


Figura 52: Protoplastos de hojas control (+Fe, a) y deficientes (-Fe, b) aislados a las concentraciones consideradas como óptimas de los enzimas (40 aumentos) y protoplastos control (+Fe*, c) aislados en las condiciones de los protoplastos de hojas deficientes (10 aumentos).

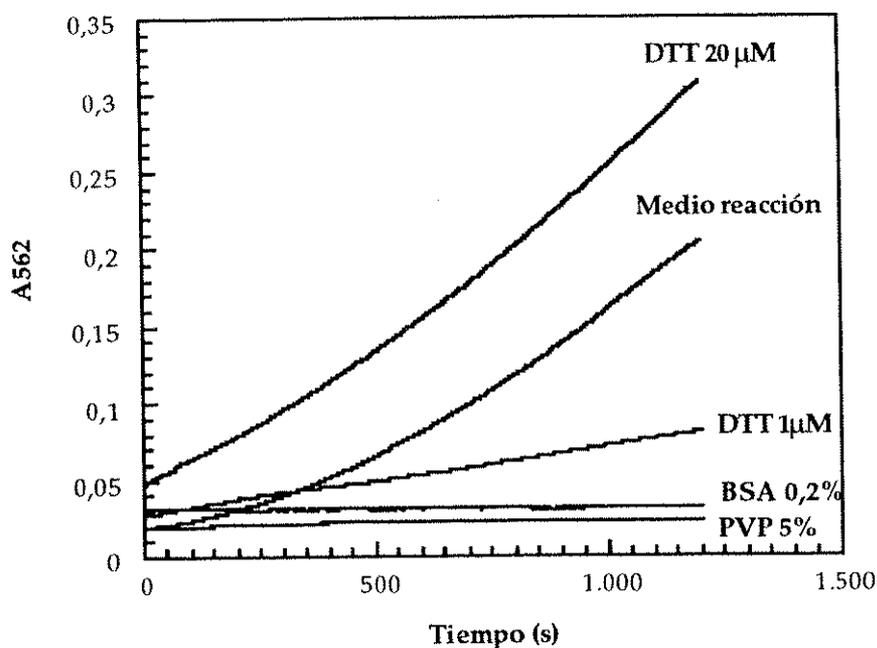


Figura 53: Reducción inespecífica de Fe por el medio de reacción sin protoplastos y por los componentes individuales del medio.

El medio de aislamiento original de protoplastos contenía DTT (2 mM), cuya presencia en el medio de incubación era necesaria para obtener buenos rendimientos en el aislamiento. Por ejemplo, la utilización de una concentración de DTT 200 μ M conllevaba un descenso en el rendimiento de un 50%. Sin embargo, el DTT es un reductor fuerte que interfiere en las medidas de reducción posteriores. Como se muestra en la Figura 53, tanto el medio de reacción sin protoplastos como el DTT sólo daban una fuerte reducción inespecífica (indicada por un aumento de absorbancia a 562 nm). En la misma Figura 53 se observa que ni el PVP, ni el BSA producen reducción inespecífica. Dado que la reducción por DTT podría enmascarar la reductasa férrica de los protoplastos, se decidió eliminar dicho compuesto antes de la medida. Para ello, los protoplastos aislados se lavaron varias veces con medio sin DTT y se recogió el sobrenadante. Como se muestra en la Figura 54, tras 3 lavados el sobrenadante presentaba la misma capacidad de reducción que el medio fresco libre de DTT, por lo que se consideró que los protoplastos estaban libres de DTT tras dicho número de lavados.

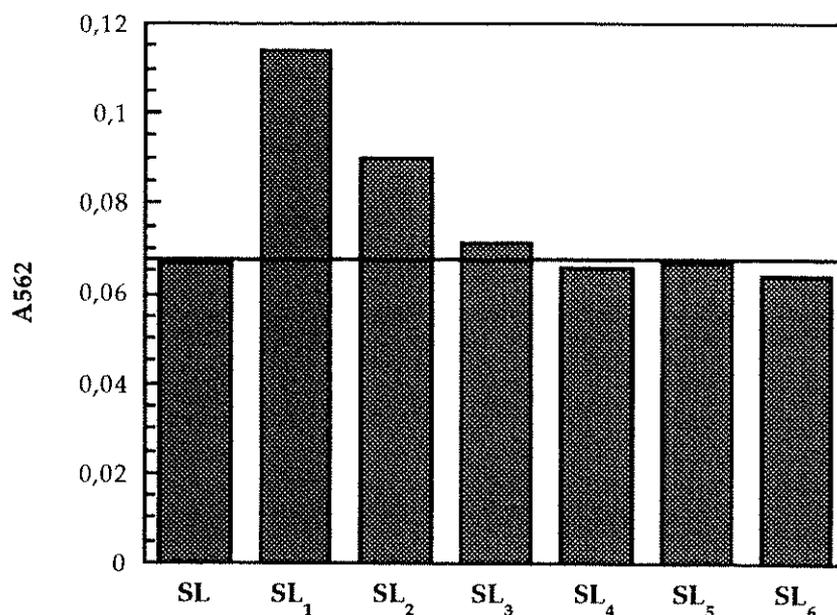


Figura 54: Reducción inespecífica de Fe en el medio de disolución de los protoplastos tras sucesivos lavados con el medio sin DTT. SL corresponde a la solución de lavado fresca, SL₁ al primer sobrenadante sin ningún lavado y de SL₂ en adelante a los sobrenadantes de los lavados sucesivos. Se adicionaron 20 μ L de la solución de lavado para 1 mL de medio de reacción. La medida se mantuvo durante 20 min.

Los rendimientos obtenidos en el aislamiento y purificación de protoplastos, tal y como se describe en el apartado 3.6.2.2. de Materiales y Métodos, fueron de 230 y 78 μ g Cfl.(g hoja)⁻¹ para las hojas control y deficientes, respectivamente (Cuadro 32). Así, la cantidad de clorofila recuperada en los protoplastos correspondió al 38% y 50% de la clorofila inicial de las hojas control y deficientes en Fe, respectivamente. El porcentaje de protoplastos intactos en las preparaciones finales fue de un 91-96%. Tal como se muestra en la Figura 52, los protoplastos obtenidos tanto de hojas control como deficientes presentan forma esférica, con los cloroplastos distribuidos en la periferia, y color verde.

	Hoja		Protoplastos		
	μ mol Cfl.m ⁻²	μ g Cfl.(g hoja) ⁻¹	μ g Cfl.(g hoja) ⁻¹	Rendimiento	% Intactos
+Fe	350 \pm 10	606 \pm 17	230 \pm 6	38%	91 \pm 2
-Fe	90 \pm 10	156 \pm 17	78 \pm 8	50%	96 \pm 1

Cuadro 32: Concentración de clorofila en hojas y protoplastos aislados de hojas, rendimientos en la recuperación de la clorofila inicial de la hoja en los protoplastos y grado de protoplastos intactos obtenidos en el aislamiento de hojas control y deficientes en Fe. Los valores son la media de 3 aislamientos \pm EE.

Para comprobar si los protoplastos eran representativos de las hojas de las que se habían aislado se analizó la composición de pigmentos fotosintéticos mediante HPLC. Esta comprobación es posible, ya que la composición de los pigmentos fotosintéticos en hojas enteras de remolacha ya ha sido caracterizada tanto en condiciones control como de deficiencia de Fe (Morales *et al.*, 1990). Los protoplastos deficientes presentaron incrementos del 19% en la relación violaxantina/clorofila a y del 31% en la relación luteína/clorofila a (Cuadro 33) respecto a los protoplastos control. En general se observa un aumento en la concentración de los pigmentos del ciclo VAZ (violaxantina, anteraxantina y zeaxantina) para los protoplastos de hojas deficientes. Estas diferencias concuerdan con los cambios en composición descritos para las hojas enteras control y deficientes utilizadas en el aislamiento, con unos contenidos de 350 y 90 $\mu\text{mol Cfl.m}^{-2}$, respectivamente (Morales *et al.*, 1990). Por lo tanto, estos datos permiten asegurar que los protoplastos obtenidos son representativos de las hojas de las que fueron aislados.

	+Fe	-Fe
violaxantina/clorofila <u>a</u>	59 \pm 1	70 \pm 1
anteraxantina/clorofila <u>a</u>	7 \pm 1	20 \pm 1
luteína/clorofila <u>a</u>	158 \pm 5	207 \pm 5
Zeaxantina/clorofila <u>a</u>	1 \pm 1	8 \pm 1
VAZ/clorofila <u>a</u>	68 \pm 1	98 \pm 1
β -caroteno/clorofila <u>a</u>	110 \pm 1	105 \pm 5
clorofila a /clorofila <u>b</u>	3,4 \pm 0,1	3,4 \pm 0,2

Cuadro 33: Relación molar de los pigmentos fotosintéticos en preparaciones de protoplastos intactos aislados de hojas control (+Fe) y deficientes (-Fe) en Fe. Las medidas se expresan en $\text{mmol pigmento} \cdot (\text{mol clorofila } \underline{a})^{-1}$. Los valores son la media de 2 medidas \pm EE.

4.1.3.2.- Caracterización de la reductasa férrica en los protoplastos

Para optimizar las condiciones de la reacción se realizaron estudios previos a las medidas de reductasa. Por un lado, se comprobó la influencia de las variables luz y tiempo de reacción. Por otro lado, se comprobó que los protoplastos estaban intactos después de las medidas de reducción.

Para estudiar la influencia de la luz en la reducción de Fe por los protoplastos se realizaron medidas tanto en oscuridad total durante el tiempo de la reacción como medidas iluminando las muestras con luz roja (intensidad 50 $\mu\text{mol quanta.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Tal como se muestra en la Figura 55, las muestras iluminadas mostraron valores significativos de reducción, mientras que las que permanecían en oscuridad

reducían mucho menos Fe. Los valores de actividad para las muestras iluminadas fueron de $1,5 \pm 0,1$ y $2,0 \pm 0,1$ nmol Fe reducido.(mg Cfl)⁻¹.s⁻¹ para protoplastos de hojas control y deficientes en Fe respectivamente. Por tanto, la relación -Fe/+Fe fue de 1,3. En el caso de las medidas en oscuridad se obtuvo un valor de aproximadamente 0,04 nmol Fe reducido.(mg Cfl)⁻¹.s⁻¹ para los protoplastos de hojas control, mientras que para los protoplastos de hojas deficientes los valores de absorbancia estaban por debajo del límite de detección (aproximadamente 0,01 nmol Fe.(mg Cfl)⁻¹.s⁻¹ en 1 mL). Por lo tanto, todas las medidas posteriores fueron realizadas con protoplastos iluminados.

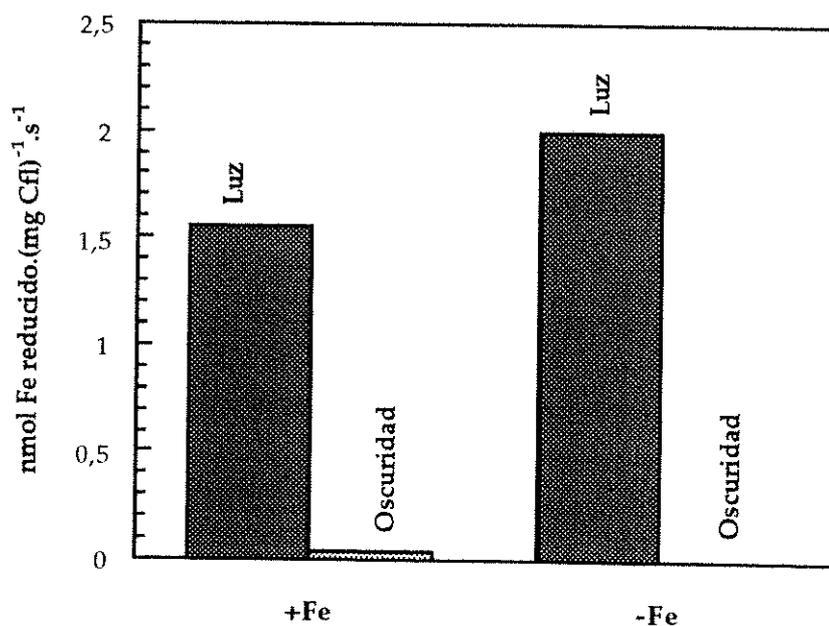


Figura 55: Comparación de la reducción de Fe(III)-EDTA por protoplastos de hojas control y deficientes en Fe en presencia o ausencia de luz durante el tiempo de reacción. Los valores son la media de 3 medidas \pm EE.

También se comprobó que los cambios en absorbancia a 562 nm variaban linealmente con el tiempo por lo menos hasta 90 minutos de iluminación (Figura 56).

Por último se comprobó la integridad de los protoplastos tras la reacción. Este punto era muy importante, para asegurar que la reducción que se medía era debida exclusivamente a los protoplastos y no a compuestos u orgánulos liberados durante la medida. Tal como se observa en la Figura 57, los protoplastos permanecen intactos tras 30 minutos en el medio de reacción.

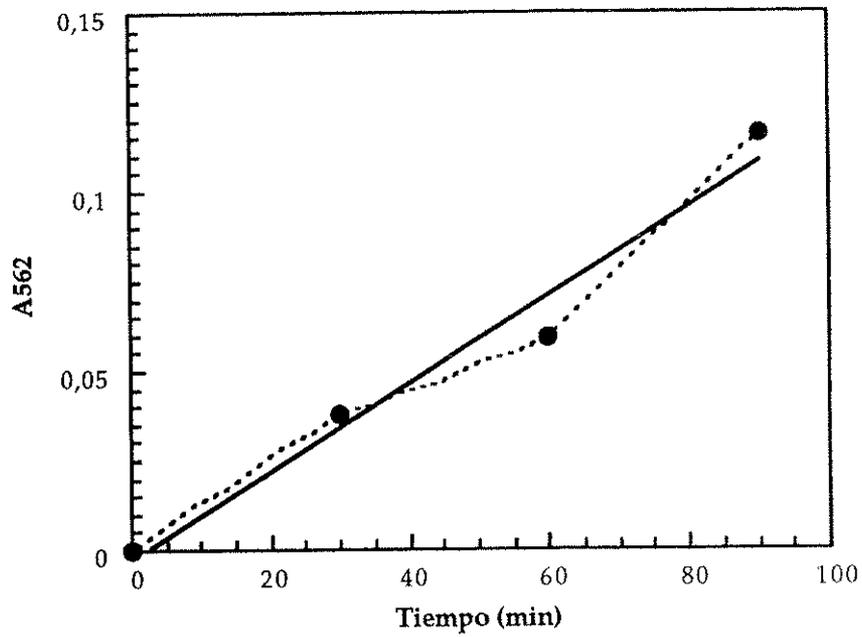


Figura 56: Linealidad de la medida de absorbancia con el tiempo de reacción en condiciones de iluminación.

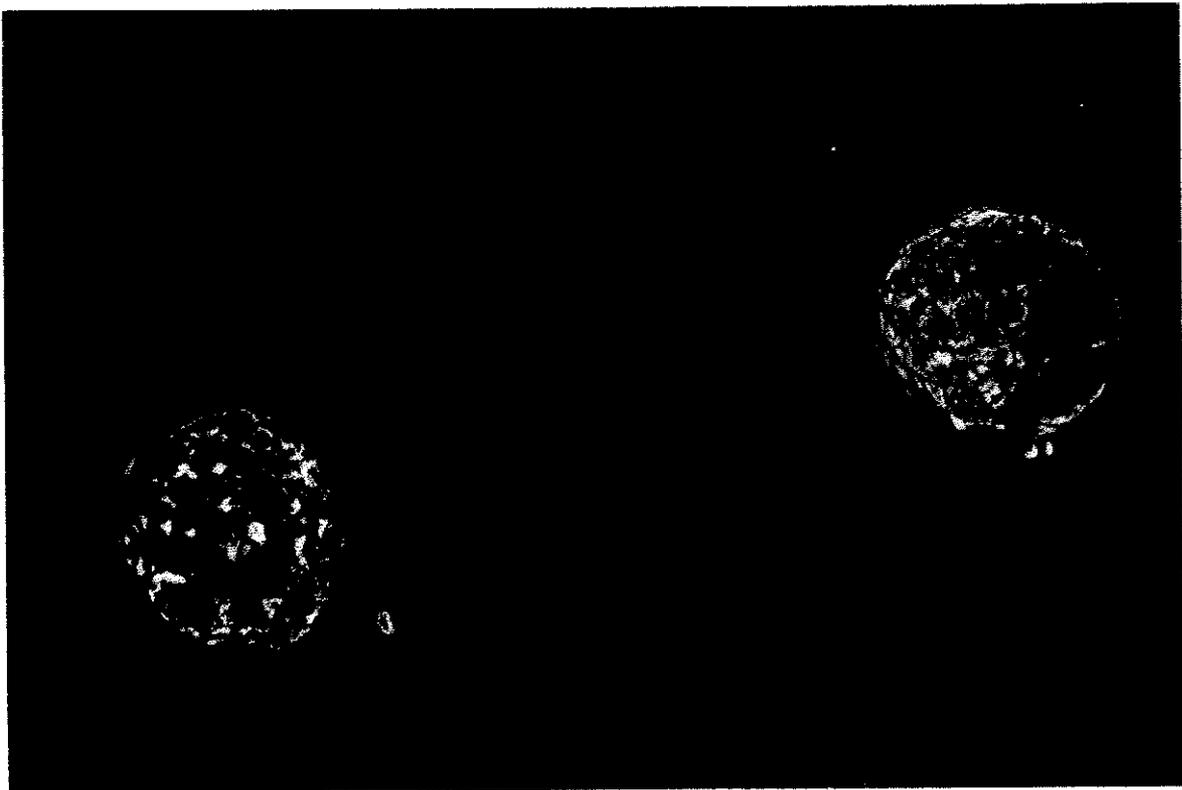


Figura 57: Protoplastos de hojas tras 30 minutos en el medio de reacción (40 aumentos).

Una vez optimizadas las condiciones de la medida de reducción, se caracterizó su dependencia de pH (Figura 58). Para los protoplastos de hojas deficientes el máximo de actividad correspondió a un pH de 5,5, mientras que para los protoplastos de hojas control el intervalo de actividad máxima aparecía a pHs entre 5,5-6,0. A pH 5,5 los protoplastos deficientes redujeron un 33% más que los protoplastos control cuando la actividad se expresó en función del contenido en clorofila (1,5 y 2,0 nmol Fe reducido.(mg Cfl)⁻¹.s⁻¹ para protoplastos de hojas control y deficientes en Fe respectivamente). El comportamiento a partir de pH 6,0 fue similar para ambas preparaciones, con un descenso paulatino de la actividad a medida que aumentaba el pH, aunque los valores de actividad de los protoplastos controles eran siempre algo mayores que los que presentaban los deficientes.

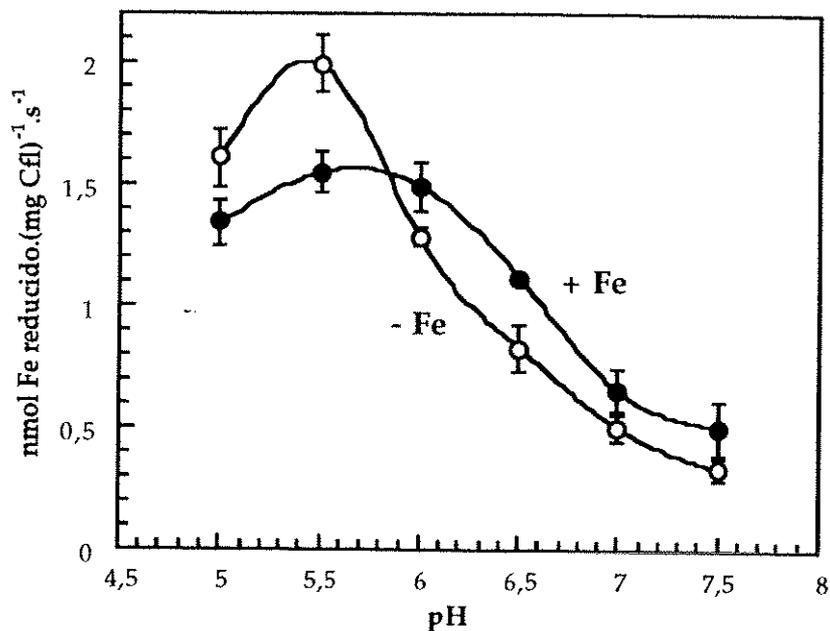


Figura 58: Dependencia de la actividad FC-R de protoplastos con el pH. Los protoplastos se aislaron de hojas control (+Fe) y deficientes en Fe (-Fe). Los valores son la media de 3 medidas \pm EE.

Para caracterizar la actividad FC-R se determinaron los valores de las constantes cinéticas, variando la concentración de Fe(III)-EDTA. A una concentración de 1.000 μ M de Fe(III)-EDTA, la saturación no era todavía completa (Figura 59). Tal como se muestra en el Cuadro 34, las constantes cinéticas obtenidas mostraron diferencias entre los protoplastos control y deficientes. Los valores de K_m obtenidos fueron 153 y 239 μ M para los protoplastos control y deficientes en Fe respectivamente, con una relación -Fe/+Fe de 1,6. La relación -Fe/+Fe para los valores de V_{max} obtenidos fue también de 1,6, con unos

valores de 2,0 y 3,1 nmol Fe reducido.(mg Cfl)⁻¹.s⁻¹ para los protoplastos de hojas control y deficientes en Fe respectivamente.

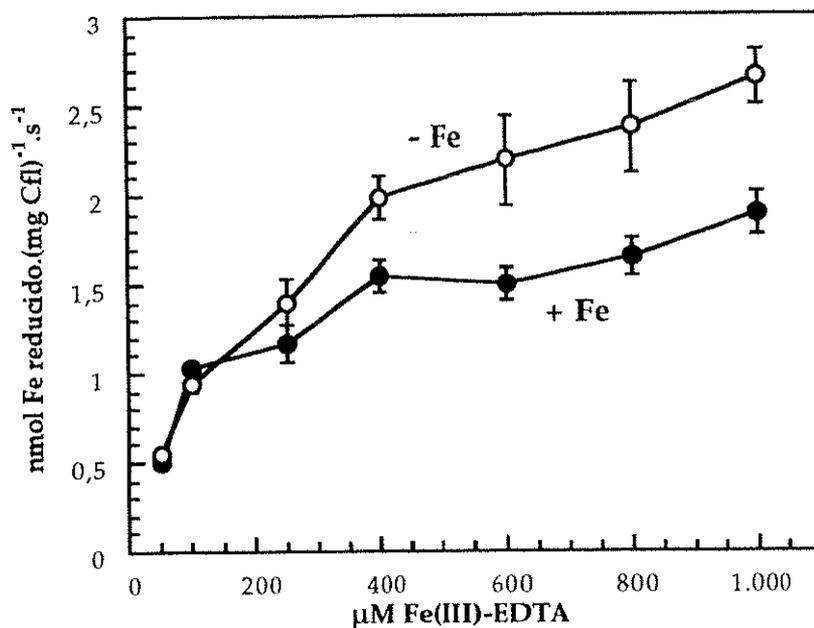


Figura 59: Actividad reductasa con diferentes concentraciones de Fe(III)-EDTA en protoplastos aislados de hojas control y deficientes en Fe. La actividad se midió a pH 5,5. Los valores son la media de 3 medidas \pm EE.

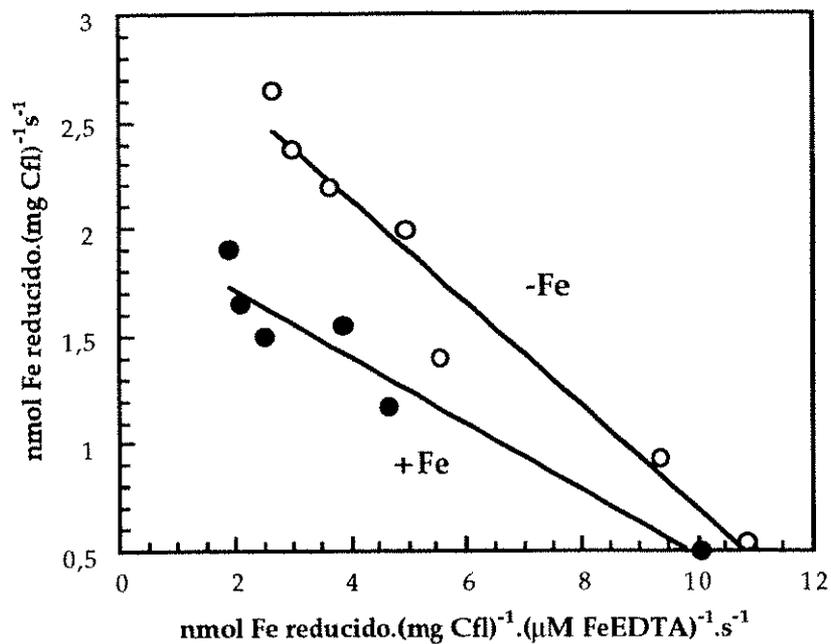


Figura 60: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con diferentes concentraciones de Fe(III)-EDTA (Figura 59). Los valores son la media de 3 medidas \pm EE.

	K_m	V_{max}
+Fe	153	2,0
-Fe	239	3,1
-Fe/+Fe	1,6	1,6

Cuadro 34: Valores de las constantes cinéticas para la reducción de Fe en función de la concentración de Fe(III)-EDTA en el medio de reacción para protoplastos control (+Fe) y deficientes (-Fe) en Fe. Las medidas se realizaron a pH 5,5. K_m se expresa en μM y V_{max} en $nmol\ Fe\ reducido.(mg\ Cfl)^{-1}.s^{-1}$.

Por último se localizó visualmente la reducción de Fe en los protoplastos aislados. Para ello se sustituyó el PDTS, que forma complejos solubles en H_2O con el Fe(II), por el NBT, con el que forma complejos insolubles de color azul oscuro. Tal como se muestra en la Figura 61, la reducción se produce en la superficie de los protoplastos, donde se produce una acumulación de precipitados de color oscuro.



Figura 61: Localización de la actividad FC-R en la superficie de protoplastos de hojas (40 aumentos).

4.2.- Variación de los patrones polipeptídicos inducida por la deficiencia de Fe

4.2.1.- Puntas de raíz

4.2.1.1.- Obtención de la muestra

Las muestras obtenidas a partir de la extracción con tricina (50 mM, pH 7,8 y PVP 5%) no resultaron adecuadas para el análisis posterior ni en una ni en dos dimensiones. En los geles de una dimensión no se apreciaban bandas definidas. Los geles obtenidos en dos dimensiones mostraban un número reducido de puntos, con resultados aleatorios tanto para las puntas de raíz control como para las deficientes (geles no mostrados). En ambos casos los resultados no permitían realizar análisis fiables de los niveles de expresión de proteínas.

La extracción con SDS significó una mejora en la cantidad de proteínas obtenidas respecto a la extracción anterior. Los geles de una dimensión obtenidos mostraban un gran número de bandas y resultaba posible realizar análisis cuantitativos. En cambio, los geles de dos dimensiones presentaban muy poca cantidad de polipéptidos, así como poca definición de los puntos.

Por último se utilizó un método de extracción con fenol (Meyer *et al.*, 1988). Los geles bidimensionales obtenidos a partir de estos extractos presentaban gran cantidad de puntos bien definidos que permitían realizar comparaciones. Así pues, el resto de las extracciones de proteínas de puntas de raíz de remolacha para electroforesis en dos dimensiones se realizó con este último método. Asimismo, se compararon geles monodimensionales a partir de esta extracción con geles obtenidos a partir de la extracción con SDS, obteniendo resultados muy similares en ambos casos.

Se extrajeron proteínas de puntas de raíz de plantas control y plantas sometidas a deficiencia de Fe. El rendimiento de la extracción de las proteínas, expresado como relación mg proteína/g raíz, resultó ser diferente para las plantas sometidas a deficiencia de Fe y las controles. Para las plantas crecidas con Fe se obtuvo un rendimiento de $0,9 \pm 0,3$ mg proteína/g raíz. Para las plantas con deficiencia de Fe el rendimiento fue mayor, de $2,5 \pm 0,5$ mg proteína/g raíz.

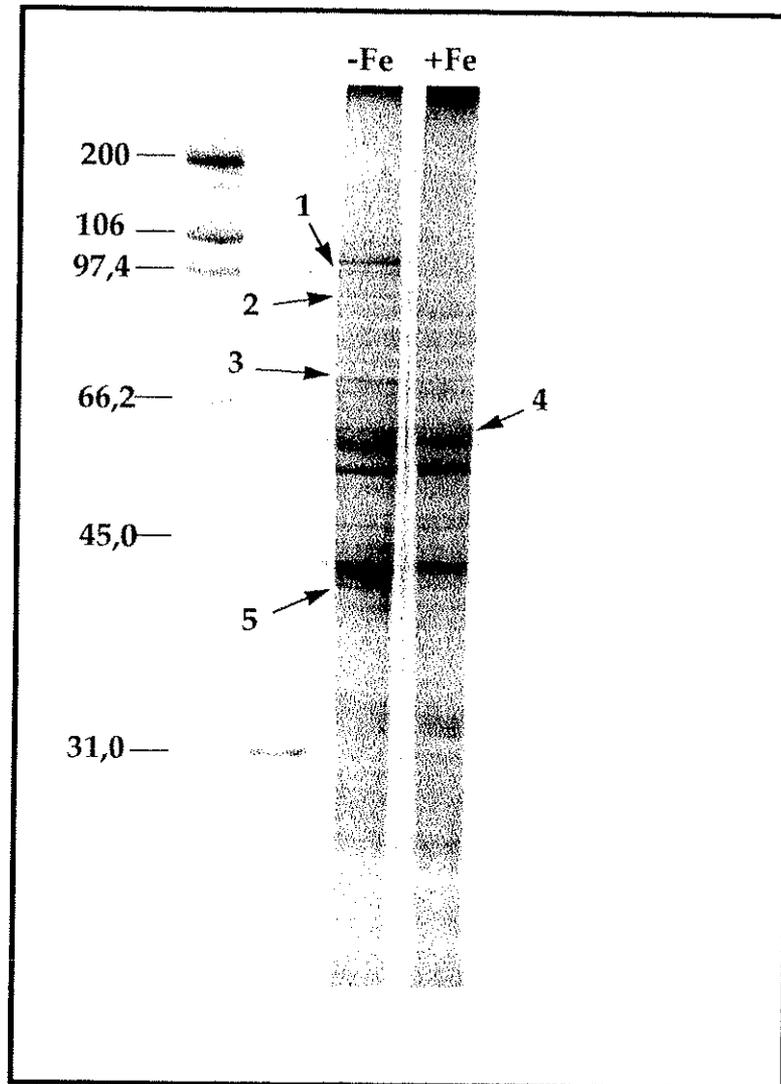


Figura 62: Electroforesis en gel SDS-PAGE de una dimensión de extractos de proteínas de punta de raíz de plantas en condiciones control (+Fe) y de deficiencia de Fe (-Fe). Los geles se tiñeron con Coomasie. La cantidad cargada para ambas muestras fue de 35 μg .

4.2.1.2.- Geles monodimensionales SDS-PAGE

En la Figura 62 se muestran los resultados obtenidos para un gel monodimensional representativo de los extractos de proteínas de puntas de raíz realizados con fenol. Los patrones polipeptídicos de puntas de raíz de remolacha de plantas control y deficientes en Fe difieren ligeramente entre sí.

Se detectó un gran número de bandas que permitió apreciar algunas diferencias significativas. En el Cuadro 35 se señalan los polipéptidos con mayores diferencias, a partir del análisis de 4 geles diferentes.

Banda	M _R (kDa)	I. integrada +Fe	I. integrada -Fe	-Fe/+Fe
1	100,1	n. d.	0,25 ± 0,09	> 1000
2	91,0	n. d.	0,08 ± 0,04	> 1000
3	68,0	0,03 ± 0,02	0,19 ± 0,05	5,4
4	58,0	0,37 ± 0,20	n. d.	< 1000
5	40,9	0,04 ± 0,03	0,31 ± 0,14	7,3

Cuadro 35: Bandas que muestran una mayor variación en los geles de una dimensión de extractos de proteínas de puntas de raíz de plantas en condiciones control (+Fe) y de deficiencia en Fe (-Fe). I. integrada= intensidad x área.

Las dos bandas de alto peso molecular aparecieron sólo en los extractos de plantas deficientes. La banda 4 se detectó sólo en extractos de plantas control. Las otras dos bandas señaladas, bandas 3 y 5, muestran un aumento de la expresión con la deficiencia de Fe.

4.2.1.3.- Geles de dos dimensiones

Ya que en este tipo de electroforesis los resultados se obtienen tanto en base a pesos moleculares como a puntos isoeléctricos, es importante conocer el intervalo de pH formado en cada gel. Así pues, se comprobó el gradiente de pH que se obtenía en la primera dimensión con las condiciones de trabajo utilizadas (Figura 63). Se obtuvo un gradiente prácticamente lineal con un rango de pH de 4,5 a 7,0.

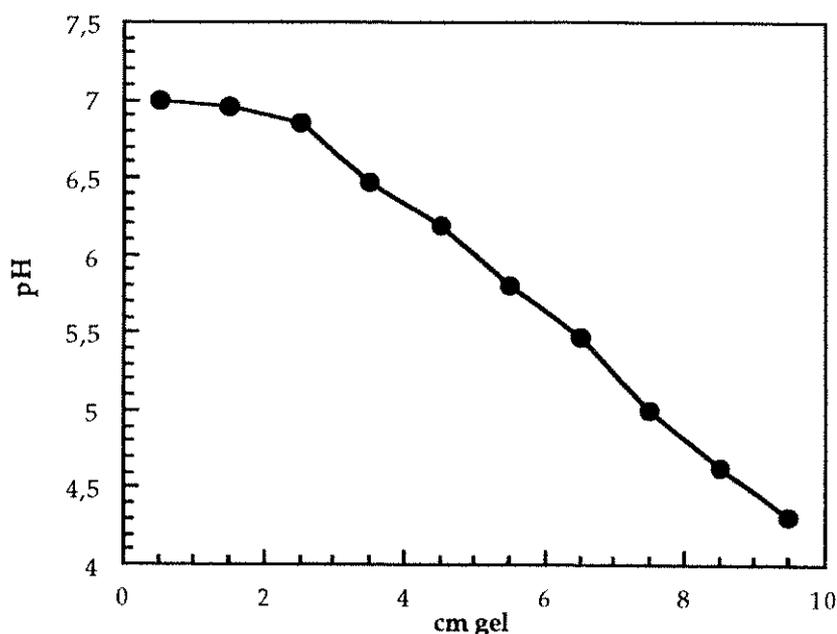


Figura 63: Gradiente de pH en un gel de primera dimensión en las condiciones descritas en el apartado 3.7.1.4.a de Materiales y Métodos.

Se determinó el tipo de gel necesario para conseguir la mejor resolución en la segunda dimensión. Se probaron geles con concentraciones constantes de acrilamida de 10 y 12,5% y también gradientes de acrilamida del 10% al 20%. El gel de acrilamida al 10% resultó tener un tamaño de poro demasiado grande. Los otros dos tipos de geles ofrecían resultados muy similares. Se decidió utilizar para la segunda dimensión un gel con una concentración constante de acrilamida del 12,5%, ya que los gradientes de acrilamida presentan más problemas de reproducibilidad. También se intentó mejorar la definición de los polipéptidos de bajo peso molecular con un gel de acrilamida del 12,5% cuya parte final era un gel del 15%, pero no se obtuvo una mejora sustancial en la resolución de dichos polipéptidos. Así pues, todos los análisis polipeptídicos posteriores se realizaron con geles de poli(acrilamida) al 12,5%. En todos los casos (excepto para los geles usados en la secuenciación) se cargaron 50 μg de proteínas/gel. Todas las tinciones se realizaron con AgNO_3 . El análisis de los geles se realizó mediante el sistema Bioimage (Genomic Solutions).

4.2.1.3.a.- Comparación de perfiles polipeptídicos en condiciones control y con deficiencia de Fe

Los geles de dos dimensiones de puntas de raíz de remolacha cultivada en condiciones control y con deficiencia de Fe mostraron patrones polipeptídicos diferentes (Figuras 64 y 65). El número total de polipéptidos que aparecían en los geles tras el análisis fue aproximadamente de unos 175.

Para dar una idea del perfil tipo de las muestras, en las Figuras 64 y 65 se muestran composiciones de 4 geles diferentes para cada tratamiento, que integran las intensidades de los puntos de dichos geles. No se han realizado análisis numéricos sobre estas composiciones.

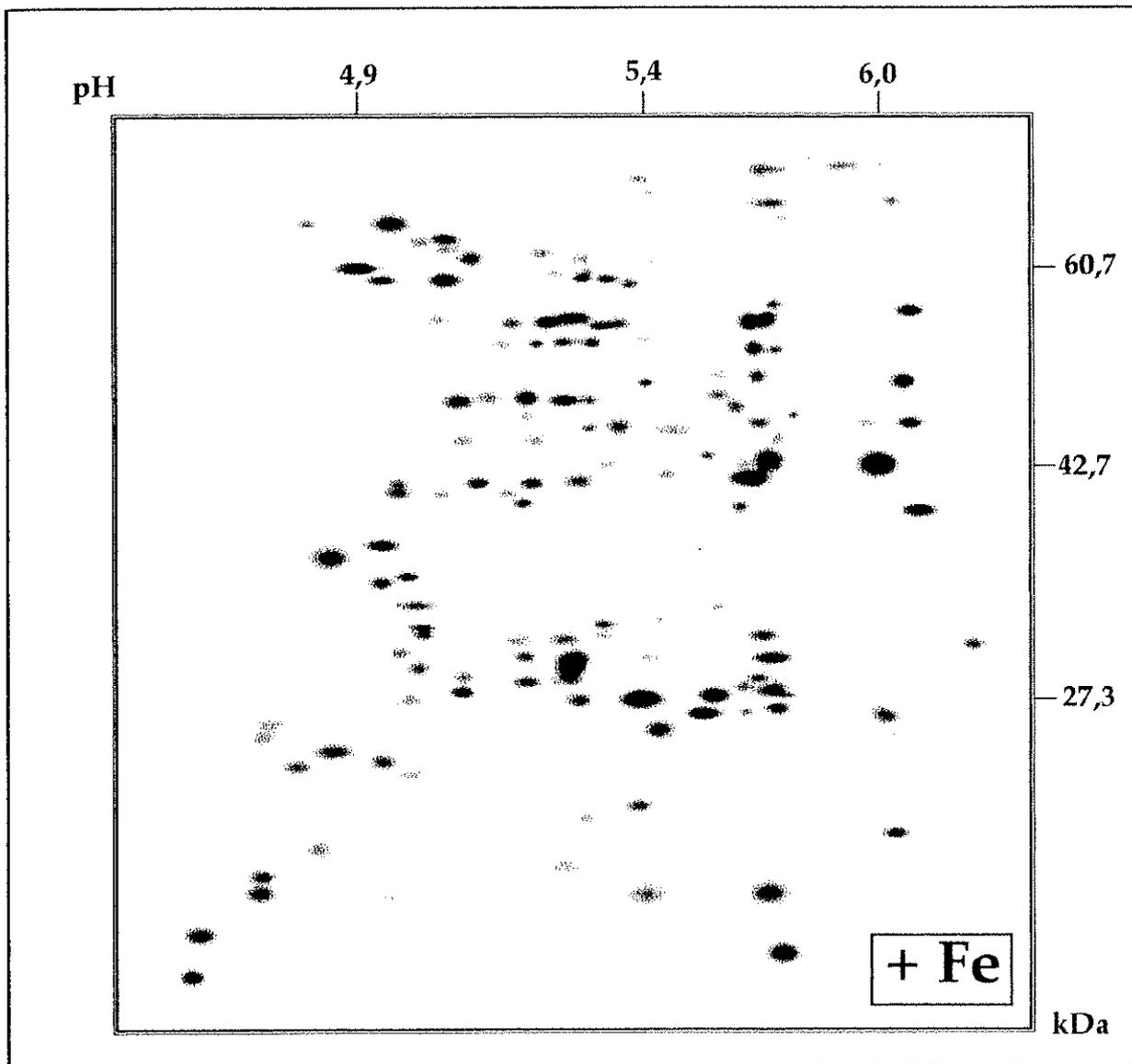


Figura 64: Composición de geles 2-D de puntas de raíz de remolacha cultivada en condiciones control (+Fe).

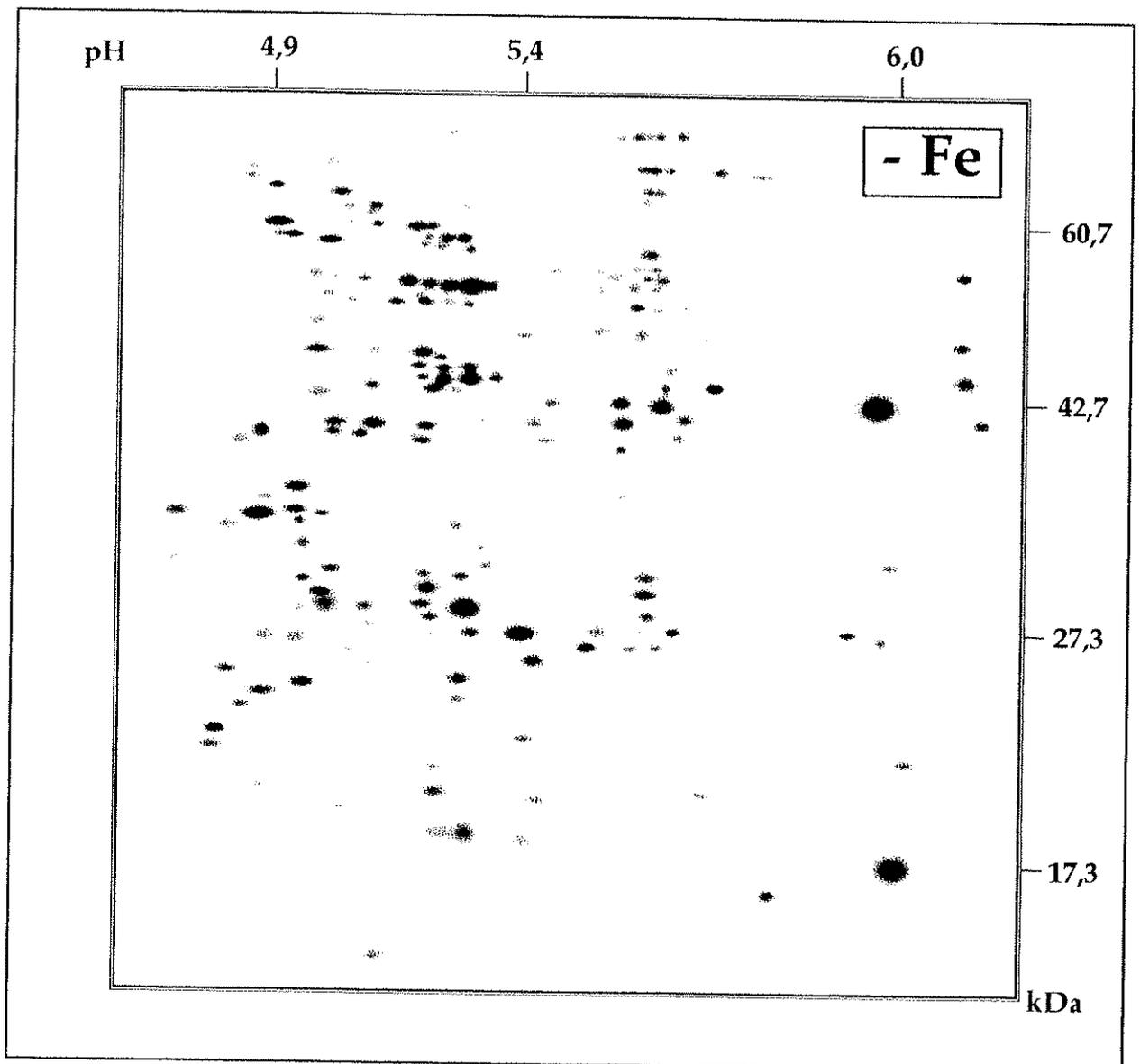


Figura 65: Composición de geles 2-D de puntas de raíz de remolacha cultivada en condiciones de deficiencia de Fe (-Fe).

En la Figura 66 se detallan las zonas en las que se han encontrado los mayores cambios, tanto en la composición de 4 geles del control como en el de las puntas de raíz deficientes en Fe. Una ampliación de cada una de dichas zonas, esta vez en geles individuales, se muestra en la Figura 67. En cada zona se han marcado los polipéptidos mencionados en el Cuadro 36. La zona 6 no aparece en esta Figura, ya que las diferencias encontradas sólo son importantes en el caso de adición de Fe, que se presentará posteriormente.

Polipéptidos que aparecen con la deficiencia de Fe

	pI	M _R (kDa)	I. integrada +Fe	I. integrada -Fe	-Fe/+Fe	Zona
PR1	5,9 ± 0,1	46,8 ± 0,4	n. d.	0,65 ± 0,09	> 1000	3
PR5	5,1 ± 0,2	24,5 ± 0,2	n. d.	0,54 ± 0,15	> 1000	9
PR6	6,0 ± 0,1	17,3 ± 0,1	n. d.	2,82 ± 0,55	> 1000	11
PR13	4,8 ± 0,1	34,6 ± 0,4	n. d.	0,60 ± 0,18	> 1000	5
PR14	4,8 ± 0,1	32,6 ± 0,4	n. d.	0,35 ± 0,08	> 1000	10
PR19	5,5 ± 0,1	42,0 ± 0,1	n. d.	0,26 ± 0,04	> 1000	8

Polipéptidos que aumentan su expresión con la deficiencia de Fe

	pI	M _R (kDa)	I. integrada +Fe	I. integrada -Fe	-Fe/+Fe	Zona
PR2	5,7 ± 0,1	42,7 ± 0,1	0,18 ± 0,03	0,88 ± 0,08	4,9	3
PR3	5,4 ± 0,1	54,6 ± 0,3	0,33 ± 0,05	1,98 ± 0,27	6,1	2
PR4	5,3 ± 0,1	42,3 ± 0,4	0,28 ± 0,04	1,72 ± 0,19	6,2	2
PR7	5,0 ± 0,1	38,7 ± 0,1	0,13 ± 0,04	0,49 ± 0,10	3,7	4
PR11	5,9 ± 0,1	42,9 ± 0,2	0,39 ± 0,06	0,54 ± 0,08	1,4	3
PR20	5,2 ± 0,1	53,8 ± 0,1	0,42 ± 0,09	0,80 ± 0,13	1,9	2
PR22	5,3 ± 0,1	54,1 ± 0,2	0,39 ± 0,07	1,07 ± 0,20	2,8	2

Polipéptidos que disminuyen su expresión con la deficiencia de Fe

	pI	M _R (kDa)	I. integrada +Fe	I. integrada -Fe	-Fe/+Fe	Zona
PR8	5,5 ± 0,1	27,4 ± 0,1	0,78 ± 0,11	0,49 ± 0,09	0,6	1
PR9	5,2 ± 0,1	38,3 ± 0,1	0,34 ± 0,05	0,18 ± 0,03	0,5	4
PR10	5,3 ± 0,1	14,0 ± 1,0	0,99 ± 0,15	0,55 ± 0,06	0,6	12
PR17	4,7 ± 0,1	28,2 ± 0,2	1,06 ± 0,59	0,31 ± 0,16	0,3	10
PR23	5,8 ± 0,1	61,2 ± 0,6	0,63 ± 0,09	0,39 ± 0,05	0,9	7
PR24	5,3 ± 0,1	45,3 ± 0,3	0,53 ± 0,07	0,33 ± 0,05	0,6	2

Cuadro 36: Análisis cuantitativo de los polipéptidos que presentan mayores variaciones entre las plantas en condiciones control (+Fe) y de deficiencia de Fe (-Fe). Se han utilizado 11 geles en el tratamiento de deficiencia y 12 de los controles, provenientes de tres extracciones diferentes. I. integrada= Intensidad x área. Se considera que la mínima diferencia significativa para el pI fue de 0,1. (n. d. = no detectada).

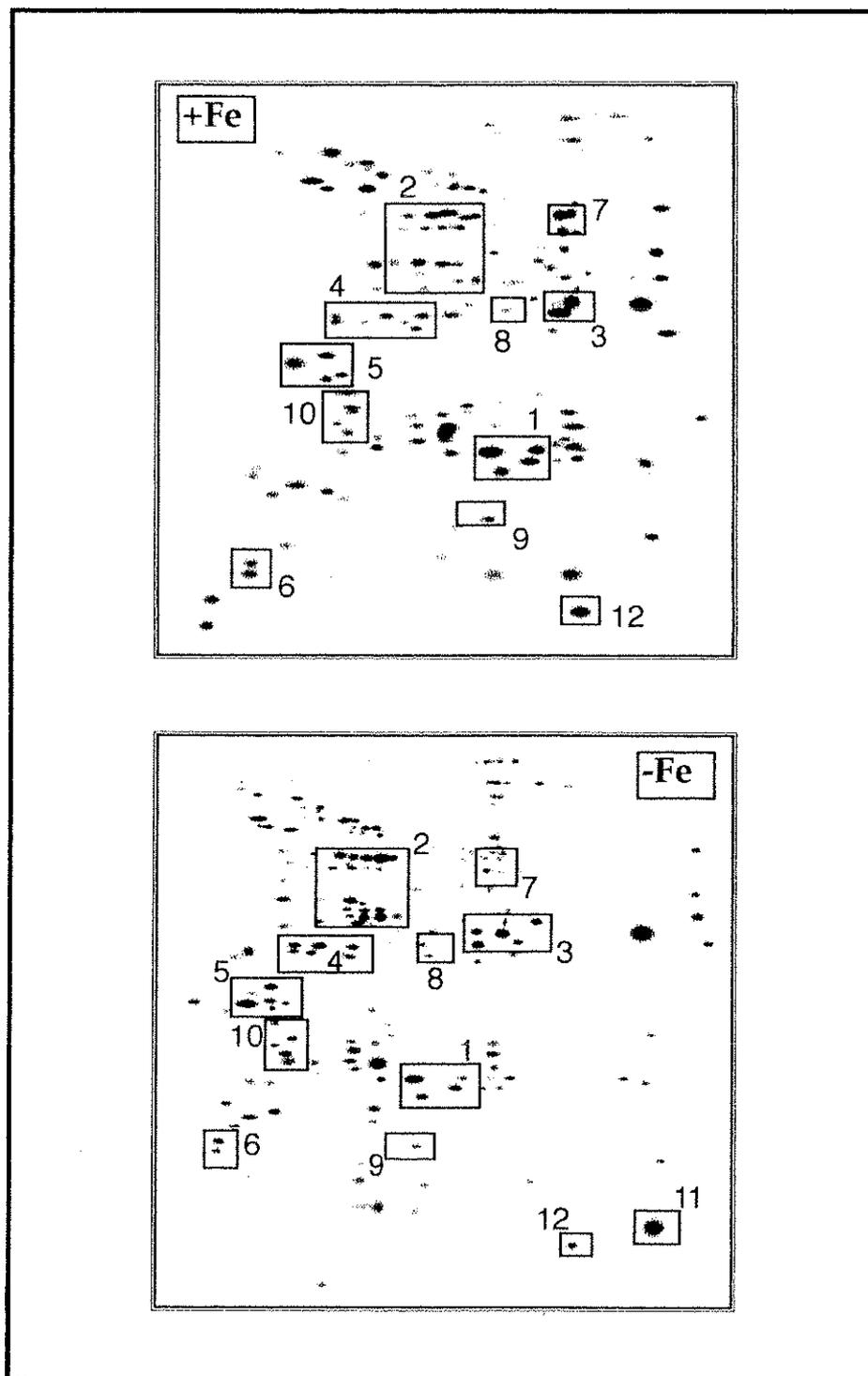


Figura 66: Composiciones de los gels bidimensionales con la localización de las zonas donde se produce variación en la cantidad de polipéptidos.

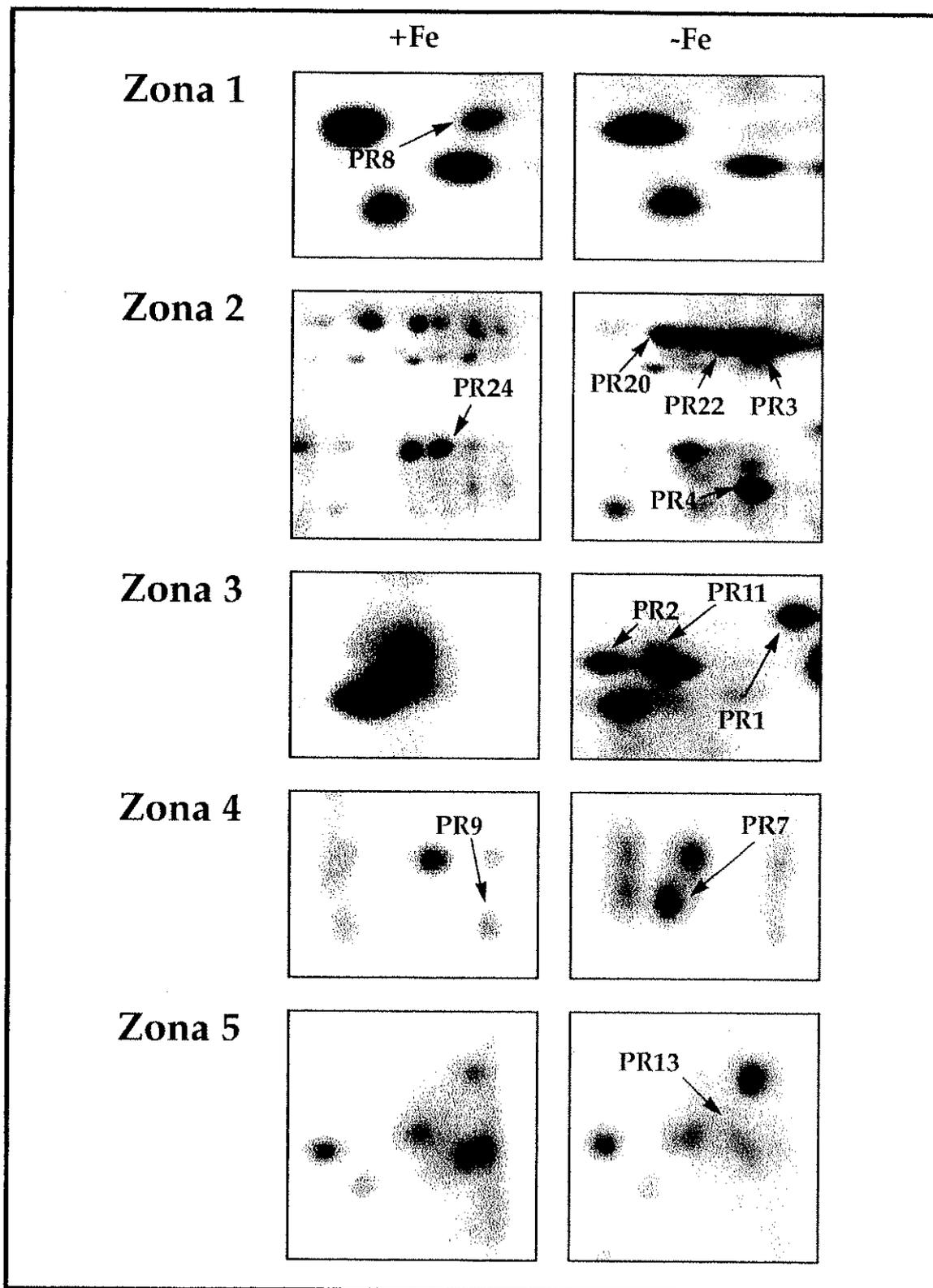


Figura 67: Detalle de las zonas que muestran los polipéptidos cuya intensidad varía en condiciones de deficiencia de Fe.



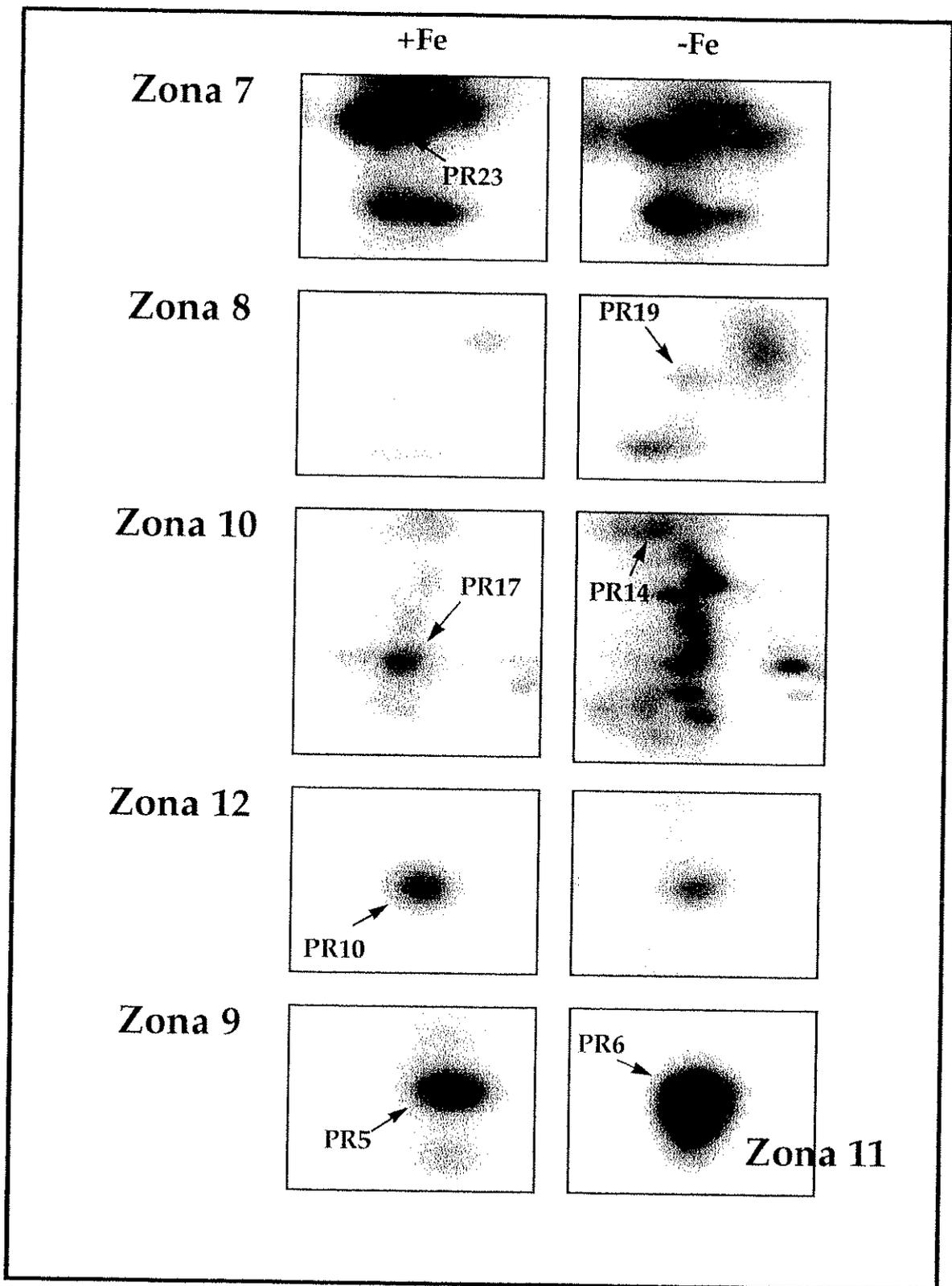


Figura 67 cont.: Detalle de las zonas que muestran los polipéptidos cuya intensidad varía en condiciones de deficiencia de Fe.

Para las determinaciones de pI y M_R (Cuadro 36) se han utilizado 11-12 geles individuales por tratamiento, de puntas de raíces controles y deficientes en Fe. De los aproximadamente 175 polipéptidos, 6 aparecen *de novo* con la deficiencia de Fe (Cuadro 36). Asimismo, otros 13 polipéptidos presentaron cambios significativos (aumentos o descensos) en su intensidad. Los resultados más importantes del análisis se muestran en el Cuadro 36.

4.2.1.3.b.- Expresión de polipéptidos tras la adición de Fe

Se analizó el patrón polipeptídico de puntas de raíz de plantas deficientes tras la adición de Fe para comprobar si este elemento tenía un efecto específico en la composición polipeptídica. Tras 15 días en deficiencia de Fe se adicionó Fe(III)-EDTA 45 μM a la solución nutritiva, y se recogieron muestras a las 24, 48 y 96 horas tras la adición de Fe.

La cantidad de proteína obtenida en la extracción fue distinta en función del tiempo transcurrido tras la adición. Pasadas 24 h de la adición se obtuvo un rendimiento igual al de las plantas deficientes, mientras que tras 96 h el rendimiento fue similar al de las plantas control. Los rendimientos obtenidos se muestran en el Cuadro 37.

	-Fe	-Fe (+ 24)	-Fe (+ 48)	-Fe (+ 96)	+Fe
mg proteína/g raíz	2,5	2,5	1,3	1,1	0,9

Cuadro 37: Cantidad de proteína obtenida tras la extracción con fenol de puntas de raíz de remolacha en condiciones de deficiencia de Fe (-Fe), adición de Fe (-Fe + 24, 48 y 96) y control (+Fe).

El análisis de los geles de puntas de raíz deficientes, tras la adición de Fe, permitió relacionar la expresión de algunos polipéptidos con la presencia o ausencia de Fe en la solución nutritiva.

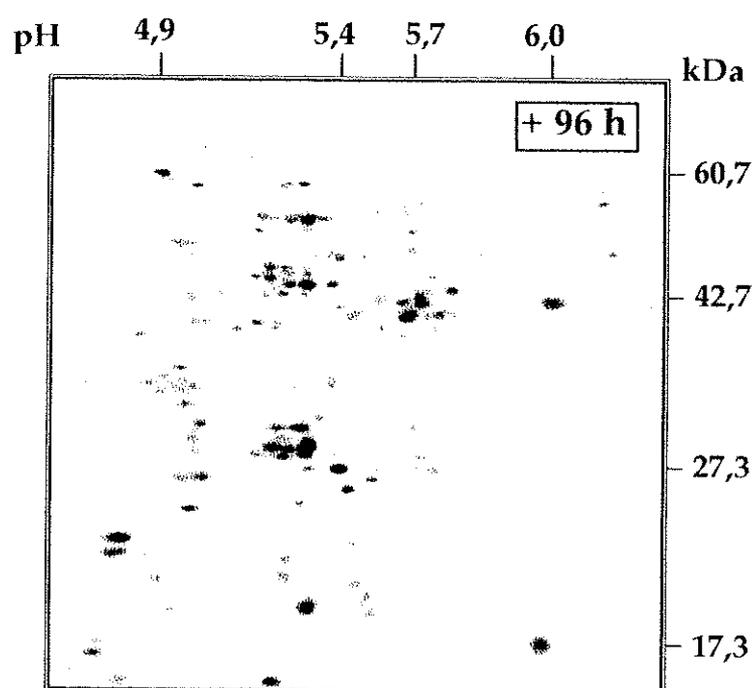
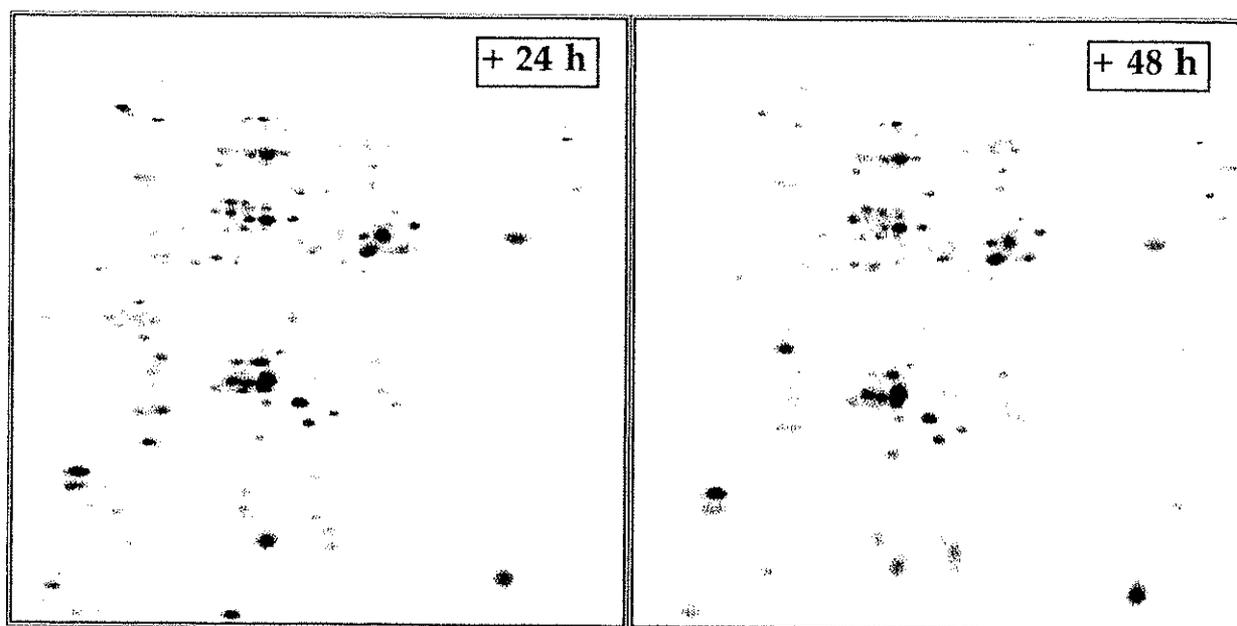


Figura 68: Geles de dos dimensiones de puntas de raíz de remolacha en deficiencia de Fe tras 24, 48 y 96 h de la adición de $45 \mu\text{M}$ Fe(III)-EDTA.

En la Figura 68 se muestran geles individuales 24, 48 y 96 horas después de la adición de Fe. Se puede observar claramente que el perfil es más parecido al encontrado para las puntas deficientes que para las control (Figuras 64 y 65), encontrándose unos 200 polipéptidos.

En la Figura 69 se amplian diferentes zonas en las que se han encontrado variaciones en la intensidad (ver Figura 67). Los polipéptidos marcados se describen en el Cuadro 38.

	I. integrada -Fe	I. integrada -Fe (+ 24)	I. integrada -Fe (+ 48)	I. integrada -Fe (+ 96)	I. integrada +Fe	Zona
PR1	0,65	0,94	1,17	0,89	n. d.	3
PR2	0,88	0,74	0,82	1,04	0,18	3
PR3	1,98	2,45	2,85	2,64	0,33	2
PR4	1,72	2,20	2,28	2,58	0,28	2
PR5	0,54	0,51	1,36	1,17	n. d.	9
PR6	2,82	3,20	4,45	3,95	n. d.	11
PR7	0,49	0,48	0,44	0,17	0,13	4
PR8	0,49	0,24	0,28	2,18	0,78	1
PR9	0,18	0,17	0,29	0,16	0,34	4
PR10	0,55	0,24	0,32	0,57	0,99	12
PR11	0,54	2,65	1,08	0,37	0,39	3
PR12	0,16	n. d.	n. d.	1,43	n. d.	9
PR13	0,60	0,39	n. d.	1,40	n. d.	5
PR14	0,35	0,94	1,28	0,34	n. d.	10
PR15	0,40	0,78	0,44	0,61	0,39	10
PR16	0,50	4,01	3,28	0,67	0,41	6
PR17	0,31	n. d.	0,27	0,65	1,06	10
PR18	0,63	1,91	0,47	0,82	0,65	2
PR19	0,26	0,15	0,32	0,83	n. d.	8
PR20	0,80	0,64	1,24	0,77	0,42	2
PR21	0,59	n. d.	0,61	0,78	0,61	2
PR22	1,07	0,62	0,93	0,84	0,39	2
PR23	0,39	0,31	0,41	0,34	0,63	7
PR24	0,33	0,45	0,74	0,66	0,53	2
PR25	n. d.	0,45	1,00	0,36	n. d.	2

Cuadro 38: Análisis cuantitativo de los polipéptidos que presentan variaciones entre las plantas sometidas a deficiencia de Fe (-Fe), tras la adición de 45 μ M Fe (-Fe + 24, 48 y 96) y las cultivadas en presencia de Fe (+Fe). I. integrada= Intensidad x área. Los valores son la media de dos geles diferentes del mismo aislamiento.

El análisis de los geles mostró tanto diferencias que ya han sido descritas al estudiar los geles de puntas control y deficientes, como variaciones de expresión que no se habían visto anteriormente (Figura 69).

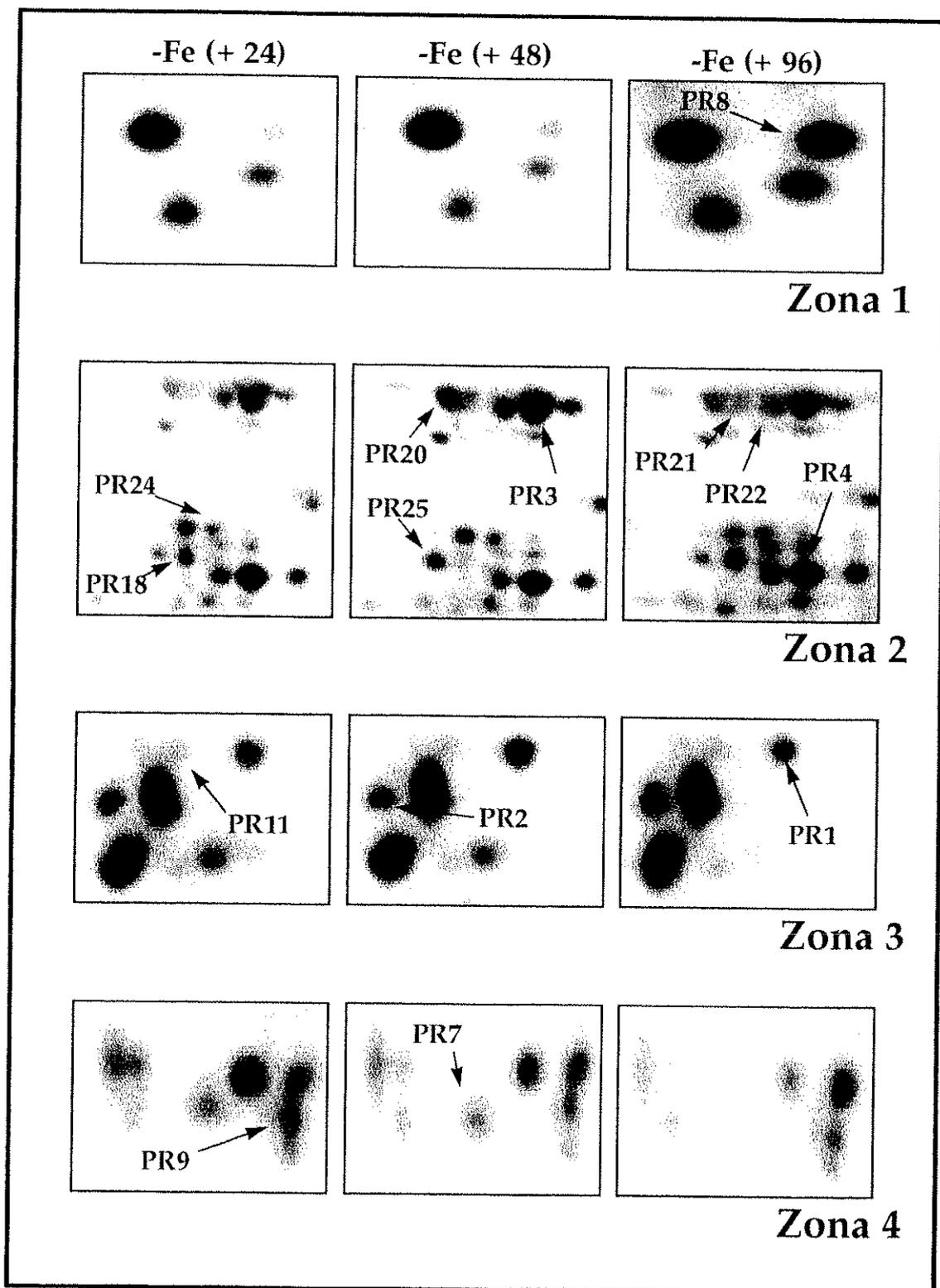


Figura 69: Detalle de zonas del gel con polipéptidos cuya intensidad varía tras la adición de Fe. La localización de las zonas se encuentra en los gels de puntas de raíz mostrados en la Figura 66.

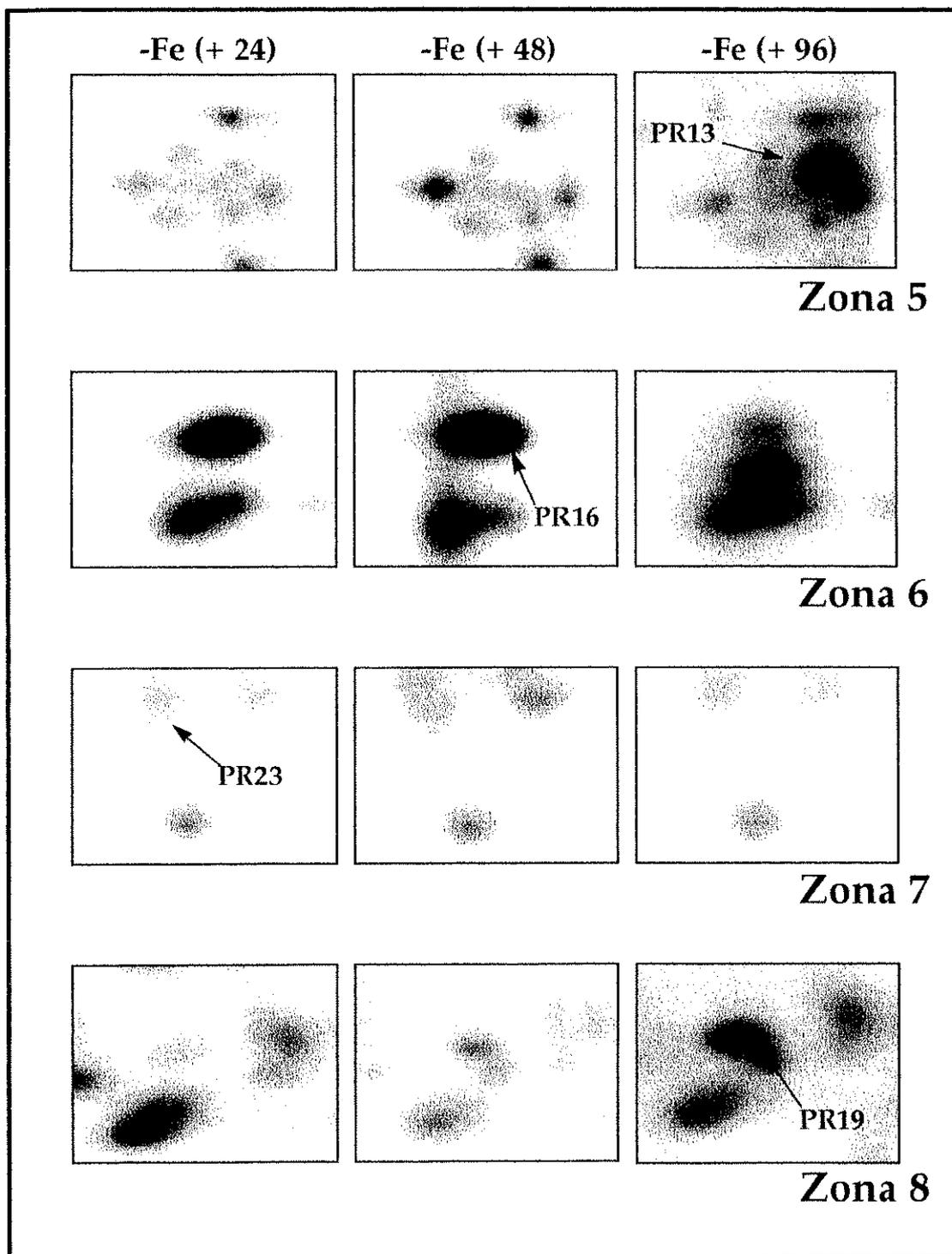


Figura 69 cont.: Detalle de zonas del gel con polipéptidos cuya intensidad varía tras la adición de Fe. La localización de las zonas se encuentra en los gels de puntas de raíz mostrados en la Figura 66.

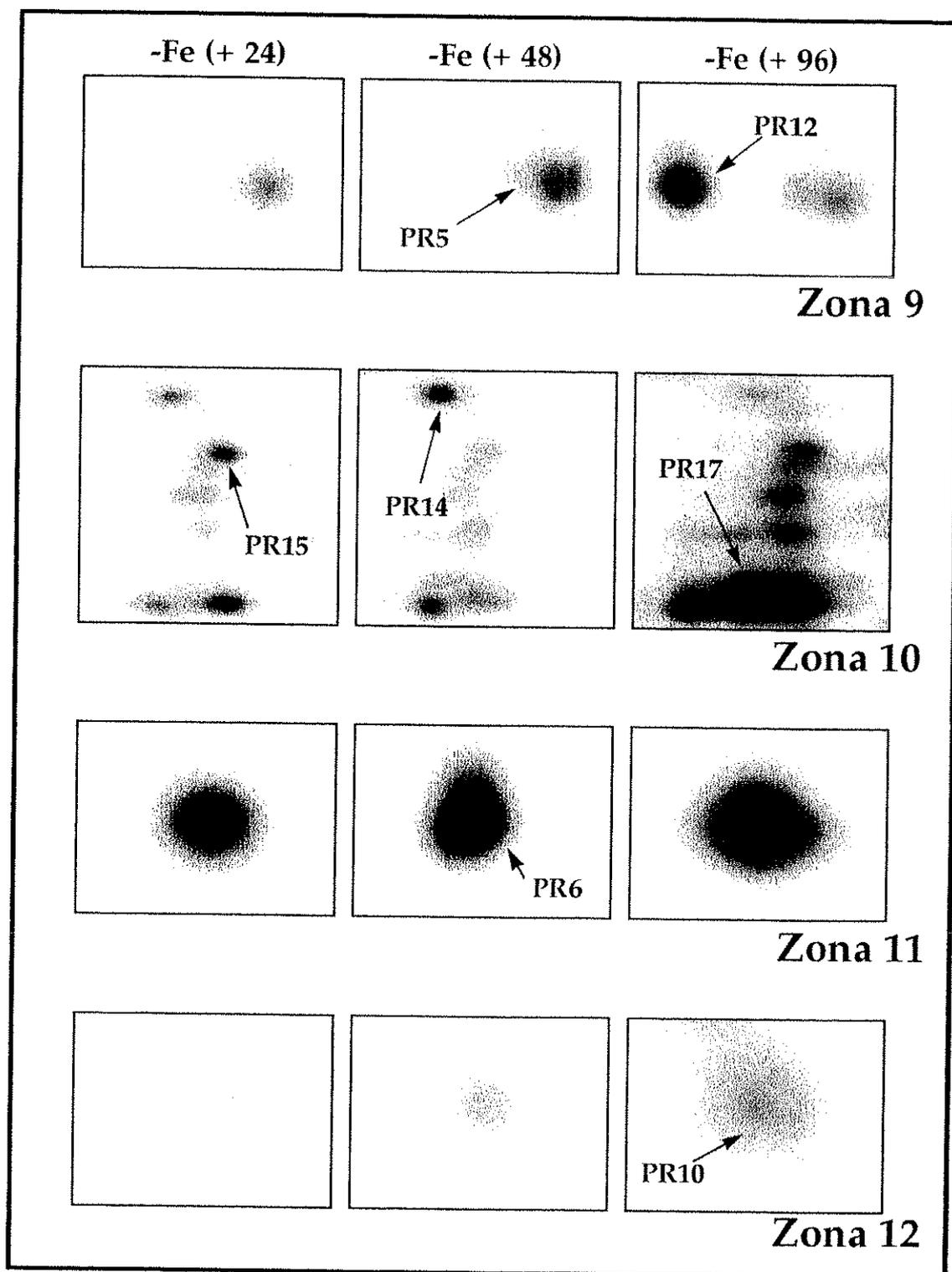


Figura 69 cont.: Detalle de zonas del gel con polipéptidos cuya intensidad varía tras la adición de Fe. La localización de las zonas se encuentra en los gels de puntas de raíz mostrados en la Figura 66.

Existen cuatro comportamientos distintos de los polipéptidos.

1) Mantenimiento o ligero aumento de la intensidad con el tiempo. La intensidad se mantuvo al mismo nivel que en las plantas deficientes o incluso aumentó ligeramente tras añadir Fe. Los polipéptidos que muestran este comportamiento (puntos PR1, PR2, PR3, PR4, PR5, PR6 y PR19) se habían visto inducidos en deficiencia de Fe como se ha mostrado en el apartado anterior.

2) Cambio progresivo de las intensidades desde niveles propios de las puntas deficientes hasta niveles más cercanos a los de puntas de raíz control. Este comportamiento lo presentaron polipéptidos cuya intensidad aumentó con la deficiencia (punto PR7) o disminuyó con la deficiencia de Fe (puntos PR8, PR17, y PR24).

3) Fuerte aumento de la intensidad a las 24 ó 48 horas y luego disminución hasta los niveles de las puntas de raíz control. Así, en un primer momento se produjo un fuerte aumento de la intensidad tras 24 h (puntos PR11 y PR14) o 48 h (punto PR16), para alcanzar progresivamente los mismos valores que en las raíces control.

4) Algunos polipéptidos que no variaron sus intensidades con la deficiencia de Fe frente a los controles (y que por tanto no aparecen en la comparación del Cuadro 36) muestran cambios cuando se produce un aporte de Fe tras un periodo en deficiencia, para volver posteriormente a los niveles normales. En general, estos puntos muestran un aumento de la intensidad entre 24-48 h del aporte de Fe para recuperar los niveles iniciales a las 96 h (puntos PR12, PR15, PR16, PR18, PR21 y PR25).

4.2.1.4.- Identificación de polipéptidos

4.2.1.4.a.- Secuenciación del amino terminal

Como ya se ha comentado en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos, se transfirieron los polipéptidos a una membrana de PVDF (Immobilon-P^{SO}, Millipore). Se trata de una membrana microporosa de fluoruro de polivinilideno cuya estructura está modificada para aumentar la unión de las proteínas. Esta membrana está diseñada para la secuenciación directa de proteínas, tras la transferencia de las mismas a partir de un gel de acrilamida.

La secuenciación del extremo amino terminal se ha realizado sobre el punto PR6. La razón de escoger este punto es que aparecía en condiciones de deficiencia de Fe y presentaba los niveles de variación más altos de todos los polipéptidos analizados. Se obtuvo una secuencia de 20 aminoácidos a partir del extremo amino terminal. La secuencia obtenida se muestra en el Cuadro 39.

Ala-Val-Arg-Glu-Leu-Glu-Gly-Tyr-Val-Thr-Lys-Ala-Gln-Asn-Thr-(Asp)-Val-Ala-X-Val
 1 10 20

Cuadro 39: Secuencia correspondiente al extremo amino terminal del polipéptido PR6. El aminoácido X no pudo ser identificado. La asignación del aminoácido entre paréntesis es dudosa.

Se realizó la búsqueda de homologías en el programa Swiss Prot sin obtener una identificación del polipéptido a través de su amino terminal. Se encontraron homologías de un 45-80% con secuencias obtenidas de la traducción de genes. Las homologías encontradas se muestran en el Cuadro 40. Cabe destacar que una de las proteínas con la que muestra homología (aunque con la zona cercana al extremo carboxilo terminal) es la ACC sintasa (aminociclopropano carboxilato sintasa) que está directamente implicada en la síntesis de etileno. Se ha propuesto la necesidad del etileno para la actividad de reducción de Fe (Romera y Alcántara, 1993; 1994; Romera *et al.*, 1996a y b).

-AVRELEGYVTKAQNTDVAXV-	
Polideoxiribonucleotido sintasa (ATP) ¹	86 A <i>EELTGY</i> TTDGKKDDVEVL - 105 (70%)
β-Glucosidasa ²	533 AQREFDAAVERARDS <i>SDVAVV</i> - 552 (80%)
ACC sintasa ³	420 AVRRLKSFVTELRSTTT <i>SNH</i> - 439 (70%)
Isocorismato sintasa ⁴	3 MKREVVGYTTMSEHL <i>IDTQL</i> - 22 (45%)
Inhibidor metal-proteinasa (fragmento) ⁵	59 AMESLCGYVHKSQNR <i>REEFL</i> - 78 (60%)

Cuadro 40: Los aminoácidos en negrita indican identidad y los aminoácidos en cursiva homología. Entre paréntesis se indica la homología con la secuencia obtenida del polipéptido PR6. (¹Armstrong *et al.*, 1988; ²Gaisser *et al.*, 1999; ³Nakagawa *et al.*, 1991; ⁴Wyckoff *et al.*, 1997; ⁵Iredale *et al.*, 1996).

4.2.1.4.b.- Inmunoidentificación de los polipéptidos

Se utilizaron distintos anticuerpos para identificar algunos polipéptidos presentes en las puntas de raíz. Los anticuerpos utilizados fueron contra formiato deshidrogenasa (FDH), fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC), oxidasa alternativa (AOX) y ATPasa. Se lograron resultados positivos en el caso de FDH, PEPC y ATPasa. En el caso de la AOX no se logró ninguna identificación.

La formiato deshidrogenasa resultó ser el punto PR2, polipéptido cuya intensidad se incrementó con la deficiencia de Fe (Figura 67). Presentó un peso molecular similar (42,7 kDa) al que presenta en patata, 43 kDa (Colas des Francs-Small *et al.*, 1993) y tomate, unos 40 kDa, (Herbik *et al.*, 1996). Una vez identificado el polipéptido, se comprobó si existía un aumento de la actividad del enzima al mismo tiempo que un aumento en la intensidad de la proteína. Para ello, se realizaron geles de una dimensión en condiciones no desnaturizantes de extractos de raíces (Figura 70). Se observó una actividad muy alta en los extractos de raíces con deficiencia de Fe. También se puede observar en la Figura 70 que el peso molecular al que aparece la actividad es significativamente más bajo que el correspondiente a la FDH usada como control. Debido a esta discrepancia y para confirmar que la actividad encontrada era debida a FDH se usaron anticuerpos con los que se comprobó que la banda encontrada era efectivamente este enzima.

La fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC) resultó ser el punto PR3, polipéptido que incrementó su expresión en deficiencia de Fe (Figura 71). El peso molecular del polipéptido identificado resultó ser algo más bajo, 54,6 kDa, que el descrito para el enzima (unos 110 kDa), aunque hay que señalar que no existen datos de peso molecular aparente del enzima para geles de dos dimensiones. Además, el anticuerpo utilizado era específico al lugar de fosforilación del enzima.

El polipéptido identificado como ATPasa no variaba su intensidad en respuesta a la deficiencia de Fe (Figura 71).

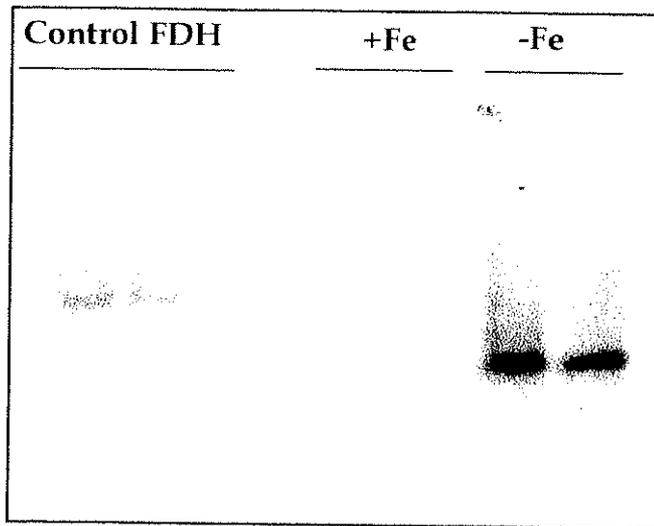


Figura 70: Medida de la actividad FDH de puntas de raíz de plantas control (+Fe) y deficientes en Fe (-Fe) en un gel monodimensional no desnaturalizante.

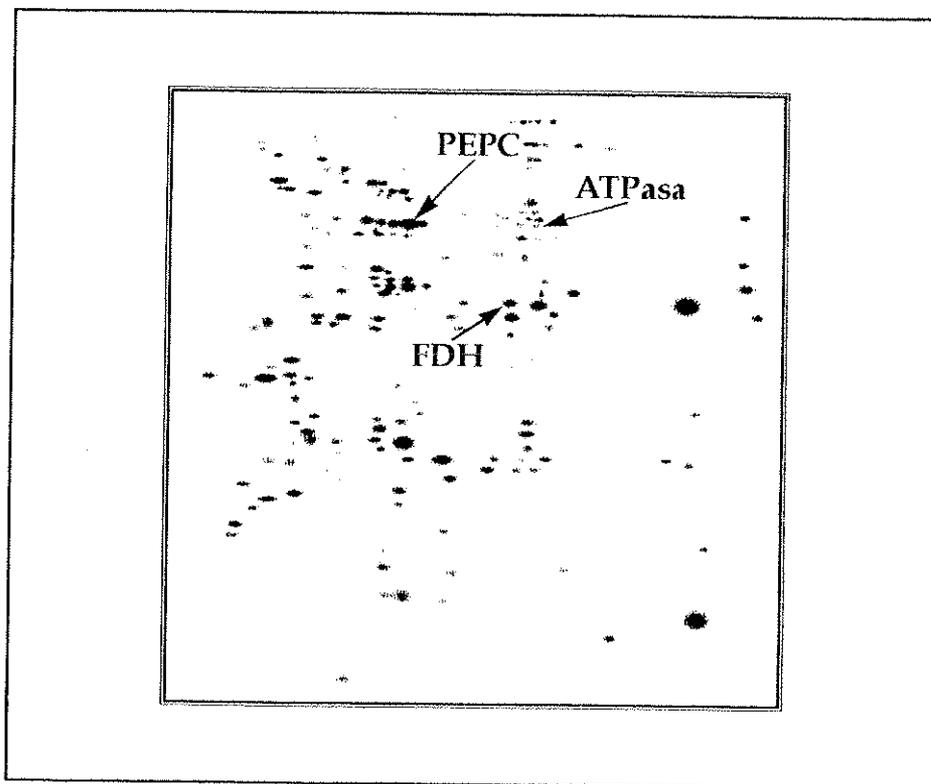


Figura 71: Gel bidimensional de puntas de raíz deficientes en Fe. Se señalan los polipéptidos identificados mediante el uso de anticuerpos.

Las características de los tres polipéptidos identificados aparecen en el Cuadro 41.

	pI	M _R	-Fe/+Fe
FDH (PR2)	5,7	42,7	4,9
PEPC (PR3)	5,4	54,6	6,1
ATPasa	5,8	61,6	1,1

Cuadro 41: Punto isoeléctrico y peso molecular de las proteínas identificadas en los geles bidimensionales de puntas de raíz de remolacha control (+Fe) y deficiente (-Fe) en Fe.

4.2.2.- Membrana plasmática: geles bidimensionales

Se realizaron geles de dos dimensiones de proteínas extractadas de la membrana plasmática de hojas de remolacha. Al igual que para la caracterización de la reductasa férrica en hojas, la membrana plasmática se aisló de hojas control con una concentración de clorofila de 250 $\mu\text{mol.m}^{-2}$ (+Fe), hojas deficientes con una concentración de clorofila entre 70-85 $\mu\text{mol.m}^{-2}$ (-Fe) y hojas con deficiencia severa con una concentración de clorofila menor de 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}$ (-Fe*). Al igual que para puntas de raíz, el análisis de los geles se realizó mediante el sistema Bioimage (Genomic Solutions).

Los geles que se obtuvieron de membrana plasmática para las hojas control y deficientes en Fe (tanto con deficiencia como con deficiencia severa) mostraron patrones polipeptídicos con pequeñas diferencias (Figura 72). El número total de polipéptidos analizados fue entre 125 y 175. En este caso, al igual que para los geles de puntas de raíz, la Figura 72 muestra composiciones en las que se pueden ver los perfiles tipo de las tres membranas, utilizando en cada caso tres geles.

Los análisis numéricos que se han realizado de los puntos se han hecho sobre geles individuales. El análisis de los geles obtenidos permitió encontrar polipéptidos cuya intensidad variaba a causa de la deficiencia de Fe. Se encontraron 6 polipéptidos que aparecían con la deficiencia de Fe y otros 7 polipéptidos que presentaban cambios significativos (aumentos o descensos) en su nivel de expresión (Cuadro 42). En la Figura 73 se muestran en detalle las zonas donde se encuentran los polipéptidos cuya intensidad varía por la deficiencia de Fe. Se han separado cuatro zonas en las que se observan las mayores diferencias, localizadas entre 30,0 y 40,0 kDa. Todos los polipéptidos que aparecen nuevos en deficiencia de Fe (MP3b, MP3c, MP3f, MP3g, MP3h y MP3i) así como 3 de los polipéptidos que aumentan su expresión por la misma (MP3a, MP3d y MP3e) se encuentran localizados en la denominada zona 3 (Figura 74). Los dos polipéptidos

que disminuyen su intensidad con la deficiencia de Fe (MP4 y MP5) lo hacen sólo en una pequeña proporción.

Se ha podido observar que la mayoría de los puntos que varían entre controles y deficiencia moderada, presentan en deficiencia severa una intensidad intermedia. Hubo tres excepciones, que fueron MP3b que aumentó su intensidad más aún en las muestras más deficientes, y MP3a y MP5 que presentaron una intensidad menor en las muestras muy deficientes.

Polipéptidos que aparecen con la deficiencia de Fe

	pI	M _R (kDa)	I. integrada +Fe	I. integrada -Fe	-Fe/+Fe	I. integrada -Fe*
MP3b	5,5 ± 0,1	37,5 ± 0,2	n. d.	0,64 ± 0,16	> 1000	0,97
MP3c	5,6 ± 0,1	38,8 ± 0,2	n. d.	0,28 ± 0,04	> 1000	0,14
MP3f	5,5 ± 0,1	36,2 ± 0,1	n. d.	1,01 ± 0,08	> 1000	0,21
MP3g	5,6 ± 0,1	36,0 ± 0,1	n. d.	0,53 ± 0,09	> 1000	0,17
MP3h	5,6 ± 0,1	36,3 ± 0,1	n. d.	1,39 ± 0,30	> 1000	0,48
MP3i	5,7 ± 0,1	38,1 ± 0,3	n. d.	0,26 ± 0,05	> 1000	0,19

Polipéptidos que aumentan su expresión con la deficiencia de Fe

	pI	M _R (kDa)	I. integrada +Fe	I. integrada -Fe	-Fe/+Fe	I. integrada -Fe*
MP1	4,9 ± 0,1	28,1 ± 0,1	0,41 ± 0,04	2,84 ± 0,50	6,9	1,74
MP2	5,4 ± 0,1	37,6 ± 0,2	0,13 ± 0,01	1,68 ± 0,22	13,3	0,49
MP3a	5,5 ± 0,1	38,2 ± 0,2	0,54 ± 0,20	1,03 ± 0,16	1,9	0,29
MP3d	5,7 ± 0,1	39,8 ± 0,2	0,34 ± 0,01	1,54 ± 0,25	4,6	0,66
MP3e	5,8 ± 0,1	40,7 ± 0,2	0,11 ± 0,01	1,02 ± 0,17	9,7	0,48

Polipéptidos que disminuyen su expresión con la deficiencia de Fe

	pI	M _R (kDa)	I. integrada +Fe	I. integrada -Fe	-Fe/+Fe	I. integrada -Fe*
MP4	4,9 ± 0,1	33,9 ± 0,1	0,19 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,7	n. d.
MP5	5,6 ± 0,1	35,1 ± 0,3	0,46 ± 0,09	0,31 ± 0,08	0,7	0,27

Cuadro 42: Análisis cuantitativo de los polipéptidos que presentan mayores variaciones en la membrana plasmática de las hojas de plantas sometidas a deficiencia (-Fe y -Fe*) y cultivadas en presencia de Fe (+Fe). Se han utilizado 6 geles en el tratamiento de deficiencia moderada y controles, y 2 geles en el tratamiento de deficiencia severa. Cada gel corresponde a un aislamiento y extracción de membrana plasmática distinto. (n. d. = no detectada). I. integrada= Intensidad x área. Se considera que la mínima diferencia significativa para el pI fue de 0,1.

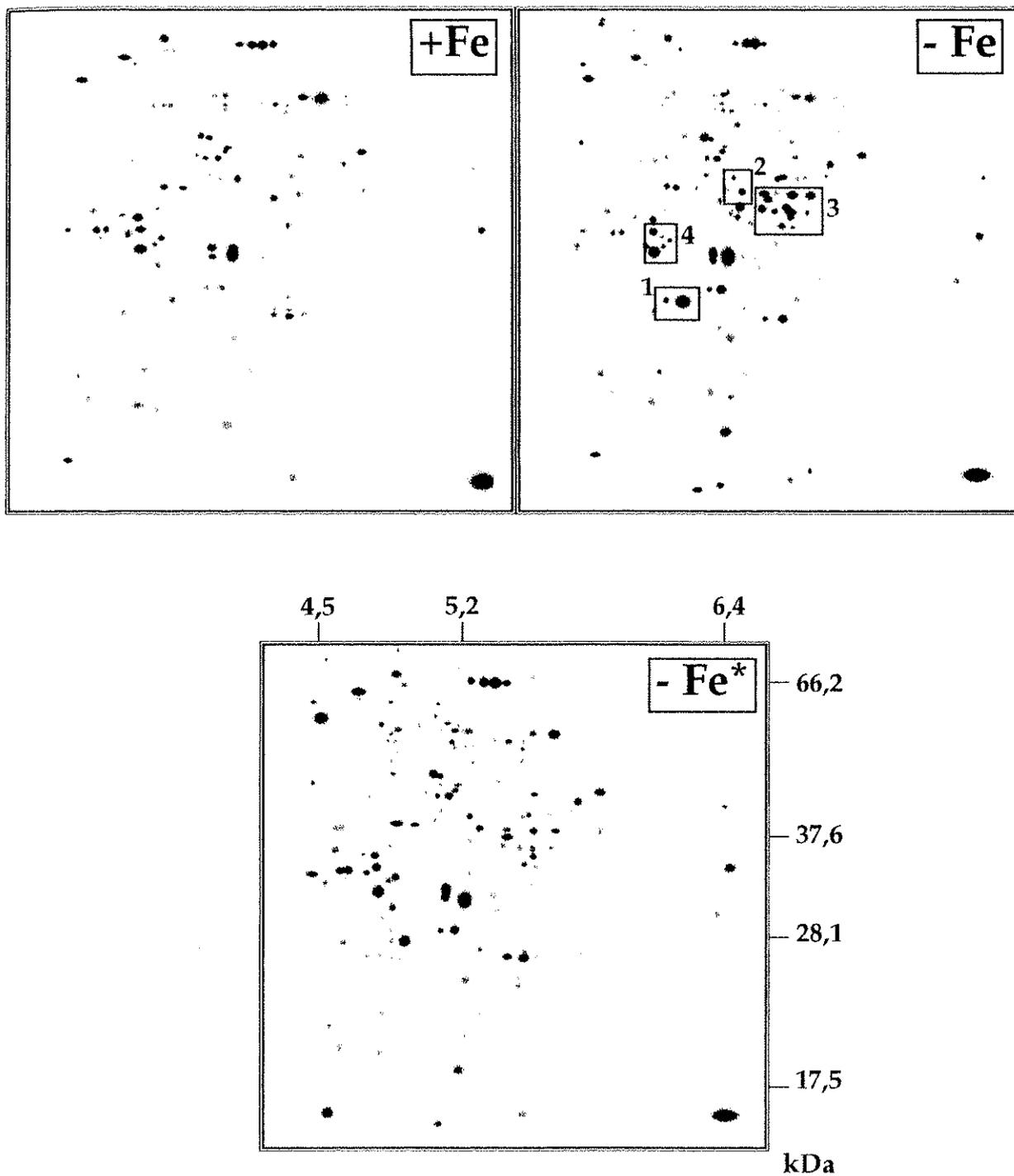


Figura 72: Composiciones de geles de dos dimensiones de membrana plasmática de hoja de plantas control (+Fe) y con deficiencia (-Fe) y deficiencia severa (-Fe*) de Fe.

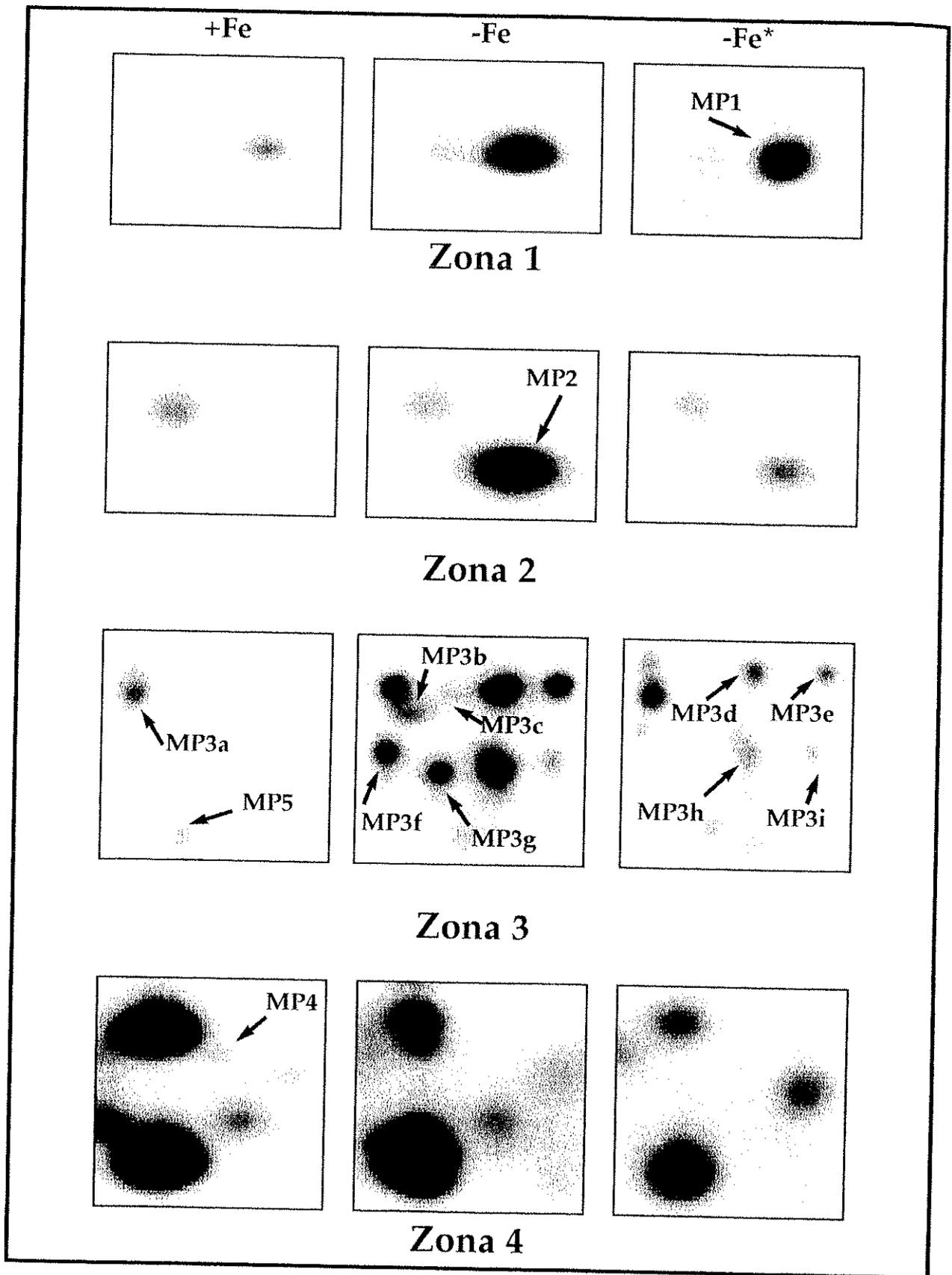


Figura 73: Detalle de las zonas que muestran los polipéptidos cuya expresión varía en condiciones de deficiencia de Fe para la membrana plasmática de las hojas. La localización de las zonas se encuentra en el gel deficiente en Fe mostrado en la Figura 72.

		pI	M _r (kDa)	-Fe/+Fe
Punto 1	PR	4,8 ± 0,1	33,9 ± 0,2	1,0
	MP	4,8 ± 0,1	32,6 ± 0,2	1,0
Punto 2	PR	4,8 ± 0,1	35,6 ± 0,1	1,2
	MP	4,9 ± 0,1	34,4 ± 0,2	0,7
Punto 3	PR	4,9 ± 0,1	40,8 ± 0,3	2,0
	MP	5,0 ± 0,1	40,1 ± 0,4	0,7
Punto 5	PR	4,9 ± 0,1	59,4 ± 0,1	0,6
	MP	4,7 ± 0,1	60,5 ± 0,1	0,5
Punto 6	PR	4,9 ± 0,1	60,8 ± 0,1	0,7
	MP	4,6 ± 0,1	61,7 ± 0,3	0,8
Punto 7	PR	5,1 ± 0,1	63,8 ± 0,1	1,0
	MP	4,9 ± 0,1	66,1 ± 0,3	0,6
Punto 8	PR	5,1 ± 0,1	62,0 ± 0,2	1,6
	MP	4,9 ± 0,1	64,0 ± 0,3	0,4
Punto 9	PR	5,3 ± 0,1	60,0 ± 1,0	> 1000
	MP	5,2 ± 0,1	61,0 ± 0,4	1,4
Punto 10	PR (PEPC)	5,4 ± 0,1	54,6 ± 0,3	6,1
	MP	5,3 ± 0,1	55,7 ± 0,4	1,5
Punto 11	PR	5,1 ± 0,1	30,5 ± 0,1	1,1
	MP	5,1 ± 0,1	29,1 ± 0,1	0,9
Punto 12	PR	5,2 ± 0,1	30,5 ± 0,1	1,6
	MP	5,2 ± 0,1	29,2 ± 0,1	2,2
Punto 13	PR (PR4)	5,3 ± 0,1	42,3 ± 0,4	6,2
	MP	5,3 ± 0,1	43,8 ± 0,5	1,1
Punto 14	PR	5,2 ± 0,1	39,4 ± 0,1	1,2
	MP	5,1 ± 0,1	39,4 ± 0,4	1,4
Punto 15	PR	5,1 ± 0,1	39,0 ± 0,1	1,8
	MP	5,0 ± 0,1	39,7 ± 0,3	1,1
Punto 16	PR	5,1 ± 0,1	46,8 ± 0,1	1,0
	MP	5,0 ± 0,1	50,0 ± 0,1	1,4
Punto 17	PR	5,2 ± 0,1	46,1 ± 0,2	1,4
	MP	5,2 ± 0,1	47,8 ± 0,7	1,6
Punto 18	PR	5,0 ± 0,1	58,9 ± 0,1	1,2
	MP	4,8 ± 0,1	60,5 ± 0,3	< 1000
Punto 19	RP	5,3 ± 0,1	52,5 ± 0,4	0,6
	MP	5,3 ± 0,1	53,4 ± 0,6	1,4
Punto 20	PR	4,7 ± 0,1	24,7 ± 0,1	1,3
	MP	4,6 ± 0,1	22,6 ± 0,2	0,6

Cuadro 43: Análisis cuantitativo de los polipéptidos comunes entre los geles de puntas de raíz y de membrana plasmática de plantas control (+Fe) y deficientes en Fe (-Fe). Se considera que la mínima diferencia significativa para el pI fue de 0,1.

4.2.3.- Identificación de polipéptidos comunes de puntas y membrana plasmática

Se analizaron conjuntamente los geles de puntas de raíz y membrana plasmática para encontrar polipéptidos que pudiesen resultar comunes. Se consideró que era posible la comparación con la membrana plasmática de hoja. En la Figura 73 se muestra un gel composición de dos dimensiones de puntas de raíz deficientes en el que se han señalado 20 polipéptidos que aparecen al mismo pI y M_R tanto en geles de puntas de raíz como de membrana plasmática. Las características de estos polipéptidos en cuanto a pI y M_R se muestran en el Cuadro 43. La mayoría de los polipéptidos potencialmente comunes a ambos materiales no presentan diferencias de intensidad entre las condiciones control y de deficiencia.

Cabe destacar que se han encontrado dos polipéptidos en membrana plasmática que coinciden en características de peso molecular y punto isoeléctrico con polipéptidos que inducen su expresión en puntas de raíz en condiciones de deficiencia de Fe. Uno de ellos presenta la misma movilidad electroforética del polipéptido identificado como PEPC, y en el caso de membrana plasmática no muestra inducción significativa de la expresión. El otro polipéptido corresponde a PR4 de puntas de raíz, que en el caso de la membrana plasmática tampoco presenta inducción de su expresión.

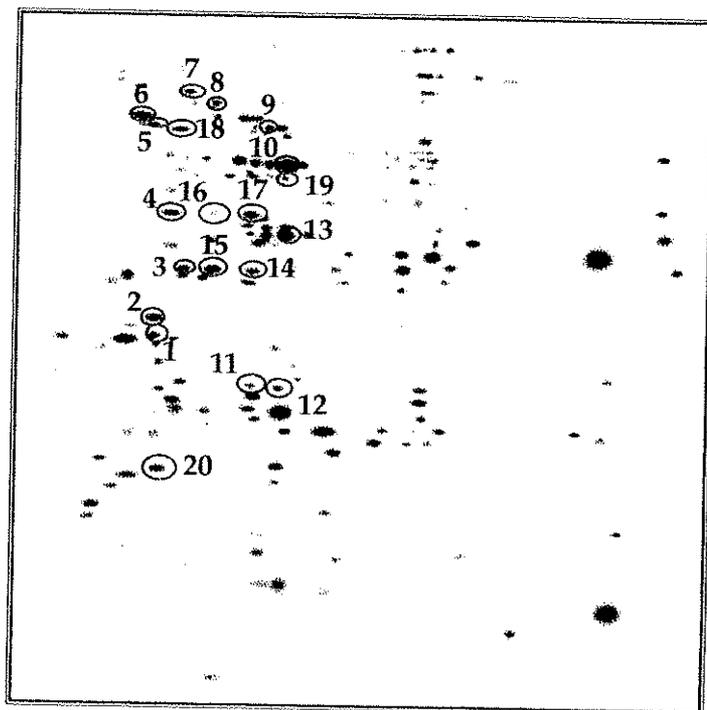


Figura 74: Composición de geles bidimensionales de proteínas de puntas de raíz de plantas en deficiencia de Fe. Los polipéptidos comunes entre membrana plasmática y puntas de raíz se presentan rodeados por un círculo.

4.2.4.- Mitocondrias

4.2.4.1.- Mitocondrias de hojas

Las hojas se separaron en tres grupos, en función de su contenido en clorofila ($250 \mu\text{mol.m}^{-2}$ (+Fe), $75 \mu\text{mol.m}^{-2}$ (-Fe) y por debajo de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}$ (-Fe*). Se partió de la misma cantidad de material fresco para todas las muestras. La relación de material mitocondrial obtenido para cada muestra varió como sigue - Fe* > -Fe > +Fe.

Se realizaron electroforesis de dos dimensiones, separando las proteínas solubles de las de membrana. Los patrones polipéptidicos de la fracción soluble obtenidos correspondieron a patrones típicos de mitocondria, pudiéndose identificar las proteínas más representativas (Colas des Francs-Small *et al.*, 1992). Las proteínas identificadas visualmente fueron las subunidades P, L, T y H del complejo de la glicina descarboxilasa, la malato deshidrogenasa, la serina hidroximetil transferasa, la rubisco, una ATPasa y la formiato deshidrogenasa. Los geles correspondientes a estas extracciones se muestran en la Figura 75.

El análisis de los geles mostró diferencias para las proteínas identificadas (Cuadro 44). El comportamiento general es una disminución de la intensidad de los polipéptidos en condiciones de deficiencia de Fe.

	I. integrada +Fe	I. integrada -Fe	I. integrada -Fe*
<u>Glicina descarboxilasa</u>			
Subunidad P	2,38	0,57	1,35
Subunidad T	1,96	0,12	0,07
Subunidad L	1,74	0,06	0,56
Subunidad H	3,01	0,20	1,47
<u>Malato deshidrogenasa</u>	1,32	0,33	1,01
<u>Serina hidroximetil transferasa</u>	1,52	0,47	0,96
<u>Rubisco</u>			
Subunidad grande	2,27	0,47	1,79
Subunidad pequeña	1,81	0,15	1,97
Subunidad pequeña (isoforma)	0,06	n. d.	0,06
<u>ATPasa</u>			
Subunidad α	0,81	0,09	0,13
Subunidad β	0,17	0,29	0,15
<u>Formiato deshidrogenasa</u>	0,23	0,08	0,23

Cuadro 44: Diferencias en la intensidad de los polipéptidos identificados en mitocondrias de hojas con distinta concentración de clorofila. I. integrada= intensidad x área.

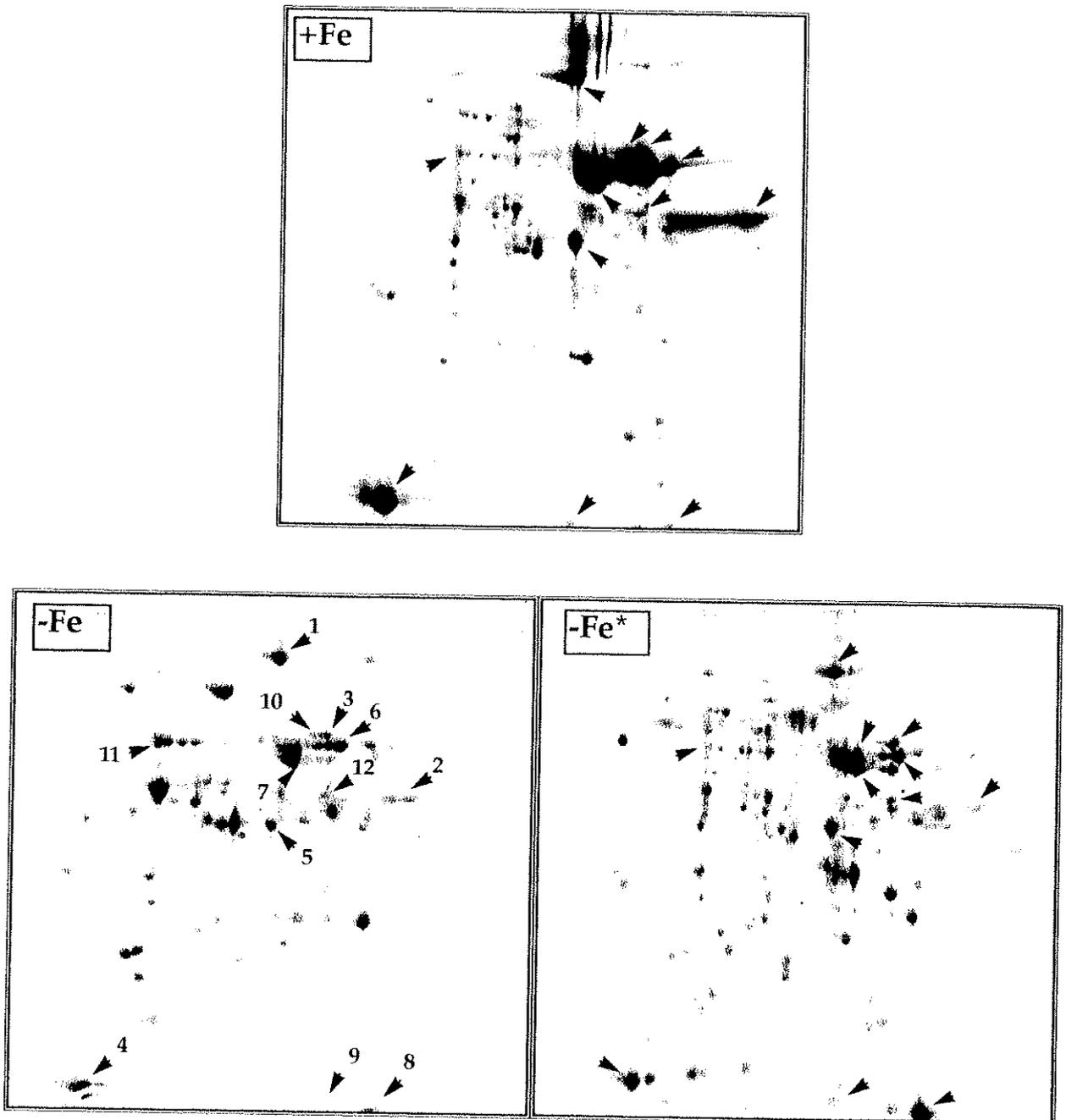


Figura 75: Patrones polipeptídicos en dos dimensiones de mitocondrias aisladas de hoja control (+Fe), con clorosis media (-Fe) y clorosis severa (-Fe*). Complejo glicina descarboxilasa, 1 = subunidad P, 2 = subunidad T, 3 = subunidad L, 4 = subunidad H; 5 = malato deshidrogenasa (MDH); 6 = serina hidroximetil transferasa; Rubisco, 7 = subunidad grande, 8 = subunidad pequeña, 9 = isoforma de la subunidad pequeña; ATPasa, 10 = subunidad α , 11 = subunidad β ; 12 = formiato deshidrogenasa (FDH).

4.2.4.2.- Mitocondrias de raíces

Se realizó el aislamiento en raíces de plantas en condiciones control y de deficiencia de Fe. Los primeros aislamientos se hicieron siguiendo el mismo protocolo que para las hojas y sólo cambiando la composición del gradiente de Percoll. Con este protocolo no se obtuvieron buenos resultados, ya que los geles de dos dimensiones obtenidos no mostraron patrones polipeptídicos típicos de mitocondria ni para las raíces deficientes ni para las control. La mayor diferencia respecto al perfil mitocondrial descrito en la bibliografía (Colas des Francs-Small *et al.*, 1992) se encontraba en las proteínas solubles. Esto hacía pensar en una posible rotura de las mitocondrias durante el aislamiento, con la consiguiente pérdida de las proteínas solubles. Se varió, pues, el protocolo de aislamiento para que no resultase tan agresivo (ver Material y Métodos 3.5.2). No se consiguió el resultado esperado, ya que ninguno de los geles presentó un perfil polipeptídico mitocondrial. El problema podía ser debido a que las raíces de remolacha son bastante frágiles, con un alto contenido en agua (80%), y formadas básicamente por tejido vascular. Por tanto, el aislamiento de cualquier tipo de orgánulo de raíz no resulta fácil. Por ejemplo, en el caso de *Arabidopsis thaliana*, cuyo sistema radicular se puede considerar morfológicamente análogo al de remolacha, sólo se ha conseguido el aislamiento de mitocondrias a partir de cultivos celulares (de Virville *et al.*, 1995).

A continuación se trató de aislar las mitocondrias de la raíz de reserva de remolacha. Se realizó el aislamiento, obteniéndose mayor cantidad de mitocondrias para la raíz deficiente en Fe que para los controles. Se separaron las proteínas solubles de las de la membrana siguiendo el mismo método que con las mitocondrias aisladas de hojas. El rendimiento obtenido fue mayor para las raíces deficientes en Fe que para las controles.

Se obtuvieron patrones polipeptídicos de la fracción soluble en geles de dos dimensiones típicos de mitocondria (Figura 76). Los geles obtenidos mostraron patrones polipeptídicos típicos de mitocondria, aunque comparados con los de hoja ambos muestran puntos característicos de cada tipo de tejido. Así, no se pueden ver las cuatro subunidades de la glicina descarboxilasa (involucrada en la fotorrespiración; puntos 1, 2, 3 y 4) ni la Rubisco (puntos 7, 8 y 9) ni la serina hidroximetil transferasa (punto 6). Las variaciones encontradas entre los geles de raíces control y deficientes no fueron significativas.

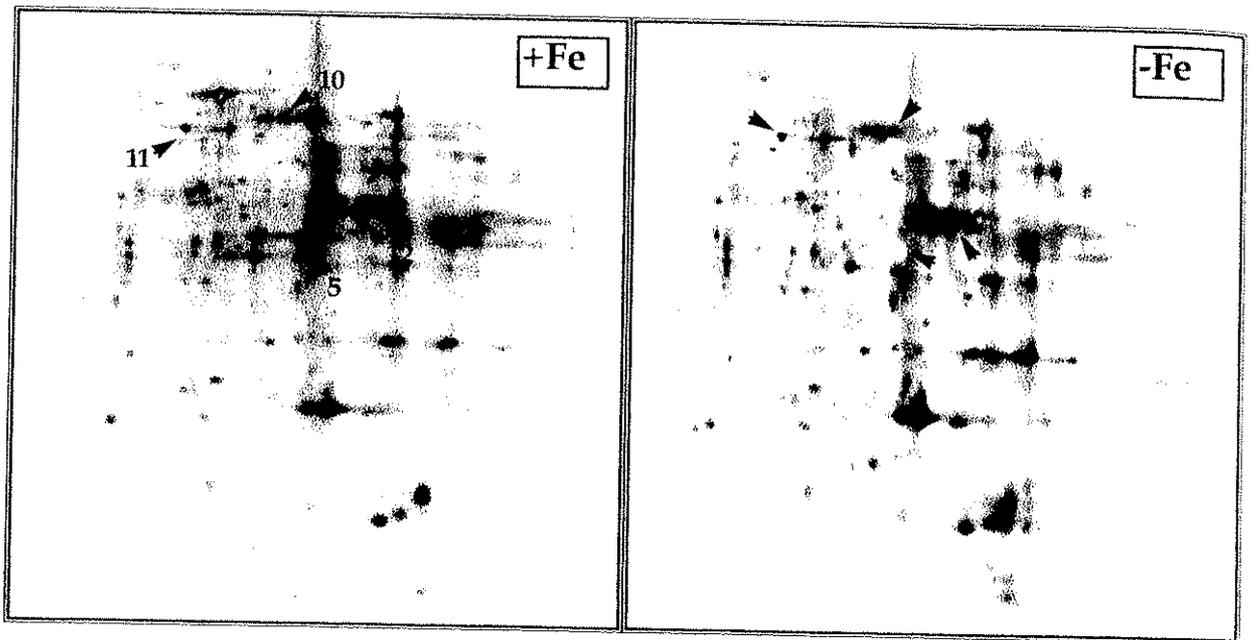


Figura 76: Patrones polipeptídicos en geles de dos dimensiones de mitocondrias aisladas de raíces en condiciones control (+Fe) y con deficiencia (-Fe) de Fe. 5 = malato deshidrogenasa (MDH); ATPasa, 10 = subunidad α , 11 = subunidad β ; 12 = formiato deshidrogenasa (FDH).

4.3.- Respuestas de frutales ante la deficiencia de Fe

En esta parte del trabajo se ha intentado aplicar los conocimientos adquiridos utilizando remolacha como planta de referencia, para obtener información sobre los mecanismos que utilizan los frutales para hacer frente a la deficiencia de hierro. En esta línea se han utilizado cultivos en hidropónico del patrón de melocotonero "Ademir", y se han estudiado dos de las respuestas características de las raíces a la deficiencia de Fe, como son la reducción de Fe y la variación de pH de la rizosfera.

4.3.1.- Adaptación al cultivo hidropónico

El patrón "Ademir" provenía de estaquillas enraizadas en la propia Estación Experimental de Aula Dei. La adaptación al cultivo hidropónico comenzó tras permanecer las estaquillas 4 meses y medio enraizando en turba. En el momento del trasplante las plantas presentaban el aspecto que se muestra en la Figura 78, y tanto la parte aérea como el sistema radicular estaban poco desarrollados. Las plantas se cultivaron con concentraciones de 1 (plantas deficientes) y 30 μM de Fe (plantas control) en la solución nutritiva. Estas condiciones se decidieron en estudios preliminares realizados con distintos patrones de frutales, en los que se había visto que es necesaria una pequeña cantidad de Fe en el medio para expresar respuestas ante la deficiencia.

En estos estudios previos no se observó inducción de la actividad reductasa en las plantas deficientes cultivadas en ausencia total de Fe o con bicarbonato, respecto a las plantas control. Los valores de actividad obtenidos fueron del mismo orden para ambas condiciones. Además se observó que, a pesar de lavar bien las raíces de las plantas antes de las medidas, y posiblemente debido a la presencia del bicarbonato, los valores de pH finales de los medios de reacción de las plantas deficientes eran ligeramente más altos que los medios de plantas control, con una diferencia máxima de media unidad de pH. Así, para la realización del trabajo posterior, se eliminó el bicarbonato y se mantuvo una concentración pequeña de Fe en la solución de las plantas consideradas deficientes.

Una semana después del inicio del tratamiento aparecieron síntomas claros de deficiencia en las plantas con 1 μM de Fe y ligeros síntomas en las plantas con 30 μM de Fe. Para estas últimas, los síntomas remitían con un aporte (1 vez a la semana) de 30 μM de Fe. Los síntomas se caracterizaban por una disminución del color verde de las hojas. El crecimiento de las plantas fue bastante rápido y similar para ambos tratamientos. El sistema radicular presentaba una regeneración

constante, con un alto porcentaje de raíces lignificadas. En la Figura 77 se muestra la evolución del crecimiento de las raíces de las plantas sometidas a los dos tratamientos. En la Figura 79 se observan plantas crecidas en ambos tratamientos y la diferencia en el desarrollo de los síntomas visuales de clorosis férrica. Se consideró que las plantas obtenidas en estas condiciones eran adecuadas para los estudios de los mecanismos de respuesta de los frutales que se querían realizar.

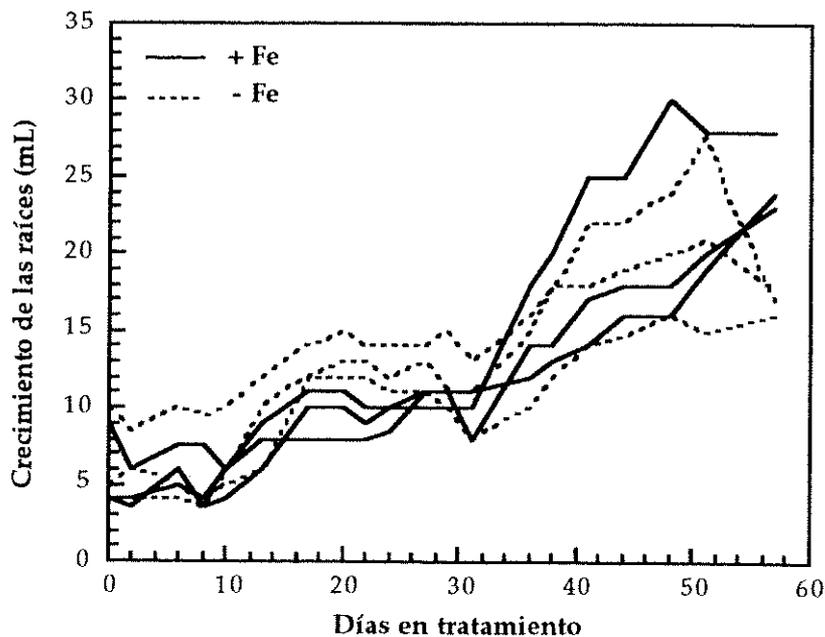
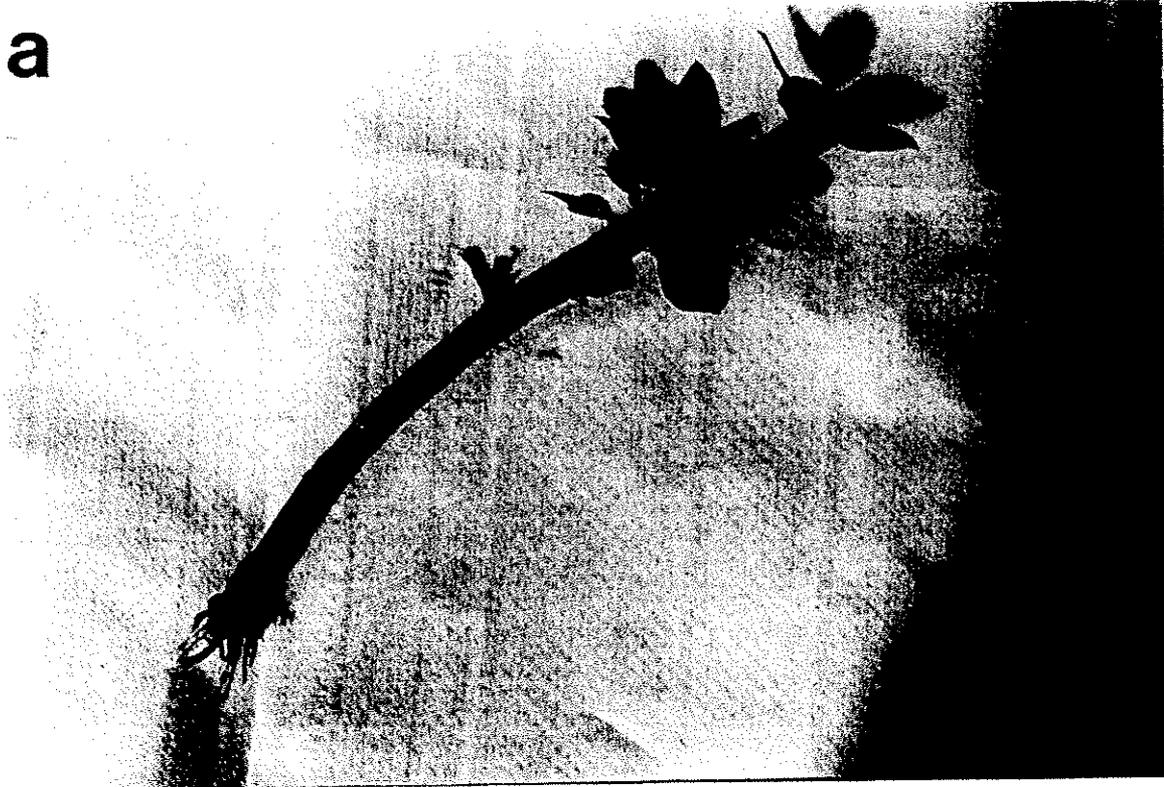


Figura 77: Evolución del crecimiento de las raíces de plantas de la variedad "Ademir" en ambos tratamientos con el tiempo. La variable utilizada para determinar el crecimiento fue el volumen de las raíces.

a



b



Figura 78: Estaquillas de la variedad "Ademir" (a) en el momento del trasplante al cultivo hidropónico y (b) detalle del sistema radicular de las mismas plantas.



Figura 79: (a) Plantas de la variedad "Ademir" en cultivo hidropónico. (b) Plantas después de 30 días en tratamiento con 30 μM Fe (izquierda) y 1 μM Fe (derecha).

4.3.2.- Reducción de Fe

4.3.2.1.- Reducción en planta entera *in vivo*

En primer lugar, se estudió el comportamiento de la reductasa férrica en frutales sometidos a deficiencia de Fe. La reductasa se determinó mediante la formación del complejo Fe(II)-BPDS (Bienfait *et al.*, 1983) y a pH 5,0, condiciones utilizadas por otros autores (Romera *et al.*, 1991). Previamente, se determinó la variación de la absorbancia a lo largo del tiempo, para optimizar el tiempo al que realizar la medida. Tal como se muestra en la Figura 80, la variación de la absorbancia a 535 nm fue lineal por lo menos hasta 5 h después del comienzo del ensayo.

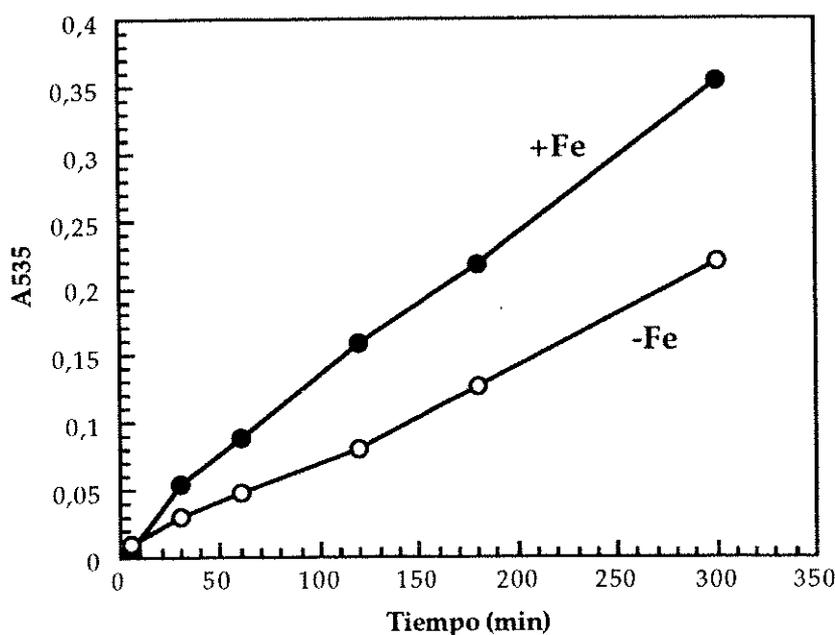


Figura 80: Variación de la absorbancia a 535 nm (complejo Fe(II)-BPDS) con el tiempo.

Las medidas de reducción se realizaron en las mismas plantas a lo largo de todo el tiempo del experimento. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 81. A aproximadamente 13 días del inicio del tratamiento y después del primer aporte semanal de Fe se observó una inducción de la actividad tanto en las plantas control como deficientes, con aumentos de 3 veces para las plantas con 30 μM Fe y de unas 4 veces para las plantas con 1 μM Fe respecto a sus valores previos. Posteriormente la actividad reductasa descendió a los valores encontrados al inicio del tratamiento (0,5-1,5 nmol Fe reducido. g^{-1} PF raíz. min^{-1}) sin que los posteriores aportes semanales de Fe produjeran inducción. Los valores de actividad reductasa

férrica de las plantas con 30 μM son siempre aproximadamente dos veces los valores de las plantas con 1 μM Fe.

Se aumentó la concentración de Fe en las plantas consideradas control, para comprobar que las medidas de actividad obtenidas no se debían a un estado de deficiencia. También se disminuyó la concentración de Fe en las plantas deficientes, por si ésta era excesiva para producir la inducción. Tal como se observa en la Figura 81, ni el aumento de la concentración de Fe en las plantas control ni su disminución en las deficientes supuso variación alguna en la actividad reductasa férrica.

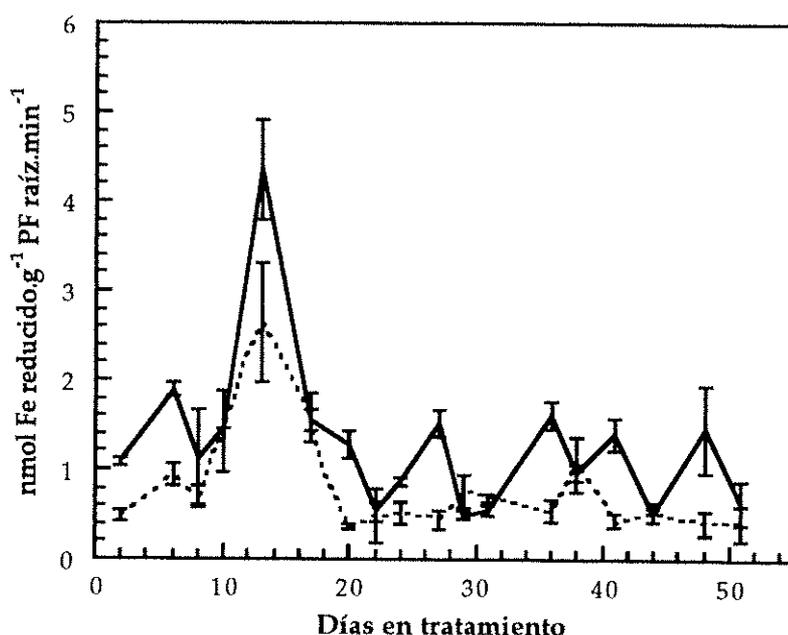


Figura 81: Variación de la actividad reductasa *in vivo* de la variedad “Ademir” durante el tiempo de tratamiento para plantas cultivadas con 30 μM de Fe, condiciones control (+Fe, línea continua) y con 1 μM de Fe, deficientes (-Fe, línea discontinua). Se realizó aporte de Fe cada 7 días. A partir de los 28 días se aumentó la concentración de Fe en las plantas control a 50 μM . A partir de los 32 días se redujo la cantidad de Fe de las plantas deficientes a 50 nM.

4.3.2.2.- Reducción en puntas de raíz

Durante el crecimiento de las variedades en cultivo hidropónico se observó que el sistema radicular se regeneraba constantemente, presentando una alta proporción de raíces lignificadas y por lo tanto posiblemente no activas. Como las medidas se realizan en función del peso fresco de raíz, el valor de las actividades obtenidas puede no mostrar la inducción de la reductasa de las raíces debido a un efecto de dilución, y por lo tanto no resultar representativo del comportamiento de la planta. Por otro lado, la reductasa férrica se encuentra localizada en la zona de

las puntas de la raíz (Moog y Brüggemann, 1994). Teniendo en cuenta estas dos observaciones, se planteó medir la reductasa férrica en las puntas de raíz. Las medidas se realizaron de forma paralela a las medidas de reducción *in vivo*. En el Cuadro 45 se muestra la variación de los valores de actividad reductasa obtenidos a lo largo del tiempo de experimento.

Días en tratamiento	+Fe (30 μM)	-Fe (1 μM)	-Fe/+Fe
7	30 \pm 13	58 \pm 11	1,9
9	57 \pm 1	31 \pm 11	0,5
10	46 \pm 19	43 \pm 16	0,9
20	185 \pm 19	122 \pm 28	0,7
22 a	19 \pm 3	325 \pm 45	17,1
22 b	295 \pm 88	521 \pm 92	1,8
24	185 \pm 62	303 \pm 78	1,6
27	203 \pm 1	75 \pm 10	0,4
56	18 \pm 2	23 \pm 2	1,3

Cuadro 45: Variación de la actividad reductasa férrica medida en puntas de raíz de la variedad "Ademir" durante el tiempo de tratamiento. La actividad se expresa como nmol Fe reducido.(PF raíz)⁻¹.min⁻¹.

Se observó que existía una gran variabilidad en las medidas obtenidas, lo que se confirmó al repetir las medidas un mismo día (día 22) y obtener valores que diferían del orden de 16 veces para el mismo tipo de muestra. Tal como se puede observar comparando los datos de la Figura 81 y el Cuadro 44, no se observa una correspondencia entre los valores de reductasa obtenidos midiendo con plantas enteras y los hallados con puntas de raíz.

4.3.2.3.- Localización de la reducción

Los resultados de localización de la reducción en medio sólido mostraron la misma tendencia que los resultados de reducción *in vivo*. Se encontró reducción localizada en las puntas de raíz para las raíces crecidas en 1 μM de Fe. Sin embargo, esta técnica presenta el mismo problema de representatividad de muestras comentado en el apartado anterior.

4.3.3.- Acidificación del medio

4.3.3.1.- Variación del pH de la solución nutritiva

Además de la inducción de la reductasa férrica de las raíces, otra de las respuestas características de las plantas sometidas a deficiencia de Fe es el aumento de la excreción de protones en las raíces para disminuir el pH de la

rizosfera y facilitar así la solubilidad del Fe. En el caso de cultivos hidropónicos, esta respuesta se puede medir por la disminución del pH de la solución nutritiva. En nuestro caso, la ausencia de bicarbonato en la solución nutritiva de las plantas deficientes ($1 \mu\text{M Fe}$) permitió tomar medidas de estas plantas, mientras que para las plantas control ($30 \mu\text{M}$) se ajustaba la solución nutritiva a pH 5,5 de forma periódica, lo que no permitía tomar medidas de pH. La variación del pH en la solución nutritiva con $1 \mu\text{M}$ se muestra en la Figura 82. El pH de la solución nutritiva aumentaba rápidamente hasta valores entre 8,0-9,0, sin casi variación a lo largo del tratamiento. Hay que tener en cuenta el efecto de dilución en los valores de pH, debidos al hecho de estar 4 plantas (con un sistema radicular no demasiado grande) en un volumen de 20 L. Teniendo en cuenta esto se puede señalar la disminución de casi una unidad de pH que se produce en el segundo cambio de solución (tras 28 días del inicio del tratamiento).

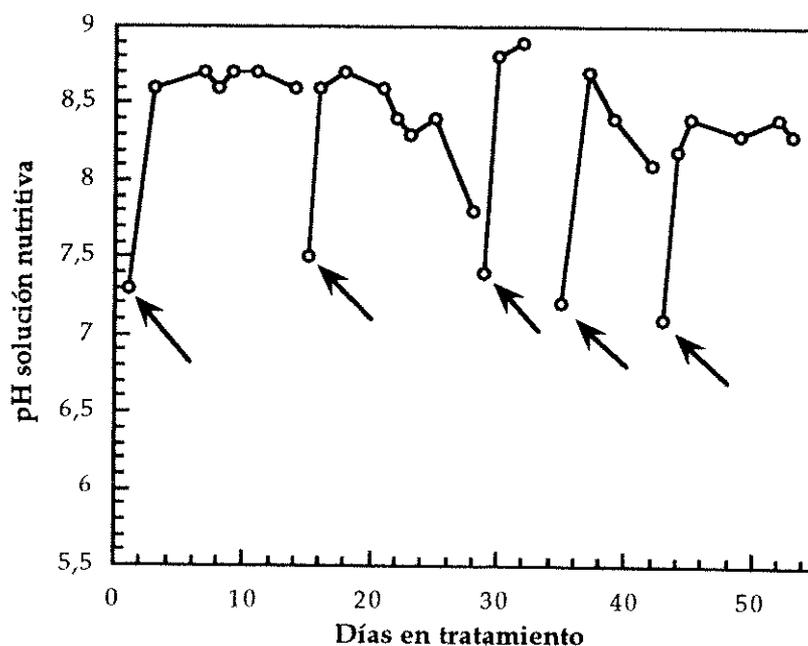


Figura 82: Variación del pH en la solución nutritiva por plantas de la variedad "Ademir" con $1 \mu\text{M Fe(III)-EDTA}$ y sin bicarbonato (4 plantas/20 L). Las flechas indican los cambios de solución nutritiva.

Se ha descrito en frutales que existe una relación entre el máximo de actividad de la reductasa férrica y el mínimo de pH de la solución nutritiva, coincidiendo ambos fenómenos en el tiempo (Romera *et al.*, 1991). En el caso de la variedad "Ademir" cultivada con $1 \mu\text{M}$ de Fe no se ha encontrado relación entre ambos parámetros.

4.3.3.2.- Localización de la disminución del pH

Debido al efecto de dilución en la solución nutritiva (4 plantas/20 L), al igual que ocurre con las medidas de actividad reductasa, es posible no detectar con fiabilidad un aumento en la excreción de los protones. Por ello se realizó una localización de la disminución de pH en puntas de raíz. La metodología utilizada fue la misma que para la localización de la reducción cambiando el BPDS por un indicador de pH: púrpura de bromocresol. Este indicador da una coloración púrpura para pH > 6,8 y amarilla para pH < 5,2 (Romera *et al.*, 1991). El pH de la solución nutritiva se ajustó a 6,0. El resultado obtenido para la variedad "Ademir" con 1 μM de Fe(III)-EDTA en la solución nutritiva fue una coloración púrpura (pH > 6,8) alrededor de las raíces, que indica un aumento de pH en esa zona.

4.3.4.- Análisis de macro y microelementos en hojas

Se analizó el contenido de macro y micronutrientes en las hojas de las plantas con las que se realizaron las medidas, como dato complementario a la caracterización de la deficiencia de Fe en frutales.

Se separaron tres grupos distintos de hojas, según el tratamiento de las plantas y el contenido en clorofila de las hojas: hojas de plantas cultivadas a 30 μM Fe con un valor de SPAD de 46, hojas de plantas cultivadas a 1 μM Fe con un valor de SPAD de 44 y hojas de plantas cultivadas a 1 μM Fe con un valor de SPAD de 15. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 46.

SPAD	% P	% K	% Ca	% Mg	ppm Fe	ppm Mn	ppm Cu	ppm Zn
46	0,42	2,38	0,93	0,42	145	188	20	34
44	0,15	1,92	1,25	0,55	109	231	17	64
15	0,23	5,43	1,84	0,88	47	152	28	33

Cuadro 46: Contenido en macro y micronutrientes de hojas del patrón "Ademir" cultivadas con 1 y 30 μM de Fe.

Para el patrón "Ademir" se observaron variaciones significativas en las concentraciones de macro y micronutrientes en las hojas, según su concentración de clorofila. Se observó un aumento de la concentración de Ca y Mg al disminuir la concentración de clorofila. La concentración de Fe en la hoja disminuye con la concentración de clorofila en la misma. La concentración de P, K y Cu disminuye en deficiencia moderada de Fe, pero con clorosis severa se produce un aumento de sus concentraciones. Para el Mn y Zn se produjo el efecto contrario, su concentración aumenta en deficiencia y luego disminuye cuando la clorosis es

severa. Estos valores están dentro del rango que se observa en hojas de melocotonero en condiciones de campo (Belkhodja *et al.*, 1998a).

DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

	pág.
5.1.- Caracterización de la actividad FC-R de la membrana plasmática de hojas	207
5.2.- Efectos de la deficiencia de Fe sobre la actividad FC-R de membrana plasmática de hojas	208
5.3.- Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato: sustratos de la actividad FC-R	209
5.4.- Modulación de la actividad FC-R de la membrana plasmática por otros factores	212
5.5.- Flavinas como cofactores de la actividad FC-R	215
5.6.- Orientación de la actividad reductasa férrica de la membrana plasmática de hoja	216
5.7.- Actividad FC-R en protoplastos y cloroplastos	219
5.8.- Variación del patrón polipeptídico en puntas de raíz en deficiencia de Fe	222
5.9.- Variación del patrón polipeptídico de la membrana plasmática de hoja	226
5.10.- Inducción de la actividad FC-R en frutales en deficiencia de Fe	228

5.- DISCUSIÓN

5.1.- Caracterización de la actividad FC-R de la membrana plasmática de hojas

La membrana plasmática de hojas de remolacha controles y deficientes en Fe presenta actividad FC-R. En remolacha, los valores de actividad obtenidos para la membrana plasmática de hoja en función de la cantidad de proteína son más bajos que los de membrana plasmática de raíz, con una relación raíz/hoja de 1,6 y 2,6 para las membranas control y deficiente respectivamente. Estos valores más bajos en hoja se encuentran no sólo para la reductasa férrica, sino también para la actividad ATPasa de la membrana plasmática, con valores de 286 y 337 nmol P_i .(mg proteína)⁻¹.min⁻¹ para membranas de hoja frente a 375 y 443 nmol P_i .(mg proteína)⁻¹.min⁻¹ para membranas de raíz control y deficiente respectivamente (Susín *et al.*, 1996). La relación raíz/hoja es de 1,3 tanto para las membranas control como para las deficientes. Estos valores están en consonancia con los mostrados por Asard y Bérczi (1998) que señalan que, en general, la actividad de los enzimas redox de la membrana plasmática de las raíces es mayor que la de la membrana plasmática de hoja, aunque con una distribución similar de las distintas actividades en cada tejido. Según estos autores la relación raíz/hoja para la

mayoría de los enzimas es de aproximadamente 1,5, concluyendo que la membrana plasmática tanto de raíz como de hoja tiene los mismos enzimas redox aunque en distinta proporción.

Al igual que ocurre con la membrana plasmática de las raíces, el enzima reductasa férrica de las hojas reacciona preferentemente con NADH, con valores de K_m de 161 y 157 μM para hojas control y deficientes en Fe respectivamente, frente a 108 y 125 μM para las raíces control y deficientes en Fe respectivamente (Susín *et al.*, 1996). En el caso de NADPH las actividades medidas para la membrana plasmática de hoja son muy bajas, 20 nmol Fe reducido.(mg proteína)⁻¹.min⁻¹, frente a 40 nmol Fe reducido. (mg proteína)⁻¹.min⁻¹ para las raíces.

También cuando se comparan los valores de las constantes cinéticas de las hojas con los de la raíz para Fe(III)-EDTA se obtiene un perfil similar. Los valores de K_m son 103 y 122 μM para la membrana plasmática de hojas control y deficientes en Fe respectivamente, frente a 220 y 220 μM para la membrana plasmática de raíz de plantas control y deficientes en Fe respectivamente. La relación de actividades máximas -Fe/+Fe es de 1,5 para las hojas y de 2,1 para las raíces. Todos estos datos cinéticos indican que el enzima FC-R de la membrana plasmática de las hojas es bioquímicamente similar al presente en la membrana plasmática de las raíces.

5.2.- Efectos de la deficiencia de Fe sobre la actividad FC-R de membrana plasmática de hoja

Teniendo en cuenta trabajos previos presentes en la bibliografía, los datos de reductasa férrica de membrana plasmática de hojas de remolacha obtenidos en este trabajo, constituyen la primera caracterización que se realiza de esta actividad en condiciones de deficiencia de Fe. Los trabajos previos incluyen medidas de reducción en membrana plasmática aislada de hojas de *Vigna unguiculata* con Fe(III)-EDTA y Fe(III)-citrato (Brüggemann *et al.*, 1993) y en microsomas enriquecidos en membrana plasmática de kiwi con Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato (Rombolà *et al.*, 1999). También existen estudios en membrana plasmática de hojas de espinaca con Fe(III)-EDTA, Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato (Moog, comunicación personal). En todos estos trabajos las medidas se realizaron a partir de plantas control, y en condiciones de anaerobiosis.

La deficiencia de Fe aumenta la actividad FC-R de membrana plasmática de hoja en función de la cantidad de proteína. Sin embargo, la relación -Fe/+Fe para la actividad FC-R de membrana plasmática de hojas a una concentración de Fe(III)-

EDTA de 500 μ M y pH de 6,8 es de 1,3, bastante más baja que la obtenida en las mismas condiciones para la membrana plasmática de raíz de remolacha, 2,2 (Susín *et al.*, 1996). La relación $-Fe/+Fe$ para los valores de V_{max} tampoco mostró inducciones importantes de la actividad FC-R en condiciones de deficiencia de Fe, variando entre 1,3 (para KFeCN) y 1,5 (Fe(III)-EDTA y NADH). Las relaciones $-Fe/+Fe$ para los valores de K_m en función de NADH, Fe(III)-EDTA y KFeCN son de aproximadamente 1 para los tres casos, sugiriendo la intervención del mismo enzima tanto en las membranas aisladas de hojas control como deficientes en Fe.

Se ha propuesto que la actividad FC-R de la membrana plasmática de hoja esté regulada por el pH (Mengel, 1994). Esta regulación haría que al aumentar el pH del apoplasto por la deficiencia de Fe, el enzima FC-R se inactivara y el Fe se acumulara en el apoplasto de las hojas deficientes (Mengel, 1994; Kosegarten *et al.*, 1998). En este trabajo los valores de actividad FC-R máxima se han encontrado en el intervalo de pH entre 6,5 y 7,0 (6,8-7,0, 6,8 y 6,5-7,0 para Fe(III)-EDTA, Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato respectivamente). Estos valores de pH son similares a los encontrados para hojas control de *Vigna unguiculata*, 6,5-6,8 con Fe(III)-citrato (Brüggemann *et al.*, 1993) y algo más altos que los encontrados para microsomas enriquecidos en membrana plasmática de hojas de kiwi, 6,5 y 6,0-6,2 con Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato respectivamente (Rombolà *et al.*, 1999). El intervalo de pH de actividad máxima para membrana plasmática de hoja de remolacha es superior a los valores de pH encontrados en el apoplasto de hoja, 5,8-6,2 (López-Millán *et al.*, 1997). Los datos presentados en este trabajo indican que cambios de pH en el intervalo de 5,8 a 7,5 producirían un descenso menor del 30% en la actividad FC-R con Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato. Descensos de la actividad FC-R superiores al 50% sólo se encontrarían fuera de ese intervalo de pH. Así, los datos obtenidos sobre la actividad FC-R caracterizada en la membrana plasmática de hoja de remolacha no parecen apoyar que dicha actividad se pueda encontrar regulada por cambios en el pH apoplástico.

5.3.- Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato: sustratos de la actividad FC-R

Se caracterizó la actividad FC-R respecto a posibles sustratos fisiológicos como Fe(III)-malato y Fe(III)-citrato. La elección de estos dos complejos orgánicos de Fe se debió a que ambos han sido considerados transportadores de Fe(III) en el xilema, inicialmente el malato (Tiffin y Brown, 1962) y posteriormente el citrato (Tiffin, 1966a; 1966b; 1970). Además, tanto citrato como malato se encuentran en concentraciones de mM en el xilema y apoplasto de remolacha, y su concentración

aumenta fuertemente en condiciones de deficiencia de Fe (López-Millán *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos muestran que los complejos Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato son buenos sustratos para el enzima FC-R presente en la membrana plasmática de las hojas. Sin embargo, el enzima muestra distintas afinidades para cada uno de los quelatos. El orden de afinidad es Fe(III)-malato > Fe(III)-EDTA > Fe(III)-citrato, con valores de K_m de 66, 103 y 157 μM (membranas control) y 73, 122 y 170 μM (para las membranas deficientes) respectivamente. Estos valores son del mismo orden de magnitud que los señalados para la actividad FC-R de membrana plasmática de hojas control de *Vigna unguiculata* (97-137 y 173 μM para Fe(III)-citrato y Fe(III)-EDTA respectivamente; Brüggemann *et al.*, 1993) y para microsomas enriquecidos en membrana plasmática de hojas control de kiwi (96 y 399 μM para Fe(III)-malato y Fe(III)-citrato respectivamente; Rombolà *et al.*, 1999). Este orden varía cuando se establece en función de los valores de V_{max} , proporcionando el Fe(III)-EDTA el valor más alto, seguido del Fe(III)-citrato y el Fe(III)-malato. Sin embargo, los valores obtenidos no difieren mucho entre sí, ya que el Fe(III)-citrato y el Fe(III)-malato presentan un 89-75% en controles y un 81-82% en deficientes de la actividad máxima con Fe(III)-EDTA. El enriquecimiento en actividad FC-R de las membranas deficientes en Fe fue similar para todos los sustratos, con relaciones $V_{max}(-\text{Fe})/V_{max}(+\text{Fe})$ de 1,5, 1,4 y 1,7 para Fe(III)-EDTA, Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato respectivamente.

El comportamiento del enzima FC-R frente a los cambios en la relación Fe : anión orgánico fue diferente para citrato y malato. Así, el máximo de actividad se encontró para una relación Fe : citrato de 1 : 5, descendiendo la actividad fuertemente para relaciones superiores. Para una relación de 1 : 150 el descenso de actividad respecto a la actividad máxima fue del 74 y 81% para las membranas control y deficientes en Fe respectivamente. Este comportamiento es distinto al mostrado por Holden *et al.* (1991) con membrana plasmática de raíces de tomate, ya que dichos autores indicaron que la actividad FC-R aumentaba al aumentar la relación Fe : citrato, alcanzando el máximo para una relación 1 : 30. En cambio, en nuestro caso y para el Fe : malato se encontró que la actividad FC-R aumentaba hasta una relación 1 : 15, a partir de la cual los valores ya no variaban mucho. En ambos casos, tanto con citrato como con malato, el comportamiento de las membranas control y deficientes en Fe fue similar.

Las diferencias de comportamiento entre citrato y malato son muy importantes, ya que uno de los efectos de la deficiencia de Fe es el aumento de la concentración de ácidos orgánicos y en especial de citrato y malato (López-Millán *et al.*, 1997). Los datos obtenidos sugieren que el complejo Fe(III)-malato podría tener una importancia especial como sustrato del enzima FC-R de membrana plasmática de hoja. Sin embargo, desde un punto de vista químico es más favorable la formación en la savia del xilema del complejo Fe(III)-citrato que del Fe(III)-malato, aunque variaciones en el pH o en las concentraciones de los ácidos y/o el Fe podrían desplazar el equilibrio hacia la formación del complejo con malato. En todo caso, estos datos sugieren que, independientemente de como se transporte el Fe en el xilema, la reducción del Fe se podría producir preferentemente cuando éste se encuentra como Fe(III)-malato, especialmente en el caso de las hojas deficientes en Fe, en las que la relación Fe : citrato podría ser tan alta como para inhibir la actividad FC-R.

Se abordó el estudio de la especiación de los complejos de Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato en las condiciones de reacción utilizadas, para intentar comprender mejor el funcionamiento del enzima FC-R. Los datos de especiación se compararon con los datos de actividad FC-R, para tratar de dilucidar las especies que podrían reaccionar preferentemente con el enzima. En el caso del complejo Fe(III)-malato se encontró una única especie mayoritaria, la especie neutra $[\text{FeOHMal}]^0$. Esta especie sería compatible con el comportamiento de la actividad FC-R en función de la relación Fe : malato. Sin embargo la dependencia de pH del enzima no se puede explicar por la concentración de $[\text{FeOHMal}]^0$, y es debida probablemente a la dependencia de pH real del enzima. En el caso del Fe(III)-citrato los datos de especiación resultaron más difíciles de interpretar. Se encontraron tres especies mayoritarias para el complejo, $[\text{FeOHCit}]^{-1}$, $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$ y $[\text{FeCit}_2]^{-3}$. Los datos de reducción obtenidos apuntaron a las especies $[\text{FeOHCit}]^{-1}$ y su dímero $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$ como posibles sustratos de la reacción. La concentración de estas especies depende de la concentración total del complejo, siendo $[\text{FeOHCit}]^{-1}$ mayoritaria a concentraciones bajas. Al contrario de lo indicado por Holden *et al.* (1991), nuestros datos sugieren que el descenso de la actividad FC-R a relaciones altas de Fe : citrato se podría deber al aumento de la concentración de la especie $[\text{FeCit}_2]^{-3}$. Otros dos factores que podrían provocar este efecto serían la competición, ya sea entre el citrato y el enzima FC-R por el Fe(III) y/o entre el citrato y el BPDS por el Fe(II) y la consiguiente reoxidación del Fe(II) a Fe(III) (Holden *et al.*, 1991). La competición entre el citrato y la reductasa ya ha sido tenida en cuenta en los cálculos de la especiación al considerar un valor constante de $\text{pH} + \text{pe}$, que simula la existencia de un dador de e^- no restringido. Respecto a la

competencia citrato/BPDS, teniendo en cuenta los valores de las constantes de estabilidad ($10^{5,9}$ - $10^{9,9}$ y $10^{23,45}$ para Fe(II)-citrato y Fe(II)-BPDS respectivamente; Schwab y Lindsay, 1989) es muy poco probable que el citrato pueda competir con el BPDS por el Fe(II).

La preferencia del enzima por malato podría deberse a una menor repulsión electrostática entre la membrana plasmática y el complejo, ya que el posible sustrato en el caso del Fe(III)-malato es una especie sin carga ($[\text{FeOHMal}]^0$) mientras que tanto para el Fe(III)-citrato como para el Fe(III)-EDTA (Susín *et al.*, 1996) son especies con una carga negativa ($[\text{FeOHCit}]^{-1}$ y $[\text{FeEDTA}]^{-1}$).

5.4.- Modulación de la actividad FC-R de la membrana plasmática por otros factores

Para caracterizar mejor el funcionamiento del enzima FC-R de la membrana plasmática de las hojas se modificó el medio de reacción hacia condiciones lo más parecidas posible al entorno de la membrana plasmática. Así, se realizaron medidas tanto con un medio de reacción similar al apoplasto como en anaerobiosis. Los valores de actividad FC-R obtenidos en estas condiciones se compararon con los obtenidos en el medio estándar.

Medio apoplástico

Ante la falta de datos de la composición del apoplasto de hoja de remolacha, tanto en condiciones control como de deficiencia de Fe, se diseñó un medio con las composiciones del apoplasto en distintas especies. Independientemente del sustrato utilizado, las variaciones en la actividad FC-R debidas al uso de un medio similar al apoplasto fueron semejantes para las preparaciones de hojas control y deficientes en Fe. Sin embargo, la variación de la actividad del enzima FC-R fue distinta según el complejo de Fe utilizado como sustrato. Así, la actividad FC-R con Fe(III)-EDTA fue aproximadamente la misma en un medio estándar que en un medio similar al apoplasto, mientras que con Fe(III)-citrato la variación en la actividad depende de la relación Fe : citrato. Para una relación de 1 : 20 no hay cambios en la actividad FC-R cuando se mide en un medio similar al apoplasto. En cambio, para una relación más baja (1 : 5) la actividad FC-R con medio similar al apoplasto es un 31 y 20% más baja que con el medio estándar para membranas control y deficientes en Fe respectivamente.

Esta diferencia de comportamiento podría tener dos causas. Por un lado, la inclusión de cationes en el medio de reacción podría conllevar una modificación de

los equilibrios de las distintas especies, que podría tener mayor importancia a relaciones bajas de Fe : citrato. Por otro lado, los complejos de citrato con otros cationes podrían competir con el complejo Fe(III)-citrato por el enzima, ya que se ha descrito que la FC-R es capaz de reducir otros cationes como el Cu (Welch *et al.*, 1993). La especiación mostró que no hay una gran variación de la concentración de las especies Fe(III)-citrato para las relaciones 1 : 5 y 1 : 20. En cambio sí que son significativas las diferencias encontradas para ambas relaciones en el caso de Mg-citrato y Ca-citrato. La concentración estimada de Mg-citrato fue muy superior para la relación de 1 : 5 que para la 1 : 20. La concentración estimada de Ca-citrato fue la mitad para la relación de 1 : 5 que para la 1 : 20. Esto nos lleva a pensar que el descenso de actividad FC-R para una relación de 1 : 5 podría estar asociada más a una competencia entre el Fe(III)-citrato y el Mg-citrato por el enzima que a un cambio en las especies de Fe(III)-citrato.

Hay que tener en cuenta que según datos recientes el citrato se encuentra en una concentración en el apoplasto de remolacha entre 1-5 mM, mientras el Fe está en el rango μM (López-Millán *et al.*, 1997). Así, en condiciones fisiológicas es poco probable encontrar relaciones Fe : citrato de 1 : 5. En otras especies las relaciones Fe : citrato para plantas control son de 1 : 15 (Tiffin, 1966a), mientras que para plantas deficientes se han encontrado desde por debajo de 1 : 1 hasta relaciones superiores a 1 : 40 (Tiffin, 1966b).

Anaerobiosis

En ausencia de O_2 se observa un aumento de la actividad FC-R, que es similar para las membranas control y deficientes en Fe. Se ha asumido que el oxígeno puede ser un aceptor para la reductasa constitutiva de los tejidos de las plantas que es capaz de reducir ferricianuro (Moog y Brüggemann, 1994). Sin embargo, se ha encontrado a menudo que en anaerobiosis también aumenta la actividad FC-R inducida por la deficiencia de Fe. Así la actividad FC-R de raíces de judía aumenta un 12% (Cakmak *et al.*, 1987), mientras en la membrana plasmática de raíz de cebada y tomate aumenta un 85% (Brüggemann y Moog, 1989) y 50% (Brüggemann *et al.*, 1990) respectivamente. La anaerobiosis también aumenta de una forma significativa la actividad FC-R en discos de hoja de girasol (de la Guardia y Alcántara, 1996). Los aumentos obtenidos en membrana plasmática de hoja de remolacha ratifican los datos anteriores. También muestran que el aumento de la actividad FC-R con la anaerobiosis es muy similar para las membranas control y deficientes en Fe, dato que no apoyaría la hipótesis de la

inducción de una reductasa "turbo" en la membrana plasmática de las hojas, ya que se comporta como el mismo enzima en membranas control y deficientes.

Se ha visto en otros trabajos que la adición de superóxido dismutasa (SOD) disminuye hasta aproximadamente la mitad la actividad FC-R con Fe(III)-EDTA en raíces intactas de judía (Cakmak *et al.*, 1987), membrana plasmática de raíz de pepino (Rabotti y Zocchi, 1994), y tomate (Brüggemann *et al.*, 1990), y en discos de hoja de girasol (de la Guardia y Alcántara, 1996). Este efecto se podría explicar por una transferencia de dos electrones desde un compuesto que contuviera una flavina o una quinona (Cakmak *et al.*, 1987). Uno de estos electrones reduciría el oxígeno, formando un radical superóxido, que a su vez reduciría el Fe(III) pero sólo en ausencia de SOD. Sin embargo el enzima SOD no produce ningún efecto en la actividad FC-R de la membrana plasmática de raíz de remolacha (Susín, 1994) ni de cebada (Brüggemann y Moog, 1989) lo que sugiere que la reducción se produciría por transferencia directa de los electrones desde el NADH y no a través de un radical del oxígeno. Tampoco parece probable la participación de la especie H_2O_2 ya que la catalasa produce un efecto muy pequeño en la FC-R. Así, la catalasa aumenta 6 y 4% la actividad FC-R de la membrana plasmática de pepino (Rabotti y Zocchi, 1994) y cebada (Brüggemann y Moog, 1989), mientras que disminuye un 20% la actividad FC-R de la membrana plasmática de la raíz de remolacha (Susín, 1994).

Al igual que ocurre con un medio similar al apoplasto, el aumento de la actividad es distinto según el complejo de Fe utilizado como sustrato. Los valores mas altos de actividad FC-R se obtienen para el Fe(III)-malato, con aumentos en anaerobiosis respecto a la actividad en un medio estándar del 90 y 70% para membranas control y deficientes respectivamente. Para Fe(III)-EDTA se obtiene un aumento de un 50% en la actividad FC-R. En cambio, para Fe(III)-citrato el aumento en la actividad FC-R no es significativo. De nuevo nos encontramos con datos que marcan una diferencia de comportamiento del Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato como sustratos del enzima FC-R. El aumento de la actividad FC-R en anaerobiosis para el complejo Fe(III)-malato contrasta con el prácticamente nulo aumento en el caso del Fe(III)-citrato. Así, en condiciones de ausencia de O_2 la actividad FC-R con el Fe(III)-malato sería más importante. Sin embargo, sólo existen datos indirectos que indicarían la existencia de hipoxia en deficiencia de Fe. Así, algunos cambios que se producen en la fluorescencia de clorofila de las hojas son similares a los provocados por la anaerobiosis (Belkhodja *et al.*, 1998b). Asimismo, se han identificado algunos polipéptidos en las raíces de plantas en

deficiencia de Fe cuya expresión aumenta en casos de hipoxia (Herbik *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1998; Hourton-Cabassa *et al.*, 1998).

5.5.- Flavinas como cofactores de la actividad FC-R

Existe una gran discrepancia entre las actividades FC-R de raíces *in vivo* y de la membrana plasmática aislada de dichas raíces. Así, la deficiencia de Fe aumenta la actividad FC-R de las raíces de remolacha deficientes *in vivo* unas 18 veces (Susín *et al.*, 1996), mientras que la inducción en membrana plasmática aislada es de sólo 2 veces. Se han encontrado discrepancias similares en otras especies como tomate (7,4 y 1,6 veces para raíz intacta y membrana plasmática respectivamente) y judía (10-22,4 y 2,6 veces para raíz intacta y membrana plasmática respectivamente) (Moog y Brüggemann, 1994). Se ha sugerido como causa de esta diferencia en la inducción de la actividad FC-R la pérdida de un cofactor durante el aislamiento (Susín *et al.*, 1996). Posibles cofactores de este tipo podrían ser algunos compuestos flavínicos como los sulfatos de riboflavina, que se acumulan en las raíces deficientes en Fe (Susín *et al.*, 1993a). También en hojas de remolacha la deficiencia de Fe produce un aumento en la concentración de flavinas (Susín *et al.* 1993b). En este caso la riboflavina (Rbfl) es mayoritaria, junto con cantidades menores de FAD y FMN, mientras que los sulfatos de riboflavina típicos de las raíces de remolacha deficientes en Fe no están presentes (Susín *et al.* 1993b). En el caso de la membrana plasmática aislada de hojas de remolacha también hemos encontrado una inducción en deficiencia de Fe bastante baja, de aproximadamente 1,4 veces en función de la cantidad de proteína. Esto nos hizo pensar en la posible participación de flavinas como cofactores del enzima FC-R.

La actividad FC-R de la membrana plasmática de hoja aumenta con la presencia de las flavinas Rbfl, FMN y FAD en una concentración de 50 μ M. Se trata de un aumento moderado, no superior a dos veces, tanto en membranas de hojas control como deficientes en Fe y con Fe(III)-EDTA y Fe(III)-citrato como sustratos. Esta activación moderada sugiere que ninguna de las flavinas utilizadas es necesaria específicamente como cofactor del enzima FC-R. La actividad FC-R de membrana plasmática de raíz de pepino también aumenta en presencia de FAD, aunque disminuye ligeramente en presencia de FMN (Zaharieva *et al.*, 1997). El aumento de la actividad FC-R encontrado al añadir flavinas al medio de reacción se puede deber a un aumento del transporte electrónico a través de la membrana.

La presencia de cofactores de naturaleza flavínica en enzimas que participan en la reducción de Fe(III) ha sido mostrada por algunos autores. Así, tanto riboflavina como FMN son necesarias para la actividad FC-R, con Fe(III)-

citrato como sustrato en el hongo ectomicorrícico *Laccaria luccatta* (Shelton y Barton, 1997). El enzima NADH-FC-R aislado de raíces de plantas de maíz y tomate (Bagnaresi y Pupillo, 1995; Bagnaresi *et al.*, 1997) muestra similitudes con el enzima citocromo b_5 , flavoproteína que tiene como cofactor un grupo FAD. Otro enzima con un grupo FAD como cofactor es la NADH monodehidroascorbato reductasa (Hossain y Asada, 1985) que también es capaz de reducir quelatos de Fe(III) (Bérczi *et al.*, 1995; Bérczi y Møller, 1998). Hay que tener en cuenta también que se ha descrito la existencia de oxidoreductasas en la membrana plasmática, con cofactores de naturaleza flavínica, que poseen capacidad de reducir quelatos de Fe. Por ejemplo, la NADH-quinona oxidoreductasa (Serrano *et al.*, 1995) cuya actividad se induce en presencia de FMN, y la NADH-monodehidroascorbato reductasa, que tiene FAD como cofactor (Bérczi *et al.* 1995; Bérczi y Møller, 1998). Finalmente, conviene destacar que las flavinas libres, en ausencia de membrana plasmática, son capaces de reducir compuestos de Fe(III). Esta reducción depende del dador de electrones (NADH ó NADPH), del pH y del tipo de flavina (Susín, 1994).

5.6.- Orientación de la actividad reductasa férrica de la membrana plasmática de hoja

La actividad fisiológica FC-R de la membrana plasmática implica un flujo transmembrana de electrones desde el citoplasma hacia el exterior de la célula. Este modelo se apoya en los cambios tanto en la concentración de los nucleótidos de piridina (Sijmons *et al.*, 1984b; Schmidt y Schuck, 1996) como en la despolarización de la membrana plasmática (Sijmons *et al.*, 1984a). Sin embargo, los datos sobre la posible relevancia de un flujo transmembrana son bastante contradictorios, achacándose a la distinta composición de proteínas redox de la membrana plasmática de hojas y de raíces (Serrano *et al.*, 1994). Por ejemplo, trabajos relativos a la topografía de los lados dador y aceptor del NAD(P)H de las oxidorreductasas de la membrana plasmática sugieren que sólo una pequeña parte de la actividad se debería a un flujo de electrones transmembrana (Askerlund *et al.*, 1988; Córdoba *et al.*, 1995; Johansson *et al.*, 1995). Askerlund y Larsson (1991) encontraron actividad FC-R y FCN-R en la parte externa de vesículas con orientación natural cargadas con ascorbato y en ausencia de cualquier otro reductor externo. El mismo tipo de vesículas cargadas con un sistema generador de NADH (NAD⁺ y alcohol deshidrogenasa) no mostró capacidad de reducir KFeCN, aunque sí diclorofenol indofenol sulfonato. En cambio, vesículas con orientación natural cargadas con NADH mediante electroporación son capaces de reducir KFeCN (Böttger, 1989). Gianini y Briskin (1988) no encontraron actividad

transmembrana al cargar KFeCN en vesículas con orientación inversa, aunque un experimento similar con membrana plasmática de raíz de pepino mostró actividad FCN-R transmembrana (Klobus y Buczek, 1995).

El aislamiento de membrana plasmática mediante un sistema de partición en doble fase permite la obtención de vesículas cerradas, que tienen en su mayoría una orientación celular natural (con el lado citoplasmático hacia el interior). Así, las preparaciones de membrana plasmática de hoja de remolacha siguen el patrón citado, con una latencia de la actividad ATPasa sensible al vanadato con Tritón X-100 del 79 y 73% respectivamente para las plantas control y deficientes en Fe. Estos valores de actividad ATPasa son similares a los obtenidos para membrana plasmática de raíz de remolacha, que son de un 86% (Susín *et al.*, 1996).

La estimulación de la actividad FC-R en presencia de detergentes se ha interpretado como la exposición de sitios activos del enzima que se encontraban latentes, lo que apoya el modelo de enzima transmembrana (Moog y Brüggemann, 1994). Sin embargo, la única forma de conseguir datos fiables de actividad *cis-* y *transmembrana* es a través de preparaciones de vesículas con una orientación homogénea. Se han utilizado diversas técnicas para invertir la orientación de las vesículas obtenidas por una separación en doble fase de polímeros, tales como ciclos congelación/descongelación (Palmgren *et al.*, 1990), choque osmótico (Dixon *et al.*, 1996), electroforesis de flujo libre (Canut *et al.*, 1988) y partición secuencial en doble fase (Larsson *et al.*, 1988). Siempre se ha estimado que puede haber una contaminación por vesículas de la orientación contraria cercana al 20% (Larsson *et al.*, 1990).

Recientemente se ha propuesto una técnica que permite obtener vesículas cerradas de membrana plasmática con un 100% de orientación inversa, mediante la adición del detergente no iónico Brij 58 a preparaciones con una orientación celular natural (Johansson *et al.*, 1995). Esta técnica ha permitido la obtención de vesículas de membrana plasmática cerradas en una orientación inversa de raíz de cebolla (Córdoba *et al.*, 1995), hipocotilo de calabacín (Dixon *et al.*, 1996), cultivos de hoja de tabaco (Ibarz *et al.*, 1994) y raíz de *Plantago lanceolata* (Schmidt y Bartels, 1998). La formación de vesículas en una orientación inversa por el Brij 58 se explica por la hipótesis de doble capa emparejada (Sheetz y Singer, 1974) basada en que las membranas biológicas tienen una distribución asimétrica de proteínas y lípidos, de tal forma que cada mitad puede responder de una forma distinta a las perturbaciones. Los detergentes de la familia del Brij se intercalan mayoritariamente en la mitad citoplasmática de la bicapa, forzando una curvatura

de la membrana que hace que las vesículas se abran y se vuelvan a cerrar en una orientación inversa. El paso intermedio de reapertura de las vesículas parece confirmarse por la pérdida de proteínas solubles contenidas en el interior (Johansson *et al.*, 1995). En cambio, el Tritón X-100 lo que hace es abrir las vesículas totalmente, exponiendo así los sitios activos del enzima.

Schmidt y Bartels (1998) utilizando el detergente Brij 58 con membrana plasmática de raíz de plantas de *Plantago lanceolata* encuentran los mismos valores de K_m tanto con Triton como con Brij, por lo que indican que parece observarse la misma actividad FC-R con ambos detergentes. Dichos autores proponen la ausencia de un transporte significativo de electrones transmembrana dentro de la actividad FC-R de la membrana plasmática. En *Plantago lanceolata* la actividad FC-R con Brij 58 representó un 69 y 79% de la actividad con Tritón X-100 para membranas control y deficientes en Fe respectivamente, sin que haya estimulación de la actividad en presencia de ambos detergentes simultáneamente respecto del Brij sólo. La relación -Fe/+Fe fue de 2 y 2,3 para Triton X-100 y Brij 58 respectivamente (Schmidt y Bartels, 1998).

Sin embargo los datos obtenidos de actividad FC-R de membrana plasmática de hoja de remolacha en presencia de Brij 58 y Triton X-100 sí que sugieren, a nuestro juicio, la existencia de un transporte de electrones transmembrana. En nuestro caso, los valores de actividad FC-R en presencia de Brij 58 son de aproximadamente un 60% de la actividad con Triton X-100. Al mezclar ambos detergentes simultáneamente en el medio de reacción se aumenta la actividad hasta aproximadamente un 75%. La relación -Fe/+Fe se mantiene similar con valores de 1,4 para Tritón X-100 y 1,3 para Brij 58 y la mezcla de los dos detergentes. La actividad FC-R de membrana plasmática de hoja de remolacha mostró valores similares de V_{max} para las membranas control y deficientes en Fe tanto con Triton como con Brij. En cambio, los valores de K_m con Brij fueron 4 veces superiores a los obtenidos en presencia de Tritón lo que indicaría que las actividades medidas no son exactamente iguales. Los datos en presencia de Brij corresponderían a una actividad exclusivamente *cis* (lado dador y acceptor en el lado citoplasmático de la membrana) mientras que los datos en presencia de Triton indicarían la suma de la actividad *cis* y *trans*. La actividad *trans* sería por tanto de un 40% del total de la actividad FC-R observada. De los valores obtenidos es posible deducir las constantes cinéticas correspondientes a la actividad transmembrana. Los valores de K_m para dicha actividad serían de 39 y 44 μM para las membranas control y deficientes en Fe respectivamente. La relación -Fe/+Fe sería de 1,1 frente al valor de 1,2 obtenido para las membranas en presencia de Brij

y Triton. Los valores de V_{\max} para el transporte transmembrana serían de 45 y 85 nmol Fe reducido.(mg proteína)⁻¹.min⁻¹ para las membranas control y deficientes en Fe respectivamente. La relación -Fe/+Fe sería de 1,9 frente a los valores de 1,5 y 1,4 para las membranas en presencia de Brij y Triton.

Aunque se ha mostrado que en presencia de Brij 58 al 0,05% se alcanza un 100% de vesículas con orientación inversa (Johansson *et al.*, 1995) no se puede descartar la presencia de una pequeña proporción de vesículas en una orientación diferente. Sin embargo los estudios de la bomba de protones de la membrana plasmática de hojas de remolacha indican que a una concentración de 0,05% de Brij ya se ha alcanzado el 100% de vesículas cerradas en orientación inversa. Las medidas también muestran que en presencia de ambos detergentes simultáneamente las vesículas cerradas son un 72 y 86% del total encontrado en presencia de Brij 58 para membranas control y deficientes en Fe respectivamente. En cambio, cuando se adiciona el Brij a una preparación en presencia de Tritón se observa un aumento progresivo de la actividad de la bomba de protones que podría indicar una formación de vesículas cerradas. Estos datos indican que el Brij 58 tiene un fuerte efecto sobre la estructura de la membrana plasmática, que no se altera demasiado con la adición de Tritón.

5.7.- Actividad FC-R en protoplastos y cloroplastos

La utilización de protoplastos para la medida de la actividad FC-R se debe a que los materiales utilizados hasta la fecha, discos de hoja y membrana plasmática, presentan problemas metodológicos. Por ejemplo, la actividad FC-R medida en discos de hojas puede incluir la reducción de Fe debida a procesos no relacionados con la membrana plasmática de las células del mesófilo. Esto se debería tanto a la liberación de compuestos reductores por la rotura de las células al cortar el disco como a la reducción por parte de orgánulos, como por ejemplo cloroplastos, expuestos al medio por el corte del disco. Los estudios de reductasa férrica con discos de hoja no suelen diferenciar dichos tipos de actividad (Brüggemann *et al.*, 1993; de la Guardia y Alcántara, 1996). Como ya hemos señalado previamente, en el caso de la actividad FC-R de la membrana plasmática aislada y medida en presencia de Triton X-100 sería necesario tener en cuenta la posible presencia de componentes *cis*.

Los datos presentados en este trabajo significan el primer aislamiento de protoplastos de hojas en condiciones de deficiencia de Fe. El nivel de recuperación de clorofila en los protoplastos es similar al señalado por otros autores (Huber y Edwards, 1975; Rathnam y Edwards, 1975) con valores de un 38 y 50% del

contenido total de clorofila de las hojas control y deficientes en Fe respectivamente. Considerando las relaciones molares de los pigmentos fotosintéticos, los protoplastos obtenidos son representativos de las hojas de procedencia. Por último, con el método descrito en este trabajo se obtienen altos porcentajes de protoplastos fisiológicamente activos (91 y 96% para las hojas control y deficientes en Fe respectivamente).

Los protoplastos del mesófilo aislados de hojas control y deficientes en Fe son capaces de reducir Fe(III)-EDTA. Pich y Scholz (1991) ya habían señalado la capacidad de reducir Fe(III)-citrato en la oscuridad por parte de protoplastos aislados de tomate y de su mutante *chloronerva*. La actividad FC-R se debe a un enzima transmembrana asociado a la membrana plasmática, ya que los protoplastos permanecen todavía intactos tras la medida, lo que minimiza la posible liberación de sustancias reductoras del interior de los protoplastos. Para excluir cualquier reducción no fisiológica se ha utilizado un medio de reacción que imita la composición iónica del apoplasto de hoja de remolacha (López-Millán *et al.*, 1997).

La actividad FC-R observada es dependiente de luz y presenta una dependencia de pH similar a la esperada para una actividad transmembrana. La actividad FC-R máxima se obtiene para un valor de pH de 5,5 y entre 5,5-6,0 para los protoplastos de hojas control y deficientes en Fe respectivamente. Estos valores de pH óptimo son una unidad de pH menores que los obtenidos para membrana plasmática de hojas de remolacha (en este trabajo) y *Vigna unguiculata* (Brüggemann *et al.*, 1993) y para microsomas enriquecidos en membrana plasmática de hojas de kiwi (Rombolà *et al.*, 1999). En el caso de *Valerianella locusta* se han señalado valores de pH óptimo de 6,8 y 7,1 para protoplastos intactos de hojas control y deficientes en Fe (Grünwald, 1996) aunque sin mostrar datos ni sobre los niveles de representatividad ni sobre el grado de integridad de las muestras.

Hay que señalar que los valores de pH óptimo para la actividad FC-R de los protoplastos son muy similares a los valores de pH del apoplasto de hoja de remolacha, que es de aproximadamente 6,2 y 5,8 para hojas control y deficientes en Fe respectivamente (López-Millán *et al.*, 1997). Mengel (1994) sugirió que el enzima FC-R de la membrana plasmática de hoja podría estar fuertemente regulado por el pH. Un aumento de pH en el apoplasto, debido a la deficiencia de Fe, llevaría a la inactivación del enzima provocando la acumulación de Fe que se observa en ocasiones en la hoja (Römheld, 1997; Morales *et al.*, 1998). Estos

nuevos datos apoyarían la regulación de la actividad FC-R en protoplastos por el pH, con un fuerte descenso de la actividad a partir de pH 7,0. Sin embargo los datos que se disponen hasta el momento parecen indicar que el pH de las hojas deficientes no puede llegar a alcanzar esos valores y que incluso la deficiencia de Fe provoca un descenso en el pH apoplástico de la hoja de remolacha (López-Millán *et al.*, 1997).

Los valores de K_m para Fe(III)-EDTA fueron de 153 y 239 μM para protoplastos de hojas control y deficientes en Fe respectivamente. Estos valores son similares a los obtenidos en membrana plasmática de hojas control de *Vigna unguiculata* (173 μM ; Brüggemann *et al.*, 1993), membrana plasmática de hojas control y deficientes en Fe de remolacha (103 y 122 μM respectivamente; en este trabajo) y discos de hojas control de *Vigna unguiculata* (226 μM ; Brüggemann *et al.*, 1993).

Resulta difícil caracterizar el comportamiento de la actividad FC-R en protoplastos de hojas deficientes en Fe comparado con los de hoja control. Hasta ahora, la actividad FC-R de las hojas se ha expresado en función de la concentración de clorofila. Así la actividad aumentó en dicha base 2,9 veces en discos de hoja de *Vigna unguiculata* (Brüggemann *et al.*, 1993) y sólo un 5% en discos de hoja de girasol (de la Guardia y Alcántara, 1996). La actividad FC-R de protoplastos de hojas deficientes aumenta un 50% respecto a los protoplastos de hojas control cuando se expresa en función de la concentración de clorofila. Sin embargo, la deficiencia de Fe disminuye fuertemente la actividad FC-R cuando se expresa en función del área de hoja. Descensos de un 75% en la concentración de clorofila de la hoja en deficiencia de Fe llevan a un descenso en la actividad FC-R de los protoplastos del 65%. Nuestros datos indican que las hojas con concentraciones muy bajas de clorofila tendrían una capacidad muy pequeña de reducir Fe(III), con lo que el Fe podría quedar acumulado en el apoplasto y podría quedar inmovilizado en forma de acervos no activos fisiológicamente.

Los cloroplastos aislados de hojas control de remolacha también presentan actividad FC-R (14 y 0-3 nmol Fe reducido.(mg clorofila)⁻¹.s⁻¹ en presencia y ausencia de NADH respectivamente). Estos resultados estarían de acuerdo con los de Bughio *et al.* (1997a, b) que proponen que el transporte de Fe a los cloroplastos está controlado por dos mecanismos, una reductasa de Fe(III) y un mecanismo no identificado similar a la Estrategia II (absorción del complejo Fe(III)-quelato). Dichos autores proponen la existencia de una reductasa férrica por la inhibición parcial del transporte de Fe al interior del cloroplasto en presencia de BPDS

(agente quelante de Fe(II)). Aunque dichos autores no miden directamente la actividad FC-R, de sus datos se puede deducir una actividad a pH 7 no superior a $4,5 \text{ nmol Fe reducido} \cdot (\text{mg clorofila})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. En nuestro caso, el máximo de actividad FC-R se encuentra a pH 7,5, no siendo posible medir actividad por debajo de pH 7. El máximo de transporte de Fe(III) en cloroplastos de cebada se produce en un intervalo de pH de entre 7,5 y 8,5 (Bugchio *et al.*, 1997a, b).

5.8.- Variación del patrón polipeptídico en puntas de raíz en deficiencia de Fe

La importancia de las puntas de raíz radica sobre todo en el hecho de que es donde se localizan las respuestas de las plantas ante la deficiencia de Fe, tales como reducción de Fe (Moog y Brüggemann, 1994), acidificación de la rizosfera (Römheld *et al.*, 1984), y acumulación y excreción de sustancias reductoras (Brown y Ambler, 1973; Welkie y Miller, 1993; Susín *et al.*, 1993a; Jones y Darrah, 1995) para las plantas con Estrategia I. Las plantas con Estrategia II llevan a cabo la liberación de fitosideróforos en la misma zona (Marschner, 1995). La mayoría de los estudios realizados han puesto un mayor énfasis en la caracterización morfológica y fisiológica de estas respuestas y todavía se sabe muy poco de la expresión y regulación de los genes dependientes de la deficiencia de Fe, sobre todo, en las plantas con Estrategia I.

La primera respuesta que se produce en las puntas de raíz de plantas de remolacha en condiciones de deficiencia de Fe es un aumento de 3 veces en la cantidad de proteína aislada por unidad de peso de raíz. Aumentos en la síntesis de proteínas en raíces en condiciones de deficiencia de Fe también se han señalado en otras especies con Estrategia I como el tomate (Herbik *et al.*, 1996; Schmidt y Buckhout, 1997) y la alfalfa (Masaoka *et al.*, 1998). El aumento de síntesis de proteínas se produce también en plantas con Estrategia II como maíz (Thoiron *et al.*, 1997) y cebada (Suzuki *et al.*, 1998).

Los geles de dos dimensiones de puntas de raíz de remolacha cultivada en ausencia o presencia de Fe muestran patrones polipeptídicos con diferencias significativas. Se han encontrado 6 polipéptidos que aparecen *de novo* con la deficiencia de Fe y otros 13 polipéptidos que presentan cambios significativos en su nivel de intensidad. Tres de estos polipéptidos se han identificado inmunológicamente. Las proteínas identificadas han sido la formiato deshidrogenasa (FDH), la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC) y una ATPasa. Un cuarto polipéptido se ha intentado identificar por secuenciación de su amino terminal no consiguiéndose una homología clara.

FDH

La formiato deshidrogenasa (FDH) resultó ser el polipéptido que presentaba un peso molecular aparente (M_R) de 42,7 kDa y un pI de 5,7. Este polipéptido presentó una intensidad 4,9 veces mayor en puntas de raíz de remolacha deficiente en Fe que en plantas control. Un aumento en la cantidad de esta proteína ha sido descrito también en condiciones de deficiencia de Fe en puntas de raíz de tomate (Herbik *et al.*, 1996) y cebada (Suzuki *et al.*, 1998).

El enzima FDH (formiato NAD^+ oxidoreductasa, E.C.1.2.1.2) cataliza la oxidación del formiato a CO_2 en presencia de NAD^+ . Junto con la formaldehído deshidrogenasa juega un papel fundamental en los procesos metabólicos, al proporcionar NADH a la cadena respiratoria (Van Dijken *et al.*, 1976). Aparte del formiato, es posible que la S-formilglutación actúe como sustrato de la FDH, como se ha sugerido en levaduras (Van Dijken *et al.*, 1976), guisante (Uotila y Koivusalo, 1979) y *Pseudomonas* sp. 101 (Popov y Lamzin, 1994). La actividad FDH está relacionada con el metabolismo anaeróbico (Drew, 1997). Por ejemplo, el formiato se produce en los tubérculos y raíces de patata en condiciones de anaerobiosis (Colas des Francs-Small *et al.*, 1993). Suzuki *et al.* (1998) demuestran la inducción de FDH en raíz de cebada tanto en condiciones de anaerobiosis como de deficiencia de Fe. La FDH se encuentra localizada en la mitocondria, especialmente de los tejidos no fotosintéticos, donde puede tener lugar una fermentación para producir formiato, similar a la descrita en bacterias y algas (Colas des Francs-Small *et al.*, 1993). Los geles de dos dimensiones de mitocondrias aisladas de raíz de reserva también muestran un aumento en la cantidad de FDH para las raíces de plantas deficientes. Las medidas de actividad enzimática FDH muestran una fuerte inducción para los extractos de puntas de raíz de remolacha deficientes en Fe que confirman los datos de electroforesis 2-D.

Herbik *et al.* (1996) proponen un papel general para el FDH en la fisiología de las plantas ante cualquier estrés. Suzuki *et al.* (1998) encontraron que en raíz de cebada la FDH se transcribe más rápido en condiciones de anaerobiosis que en deficiencia de Fe, lo que significaría que la expresión de FDH se induce por el estrés anaeróbico. Esto les llevó a proponer que la inducción de FDH se debería realmente a una hipoxia producida por la deficiencia, a pesar de la presencia de O_2 . Aunque el enzima se encuentra preferentemente en tejidos no fotosintéticos se ha comprobado que su expresión en hojas de patata se induce en condiciones de oscuridad, hipoxia, heridas, frío y sequía (Hourton-Cabassa *et al.*, 1998). En nuestro trabajo se ha encontrado que la actividad FDH de las hojas no varía en

condiciones de deficiencia de Fe. Tampoco varía, en las mismas condiciones, la cantidad de FDH presente en mitocondrias aisladas de hojas.

PEPC

La fosfoenolpiruvato carboxilasa resultó ser el polipéptido que presentaba un peso molecular de 54,6 kDa y un pI de 5,4. Este polipéptido presentó una intensidad 6,1 veces mayor en puntas de raíz de remolacha deficiente en Fe que en las de plantas control. Es la primera vez que se ha medido la inducción de la cantidad de la PEPC en puntas de raíz de plantas sometidas a condiciones de deficiencia de Fe, aunque ya se habían medido fuertes aumentos de su actividad en raíces de plantas en deficiencia (Landsberg, 1981; Miller *et al.*, 1990; López-Millán *et al.*, 1998). El aumento en la actividad PEPC en las mismas puntas de raíz fue de 60 veces (López-Millán *et al.*, 1998).

La PEPC (E.C. 4.1.1.31) es un enzima citosólico ampliamente presente tanto en plantas superiores como en bacterias, cianobacterias y algas (Lepiniec *et al.*, 1994). Cataliza la β -carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato (PEP) para dar oxalacetato (OAA) y P_i en presencia de HCO_3^- . Tiene como cofactores al Mg^{2+} o Mn^{2+} y su actividad está modulada por el pH y las concentraciones de malato y gliceraldehído 6 fosfato (G6P) (Bakrim *et al.*, 1993). Además de formar parte del ciclo C_4 del metabolismo de los ácidos dicarboxílicos de las plantas interviene en sistemas no-fotosintéticos como la apertura estomática (Outlaw, 1990) y la fijación de N_2 en nódulos de legumbres (Deroche y Carrayol, 1988). Aunque no se sabe con exactitud el papel de la PEPC en deficiencia de Fe los aumentos de actividad medidos se han relacionado con dos procesos fisiológicos de gran importancia en las plantas: la fijación no fotosintética de CO_2 y el mantenimiento del pH citoplasmático o teoría del "pH-stat".

La asimilación no fotosintética de CO_2 se realiza a través de la PEPC asimilando el HCO_3^- y el PEP obtenido en la glicólisis para dar OAA que se transforma en malato por acción de la malato deshidrogenasa. Esto permite evitar el paso directo de PEP a piruvato a través de la piruvato quinasa que actúa como paso limitante (Lance y Rustin, 1984).

Davies (1973, 1986) propuso la teoría del "pH-stat" que consiste en un mecanismo bioquímico que mantiene el pH citoplasmático dentro de un rango determinado. El mecanismo de la teoría del "pH-stat" comprende series de reacciones de carboxilación y descarboxilación, estando la actividad de los enzimas (PEPC y enzima málico) regulada por el pH (Davies, 1986). Así cuando el pH

citoplasmático aumenta, la actividad PEPC sería predominante ya que su pH óptimo está en el intervalo alcalino. Esto produce un aumento en la producción de OAA que a través de la malato deshidrogenasa se transforma en malato, ácido fuerte que compensaría la subida del pH. Cuando el pH desciende se activaría el enzima málico que retiraría el malato del medio, aumentando así el pH.

Otras proteínas

La identificación de proteínas inducidas en condiciones de deficiencia de Fe en raíces mediante electroforesis en dos dimensiones es una aproximación relativamente reciente, no disponiéndose de muchos datos hasta la fecha. La mayoría de los trabajos realizados muestran inducción en la expresión de proteínas en condiciones de deficiencia de Fe, aunque un estudio realizado con raíces de plantas jóvenes de maíz en deficiencia de Fe no observó ninguna variación en el patrón polipeptídico de proteínas solubles (Thoiron *et al.*, 1997).

Además de la FDH ya citada anteriormente, otras proteínas cuya expresión se induce en raíces de tomate en deficiencia de Fe son la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con una M_R de 37 kDa y ascorbato peroxidasa (AP) con una M_R de 26,6 (Herbik *et al.*, 1996). Ambas proteínas están relacionadas con respuestas a distintos estreses fisiológicos. En el mismo trabajo (Herbik *et al.*, 1996) se señala otro polipéptido de 37 kDa sin identificar que aumenta su expresión. Nuestros resultados muestran cuatro polipéptidos con M_R cercanas a las señaladas por estos autores, cuya expresión también aumenta con la deficiencia de Fe, los polipéptidos PR4 (5,3 y 42,3 kDa), PR7 (5,0 y 38,7 kDa), PR11 (5,9 y 42,9 kDa) y PR5 (5,1 y 24,5 kDa).

Un estudio similar en alfalfa (Masaoka *et al.*, 1998) ha permitido la identificación de otras tres proteínas que se inducen en deficiencia de Fe. Dos de ellas, PvPR1 y PvPR2 con M_R de aproximadamente 17 kDa y pI de 6,0 y 5,0 respectivamente, presentan altas homologías con proteínas relacionadas con el sistema de defensa de las plantas (Ohashi y Ohshima, 1992). Una tercera proteína, con una M_R de aproximadamente 18 kDa y pI de 6,8, sería la superóxido dismutasa (SOD) citoplasmática dependiente de Zn y Cu. En nuestro caso, solamente el polipéptido PR6 con una M_R de 17,3 kDa y pI de 6,0 podría corresponder a alguno de estos polipéptidos. Sin embargo este polipéptido fue secuenciado en su amino terminal y no mostró homología con proteínas de estas características.

Schmidt y Buckhout (1997) identifican 7 polipéptidos con pesos moleculares entre 36 y 62 kDa, cuya expresión aumenta específicamente en condiciones de deficiencia de Fe en raíces de tomate. La expresión de estos polipéptidos no varía en condiciones de deficiencia de P, mientras que el aporte de Fe tras un tiempo en condiciones de deficiencia de Fe produce una disminución de la inducción, lo que les hace sugerir que estos polipéptidos no constituyen una respuesta general a una deficiencia nutricional, como es el caso de la mayoría de los polipéptidos identificados hasta la fecha. De entre los polipéptidos que aumentan su expresión, el denominado polipéptido 11 con una M_r de 41 y pI de 5,8 podría corresponder al PR11 (5,9 y 42,9 kDa) o al identificado como FDH (5,7 y 42,7 kDa). Schmidt y Buckhout (1997) tampoco encuentran ningún polipéptido cuya expresión disminuya en condiciones de deficiencia de Fe.

Los geles correspondientes a puntas de raíz de plantas deficientes tras un aporte de Fe no han mostrado un descenso significativo en la expresión de los polipéptidos pasadas 24 h. Al mismo tiempo, la expresión de algunos polipéptidos permanece todavía a los mismos niveles que cuando las plantas están en condiciones de deficiencia. Sin embargo, se sabe que a las 24 h del aporte de Fe las plantas de remolacha suprimen la inducción de la reductasa férrica y la excreción de protones, aunque las flavinas permanecen acumuladas en las puntas de raíz. A las 96 h del aporte de Fe se observa que algunos polipéptidos recuperan los niveles de expresión propios de las plantas control. Tanto la FDH como la PEPC mantienen, tras 96 h del aporte de Fe, los niveles de inducción de las condiciones de deficiencia. Schmidt y Buckhout (1997) comprobaron que 48 h después del aporte de Fe, los ARN_m de los siete polipéptidos cuya expresión aumentaba en raíces de plantas de tomate en deficiencia, recuperaban los niveles de expresión de plantas control.

5.9.- Variación del patrón polipeptídico de la membrana plasmática de hoja

Una de las características más importantes de las plantas es su capacidad de adaptación a distintos factores medioambientales mediante mecanismos de respuesta específicos. Esta capacidad de respuesta implica la existencia de cambios en la composición membrana plasmática (Masson y Rossignol, 1995). Así, se ha señalado que la expresión de algunos polipéptidos de la membrana plasmática aumenta o disminuye en condiciones de estrés salino (Hurkman *et al.*, 1988), deficiencia de S o P (Hawkesford y Belcher, 1991), exposición al Al (Ownby y Hruschka, 1991) y adaptación al frío (Uemara y Yoshida, 1984). En este trabajo

hemos visto que los patrones polipeptídicos de membrana plasmática de hojas de remolacha control y deficientes en Fe muestran sólo ligeras diferencias.

Los cambios más significativos en el patrón polipeptídico de membrana plasmática aislada de hojas control y deficientes en Fe se producen en la zona entre 30 y 40 kDa, dónde se produce tanto un aumento en la expresión como la aparición de nuevos polipéptidos en deficiencia. La expresión de estos polipéptidos disminuye en las membranas aisladas de hojas con una clorosis severa. Sin embargo, hay que considerar que los geles de dos dimensiones obtenidos no son totalmente representativos de la membrana plasmática *in vivo*. Las membranas plasmáticas aisladas por separación en doble fase están constituidas mayoritariamente por proteínas intrínsecas (Masson y Rossignol, 1995). Así se ha estimado que la membrana plasmática podría estar formada por unos 500 polipéptidos siendo el número de polipéptidos encontrados en este trabajo entre 125-175.

En primer lugar resulta interesante comprobar si los polipéptidos cuya expresión varía podrían relacionarse con los enzimas redox descritos hasta ahora en la membrana plasmática. De todos ellos, el más importante para este trabajo es la reductasa férrica (enzima FC-R), aunque la caracterización molecular del enzima se ha realizado preferentemente a partir de membrana plasmática de raíces. Se han identificado tres isoformas con actividad reductasa y un pI entre 5,5 y 6,2 en membrana plasmática de raíz de tomate (Holden *et al.*, 1991; 1992). Se ha identificado también un polipéptido de 34 kDa que puede tener capacidad de reducir quelatos de Fe (Holden, 1994). Bagnaresi y Pupillo (1995) también señalan la existencia de un polipéptido de 46 kDa en membrana plasmática de raíz de maíz con capacidad de reducir Fe(III)-citrato. Estos datos coinciden con los polipéptidos de la zona 3, que es la que presenta una mayor variación en condiciones de deficiencia de Fe. Dichos polipéptidos presentan valores de M_R entre 36,0 y 40,7 kDa y de pI entre 5,4 y 5,8. En un estudio mediante electroforesis de dos dimensiones con membrana plasmática de raíz de remolacha se describen cuatro polipéptidos que coinciden con los descritos en la denominada zona 3 (Susín, 1994). Estos polipéptidos aparecen en la membrana plasmática de raíz en condiciones de deficiencia de Fe y presentan unos valores de M_R y pI de 36,2 y 5,6; 38,6 y 5,6; 39,2 y 5,8; y 40,7 y 5,8. Es factible pensar, por lo tanto, que los polipéptidos de la denominada zona 3 corresponden a subunidades de la reductasa férrica de membrana plasmática.

Recientemente se han identificado, en membrana plasmática de remolacha, dos homólogos de las proteínas MIP (de "Major Intrinsic Protein") de plantas con

M_r de 31 y 27 kDa (Qi *et al.*, 1995). Se trata de polipéptidos muy hidrófobos y con tendencia a formar agregados unidos por puente disulfuro. Esta familia de proteínas, denominadas genéricamente aquaporinas, está formada por proteínas integrales de membrana altamente hidrófobas cuya función es la de actuar como canales para el agua y pequeños iones, con un peso molecular entre 25 y 30 kDa.

Frommer *et al.* (1994) comparó la expresión de proteínas de membrana plasmática de hojas de remolacha, diferenciando entre hojas fuente (hojas viejas) y hojas sumidero (hojas jóvenes). En este estudio se encontró que las mayores diferencias se producían en un grupo de polipéptidos situados en un punto isoeléctrico ácido y con M_r entre 31 y 34 kDa. El grupo estaba formado por dos polipéptidos mayoritarios y al menos otros seis polipéptidos más. Estos autores sugieren que estos polipéptidos podrían corresponder a transportadores de membrana.

5.10.- Inducción de la actividad FC-R en frutales en deficiencia de Fe

Los experimentos de inducción de la actividad FC-R en frutales en condiciones de deficiencia de Fe presentados en esta memoria constituyeron el inicio de una línea de trabajo dentro del grupo que está siendo desarrollada actualmente (Gogorcena *et al.*, 1998).

Según los datos aportados en este trabajo y los obtenidos por Gogorcena *et al.* (1998) se deduce que la característica más importante de la actividad FC-R de raíces de frutales es que para que la reducción tenga lugar es necesaria la presencia de una cantidad mínima de Fe en la solución nutritiva. Así, los valores de actividad reductasa para las plantas con 30 μM son de aproximadamente dos veces los obtenidos para las plantas con 1 μM de Fe. Sin embargo, la inducción de la reductasa tanto para las plantas con 30 como con 1 μM de Fe, sólo se produce tras un aporte de Fe a la solución nutritiva. Esta característica difiere por completo del comportamiento encontrado en remolacha (Susín *et al.*, 1996) aunque coincide con el descrito para tomate (Zouari, 1996). Otros estudios han señalado también que cuando se aportan pequeñas cantidades de Fe a plantas en condiciones de deficiencia se produce un aumento de la actividad FC-R en las raíces (Chaney *et al.*, 1972; Grusak *et al.*, 1990; Romera *et al.*, 1992b).

Aunque no se puede descartar la teoría de que cuando las plantas crecen con algo de Fe en la solución nutritiva son más fuertes y sanas (Grusak *et al.*, 1990), parece mucho más acertada la hipótesis de que el Fe sería necesario para alguno

de los enzimas o transportadores de electrones que participan en la actividad FC-R. Por ejemplo, se ha sugerido la implicación del etileno en la regulación de la actividad de la reductasa férrica. Así, la adición de inhibidores de la síntesis de etileno disminuye drásticamente la actividad FC-R en plantas deficientes, mientras que la adición de promotores del etileno induce la actividad FC-R en plantas control (Romera y Alcántara, 1993; 1994; Romera *et al.*, 1996a, b). La relación entre el etileno y el Fe se basaría en que en uno de los pasos de su síntesis interviene la ACC oxidasa, dependiente de Fe(II) para su activación. La presencia de Co(II), inhibidor de la ACC oxidasa, produce también la disminución de la actividad FC-R (Romera *et al.*, 1996a, b). Recientemente se ha encontrado que tanto los activadores como inhibidores del etileno afectan de distinta forma la actividad FC-R y la reducción de ferricianuro en plantas control y deficientes en Fe (Romera *et al.*, 1998).

La necesidad de la presencia de Fe se puede deber a otras causas. Bagnaresi y Pupillo (1997) señalaron la similitud entre la reductasa férrica aislada de la membrana plasmática de raíces de maíz y tomate con el citocromo b_5 . La posibilidad de que la reductasa férrica de la membrana plasmática contenga un citocromo justificaría también la necesidad del Fe para la inducción de la actividad FC-R ya que éstos se caracterizan por tener un grupo hemo Fe-porfirina. Así pues, sería necesaria la presencia de una cantidad mínima de Fe para que hubiera actividad.

Estos resultados ponen de manifiesto que para estudiar la capacidad de reducción de Fe por las raíces de los frutales sería necesario establecer la cantidad adecuada de Fe para que se produzcan las respuestas. Posiblemente esta cantidad podría depender de cada variedad.

CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

1.- La membrana plasmática de hoja de remolacha muestra una actividad FC-R dependiente de NADH, con características bioquímicas similares al enzima presente en la membrana plasmática de raíz. Estas características son similares para preparaciones de membrana plasmática controles y deficientes en Fe. El pH óptimo es aproximadamente 6,8, tanto en condiciones de anaerobiosis como en presencia de oxígeno.

2.- El Fe(III)-malato es buen sustrato para la actividad FC-R, con un valor de K_m (relación Fe : malato 1 : 25) de 6-8 μM . Los valores de K_m para Fe(III)-citrato (relación 1 : 5) y Fe(III)-EDTA fueron de 140-141 y 103-122 μM respectivamente.

3.- La actividad FC-R para el Fe : citrato presenta el máximo para una relación 1 : 5. Para Fe : malato la actividad es máxima a partir de una relación 1 : 15.

4.- En condiciones de deficiencia de Fe la actividad FC-R, utilizando como base de cálculo la cantidad de proteína, aumenta 1,3 veces para Fe(III)-citrato y 1,5 veces para Fe(III)-EDTA y Fe(III)-malato.

5.- Los sustratos más probables para la FC-R parecen ser las especies químicas $[\text{FeCitOH}]^{-1}$ y $[\text{FeMalOH}]^0$.

6.- El enzima FC-R no parece tener como cofactor específico a las flavinas riboflavina, FAD o FMN, aunque estas flavinas producen un aumento en su actividad.

7.- Los protoplastos de hoja de remolacha poseen actividad FC-R localizada en su superficie externa, con un pH óptimo de 5,5-6,0. Los cloroplastos aislados de hojas controles tienen también actividad FC-R, con un máximo a pH 7,5.

8.- La actividad FC-R de protoplastos de hoja de remolacha control y deficiente en Fe presentan valores de K_m de 153 y 239 μM respectivamente.

9.- La capacidad de reducir Fe en los protoplastos disminuye aproximadamente en un 70% con la deficiencia de Fe en función del área de protoplasto. En función de la clorofila la capacidad de reducir Fe en los protoplastos aumenta 1,5 veces con la deficiencia de Fe.

10.- La deficiencia de Fe produce un aumento en la cantidad relativa de proteínas en las puntas de raíz de plantas de remolacha, detectándose 6 polipéptidos que aparecen *de novo* y 13 cuya intensidad varía significativamente. El aporte de Fe en plantas en condiciones de deficiencia no produce la supresión de ninguno de los polipéptidos anteriores.

11.- La deficiencia de Fe induce un aumento de la cantidad de PEPC y FDH y un aumento de la actividad de esta última en puntas de raíz.

12.- La deficiencia de Fe produce cambios en polipéptidos de la membrana plasmática aislada de hoja con M_r entre 36,0 y 40,7 kDa y con pI entre 5,4 y 5,8.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

Abadía A., Sanz M., de las Rivas J. y Abadía J. (1989) *Photosynthetic pigments and mineral composition of iron deficient pear leaves*. J. Plant Nutr. 12: 827-838.

Abadía J. (1992) *Leaf responses to Fe deficiency: a review*. J. Plant Nutr. 15: 1699-1713.

Abadía J. y Abadía A. (1993) *Iron and plant pigments*. En: Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms. L.L. Barton y B. Hemming (eds.) Academic Press. New York. pp 327-343.

Abadía J., Nishio J.N., Monge E., Montañés L. y Heras L. (1985) *Mineral composition of peach tree leaves affected by iron chlorosis*. J. Plant Nutr. 8: 697-708.

Abbott A.J. (1967) *Physiological effects on micronutrient deficiencies in isolated roots of Lycopersicon esculentum*. New Phytologist 66: 419-437.

Ageorges A., Morel M.H. y Grouzis J.P. (1996) *High resolution 2-D electrophoresis of polypeptides of maize root plasma membrane: identification of polypeptides whose expression is regulated by nitrate*. Plant Physiol. Biochem. 34: 863-870.

Albertsson P.-Å. (1971) *Partition of cell particles and macromolecules*. Wiley (eds.) New York.

Alcántara E., de la Guardia M.D. y Romera F.J. (1991) *Plasmalemma redox activity and H⁺ extrusion in roots of Fe-deficient cucumber plants*. Plant Physiol. 96: 1034-1037.

Alcántara E., Romera F.J., Canete M. y de la Guardia M.D. (1994) *Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe(III) reductase in Fe-deficient cucumber (Cucumis sativus L.) plants.* J. Exp. Bot. 45: 1893-1898.

Alhendawi R.A., Römheld V., Kirkby E.A. y Marschner H. (1998) *Influence of increasing bicarbonate concentrations on plant growth, organic acid accumulation in roots and iron uptake by barley, sorghum, and maize.* J. Plant Nutr. 20: 1731-1753.

Allison J.D., Brown D.S. y Novo-Gradak K.J. (1991) *A geochemical assessment model for environmental systems v. 3.0.* Washintong D. C., Environmental Research Laboratory. United States Environmental Protection Agency.

Allnut F.C.T. y Bonner W.D. (1987) *Evaluation of reductive release as a mechanism for iron uptake from ferrioxamine B by Chlorella vulgaris.* Plant Physiol. 8: 629-644.

Ao T.Y., Fan F., Korcak R.F. y Faust M. (1985) *Iron reduction by apple roots.* J. Plant Nutr. 8: 629-644.

Armstrong J., Brown R.S. y Tsugita A. (1983) *Primary structure and genetic organization of phage T4 DNA ligase.* Nucleic. Acids Res. 11: 7145-7156.

Arnon D.I. y Stout P.R. (1939) *The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper.* Plant Physiol. 14: 371-375.

Arulanathan A.R., Rao I.M. y Terry N. (1990) *Limiting factors in photosynthesis. IV. Regeneration of ribulose 1,5-bisphosphate limits photosynthesis at low photochemical capacity.* Plant Physiol. 93: 1466-1475.

Asard H. y Bérczi A. (1998) *Comparison of the redox activities in plasma membranes from roots and shoots of etiolated bean seedlings.* Protoplasma. En prensa.

Asard H., Horemans N., Mertens J. y Caubergs R. (1994) *The plant plasma membrane b-type cytochrome: an overview.* Belg. J. Bot. 127: 171-183.

Askerlund P., Larsson C. y Widell S. (1988) *Localization of donor and acceptor sites of NADH dehydrogenase activities using inside-out and right-side-out plasma membranese vesicles from plants.* FEBS letters 239: 23-28.

Askerlund P. y Larsson P. (1991) *Transmembrane electron transport in plasma membrane vesicles loaded with an NADH-generating system or ascorbate.* Plant Physiol. 96: 1178-1184.

Askerlund P., Laurent P., Nakagawa H. y Kader J.C. (1991) *NAD(P)H-Ferricyanide reductase of leaf plasma membranes.* Plant Physiol. 95: 6-13.

Askwith C., Eide D., Van Ho A., Bernard P.S., Li S., Davis-Kaplan S., Sipe D.M. y Kaplan J. (1994) *The FET3 gene of S. cerevisiae encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake.* Cell 76: 403-410.

Award F., Römheld V. y Marschner H. (1988) *Mobilization of ferric iron chlorosis in calcareous soil by plant-borne chelators (phytosiderophores).* J. Plant Nutr. 11: 701-713.

Bagnaresi P., Basso B. y Pupillo P. (1997) *The NADH-dependent Fe³⁺-chelate reductases of tomato roots*. *Planta* 202: 427-434.

Bagnaresi P. y Pupillo P. (1995) *Characterization of NADH-dependant Fe³⁺-chelate reductases of maize roots*. *J. Exp. Bot.* 46: 1497-1503.

Bakrim N., Prioul J.L., Deleens E., Rocher J.P. y Arrio-Dupont M. (1993) *Regulatory phosphorylation of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase: a cardinal event influencing the photosynthesis rate in sorghum and maize*. *Plant Physiol.* 101: 891-897.

Barak P. y Chen Y. (1984) *The effect of potassium on iron chlorosis in calcareous soils*. *J. Plant Nutr.* 7: 125-133.

Barr R., Sandelius A.S., Crane F.L. y Morré D.J. (1986) *Redox reactions of tonoplast and plasma membranes isolated from soybean hypocotyls by free-flow electrophoresis*. *Biochem. Biophys. Acta* 852: 254-261.

Bassi R., Rigoni F. y Giacometti G.M. (1990) *Chlorophyll binding proteins with antenna function in higher plants and green algae*. *Photochem. Photobiol.* 52: 1187-1206.

Basso B., Bagnaresi P., Bracale M. y Soave C. (1994) *The yellow stripe-1 and -3 mutants of maize: nutritional and biochemical studies*. *Maydica* 39: 97-105.

Belkhodja R., Morales F., Sanz M., Abadía A. y Abadía J. (1998a) *Iron deficiency in peach trees: effects on leaf chlorophyll and nutrient concentrations in flowers and leaves*. *Plant Soil* 203: 257-268.

Belkhodja R., Morales F., Quílez R., López-Millán A.F., Abadía A. y Abadía J. (1998b) *Iron deficiency causes changes in chlorophyll fluorescence due to the reduction in the dark of the photosystem II acceptor side photosynth.* *Res.* 56: 265-276.

Bell P.F., Chaney R.L. y Angle J.S. (1988) *Staining localization of ferric reduction on roots*. *J. Plant Nutr.* 11: 1237-1252.

Benes I., Schreiber K., Ripperger H. y Kircheiss A. (1983) *Metal complex formation by nicotianamine, a possible phytosiderophore*. *Experientia* 39: 261-262.

Bérczi A. y Asard H. (1995) *NAD(P)H-utilizing oxidoreductases of the plasma membrane*. *Protoplasma* 184: 140-144.

Bérczi A., Fredlund K.M. y Møller I.M. (1995) *Purification and characterization of an NADH-hexacyanoferrate(III) oxidoreductase from spinach leaf plasma membrane*. *Arch. Biochem. Biophys.* 320: 65-72.

Bérczi A. y Møller I.M. (1998) *NADH-monodehydroascorbate oxidoreductase is one of the redox enzymes in spinach leaf plasma membranes*. *Plant Physiol.* 116: 1029-1036.

Bérczi A., van Gestelen P. y Pupillo P. (1998) *NAD(P)H-utilizing flavo-enzymes in the plant plasma membrane*. En: *Plasma Membrane Redox Systems and their Role in Biological Stress and Disease*. H. Asard, A. Bérczi y R.J. Caubergs (eds.) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp 33-67.

- Bialczyk J. y Lecowski Z. (1995) *Chemical composition of xylem sap of tomato grown on bicarbonate containing medium*. J. Plant Nutr. 18: 2005-2021.
- Bienfait H.F. (1996) *Is there a metabolic link between H⁺ excretion and ferric reduction by roots of Fe-deficient plants - A viewpoint*. J. Plant Nutr. 19: 1211-1222.
- Bienfait H.F. (1987) *Biochemical basis of iron efficiency reactions in plants*. En: Iron Transport in Microbes, Plants and Animals. G. Winkelmann, D.v.d. Helm y J.B. Neilands (eds.) VCH Verlagsgesellschaft. Weinheim, F. R. G. pp 339-349.
- Bienfait H.F. (1988a) *Mechanisms in Fe-efficiency reactions of higher plants*. J. Plant Nutr. 11: 605-629.
- Bienfait H.F. (1988b) *Proteins under the control of the gene for Fe efficiency in tomato*. Plant Physiol. 88: 785-787.
- Bienfait H.F. (1989) *Prevention of stress in iron metabolism of plants*. Acta Botanica Neerlandica 38: 105-129.
- Bienfait H.F., Bino R.J., van der Bliet A.M., Duivenvoorden J.F. y Fontaine J.M. (1983) *Characterization of ferric reducing activity in roots of Fe-deficient Phaseolus vulgaris*. Physiol. Plant. 59: 196-202.
- Bienfait H.F., de Weger L.A. y Kramer D. (1987) *Control of the development of iron-efficiency reactions in potato as response to iron deficiency is located in the roots*. Plant Physiol. 83: 244-247.
- Bienfait H.F. y Scheffers M.R. (1992) *Some properties of ferric citrate relevant to the iron nutrition of plants*. Plant Soil 143: 141-144.
- Böttger M. (1989) *Transmembrane electron transfer of NADH loaded right side out vesicles*. En: Plant Membrane Transport: The Current Position. J. Dainty, M.I. de Michaelis, E. Marrè y F. Rasi-Calogno (eds.) Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. pp 55-60.
- Boutry M. y Briquet M. (1982) *Mitochondrial modifications associated with the cytoplasmic male sterility in faba beans*. Eur. J. Biochem. 127: 129-135.
- Brain R.D., Freeburg J.A., Weiss C.V. y Briggs W.R. (1977) *Blue light-induced absorbance changes in membrane fractions from corn and Neurospora*. Plant Physiol. 59: 948-952.
- Brancadoro L., Rabotti G., Scienza A. y Zocchi G. (1995) *Mechanisms of Fe-efficiency in roots of Vitis Spp in response to iron deficiency stress*. Plant Soil 171: 229-234.
- Briat J.F. (1996) *Roles of ferritin in plants*. J. Plant Nutr. 19: 1331-1342.
- Briat J.F. y Lobréaux S. (1997) *Iron transport and storage in plants*. Trends in Plant Science 2: 187-193.
- Brightman A.O., Barr R., Crane F.L. y Morrè D.J. (1988) *Auxin-stimulated NADH oxidase purified from plasma membrane of soybean*. Plant Physiol. 86: 1264-1269.

Briskin D.P. (1990) *The plasma membrane H⁺-ATPase of higher plant cells: biochemistry and transport function*. Biochem. Biophys. Acta 1019: 95-109.

Brown J.C. (1966) *Fe and Ca uptake as related to root-sap and stem-exudate citrate in soybeans*. Physiol. Plant. 19: 968-976.

Brown J.C. (1978) *Mechanism of iron uptake by plants*. Plant Cell Environ. 1: 249-257.

Brown J.C. y Ambler J.E. (1973) *"Reductants" released by roots of Fe-deficient soybeans*. Agron. J. 65: 311-314.

Brown J.C., Chaney R.L. y Ambler J.E. (1971) *A new tomato mutant inefficient in the transport of iron*. Physiol. Plant. 25: 48-53.

Brüggemann W., Maas-Kantel K. y Moog P.R. (1993) *Iron uptake by leaf mesophyll cells: The role of the plasma membrane-bound ferric-chelate reductase*. Planta 190: 151-155.

Brüggemann W. y Moog P.R. (1989) *NADH-dependent Fe³⁺-EDTA and oxygen reduction by plasma membrane vesicles from barley roots*. Physiol. Plant. 75: 245-254.

Brüggemann W., Nakagawa H., Janiesh P. y Kuiper P.J.C. (1990) *Plasma membrane-bound NADH Fe³⁺-EDTA reductase and iron deficiency in tomato (Lycopersicon esculentum): is there a Turbo reductase?* Physiol. Plant. 79: 339-346.

Buckhout T.J., Bell P.F., Luster D.G. y Chaney R.L. (1989) *Iron-stress induced redox activity in tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) is localized on the plasma membrane*. Plant Physiol. 90: 151-156.

Bughio N., Takahashi M., Yoshimura E., Nishizawa N.K. y Mori S. (1997a) *Light-dependent iron transporter into isolated barley chloroplasts*. Plant Cell Physiol. 38: 101-105.

Bughio N., Takahashi M., Yoshimura E., Nishizawa N.K. y Mori S. (1997b) *Characteristics of light regulated iron transport system in barley chloroplasts*. Soil Sci. Plant Nutr. 43: 959-963.

Byrne D.H. (1988) *Comparative growth of the peach seedling rootstocks under alkaline soil condition*. J. Plant Nutr. 11: 1663-1669.

Cakmak I., Van de Wetering D.A.M., Marschner H. y Bienfait H.F. (1987) *Involvement of superoxide radical in extracellular ferric reduction by iron-deficient bean roots*. Plant Physiol. 85: 310-314.

Campbell W.H. y Redinbaugh M.G. (1984) *Ferric-citrate reductase activity of nitrate reductase and its role in iron assimilation by plants*. J. Plant Nutr. 7: 799-806.

Canut H., Brightman A., Boudet A.M. y Morré D.J. (1988) *Plasma membrane vesicles of opposite sidedness from soybean hypocotyls by preparative free-flow electrophoresis*. Plant Physiol. 86: 631-637.

Cataldo D.A., McFadden K.M., Garland T.R. y Wildung R.E. (1988) *Organic constituents and complexation of nickel (II), iron (III), cadmium (II), and plutonium (IV) in soybean xylem exudates*. Plant Physiol. 50: 208-213.

Clark R.B. (1983) *Plant genotype differences in the uptake, translocation, acumulation and use of mineral elements required for plant growth*. Plant Soil 72: 175-196.

Cohen C.K., Norwell W.A. y Kochian L.V. (1997) *Induction of the root cell plasma membrane ferric reductase. An exclusive role for Fe and Cu*. Plant Physiol. 114: 1061-1069.

Colas des Francs-Small C., Ambard-Bretteville F., Darvas A., Salantin M., Huet J.C., Pernollet J.C. y Rémy R. (1992) *Variation of the polypeptide composition of mitochondria isolated from different potato tissues*. Plant Physiol. 98: 273-278.

Colas des Francs-Small C., Ambard-Bretteville F., Small I.D. y Rémy R. (1993) *Identification of a major soluble protein mitochondria from non photosynthetic tissues as NAD-dependent formate dehydrogenase*. Plant Physiol. 102: 1171-1177.

Córdoba M.C., Serrano A., Córdoba F., González-Reyes J.A., Navas P. y Villalba J.M. (1995) *Topography of the 27- and 31-kDa electron transport proteins in the onion root plasma membrane*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 216: 1054-1059.

Cramer M.D., Lewis O.A.M. y Lips S.H. (1993) *Inorganic carbon fixation and metabolism in maize roots as affected by nitrate and ammonium*. Physiol. Plant. 89: 632-639.

Crowley D.E., Reid C.P.P. y Szanislo P.J. (1987) *Microbial siderophores as iron sources in plants*. En: Iron Transport in Microbes, Plants and Animals. G. Winkelmann, D. van der Helm y J.B. Neilands (eds.) VHC Verlagsgesellschaft. Weinheim. Germany. pp 375-385.

Chaney R.L. (1984) *Diagnostic practices to identify iron deficiency in higher plants*. J. Plant Nutr. 7: 47-67.

Chaney R.L. (1988) *Plants can utilize iron from Fe-N, N'-di-(2-hydroxybenzoyl)-ethylendiamine-N, N'-diacetic acid, a ferric chelate with 10⁶ greater formation constant than Fe-EDDHA*. J. Plant Nutr. 11: 1.033-1.050.

Chaney R.L. (1989) *Translocation of iron roots to shoot*. En Actas del Fifth International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants. Jerusalem, Israel.

Chaney R.L., Brown J.C. y Tiffin L.O. (1972) *Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans*. Plant Physiol. 50: 208-213.

Chaney R.L., Coulombe B.A. y Lloyd C.A. (1984) *Bicarbonate induces Fe-chlorosis with normal plant phosphorous levels*. Agron. Abstr. 1984: 201.

Chaney R.L., Chen Y., Green C.E., Holden M.J., Bell P.F., Luster D.G. y Angle J.S. (1992) *Root hairs on chlorotic tomatoes are an effect of chlorosis rather than part of the adaptative Fe-stress response*. J. Plant Nutr. 15: 1857-1875.

- Chen J. y Wang X.C. (1995) *Existence and characteristics of nitrate reductase in plasma membrane of maize roots*. Sci. China Ser. B - Chem. Life Sci. and Earth 38: 564-572.
- Dannel F., Pfeffer H. y Marschner H. (1995) *Isolation of apoplasmic fluid from sunflower leaves and its use for studies of influence of nitrogen supply on apoplasmic pH*. J. Plant Physiol. 146: 273-278.
- Davies D.D. (1973) *Control of and by pH*. Symp. Soc. Exp. Biol. 27: 513-529.
- Davies D.D. (1986) *The fine control of cytosolic pH*. Physiol. Plant. 67: 702-706.
- de la Guardia M.D. y Alcántara E. (1996) *Ferric chelate reduction by sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves: influence of light, oxygen, iron-deficiency and leaf age*. J. Exp. Bot. 47: 669-675.
- de las Rivas J., Abadía A. y Abadía J. (1989) *A new reversed phase-HPLC method resolving all major higher plant photosynthetic pigments*. Plant Physiol. 91: 190-192.
- de Vos C.R., Lubberding H.J. y Bienfait H.F. (1986) *Rhizosphere acidification as a response to iron deficiency in bean plants*. Plant Physiol. 81: 842-846.
- Deiana S., Gessa C., Marchetti M. y Ussai M. (1995) *Phenolic and redox properties pH influence on iron (III) reduction by caffeic acid*. Soil Sci. Soc. Amer. J. 59: 1301-1307.
- Delhaize E., Ryan P.R. y Randall P.J. (1993) *Aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Aluminium-stimulated excretion of malic acid from root apices*. Plant Physiol. 103: 695-702.
- Deroche M.E. y Carrayol E. (1988) *Nodule phosphoenolpyruvate carboxylase : a review*. Physiol. Plant. 74: 775-782.
- Diez-Altarés M.C. (1959) *Fotodescomposición de clorofila en casos de deficiencia de Fe*. An. Estac. Exp. Aula Dei (Zaragoza) 6: 1-80.
- Dilley D.R., Kuai J., Poneleit L., Zhu Y., Pekker Y., Wilson I.D., Burmeister D.M., Gan C. y Bowers A. (1993) *Purification and characterization of ACC oxidase and its expression during ripening in apple fruit*. En: Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene. J.C. Peach et al. (eds.) Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp 46-52.
- Dinkelaker B., Römheld V. y Marschner H. (1989) *Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.)*. Plant Cell Environ. 12: 285-292.
- Dix D.R., Bridgham J.T., Broderius M.A., Byersdorfer C.A. y Eide D.J. (1994) *The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae**. J. Biol. Chem. 269: 26092-26099.
- Dixon M.W., Jacobson J.A., Cady C.T. y Muday G.K. (1996) *Cytoplasmatic orientation of the naphthylphthalamic acid-binding protein in zucchini plasma membrane vesicles*. Plant Physiol. 112: 421-432.

Döring O., Lühje S. y Böttger M. (1992) *Modification of the activity of the plasma membrane redox system of Zea mays L. roots by vitamin K₃ and dicumerol.* J. Exp. Bot. 43: 175-181.

Douglas T.J. y Walker R.R. (1984) *Phospholipids, free sterols and adenosine triphosphatase of plasma membrane-enriched preparations from roots of citrus genotypes differing in chloride exclusion ability.* Physiol. Plant. 62: 51-58.

Drew M.C. (1997) *Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia.* Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 223-250.

Eckerskorn C. y Lottspeich F. (1993) *Structural characterization of blotting membranes and the influence of membrane parameters for electroblotting and subsequent amino acid sequence analysis of proteins.* Plant Soil 165: 173-179.

Eide D., Brodenius M., Fett J. y Guerinot M.L. (1996) *A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 5624-5628.

Fodor F., Böddi B., Sárvári E., Záray G., Cseh E. y Láng F. (1995) *Correlation of iron content, spectral forms of chlorophyll and chlorophyll-proteins in iron deficient cucumber (Cucumis sativus).* Physiol. Plant. 93: 750-756.

Fox T.C. y Guerinot M.L. (1998) *Molecular biology of cation transport in plants.* Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 669-676.

Frommer W.B., Hummel S., Lemoine R. y Delrot S. (1994) *Development changes in the two-dimensional protein pattern of plasma membrane vesicles between sink and source leaves from sugar beet.* Plant Physiol. Biochem. 32: 205-209.

Gaisser S., Boehm G.A., Doumith M., Raynal M.C., Dhillon N., Cortes J. y Leadlay P.F. (1999) *Mol. Gen. Genet.* En prensa.

Gerke J., Roemer W. y Jungk A. (1994) *Excretion of citric and malic acid by proteid roots of Lupinus albus L. Effect on soil solution concentrations of phosphate, iron and aluminium in the proteid rhizosphere in samples of oxisol and a luvisol.* Z. Pflanzenernähr. Bodenkd. 157: 289-294.

Gianni J.L. y Briskin D.P. (1988) *Pyridine nucleotide oxidation by a plasma membrane fraction from red beet (Beta vulgaris L.) storage tissue.* Arch. Biochem. Biophys. 260: 653-660.

Gogorcena Y., Abadía J. y Abadía A. (1998) *Inducción in vivo de la reductasa de patrones frutales de Prunus persica L.* En Actas del VII Simposio Nacional-III Ibérico sobre Nutrición Mineral de las Plantas. Madrid. pp 27-32.

Granier F. (1988) *Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis.* Electrophoresis 9: 712-718.

Grünewald S. (1996) *Eisenchelatreduktion durch Mesophyllzellen.* Diploma Tesis. Heinrich-Heini-Universität Düsseldorf.

Grusak M.A. (1995) *Whole-root iron(III)-reductase activity throughout the life cycle of iron-grown Pisum sativum L. (Fabaceae): relevance to the iron nutrition of developing seeds.* *Planta* 197: 111-117.

Grusak M.A. y Pezeshgi S. (1996) *Shoot-to-root signal transmission regulates root Fe(III) reductase activity in the *dgl* mutant of pea.* *Plant Physiol.* 110: 329-334.

Grusak M.A., Welch R.M. y Kochian L.V. (1990) *Physiological characterization of a single-gene mutant of Pisum sativum exhibiting excess iron accumulation. I Root iron reduction and iron uptake.* *Plant Physiol.* 93: 976-981.

Guerinot M.L. y Yi Y. (1994) *Iron: nutritious, noxious, and not readily available.* *Plant Physiol.* 104: 815-820.

Harley C.P. y Linder R.C. (1945) *Observed responses of apple and pear trees to some irrigation waters of north central Washington.* *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 46: 35-44.

Hawkesford M.J. y Belcher A.R. (1991) *Differential protein synthesis in response to sulphate and phosphate deprivation: identification of possible components of plasma membrane transport systems in cultured tomato roots.* *Planta* 185: 323-329.

Herbik A., Giritch A., Horstmann C., Becker R., Balzer H.J., Bäumlein H. y Stephan U.W. (1996) *Iron and copper nutrition-dependent changes in protein expression in a tomato wild type and the nicotianamine-free mutant *chloronerva*.* *Plant Physiol.* 111: 533-540.

Hernández L.E. y Cooke D.T. (1997) *Modification of the root plasma membrane lipid composition of cadmium-treated Pisum sativum.* *J. Exp. Bot.* 48: 1375-1381.

Hether N.H., Olsen R.A. y Jackson L.L. (1984) *Chemical identification of iron reductants exuded by plant roots.* *J. Plant Nutr.* 7: 667-676.

Heukeshoven J. y Dernick R. (1985) *Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining.* *Electrophoresis* 6: 103-112.

Hider R., C., von Wiren N., Leigh R., Bansal S. y Briat J.F. (1997) *Physicochemical characterisation of Fe-nicotianamine complexes and their physiological implications.* En *Actas del Ninth International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants.* Stuttgart, Germany. pp 70.

Higuchi K., Kanazawa K., Nishizawa N.K., Chino M. y Mori S. (1994) *Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley roots.* *Plant Soil* 165: 173-179.

Hiltbrunner E. y Fluckiger W. (1996) *Manganese deficiency of silver Fir trees (Abies alba) at a reforested site in the Jura Mountains, Switzerland. Aspects of cause and effect.* *Tree Physiol.* 16: 963-975.

Hill J. (1980) *The remobilization of nutrients from leaves.* *J. Plant Nutr.* 2: 407-444.

Hoffland G., Vandenboogaard R., Nelemans J. y Findenegg G. (1992) *Biosynthesis and root exudation of citric and malic acids in phosphate-starved rape plants*. *New Phytologist* 122: 675-680.

Holden M.J., Luster D.G. y Chaney R.J. (1994) *Enzymatic iron reduction at the root plasma membrane: partial purification of the NADH-Fe chelate reductase*. En: *Biochemistry of Metal Micronutrients in the Rhizosphere*. J.A. Manthey, D.E. Crowley y D.G. Luster (eds.) CRC Press. Boca Raton, Florida. pp 285-294.

Holden M.J., Luster D.G., Chaney R.L. y Buckhout T.J. (1992) *Enzymology of ferric chelate reduction at the root plasma membrane*. *J. Plant Nutr.* 15: 1667-1678.

Holden M.J., Luster D.G., Chaney R.L., Buckhout T.J. y Robinson C. (1991) *Fe³⁺-chelate reductase activity of plasma membranes isolated from Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) roots. Comparison of enzymes from Fe-deficient and Fe-sufficient roots*. *Plant Physiol.* 97: 537-544.

Hossain M.W. y Asada K. (1985) *Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine nucleotide enzyme*. *J. Biol. Chem.* 260: 12.920-12.926.

Hourton-Cabassa C., Ambard-Bretteville F., Moreau F., Davy de Virville J., Rémy R. y Colas des Francs-Small C. (1998) *Stress induction of mitochondrial formate dehydrogenase in potato leaves*. *Plant Physiol.* 116: 627-635.

Huang I.J., Welkie G.W. y Miller G.W. (1992) *Ferredoxin and flavodoxin analysis in tobacco in response to iron stress*. *J. Plant Nutr.* 15: 1765-1782.

Huber S.C. y Edwards G.E. (1975) *An evaluation of some parameters required for an enzymatic isolation of cells and protoplasts with CO₂ fixation capacity from C₃ and C₄ grasses*. *Physiol. Plant.* 35: 203-209.

Hurkman W.J., Tanaka C.K. y DuPont F.M. (1988) *The effects of salt stress on polypeptides in membrane fractions from barley roots*. *Plant Physiol.* 88: 1263-1273.

Husted S. y Schjoerring K. (1995) *Apoplastic pH and ammonium concentration in leaves of *Brassica napus* L.* *Plant Physiol.* 109: 1453-1460.

Ibarz E., Palmgren M.G., Palazón J., Pinol M.T. y Serrano R. (1994) *Activation of plant plasma membrane H⁺-ATPase by the non-ionic detergent Brij 58*. *Biochem. Biophys. Acta* 1196: 93-96.

Iljin W.S. (1951) *Metabolism of plants affected with lime induced chlorosis. II Organic acids and carbohydrates*. *Plant Soil* 339-351.

Imsande J. (1998) *Iron, sulfur, and chlorophyll deficiencies: A need for an integrative approach in plant physiology*. *Physiol. Plant.* 103: 139-144.

Iredale J.P., Benyon R.C., Arthur M.J., Ferris W.F., Alcolado R., Winwood P.J., Clark N. y Murphy G. (1996) *Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis*. *Hepatology* 24: 176-184.

Jesaitis A.J., Heners P.R., Hertel R. y Briggs W.R. (1977) *Characterization of a membrane fraction containing a b-type cytochrome*. *Plant Physiol.* 59: 941-947.

Johansson F., Olbe M., Sommarin M. y Larsson C. (1995) *Brij 58, a polyoxyethylene acyl ether, creates membrane vesicles of uniform sidedness: a new tool to obtain inside-out (cytoplasmatic side-out) plasma membrane vesicles.* Plant J. 7: 109-113.

Jolley V.D. y Brown J.C. (1985) *Iron stress response in tomato affected by potassium and renewing nutrient solutions.* J. Plant Nutr. 8: 527-541.

Jolley V.D., Brown J.C., Pushnik J.C. y Miller G.W. (1987) *Influences of ultraviolet(uv)-blue light radiation on the growth of cotton. I. Effect on iron nutrition and iron stress response.* J. Plant Nutr. 10: 333-351.

Jones D.L. y Darrah P.R. (1994) *Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere.* Plant Soil 166: 247-257.

Jones D.L. y Darrah P.R. (1995) *Influx and efflux of organics acids accross the soil-root interface of Zea mays L. and its implications in rhizosphere C flow.* Plant Soil 173: 103-109.

Jungblut P.R. y Seifert R. (1990) *Analysis by high-resolution two-dimensional electrophoresis of differentiation-dependent alteration in cytosolic protein pattern of HL-60 luekemic cells.* J. Biochem. Biophys. Methods 21: 47-58.

Kanawaza K., Higuchi K., Nishizawa N.K., Fushiya S., Chino M. y Mori S. (1994) *Nicotianamine aminotransferase activities correlated to the phytosiderophore secretions under Fe-deficient conditions in Graminae.* J. Exp. Bot. 45: 1903-1906.

Kanay R. y Edwards G.E. (1973) *Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplasts from C₃, C₄ and crassulacean acid metabolism plants using an aqueous dextran-polyethylene glycol two phase system.* Plant Physiol. 52: 484-490.

Kannan S. y Seshadri K. (1988) *Physiology responses associated with Fe-deficiency stress in different plant species.* J. Plant Nutr. 11: 1185-1192.

Kashirad A. y Marschner H. (1974) *Effect of pH and phosphate on iron nutrition of sunflower and corn plants.* Agrochimica 6: 497-508.

Kawai S., Itoh K. y Takagi S. (1993) *Incorporations of ¹⁵N and ¹⁴C of methionine into the mugineic acid family of phytosiderophores in iron-deficient barley roots.* Physiol. Plant. 88: 668-674.

Klobus G. y Buczek J. (1995) *The role of plasma membrane oxidoreductase activity in proton transport.* J. Plant Physiol. 146: 103-107.

Kolesch H., Höfner W. y Schaller K. (1987a) *Effect of bicarbonate and phosphate on iron chlorosis of grape-vines with special regard to the susceptibility of the rootstocks. I. Field experiments.* J. Plant Nutr. 10: 207-230.

Kolesch H., Höfner W. y Schaller K. (1987b) *Effect of bicarbonate and phosphate on iron chlorosis of grape-vines with special regard to the susceptibility of the rootstocks. II. Pot experiments.* J. Plant Nutr. 10: 231-249.



- Kolesch H., Oktay M. y Höfner W. (1984) *Effect of iron chlorosis-inducing factors on the pH of the cytoplasm of sunflower (Helianthus annuus)*. Plant Soil 82: 215-221.
- Kosegarten H., Schwed U., Wilson G. y Mengel K. (1998) *Comparative investigation on the susceptibility of faba bean (Vicia faba L.) and sunflower (Helianthus annuus L.) to iron chlorosis*. J. Plant Nutr. 21: 1.511-1.528.
- Kramer D., Römheld V., Landsberg E.C. y Marschner H. (1980) *Induction of transfer-cell formation by iron deficiency in the root epidermis of Helianthus annuus L.* Planta 147: 335-339.
- Kunze M., Fiedel J., Lange U., Hurwitz R. y Tischner R. (1997) *Evidence for the presence of GPI-anchored PM-NR in leaves of Beta vulgaris and for PM-NR in barley leaves*. Plant Physiol. Biochem. 35: 507-512.
- Laemmli U.K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227: 680-685.
- Lance C. y Rustin P. (1984) *The central role of malate in plant metabolism*. Physiol. Vég. 22: 625-641.
- Landsberg E.C. (1981) *Organic acid synthesis and release of hydrogen ions in response to Fe deficiency stress of mono and dicotyledoneous plant species*. J. Plant Nutr. 3: 579-591.
- Landsberg E.C. (1984) *Regulation of iron-stress-response by whole-plant activity*. J. Plant Nutr. 7: 609-621.
- Landsberg E.C. (1986) *Function of rhizodermal transfer cells in the Fe stress response mechanisms of Capsicum annum L.* Plant Physiol. 82: 511-517.
- Landsberg E.C. (1994) *Transfer cell formation in sugar beet roots induced by latent Fe deficiency*. Plant Soil 165: 197-205.
- Larsson C. (1985) *Plasma membranes*. En: Modern Methods of Plant Analysis. H. Linskens y J. Jackson (eds.) Springer-Verlag. Berlin. pp 85-104.
- Larsson C., Kjellbom P., Widell S. y Lundborg T. (1984) *Sidedness of plant plasma membrane vesicles purified by partitioning in aqueous two-phase systems*. FEBS Letters 171: 271-276.
- Larsson C. y Møller I.M. (1990) *The Plant Plasma Membrane: Structure, Function and Molecular Biology*. C. Larsson y Y. M. Møller (eds.) Springer-Verlag. Berlin, Germany.
- Larsson C., Widell S. y Sommarin S. (1988) *Inside-out plant plasma membrane vesicles of high purity obtained by two-phase partitioning*. FEBS Lett. 229: 289-292.
- Lepiniec L., Vidal J., Chollet R., Gadal P. y Crépin C. (1994) *Phosphoenolpyruvate-carboxylase: structure, regulation, and evolution*. Plant Sci. 99: 111-124.

Lichtenthaler H.K. (1987) *Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes*. Meth. Enzymol. 148: 350-382.

Lin C.H. y Stocking C.R. (1978) *Influence of leaf age, light, dark and iron deficiency on polyribosome level in maize leaves*. Plant Cell Physiol. 19: 461-470.

Lindsay W.L. (1972) *Inorganic phase equilibria of micronutrients in soils*. En Micronutrients in Agriculture. Soil Sci. Soc. Am., Madison, USA. pp 41-59.

Lindsay W.L. (1974) *Role of chelation in micronutrient availability*. En: The Plant Root and its Environment. University Press of Virginia. pp 507-524.

Lindsay W.L. y Schwab A.P. (1982) *The chemistry of iron soils and its availability to plants*. J. Plant Nutr. 5: 821-840.

Loeppert R.H. (1986) *Reactions of iron and carbonates in calcareous soils*. J. Plant Nutr. 9: 195-215.

Loeppert R.H. y Clarke E.T. (1984) *Reactions of Fe(II) and Fe(III) in calcareous soils*. J. Plant Nutr. 7: 149-163.

Loeppert R.H. y Hallmark C.T. (1985) *Indigenous soil properties influencing the availability of iron in calcareous soils*. Soil Sci. Soc. Am. J. 49: 597-603.

Lohaus G., Winter H., Riens B. y Heldt H.W. (1995) *Further studies of the phloem loading process in leaves of barley and spinach. The comparison of metabolite concentrations in the apoplastic compartment with those in the cytosolic compartment and in sieve tubes*. Bot. Acta 108: 270-275.

Longnecker N. y Welch R. (1986) *The relationship among iron-stress response, iron-efficiency and iron uptake of plants*. J. Plant Nutr. 9: 715-727.

López-Millán A.F., Abadía A. y Abadía J. (1997) *Organic acid concentrations in the apoplast of iron-sufficient and iron deficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.)*. En Actas del Ninth International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants. Stüttgat, Germany. pp 44.

López-Millán A.F., Morales F., Abadía A. y Abadía J. (1998) *Implicaciones metabólicas en la respuesta bioquímica a la deficiencia de Fe en remolacha (*Beta vulgaris* L.)*. En Actas del VII simposio Nacional III Ibérico sobre Nutrición Mineral de las Plantas. Madrid, Spain. pp 143-148.

Loué A. (1986) *Los Microelementos en Agricultura*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Lewis-Farr A. y Randall R.J. (1951) *Protein measurement with the folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Lundegardh H. (1945) *Absorption, transport and exudation of inorganic ions by the roots*. Arkiv. Bot. 32A: 1-139.

Lurie S., Ronen R., Lipsker Z. y Aloni B. (1994) *Effects of paclobutrazol and chilling temperatures on lipids, antioxidants and ATPase activity of plasma membrane isolated from green bell pepper fruits*. Physiol. Plant. 91: 593-598.

- Luster D.G. y Buckhout T.J. (1989) *Purification and identification of a plasma membrane associated electron transport protein from maize (Zea mays L.) roots*. *Plant Physiol.* 91: 1014-1019.
- Lüthje S., Döring O. y Böttger M. (1992) *The effects of vitamin K₃ and dicumerol on the plasma membrane redox system and H⁺ pumping activity of Zea mays L. roots measured over a long time scale*. *J. Exp. Bot.* 43: 183-188.
- Lüthje S., Döring O., Heuer S., Lüthen H. y Böttger M. (1997) *Oxidoreductases in plant plasma membrane*. *Biochim. Biophys. Acta* 1331: 81-102.
- Lüthje S., van Gestelen P., Córdoba-Pedregosa M.C., González-Reyes J.A., Böttger M., Asard H. y Villalba J.M. (1998) *Quinones in plant plasma membrane - a missing link?* *Protoplasma*. En prensa.
- Lynch D.V. y Steponkus P.L. (1987) *Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (Secale cereale L. cv. Puma)*. *Plant Physiol.* 83: 761-767.
- Ma J.F., Kusano G., Kimura S. y Nomoto K. (1993) *Specific recognition of mugineic acid-ferric complex by barley roots*. *Phytochemistry* 34: 599-603.
- Maas F.M., van de Wetering D.A.M., van Beusichem M.L. y Bienfait H.F. (1988) *Characterization of phloem iron and its possible role in the regulation of Fe-efficiency reactions*. *Plant Physiol.* 87: 167-171.
- MacKinney G. (1941) *Absorption of light by chlorophyll solutions*. *J. Biol. Chem.* 140: 315-322.
- Mansour M.M.F., van Hasselt P.R. y Kuiper P.J.C. (1994) *Plasma membrane lipid alterations induced by NaCl in winter wheat roots*. *Physiol. Plant.* 92: 473-478.
- Markwell M., Haas S.M., Tolbert N.E. y Lieber L.L. (1981) *Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures*. *Meth. Enzymol.* 72: 296-303.
- Marrè M.T., Moroni A., Albergoni F.G. y Marrè E. (1988) *Plasmalemma redox activity and H⁺ extrusion. I Activation of the H⁺-pump by ferricyanide-induced potential depolarization and cytoplasm acidification*. *Plant Physiol.* 87: 25-29.
- Marschner H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plant*. H. Marschner (ed.) Academic Press. London.
- Marschner H. y Römheld V. (1983) *In vivo measurement of root induced pH changes at the soil-root interface: Effect of plant species and nitrogen source*. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 111: 241-251.
- Marschner H., Römheld V. y Kissel M. (1986) *Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron*. *J. Plant Nutr.* 9: 695-713.
- Marschner H., Römheld V. y Kissel M. (1987) *Localization of phytosiderophore release and of iron uptake along intact barley roots*. *Physiol. Plant.* 71: 157-162.

- Marschner H., Römheld V. y Ossenberg-Neuhaus H. (1982) *Rapid method for measuring changes in pH and reducing processes along roots of intact plants*. Z. Pflanzenphysiol. 105: 407-416.
- Marschner H., Treeby M. y Römheld V. (1989) *Role of root-induced changes in the rhizosphere for iron acquisition in higher plants*. Z. Pflanzenernähr. Bodenk. 152: 197-204.
- Martell A.E. y Motekaitis R.J. (1992) *Determination and use of Stability Constants*. Editorial etc. VCH Publishers. New York.
- Masaoka Y., Chino M. y Mori S. (1998) *Amino acid sequence of proteins induced in Fe-deficient stressed alfalfa (Medicago sativa L.) roots*. Soil Sci. Plant Nutr. 44: 453-458.
- Masson F. y Rossignol M. (1995) *Basic plasticity of protein expression in tobacco leaf plasma membrane*. Plant J. 8: 77-85.
- Mengel K. (1994) *Iron availability in plant tissues - Iron chlorosis on calcareous soils*. Plant Soil 165: 275-283.
- Mengel K. y Geurtzen G. (1986) *Iron chlorosis on calcareous soils. Alkaline nutritional condition as the cause for the chlorosis*. J. Plant Nutr. 9: 161-173.
- Mengel K. y Geurtzen G. (1988) *Relationship between iron chlorosis and alkalinity in Zea mays*. Physiol. Plant. 72: 460-465.
- Meyer I., Grosset J., Chartier Y. y Cleyet-Marel J.C. (1988) *Preparation by two-dimensional electrophoresis of proteins for antibody production: antibody against proteins whose synthesis is reduced by auxin in tobacco mesophyll protoplasts*. Electrophoresis 9: 704-712.
- Michelet B. y Boutry M. (1995) *The plasma membrane H⁺-ATPase - A highly regulated enzyme with multiple physiological functions*. Plant Physiol. 108: 1-6.
- Miller G.W., Shigematsu A., Welkie G.W., Motoji N. y Szlek M. (1990) *Potassium effect on iron stress in tomato. II The effects on root CO₂-fixation and organic acid formation*. J. Plant Nutr. 13: 1355-1370.
- Moog P.R. y Brüggemann W. (1994) *Iron reductase systems on the plant plasma membrane - A review*. Plant Soil 165: 241-260.
- Moog P.R., van der Kooij T.A.W., Brüggemann W., Schiefelbein J.W. y Kuiper P.J.C. (1995) *Responses to iron deficiency in Arabidopsis thaliana: The turbo iron reductase does not depend on the formation of root hairs and transfer cells*. Planta 195: 505-513.
- Morales F., Abadía A. y Abadía J. (1990) *Characterization of the xanthophyll cycle and other photosynthetic pigment changes induced by iron deficiency in sugar beet (Beta vulgaris L.)*. Plant Physiol. 94: 607-613.
- Morales F., Cerovic Z.G. y Moya I. (1994) *Characteristics of blue-green fluorescence in the mesophyll of sugar beet (Beta vulgaris L.) leaves affected by iron deficiency*. Plant Physiol. 106: 127-133.

Morales F., Grasa R., Abadía A. y Abadía J. (1998) *Iron chlorosis paradox in fruit trees*. J. Plant Nutr. 21: 815-825.

Mori S. (1998) *Iron transport in graminaceous plants*. En: Metal Ions in Biological Systems. A. Siegel y H. Sigel (eds.) Basel, Switzerland. pp 215-238.

Mori S. y Nishizawa N. (1987) *Methionine as a dominant precursor of phytosiderophores in Graminaceae plants*. Plant Cell Physiol. 28: 1081-1092.

Mori S., Nishizawa N., Hayashi H., Chino M., Yoshimura E. y Ishihara J. (1991) *Why are young rice plants highly susceptible to iron deficiency?* En: Iron Nutrition and Interactions in Plants. Y. Chen y Hadar Y. (eds.) Kluwer Academic Publishing. Dordrecht, The Netherlands. pp 175-188.

Morré D.J. y Brightmann A.O. (1991) *NADH oxidase of plasma membranes*. J. Bioenerg. Biomembr. 23: 469-489.

Morré D.J., Brightmann A.O., Hidalgo A. y Navas P. (1995a) *Selective inhibition of auxin-stimulated NADH oxidase activity and elongation growth of soybean hypocotyls by thiol reagents*. Plant Physiol. 107: 1285-1291.

Morré D.J., De Cabo R., Jacobs E. y Morré D.M. (1995b) *Auxin-modulated protein disulfidethiol interchange activity from soybean plasma membranes*. Plant Physiol. 109: 573-578.

Morré D.J., Lawrence J., Safranski K., Hammond T. y Morré D.M. (1994) *Experimental basis for separation of membrane vesicles by preparative free-flow electrophoresis*. J. Chromatography 668: 201-213.

Murad E. y Fisher W.R. (1988) *Iron in soils and clay minerals*. J. W. Stucki, B.A. Goodman y U. Schwertmann (eds.). Dordrecht, The Netherlands.

Nakagawa N., Mori H., Yamazaki K. y Imaseki H. (1991) *Cloning of a complementary DNA for auxin-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and differential expression of the gene by auxin and wounding*. Plant Cell Physiol. 32: 1153-1163.

Nakanishi H., Okamura N., Umehara Y., Nishizawa N.K., Chino M. y Mori S. (1993) *Expression of a gene specific for iron deficiency (Ids3) in the roots of Hordeum vulgare*. Plant Cell Physiol. 34: 401-410.

Navari-Izzo F., Quartacci M.F., Melfi D. y Izzo R. (1993) *Lipid composition of plasma membranes isolated from sunflower seedlings grown under water-stress*. Physiol. Plant. 87: 508-514.

Nedunchezian N. y Kulandaivelu G. (1991) *Evidence for the ultraviolet-B (280-320 nm) radiation induced structural reorganization and damage of photosystem II polypeptides in isolated chloroplasts*. Physiol. Plant. 81: 558-562.

O'Farrell P. (1974) *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J. Biol. Chem. 250: 4007-4021.

Oaks A. y Hirel B. (1985) *Nitrogen metabolism in roots*. Annu. Rev. Plant Physiol. 36: 345-365.

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

Okumura N., Nishizawa N.K., Umehara Y. y Mori S. (1991) *An iron deficiency-specific cDNA from barley roots having two homologous cysteine-rich MT domains*. Plant Mol. Biol. 17: 531-533.

Okumura N., Nishizawa N.K., Umehara Y., Ohara T., Nakanishi H., Yamaguchi T., Chino M. y Mori S. (1994) *A dioxygenase gene (Ids2) expressed under iron deficiency conditions in the roots of Hordeum vulgare*. Plant Mol. Biol. 25: 705-719.

Olsen R.A., Bennett J.H., Blume D. y Brown J.C. (1981) *Chemical aspects of the Fe stress response mechanism in tomatoes*. J. Plant Nutr. 3: 905-921.

Olsen R.A. y Brown J.C. (1980) *Factors related to iron uptake by dicotyledoneous and monocotyledoneous plants. II. The reduction of Fe³⁺ as influenced by roots and inhibitors*. J. Plant Nutr. 2: 647-660.

Olsen R.A., Brown J.C., Bennet J.H. y Blume D. (1982) *Reduction of Fe(III) as it relates to Fe chlorosis*. J. Plant Nutr. 5: 433-445.

Onyezili F.N. y Ross J.D. (1993) *Iron deficiency stress responses of five graminaceous monocots*. J. Plant Nutr. 16: 953-974.

Outlaw W.H.J. (1990) *Kinetic properties of guard cell phosphoenolpyruvate carboxylase*. Biochem. Physiol. Pflanzen. 186: 317-325.

Ownby J.D. y Hruschka W.R. (1991) *Quantitative changes in cytoplasmatic and microsomal proteins associated with aluminium toxicity in two cultivars of winter wheat*. Plant Cell Environ. 14: 303-309.

Palmer M.J., DeKock P.C. y Bacon J.S.D. (1963) *Changes in concentration of malic acid, citric acid, Ca and K in the leaves during the growth of normal and iron deficient mustard plants*. Biochem. J. 86: 484-493.

Palmgren M.G. (1990) *An H⁺-ATPase assay: proton pumping and ATPase activity determined simultaneously in the same sample*. Plant Physiol. 94: 882-886.

Palmgren M.G., Askerlund P., Fredrikson K., Widell S., Sommarin M. y Larsson C. (1990) *Sealed inside-out and right-side-out plasma membranes vesicles. Optimal conditions for formation and separation*. Plant Physiol. 92: 871-880.

Pearson W.R. y Lipman D.J. (1988) *Improved tools for biological sequence comparison*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448.

Pich A. y Scholz G. (1991) *Nicotianamine and the distribution of iron into apoplast and symplast of tomato (Lycopersicon esculentum L.) II. Uptake of iron by protoplasts from the variety Bonner Beste and its nicotianamine-less mutant chloronerva and the compartmentation of iron in leaves*. J. Exp. Bot. 42: 1517-1523.

- Pinton R., Cakmak I. y Marschner H. (1994) Zinc deficiency enhanced NAD(P)H-dependent superoxide radical production in plasma membrane vesicles isolated from roots of bean plants. *J. Exp. Bot.* 45: 45-50.
- Popov V.O. y Lamzin V.S. (1994) NAD(+)-dependent formate dehydrogenase. *Biochem. J.* 302: 967.
- Pupillo P., Valenti V., DeLuca L. y Hertel R. (1986) Kinetic characterization of reduced pyridine nucleotide dehydrogenases (duroquinone-dependent) in Cucurbita microsomes. *Plant Physiol.* 80: 384-389.
- Qi X., Tai C.Y. y Wasserman P. (1995) Plasma membrane intrinsic proteins of Beta vulgaris L. *Plant Physiol.* 108: 387-392.
- Qiu Q.S., Cheng P. y Liang H.G. (1995) Characterization of the NAD(P)H oxidation by purified plasma membrane vesicles using a spin-trapper EPR method. *J. Plant Physiol.* 146: 445-449.
- Rabotti G., de Nisi P. y Zocchi G. (1995) Metabolic implications in the biochemical responses to iron deficiency in Cucumber (Cucumis sativus L.) roots. *Plant Physiol.* 107: 1195-1199.
- Rabotti G. y Zocchi G. (1994) Plasma membrane-bound H⁺-ATPase and reductase activities in Fe-deficient cucumber roots. *Physiol. Plant.* 90: 779-785.
- Ramírez J.M., Gallego G.G. y Serrano R. (1984) Electron transfer constituents in plasma membrane fractions of Avena sativa and Saccharomyces cerevisiae. *Plant Sci. Lett.* 34: 103-119.
- Rathnam C.K.M. y Edwards G.E. (1976) Protoplasts as a tool for isolating functional chloroplasts from leaves. *Plant Cell Physiol.* 17: 177-186.
- Rea P.A. y Sanders D. (1987) Tonoplast energization: two H⁺ pumps, one membrane. *Physiol. Plant.* 71: 131-141.
- Redinbaugh M.G. y Campbell W.H. (1983) Reduction of ferric citrate catalyzed by NADH: nitrate reductase. *Biochem. Biophys. Research Comm.* 114: 1182-1188.
- Rémy R. y Ambard-Bretteville F. (1987) Two-dimensional electrophoresis in the analysis and preparation of cell organelle polypeptides. *Methods Enzymol.* 148: 623-632.
- Robinson N.J., Sadjuga y Groom Q.J. (1997) The froh gene family from Arabidopsis thaliana: Putative iron-chelate reductases. *Plant Soil* 196: 245-248.
- Roland J.C., Lembi C.A. y Morré D.J. (1972) Phosphotungstic acid-chromic acid as a selective electron dense stain for plasma membranes of plant cells. *Stain Technol.* 47: 195-200.
- Rombolá A., Brüggemann W., Tagliavini M., Marangoni B. y Moog P.R. (1999) Iron source affects Fe reduction and re-greening of kiwifruit (Actinidia deliciosa) leaves. *J. Plant Nutr.* En prensa.

Romera F.J. y Alcántara E. (1993) *Ethylene involvement in the regulation of iron deficiency responses in cucumber*. Plant Physiol. 102 (Sup): 63.

Romera F.J. y Alcántara E. (1994) *Iron-deficiency stress responses in Cucumber (Cucumis sativus L.) roots*. Plant Physiol. 105: 1133-1138.

Romera F.J., Alcántara E. y de la Guardia M.D. (1991) *Characterization of the tolerance to iron chlorosis in different peach rootstocks grown in nutrient solution. II Iron stress response mechanisms*. En: Iron Nutrition and Interactions in Plants. Y. Chen y Y. Hadar (eds.) Kluwer Academic Publisher. The Netherlands. pp 151-155.

Romera F.J., Alcántara E. y de la Guardia M.D. (1992a) *Role of roots and shoots in the regulation of the Fe efficiency responses in sunflower and cucumber*. Physiol. Plant. 85: 141-146.

Romera F.J., Alcántara E. y de la Guardia M.D. (1992b) *Effects of bicarbonate, phosphate and high pH on the reducing capacity of Fe-deficient sunflower and cucumber plants*. J. Plant Nutr. 15: 1519-1530.

Romera F.J., Alcántara E. y de la Guardia M.D. (1998) *The induction of the "turbo reductase" is inhibited by cicloheximide, cordycepin and ethylene inhibitors in Fe-deficient cucumber (Cucumis sativus L.) plants*. Protoplasma 205: 156-162.

Romera F.J. y de la Guardia M.D. (1991) *La nutrición férrica de las plantas*. Servicio de Publicaciones. Universidad de Córdoba. Grupo Gestión Editorial. Córdoba.

Romera F.J., Welch R.M., Norwell W.A. y Schaefer S.C. (1996a) *Iron requirement for and effects of promoters and inhibitors of ethylene action on stimulation of Fe(III)-chelate reductase in roots of strategy I species*. Biometals 9: 45-50.

Romera F.J., Welch R.M., Norwell W.A., Schaefer S.C. y Kochian L.V. (1996b) *Ethylene involvement in the over-expression of Fe(III)-chelate reductase by roots of E107 pea [Pisum sativum L. (brz, brz)] and chloronerva tomato (Lycopersicon esculentum L.) mutant genotypes*. Biometals 9: 38-44.

Römheld V. (1987) *Existence of two different strategies for the acquisition of iron in higher plants*. En: Iron Transport in Microbes, Plants and Animals. G. Winkelmann, D.van der Helm y J.B. Neilands (eds.) VCH Verlagsgesellschaft. Weinheim, F. R.G. pp 353-373.

Römheld V. (1997) *The chlorosis paradox: Fe inactivation in leaves as a secondary event in Fe deficiency chlorosis*. En Actas del Ninth International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants. Hohenheim, Stuttgart. pp 10.

Römheld V. y Marschner H. (1981) *Iron deficiency stress induced morphological and physiological changes in root tips of sunflower*. Physiol. Plant. 53: 354-360.

Römheld V. y Marschner H. (1983) *Mechanism of iron uptake by peanuts plants. I. Fe(III) reduction, chelate splitting, and release of phenolics*. Plant Physiol. 71: 949-954.

- Römheld V. y Marschner H. (1986) *Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species*. B. Tinker y A. Läuchli (eds.) Praeger Scientific. New York, USA.
- Römheld V. y Marschner H. (1990) *Genotypical differences among graminaceous species in release of phytosiderophores and uptake of iron phytosiderophores*. Plant Soil 123: 147-153.
- Römheld V., Müller C. y Marschner H. (1984) *Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants*. Plant Physiol. 76: 603-606.
- Rubinstein B. y Luster D.G. (1993) *Plasma membrane redox activity: Components and role in plant processes*. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44: 131-155.
- Rubinstein B. y Stern A.I. (1986) *Relationship of transplasmalemma redox activity to proton and solute transport by roots of Zea mays L.* Plant Physiol. 80: 805-811.
- Sanz M., Caverro J. y Abadía J. (1992) *Iron chlorosis in the Ebro river basin, Spain*. J. Plant Nutr. 15: 1971-1981.
- Schaller G. (1987) *pH changes in the rhizosphere in relation to the pH-buffering of soils*. Plant Soil 97: 439-444.
- Schmidt A. y Buckhout T.J. (1997) *The response of tomato roots (Lycopersicon esculentum Mill.) to iron deficiency stress: alterations in the pattern of protein synthesis*. J. Exp. Bot. 48: 1909-1918.
- Schmidt W. (1995) *Effects of various inhibitors on "in vivo" reduction by Plantago lanceolata L. roots*. En: Iron Nutrition in Soils and Plants. J. Abadía (eds.) Kluwer Academic Publishers. pp 77-82.
- Schmidt W. y Bartels M. (1996) *Formation of root epidermal transfer cells in Plantago*. Plant Physiol. 110: 217-225.
- Schmidt W. y Bartels M. (1998) *Orientation of NADH-linked ferric chelate (turbo) reductase in plasma membranes from roots of Plantago lanceolata*. Protoplasma 203: 186-193.
- Schmidt W., Bartels M., Tittel J. y Fuhner C. (1997) *Physiological effects of copper on iron acquisition processes in Plantago*. New Phytologist 135: 659-666.
- Schmidt W. y Schuck C. (1996) *Pyridine nucleotide pool size changes in iron-deficient Plantago lanceolata roots during reduction of external oxidants*. Physiol. Plant. 98: 215-221.
- Scholz G.R., Becker U.W., Stephan A., A. R. y Pich A. (1988) *The regulation of iron uptake and possible functions of nicotianamine in higher plants*. Biochem. Physiol. Pflanzen. 183: 257-269
- Schwab, A.P. y Lindsay, W.L. (1989) *A computer simulation of Fe(III) and Fe(II) complexation in limited nutrient solution. I. Program development and testing* Soil Sci. Soc. Am. J. 53: 29-34.

- Senden M.H.M.N., Vandermeer A.J.G.M., Verburg T.G. y Wolterbeek H.T. (1995) *Citric acid in tomato plant roots and its effect on cadmium uptake and distribution*. Plant Soil 171: 333-339.
- Serrano A., Villalba J.M., González-Reyes J.A., Navas P. y Córdoba F. (1994a) *Two distinct NAD(P)H-dependent redox enzymes isolated from onion root plasma membranes*. Biochem. Mol. Biol. Int. 32: 841-849.
- Serrano A., Córdoba F., González-Reyes J.A., Navas P. y Villalba J.M. (1994b) *Purification and characterization of two distinct NAD(P)H-dehydrogenases from onion (*Allium cepa* L.) root plasma membrane*. Plant Physiol. 106: 87-96.
- Serrano A., Córdoba F., González-Reyes J.A., Santos C., Navas P. y Villalba J.M. (1995) *NADH-specific dehydrogenase from onion root plasma membrane - purification and characterization*. Protoplasma 184: 133-139.
- Serrano R. (1989) *Structure and function of plasma membrane ATPase*. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40: 61-94.
- Shelton P. y Barton L.L. (1997) *Ferric-citrate reductase activity in *Laccaria luccata*, an ectomycorrhizal fungus*. En Actas del Ninth International Symposium on Iron Nutrition and Interactions. Stuttgart, Germany. pp 24.
- Shettz M.P. y Singer S.J. (1974) *Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 4457-4461.
- Shi Y. y Byrne D.H. (1995) *Tolerance of *Prunus* rootstocks to potassium carbonate-induced chlorosis*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120: 283-285.
- Shinmachi F., Hasegawa I. y Yazaki J. (1992) *Analysis of iron-deficiency response systems on the plant root using the hairy root*. Japanese J. Soil Sci. Plant Nutr. 63: 202-209.
- Shinmachi F., Hasegawa I. y Yazaki J. (1994) *The relation between riboflavin secretion as a result of iron deficiency and ferric reduction system on the plant*. Japanese J. Soil Sci. Plant Nutr. 65: 413-418.
- Shinmachi F., Hasegawa I. y Yazaki J. (1995) *Difference in riboflavin secretion phenomenon as a result of iron-deficiency among plant species*. Japanese J. Soil Sci. Plant Nutr. 66: 337-341.
- Shojima S., Nishizawa N., Fushiya S., Nozoe S., Irifune T. y Mori S. (1990) *Biosynthesis of phyto siderofores. In vitro biosynthesis of 2'-deoxymugineic acid from L-methionine and nicotianamine*. Plant Physiol. 93: 1497-1503.
- Sijmons P.C. y Bienfait H.F. (1983) *Source of electrons for extracellular Fe(III) reduction in iron-deficient bean roots*. Physiol. Plant. 59: 409-415.
- Sijmons P.C. y Bienfait H.F. (1984) *Mechanism of iron reduction by roots of *Phaseolus vulgaris* L.* J. Plant Nutr. 7: 687-693.

- Sijmons P.C., Kolattukudi P.E. y Bienfait H.F. (1985) *Iron deficiency decreased suberization in bean roots through a decrease in suberin-specific peroxidase activity.* Plant Physiol. 78: 115-120.
- Sijmons P.C., Lanfermeijer F.C., De Boer A.H., Prins H.B.A. y Bienfait H.F. (1984a) *Depolarization of cell membrane potential during trans-plasma membrane electron transfer to extracellular electron acceptors in iron-deficient roots of Phaseolus vulgaris L.* Plant Physiol. 136: 51-55.
- Sijmons P.C., Van der Briel W. y Bienfait H.F. (1984b) *Cytosolic NADPH is the electron donor for extracellular Fe(III) reduction in iron deficient bean roots.* Plant Physiol. 75: 219-221.
- Smarrelli J. y Castignetti D. (1988) *Iron assimilation in plants. Reduction of a ferriphytosiderophore by NADH:nitrate reductase from squash.* Planta 173: 563-566.
- Smith B. (1984) *Iron in higher plants: storage and metabolic role.* J. Plant Nutr. 7: 759-766.
- Smolders A.J.P., Hendriks R.J.J., Campschrenr H.M. y Roelofs J.G.M. (1997) *Nitrate induced iron deficiency chlorosis in Juncus acutiflorus.* Plant Soil 196: 37-45.
- Speer M. y Kaiser W.M. (1991) *Ion relations of symplastic and apoplastic space in leaves from Spinacia oleracea L. and Pisum sativum L. under salinity.* Plant Physiol. 97: 990-997.
- Spiller S. y Terry N. (1980) *Limiting factors in photosynthesis. II. Iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units.* Plant Physiol. 65: 121-125.
- Stallaert V.M. y Geuns J.M.C. (1994) *Phospholipid and free sterol composition of hypocotyl plasma membranes of ageing mung bean seedlings.* Phytochemistry 36: 1177-1180.
- Stephan U.W. y Scholz G. (1993) *Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem?* Physiol. Plant. 88: 522-529.
- Stocking C.R. (1975) *Iron deficiency and the structure and physiology of maize chloroplast.* Plant Physiol. 55: 626-631.
- Stöhr C. (1998) *Plasma membrane-bound nitrate reductase in algae and higher plants.* En: Plasma Membrane Redox Systems and Their Role in Biological Stress and Disease. H. Asard, A. Bérczi y R.J. Caubergs (eds.) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp 102-119.
- Stöhr C., Schuler F. y Tischner R. (1995) *Glycosil-phosphatidylinositol-anchored proteins exist in the plasma membrane of Chorella saccharophila (Krüger) Nadson: plasma-membrane-bound nitrate reductase as an example.* Planta 196: 284-287.
- Stöhr C., Tischner R. y Ward M.R. (1993) *Characterization of the plasma-membrane-bound nitrate reductase in Chlorella saccharophila (Krüger) Nadson.* Planta 191: 79-85.

- Stöhr C. y Ullrich W.R. (1997) *A succinate-oxidising nitrate reductase is located at the plasma membrane of plant roots*. *Planta* 203: 129-132.
- Sueyoshi K., Hirata O. y Oji Y. (1997) *Characterization of plasma membrana-bound Fe³⁺-chelate reductase from Fe-deficient and Fe-sufficient cucumber roots*. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43: 149-156.
- Susín S. (1994) *Respuestas inducidas por la deficiencia de hierro en el sistema radicular de Beta vulgaris L.* Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Susín S., Abadía A., González-Reyes J.A., Lucena J.J. y Abadía J. (1996) *The pH requeriment for in vivo activity of the iron-deficiency-induced "turbo" ferric chelate reductase. A comparison of the iron-deficiency-induced iron reductase activities of intact plants and isolated plasma membrane fractions in sugar beet*. *Plant Physiol.* 110: 111-123.
- Susín S., Abián J., Peleato M.L., Sánchez-Baeza J., Abadía A., Gelpí E. y Abadía J. (1994) *Flavin excretion from iron deficient sugar beet (Beta vulgaris L.)*. *Planta* 193: 514-519.
- Susín S., Abián J., Sánchez-Baeza F., Peleato M.L., Abadía A., Gelpí E. y Abadía J. (1993a) *Riboflavin 3'- and 5'-sulfate, two novel flavins accumulating in the roots of iron-deficient sugar beet (Beta vulgaris)*. *J. Biol. Chem.* 268: 20958-20956.
- Susín S., Quílez R., Abadía A. y Abadía J. (1993b) *Differences in flavin content of leaves from iron deficient and iron sufficient sugar beet (Beta vulgaris L.)*. En *Actas del Seventh International Symposium on Iron Nutrition and Interactions*. Zaragoza, Spain. pp 107.
- Sussman M.R. (1994) *Molecular analysis of proteins in the plant plasma membrane*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 211-234.
- Suzuki K., Itai R., Suzuki K., Nakanishi H., Nishizawa N.K., Yoshimura E. y Mori S. (1998) *Formate dehydrogenase, an enzyme of anaerobic metabolism, is induced by iron deficiency in barley roots*. *Plant Physiol.* 116: 725-732.
- Sze H. (1985) *H⁺-translocating ATPases: advances using membrane vesicles*. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36: 175-208.
- Takagi S. (1976) *Naturally occurring iron-chelating compounds in oat- and rice-root washings. I. Activity measurements and preliminary characterization*. *Soil Sci. Plant Nutr.* 12: 423-433.
- Takagi S., Nomoto K. y Takemoto T. (1984) *Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants*. *J. Plant Nutr.* 7: 469-477.
- Taylor S.E., Terry N. y Huston R.P. (1982) *Limiting factors in photosynthesis III. Effects of iron nutrition on the activities of three regulatory enzymes of photosynthetic carbon metabolism*. *Plant Physiol.* 70: 1541-1543.
- Terry N. (1980) *Limiting factors in photosynthesis. I. Use of iron stress to control photochemical capacity in vivo*. *Plant Physiol.* 65: 114-120.

- Terry N. y Abadía J. (1986) *Function of iron in chloroplasts*. J. Plant Nutr. 9: 609-646.
- Thoiron S., Pascal N. y Briat J.F. (1997) *Impact of iron deficiency and iron re-supply during the early stages of vegetative development in maize (Zea mays L.)*. Plant Cell Environ. 20: 1051-1060.
- Tiffin L.O. (1966a) *Iron translocation I. Plant culture, exudate sampling, iron-citrate analysis*. Plant Physiol. 41: 510-514.
- Tiffin L.O. (1966b) *Iron translocation. II Citrate/iron ratios in plant stem exudates*. Plant Physiol. 41: 515-518.
- Tiffin L.O. (1970) *Translocation of iron citrate and phosphorus in xylem exudate of soybean*. Plant Physiol. 45: 280-283.
- Tiffin L.O. (1972) *Translocation of micronutrients in plants*. En: Micronutrients in Agriculture. Soil Sci. Soc. Am., Madison, USA. pp 199-229.
- Tiffin L.O. y Brown J.C. (1962) *Iron chelates in soybean exudate*. Science 19: 466-480.
- Tokarska-Schlattner M., Fink A., Castillo F.J., Crespi P., Crevecœur M., Greppin H. y Tacchini P. (1997) *Effects of ozone on the plasma membrane proteins in Arabidopsis thaliana L. leaves*. Plant Cell Environ, 20: 1205-1211.
- Towbin H., Staehelin T. y Gordon J. (1979) *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354.
- Trost P., Foscarini S., Preger V., Bonora P., Vitale L. y Pupillo P. (1997) *Dissecting the diphenylene iodonium -sensitive NAD(P)H-quinone oxidoreductase of zucchini plasma membrane*. Plant Physiol. 114: 737-746.
- Uemara M. y Yoshida S. (1984) *Involvement of plasma membrane alterations in cold acclimatation of winter rye seedlings (Secale cereale L. cv Puma)*. Plant Physiol. 75: 818-826.
- Uotila L. y Koivusalo M. (1979) *Purification of formaldehyde and formate dehydrogenases from pea seeds by affinity chromatography and S-formylglutathione as the intermediate of formaldehyde metabolism*. Arch. Biochem. Biophys. 196: 33-45.
- van Dijken J.P., Oostra-Demkes G.T., Otto R. y Harder W. (1976) *S-formylglutathione: the substrate for formate dehydrogenase in methanol-utilizing yeasts*. Arch. Microbiol. 111: 77-83.
- van Gestelen P., Asard P. y Caubergs R.J. (1996) *Partial purification of a plasma flavoprotein and NAD(P)H-oxidoreductase activity*. Physiol. Plant. 98: 389-398.
- Vance C.P., Gregerson R.G., Robinson D.L., Miller S.S. y Gantt J.S. (1994) *Primary assimilation of nitrogen in alfalfa nodules: molecular features of the enzymes involved*. Plant Sci. 101: 51-64.

Vanková R. y Bornman C.H. (1987) *Immobilization of plant protoplasts on solid supports*. *Physiol. Plant.* 70: 1-7.

Vianello A. y Macri F. (1989) *NAD(P)H oxidation elicits anion superoxide formation in radish plasmalemma vesicles*. *Biochim. Biophys. Acta* 980: 202-208.

Virville J.D. de, Aaron I., Alin M.F., Moreau F. y de Virville J.D. (1994) *Isolation and properties of mitochondria from Arabidopsis thaliana cell suspension cultures*. *Plant Physiol. Biochem.* 32: 159-166.

von Wiren N., Mori S., Marschner H. y Römheld V. (1994) *Iron deficiency in maize mutant ys1 (Zea mays L. cv yellow stripe) is caused by a defect in uptake of iron phytosiderophores*. *Plant Physiol.* 106: 71-77.

Walter A., Pich A., Scholz G., Marschner H. y Römheld V. (1995) *Diurnal variations in release of phytosiderophores in roots and shoots of barley*. *J. Plant Physiol.* 147: 191-196.

Wallace A. (1971) *Regulation of the microenvironment status of plants of chelating agents and others factors*. A. Wallace (eds.) Los Angeles, USA.

Ward M.R., Grimes H.D. y Huffaker R.C. (1989) *Latent nitrate reductase activity is associated with the plasma membrane of corn roots*. *Planta* 177: 470-475.

Wei L., Loeppert R. y Ocumpaugh W. (1997) *Fe-deficiency stress response in Fe-deficiency resistant and susceptible subterranean clover - Importance of induced H⁺ release*. *J. Exp. Bot.* 48: 239-246.

Weibel E.R. (1979) *Practical methods for biological morphometry*. En: *Stereological Methods*. E. Weibel (eds.) Academic Press London. London, UK. pp 101-159.

Welch R.M., Norwell W.A., Schaefer S.C., Shaff J.E. y Kochian L.V. (1993) *Induction of iron(III) and copper(II) reduction in pea (Pisum sativum L.) roots by Fe and Cu status: Does the root-cell plasmalemma Fe(III)-chelate reductase perform a general role in regulation of cation uptake?* *Planta* 190: 555-561.

Welkie G.W. (1996) *Iron-deficiency stress responses of a chlorosis-susceptible and a chlorosis-resistant cultivar of muskmelon as related to root riboflavin excretion*. *J. Plant Nutr.* 19: 1157-1169.

Welkie G.W. y Miller G.W. (1988) *Riboflavin excretion from roots of iron-stressed and reciprocally grafted tobacco and tomato plants*. *J. Plant Nutr.* 11: 691-700.

Welkie G.W. y Miller G. W. (1989) *Sugar beet responses to iron nutrition and stress*. *J. Plant Nutr.* 12: 1041-1054.

Welkie G.W. y Miller G.W. (1992) *Iron stress and salt stress responses of lettuce (Lactuca sativa L.)*. *J. Plant Nutr.* 15: 1757-1764.

Welkie G.W. y Miller G.W. (1993) *Plant iron uptake physiology by nonsiderophore systems*. En: *Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms*. L. Barton y B. Hemming (eds.) Academic Press. San Diego, USA. pp 345-369.

Winder T.L. y Nishio J. (1995) *Early iron deficiency stress response in leaves of sugar beet*. Plant Physiol. 108: 1487-1494.

Wyckoff E.E., Stoebner J.A., Reed K.E. y Payne S.M. (1997) *Cloning of a Vibrio cholerae vibriobactin gene cluster: identification of genes required for early steps in siderophore biosynthesis*. J. Bacteriol. 179: 7055-7062.

Yamaguchi H., Shioiri T. y Mori S. (1997) *Isolation and characterization of a barley cDNA clone which restores growth defect of yeast ferrous uptake mutant *ctrl**. En Actas del Ninth International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants. Stuttgart, Germany. pp 56.

Yi Y. y Guerinot M.L. (1996) *Genetic evidence that induction of root Fe(III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency*. Plant J. 10: 835-844.

Young T.F. y Terry N. (1982) *Transport of iron into leaves following iron resupply to iron-stressed sugar beet plants*. J. Plant Nutr. 5: 1273-1283.

Zaharieva T., Yamashita K. y Matsumoto H. (1997) *Characterization of ferric chelate reductase in plasma membrane isolated from cucumber roots*. En: Plant Nutrition-for Sustainable Food Production and Environment. T. Ando et al. (eds.) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp 125-126.

Zenoff A.M., Hilal M., Galo M. y Moreno H. (1994) *Changes in root lipid composition and inhibition of the extrusion of protons during salt stress in two genotypes of soybean resistant or susceptible to stress. Varietal differences*. Plant Cell Physiol. 35: 729-735.

Zhao H. y Eide D. (1996a) *The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter of a high affinity uptake system induced by zinc limitation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 2454-2458.

Zhao H. y Eide D. (1996b) *The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 271: 23203-23210.

Zocchi G. y Cocucci S.M. (1990) *Fe uptake mechanism in Fe-efficient cucumber root*. Plant Physiol. 92: 908-911.

Zouari M. (1996) *Reponses radiculaires face a la deficiencia en fer chez differents genotypes de tomate et de betterave*. Tesis Master. Instituto Agrónomico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ).

ANEXOS

Anexo I (ver resultados 4.1.1.4)

En este anexo se incluyen las gráficas de las cinéticas y sus correspondientes ajustes de Eadie-Hofstee a partir de las cuales se han obtenido los valores cinéticos de K_m indicados en el apartado de Resultados 4.1.1.4.a (especiación del Fe(III)-citrato) y 4.1.1.4.b (especiación del Fe(III)-malato).

1.- Cinética para Fe : citrato (relación 1 : 5) (recalculada)

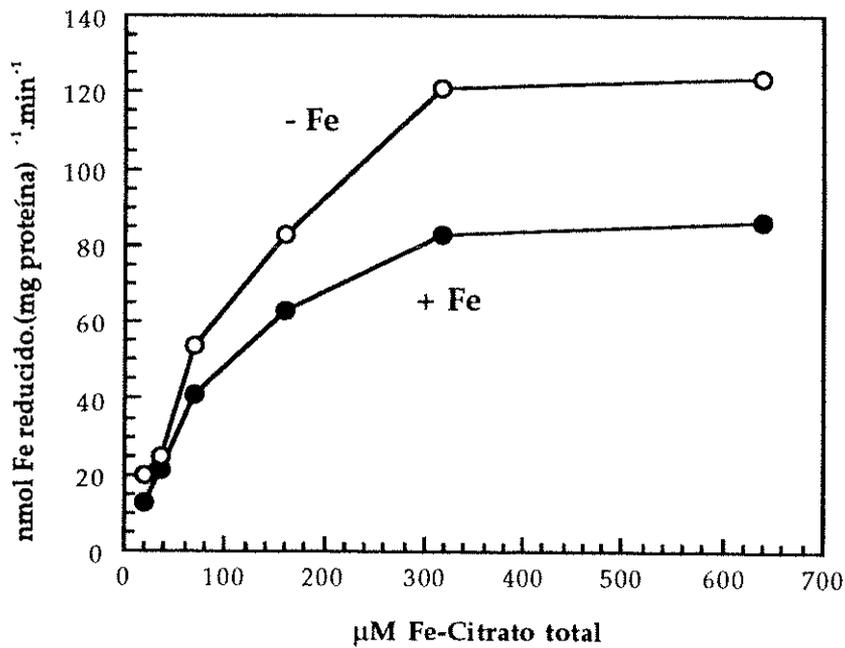


Figura A1: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con diferentes concentraciones del complejo Fe : citrato (relación 1 : 5). Las concentraciones totales corresponden a las obtenidas mediante los cálculos de especiación. La actividad se midió a pH 6,8.

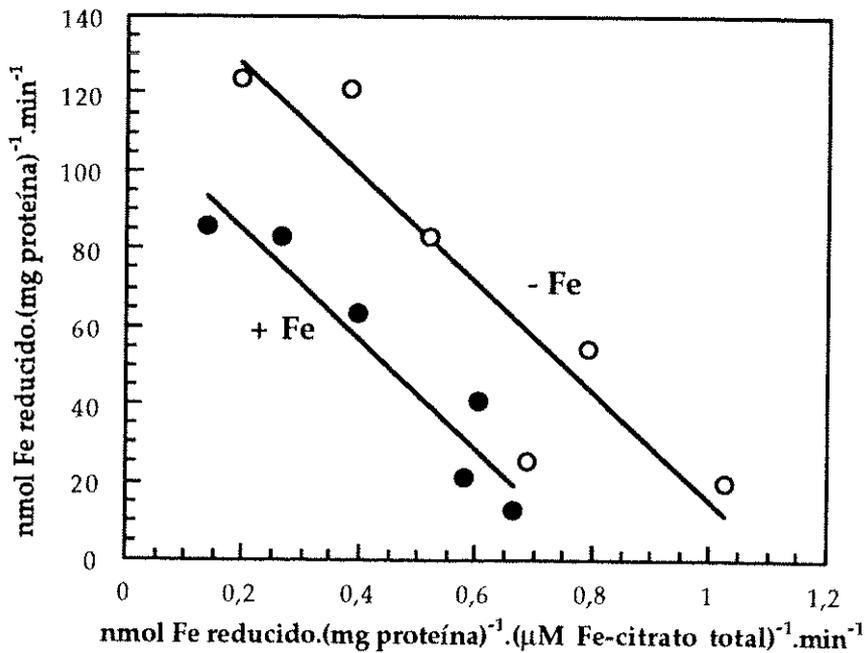


Figura A2: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con diferentes concentraciones del complejo Fe : citrato (relación 1 : 5) (Figura A1).

2.- Cinética para Fe : citrato (relación 1 : 20) (recalculada)

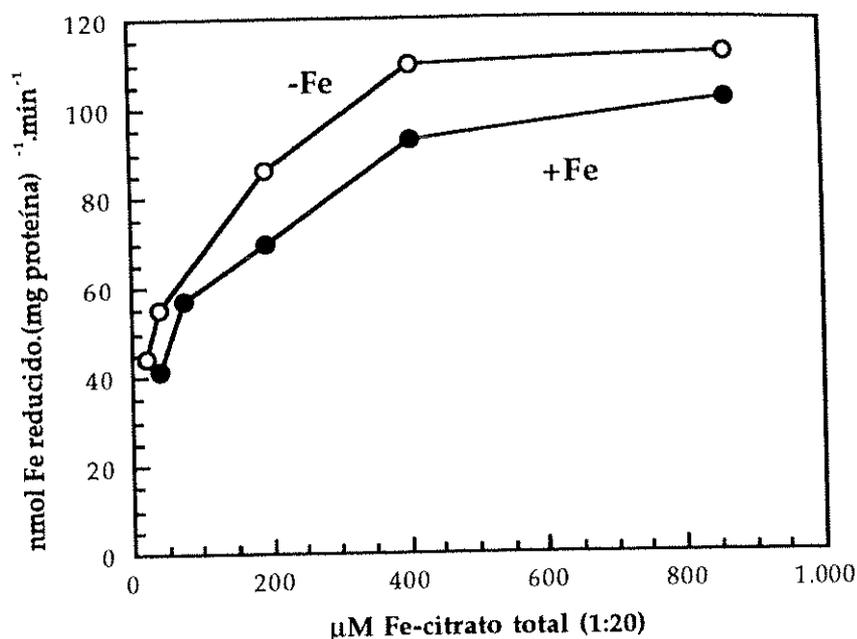


Figura A3: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con diferentes concentraciones del complejo Fe : citrato (relación 1 : 20). Las concentraciones totales corresponden a las obtenidas mediante los cálculos de especiación. La actividad se midió a pH 6,8.

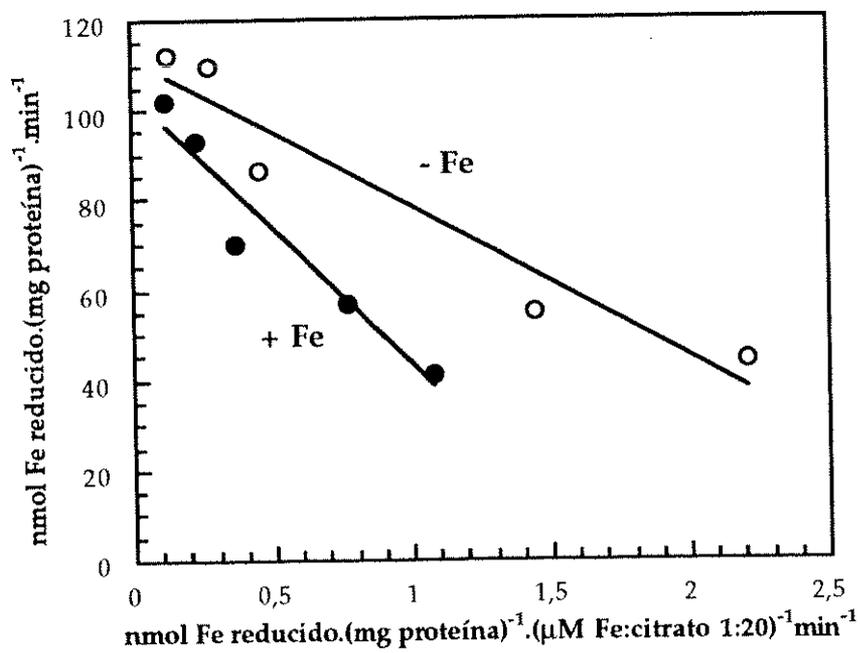


Figura A4: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con diferentes concentraciones del complejo Fe : citrato (relación 1 : 20) (Figura A3).

3.- Estimación teórica de las cinéticas para las especies mayoritarias de Fe : citrato (relación 1 : 5)

Especie $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$

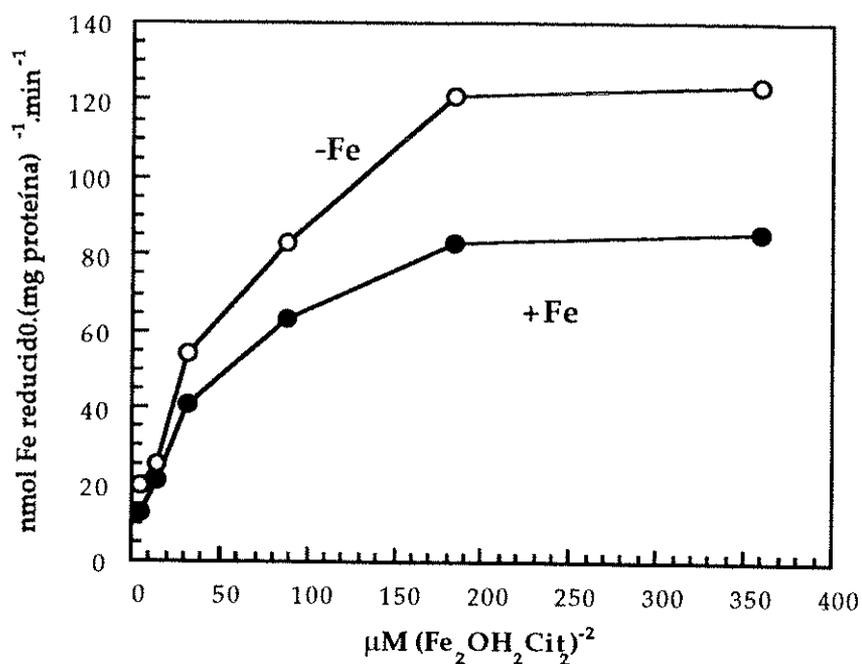


Figura A5: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con las concentraciones estimadas de la especie $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$ en el complejo de Fe : citrato (relación 1 : 5). La actividad se midió a pH 6,8.

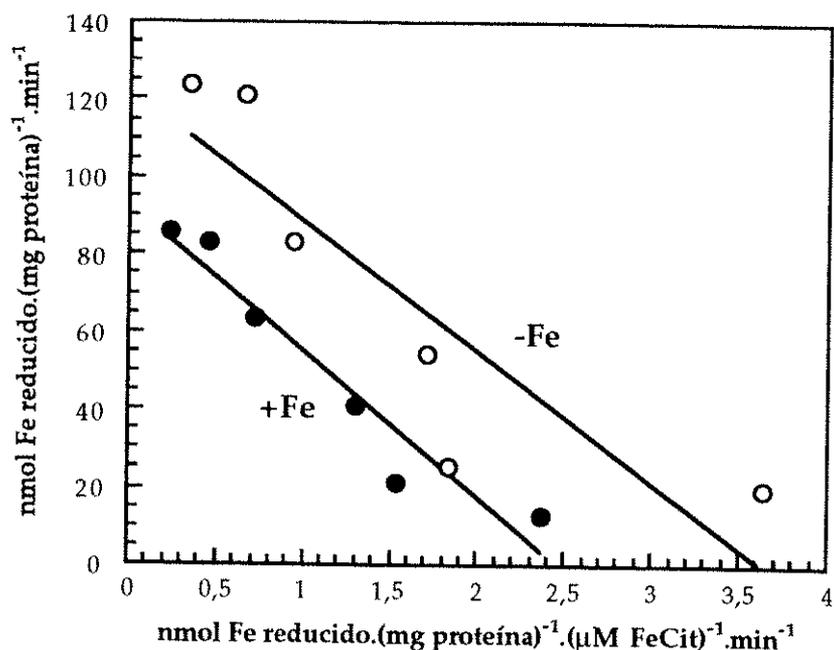


Figura A6: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con las concentraciones estimadas de la especie $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$ en el complejo de Fe : citrato (relación 1 : 5) (Figura A5).

Especie $[\text{FeOHCit}]^{-1}$

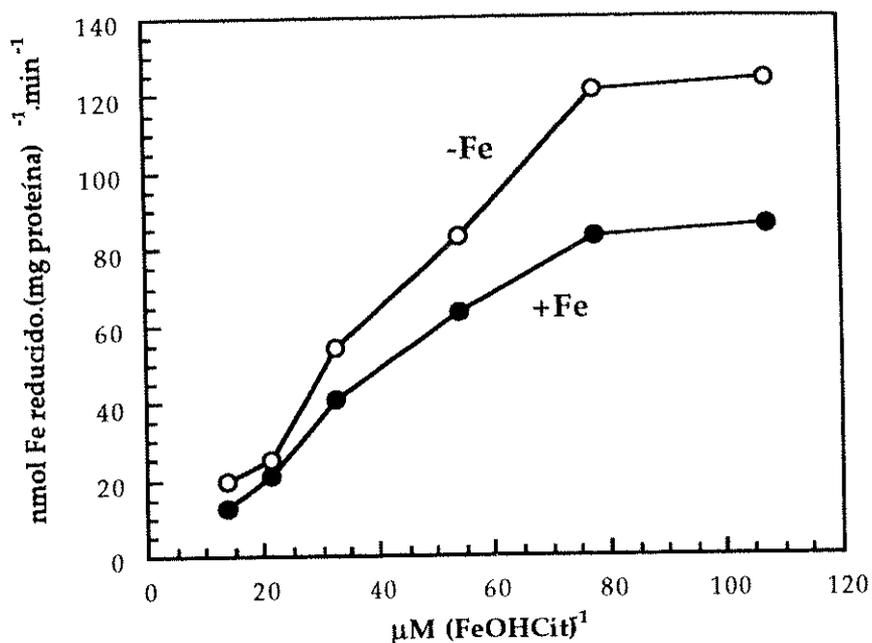


Figura A7: Actividad reductasa de la membrana plasm\u00e1tica de hoja con las concentraciones estimadas de la especie $[\text{FeOHCit}]^{-1}$ en el complejo de Fe : citrato (relaci\u00f3n 1 : 5). La actividad se midi\u00f3 a pH 6,8.

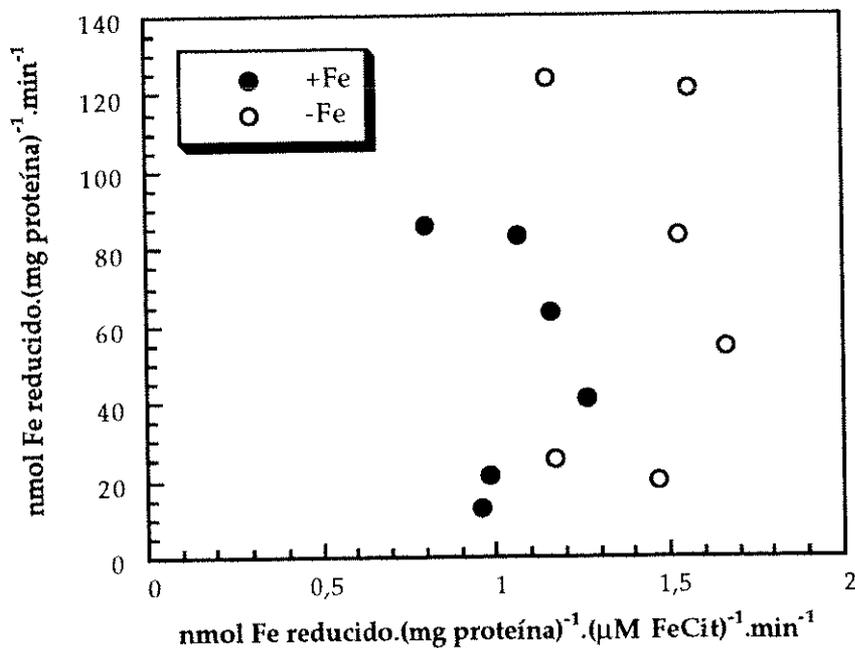


Figura A8: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con las concentraciones estimadas de la especie $[\text{FeOHCit}]^{-1}$ en el complejo de Fe : citrato (relaci\u00f3n 1 : 5) (Figura A7).

Especie $[\text{FeCit}_2]^{-3}$

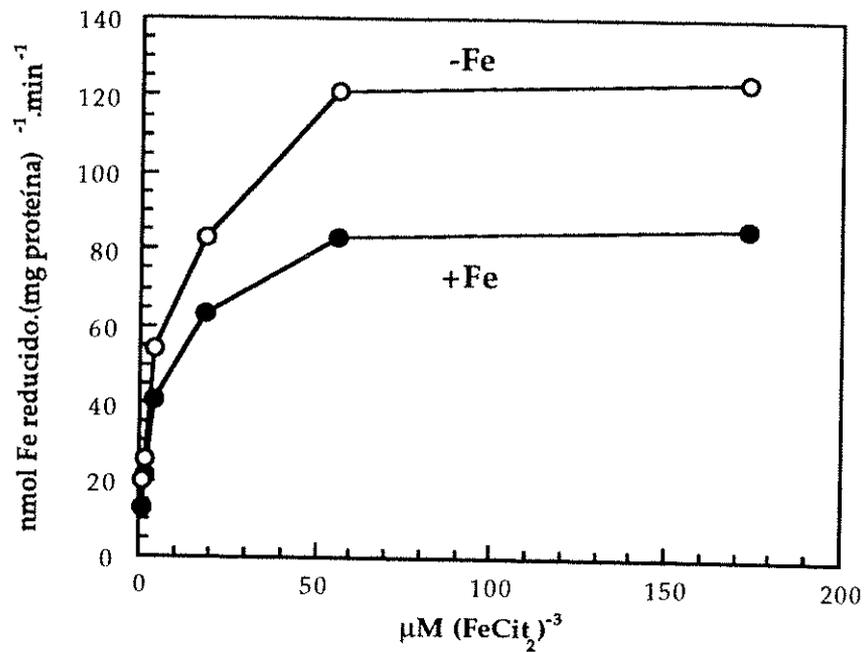


Figura A9: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con las concentraciones estimadas de la especie $[\text{FeCit}_2]^{-3}$ en el complejo de Fe : citrato (relación 1 : 5). La actividad se midió a pH 6,8.

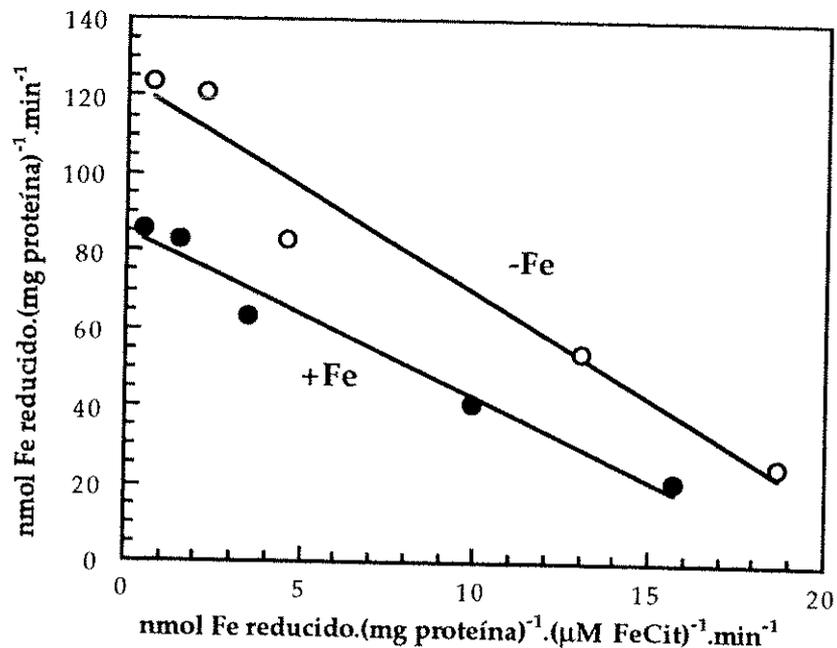


Figura A10: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con las concentraciones estimadas de la especie $[\text{FeCit}_2]^{-3}$ en el complejo de Fe : citrato (relación 1 : 5) (Figura A9).

4.- Estimación teórica de las cinéticas para las especies mayoritarias de Fe : citrato (relación 1 : 20)

Especie $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$

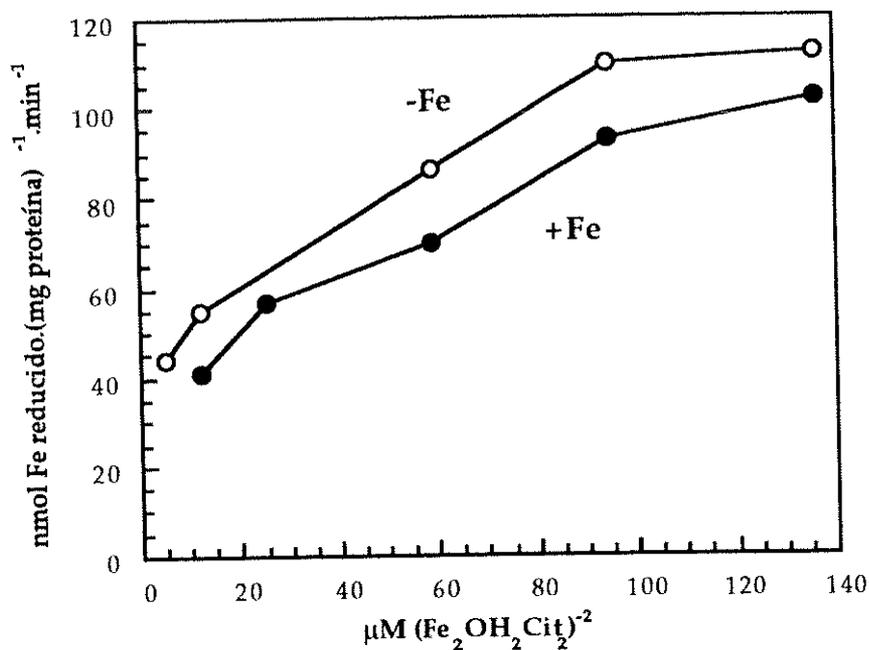


Figura A11: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con las concentraciones estimadas de la especie $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$ en el complejo de Fe : citrato (relación 1 : 20). La actividad se midió a pH 6,8.

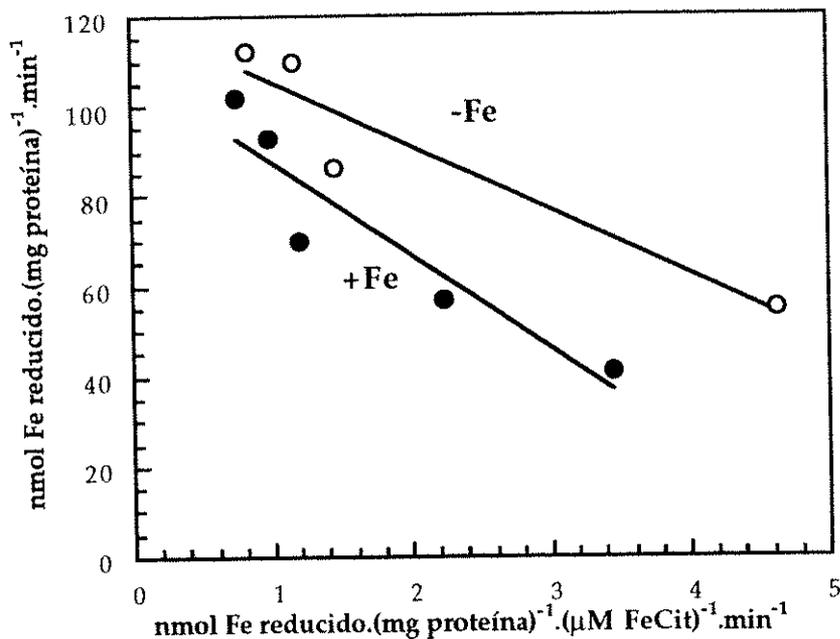


Figura A12: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con las concentraciones estimadas de la especie $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$ en el complejo de Fe : citrato (relación 1 : 20) (Figura A11).

Especie $[\text{FeOHCit}]^{-1}$

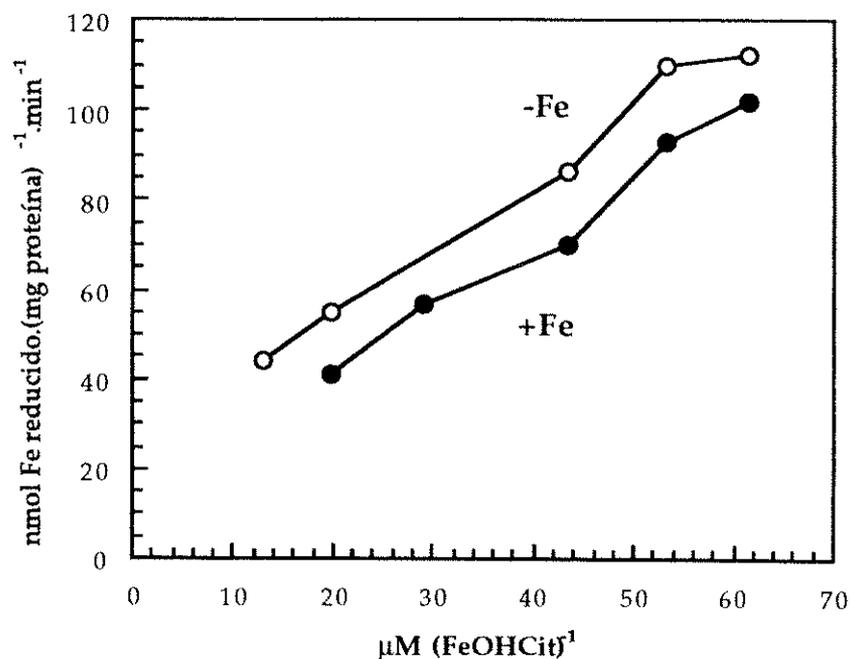


Figura A13: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con las concentraciones estimadas de la especie $[\text{FeOHCit}]^{-1}$ en el complejo de Fe : citrato (relación 1 : 20). La actividad se midió a pH 6,8.

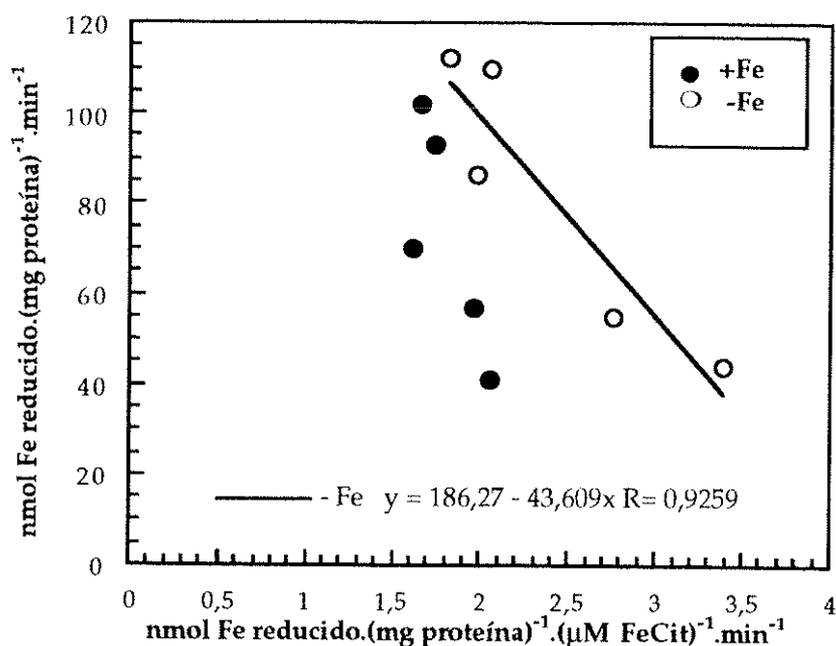


Figura A14: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con las concentraciones estimadas de la especie $[\text{FeOHCit}]^{-1}$ en el complejo de Fe : citrato (relación 1 : 20) (Figura A13).

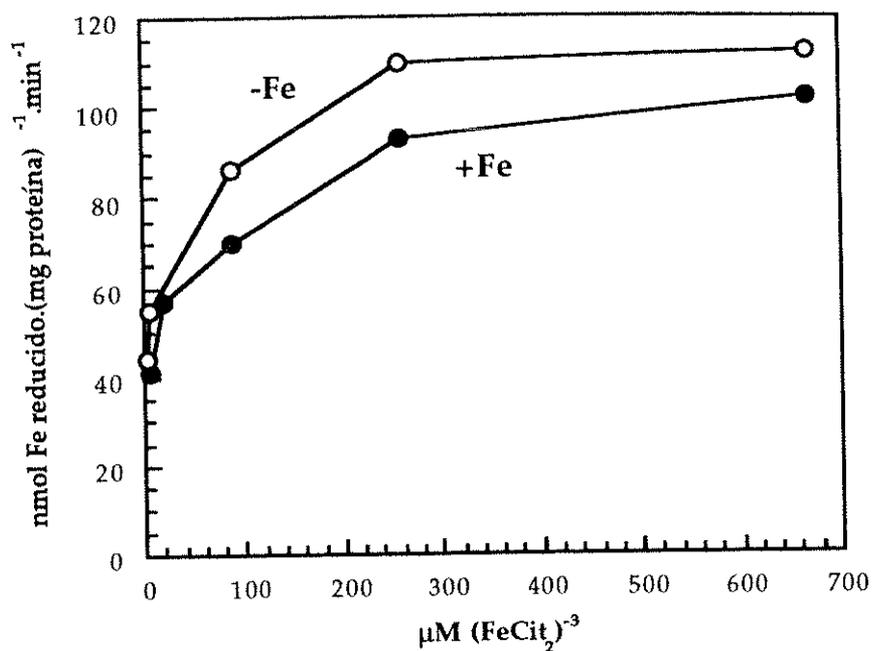
Especie $[\text{FeCit}_2]^{-3}$ 

Figura A15: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con las concentraciones estimadas de la especie $[\text{FeCit}_2]^{-3}$ en el complejo de Fe : citrato (relación 1 : 20). La actividad se midió a pH 6,8.

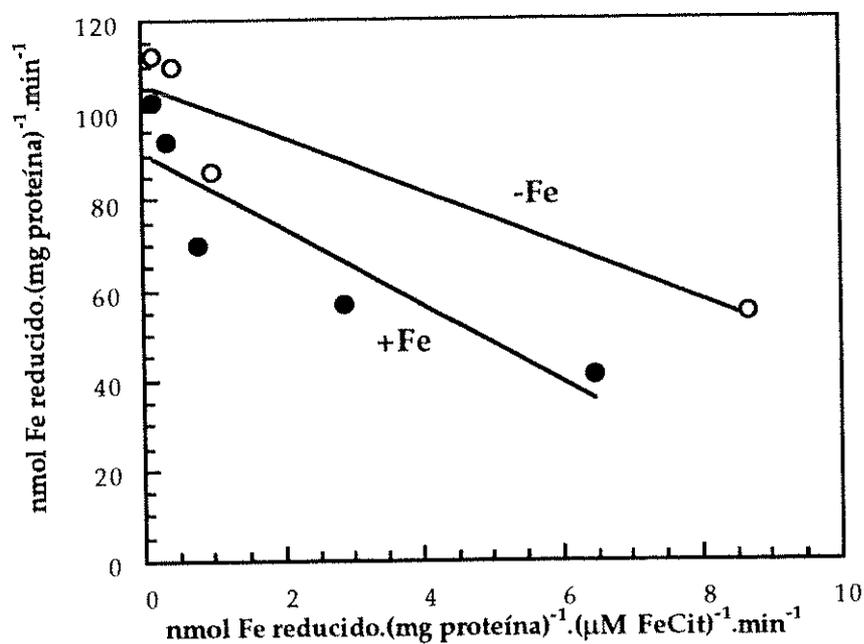


Figura A16: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con las concentraciones estimadas de la especie $[\text{FeCit}_2]^{-3}$ en el complejo de Fe : citrato (relación 1 : 20) (Figura A15).

5.- Cinética para Fe : malato (relación 1 : 25) a pH 6,8 (recalculada)

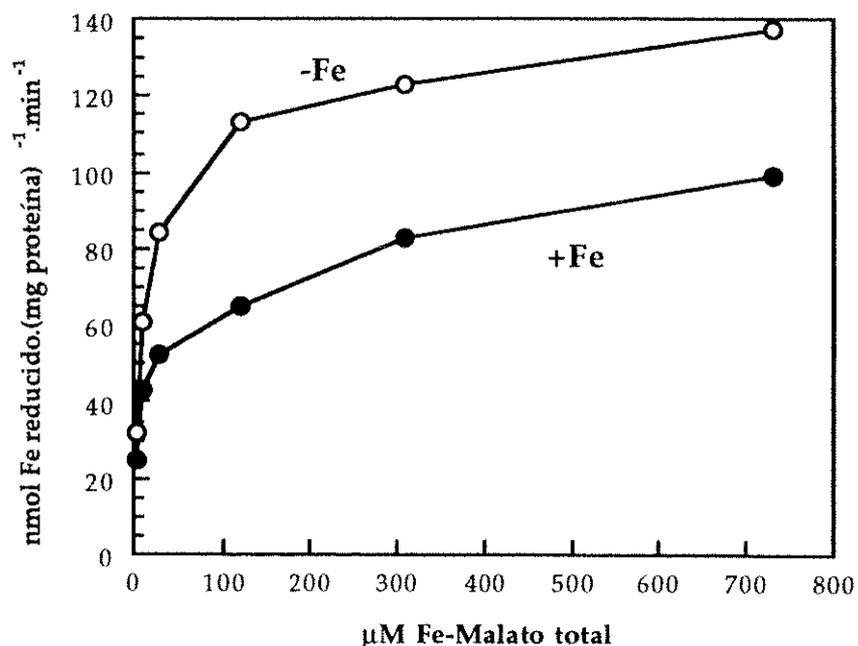


Figura A17: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con diferentes concentraciones del complejo Fe : malato (relación 1 : 25). Las concentraciones totales corresponden a las obtenidas mediante los cálculos de especiación. La actividad se midió a pH 6,8.

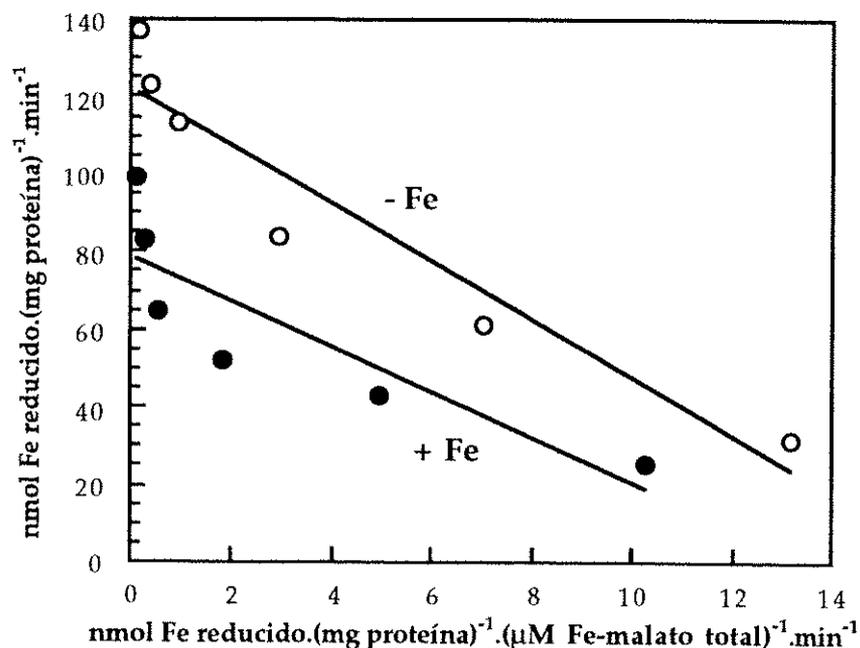


Figura A18: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con diferentes concentraciones del complejo Fe : malato (relación 1 : 25) a pH 6,8 (Figura A17).

6.- Cinética para Fe : malato (relación 1 : 25) a pH 5,5 (recalculada)

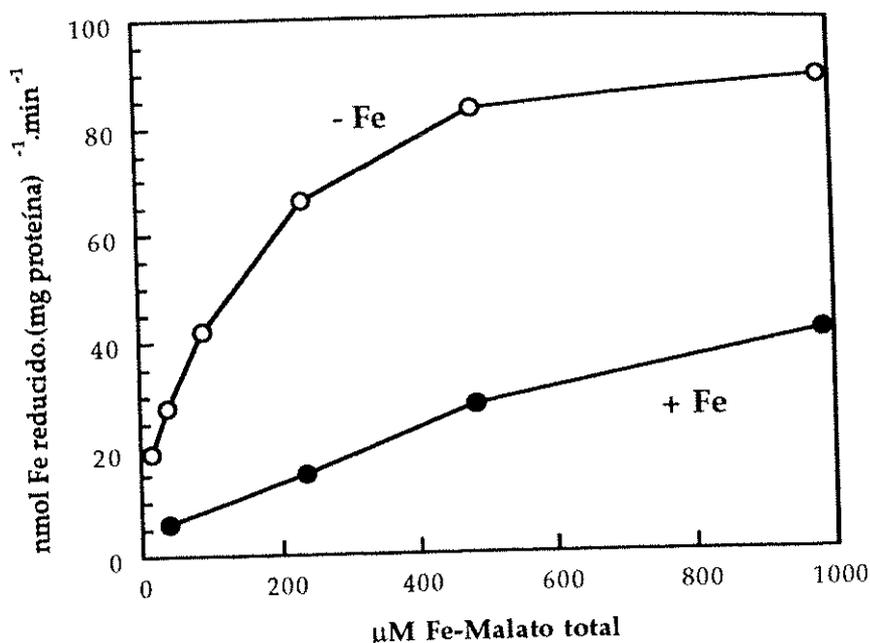


Figura A19: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con diferentes concentraciones del complejo Fe : malato (relación 1 : 25). Las diferentes concentraciones corresponden a las obtenidas mediante los cálculos de especiación. La actividad se midió a pH 5,5.

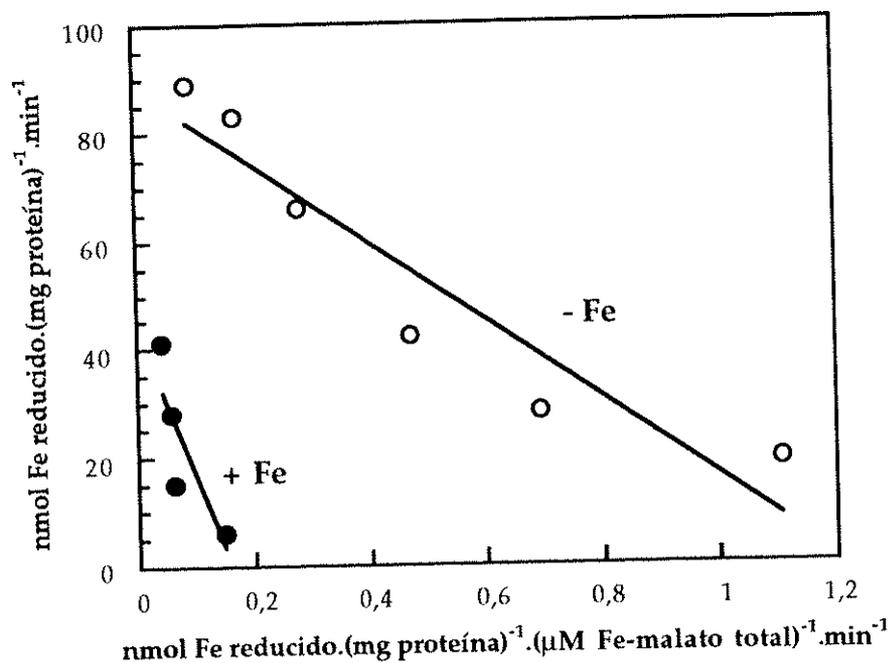


Figura A20: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con diferentes concentraciones del complejo Fe : malato (relación 1 : 25) a pH 5,5 (Figura A19).

7.- Estimación teórica de las cinéticas para las especies mayoritarias de Fe : malato (relación 1 : 25) a pH 6,8

Especie $[\text{FeOHMal}]^0$

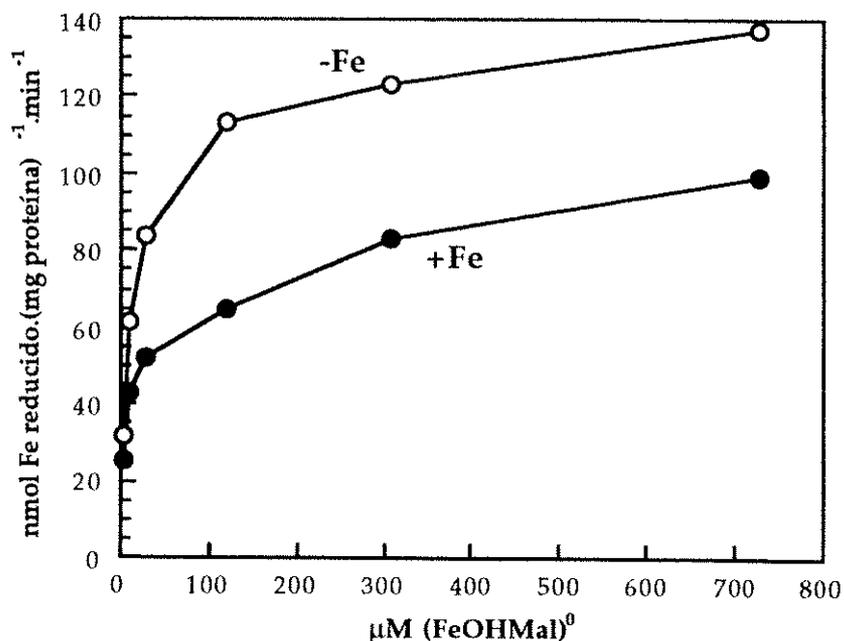


Figura A21: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con las concentraciones estimadas de la especie $[\text{FeOHMal}]^0$ en el complejo de Fe : malato (relación 1 : 25) a pH 6,8.

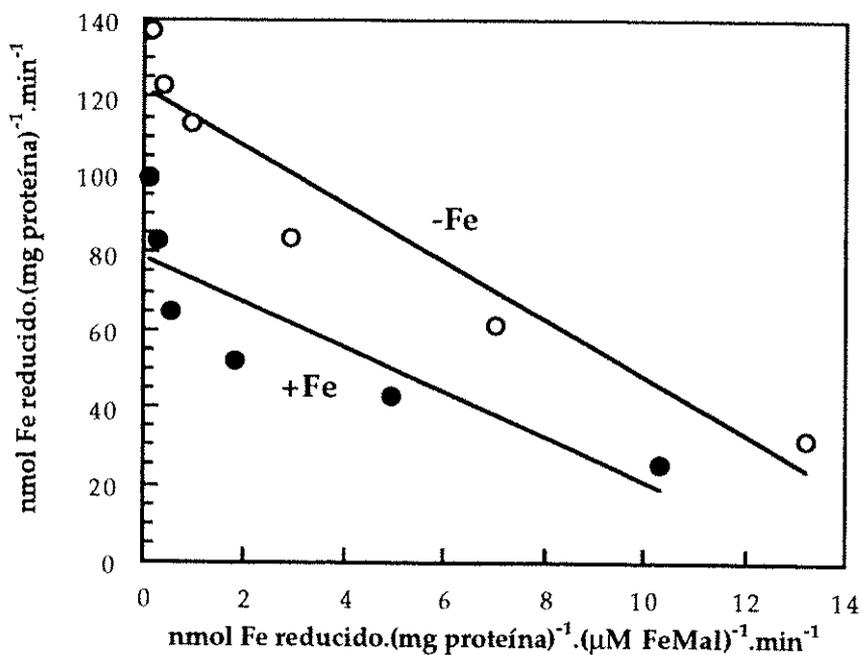


Figura A22: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con las concentraciones estimadas de la especie $[\text{FeOHMal}]^0$ en el complejo de Fe : malato (relación 1 : 25) a pH 6,8 (Figura A21).

Especie (FeMal)⁺¹

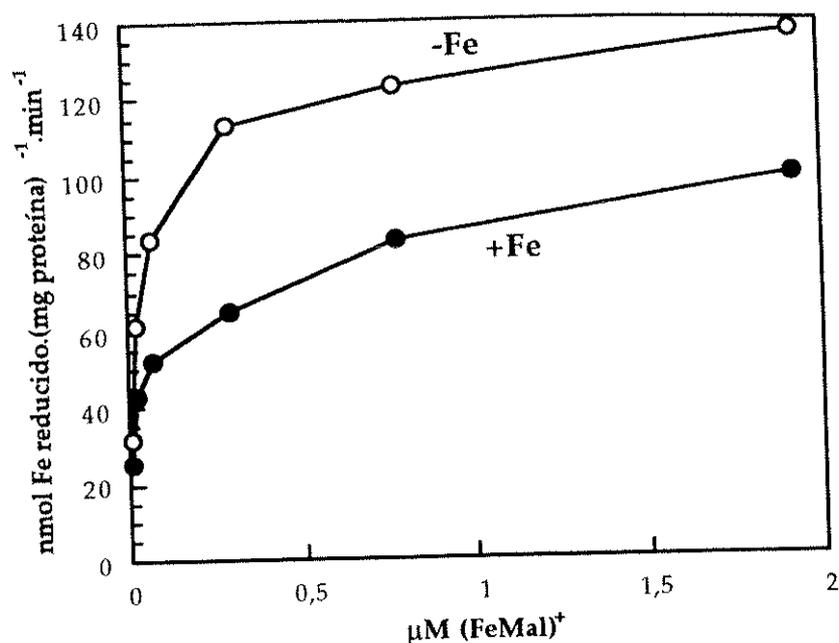


Figura A23: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con las concentraciones estimadas de la especie [FeMal]⁺¹ en el complejo de Fe : malato (relación 1 : 25) a pH 6,8.

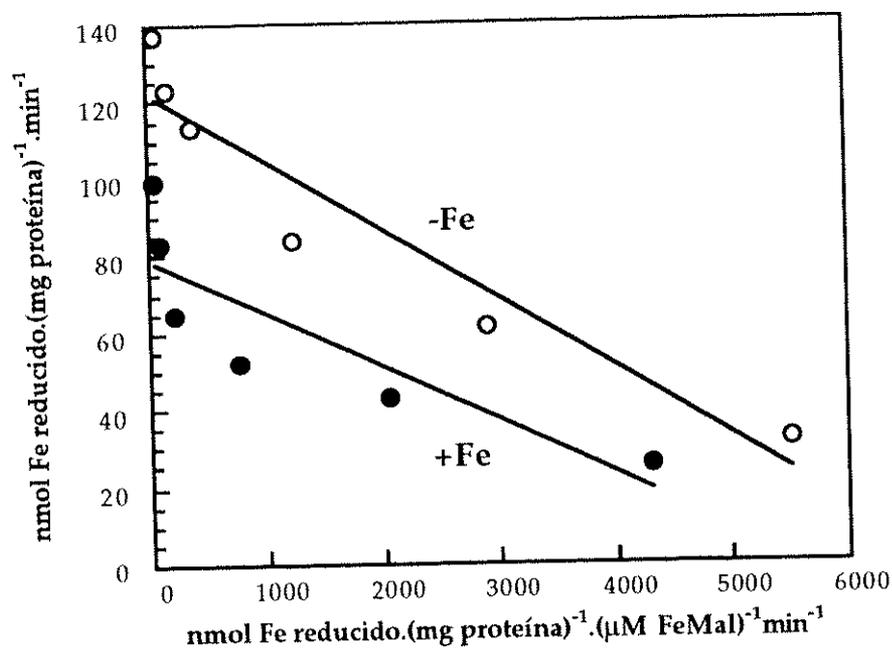


Figura A24: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con las concentraciones estimadas de la especie [FeMal]⁺¹ en el complejo de Fe : malato (relación 1 : 25) a pH 6,8 (Figura A23).

8.- Estimación teórica de las cinéticas para las especies mayoritarias de Fe : malato (relación 1 : 25) a pH 5,5

Especie [FeOHMal]⁰

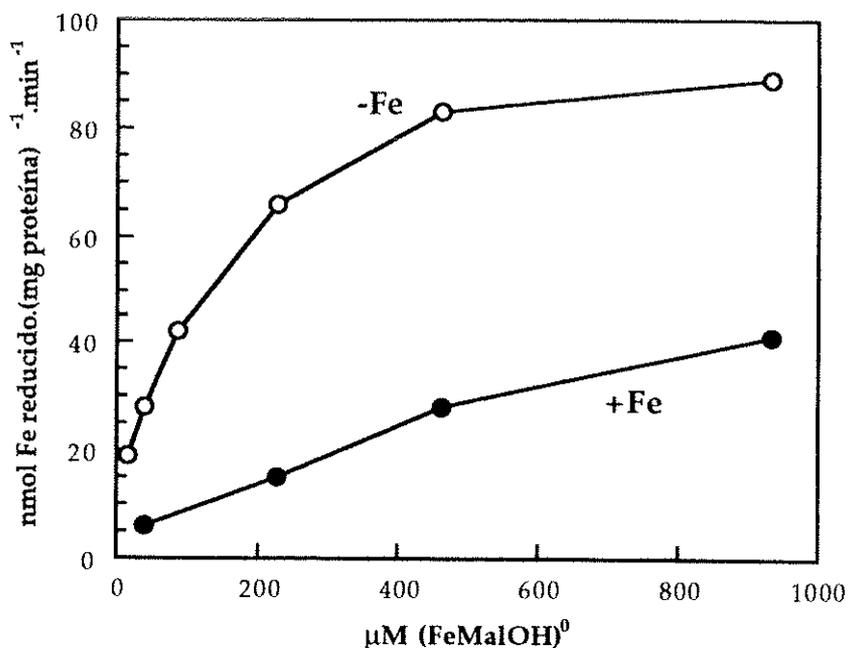


Figura A25: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con las concentraciones estimadas de la especie [FeOHMal]⁰ en el complejo de Fe : malato (relación 1 : 25) a pH 5,5.

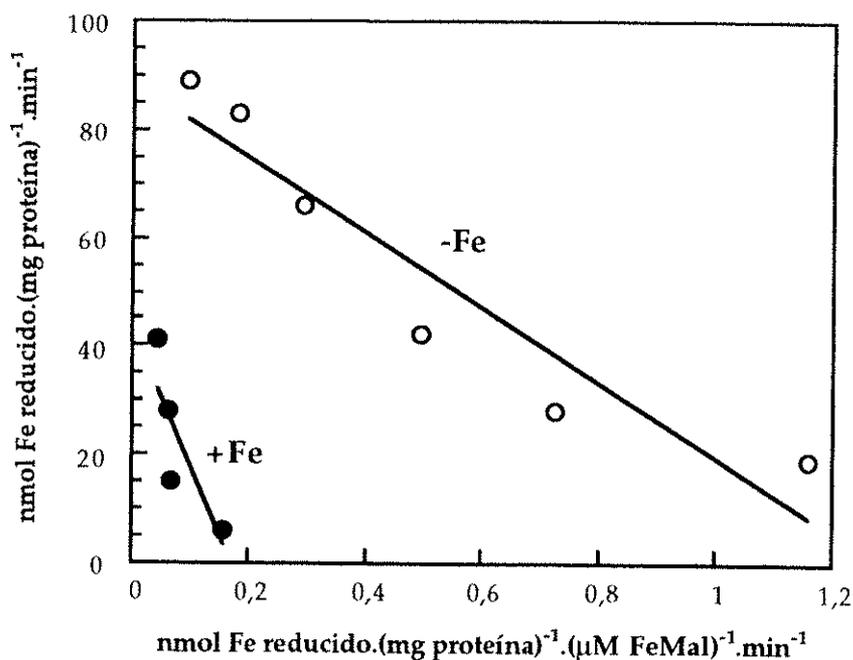


Figura A26: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con las concentraciones estimadas de la especie [FeOHMal]⁰ en el complejo de Fe : malato (relación 1 : 25) a pH 5,5 (Figura A25).

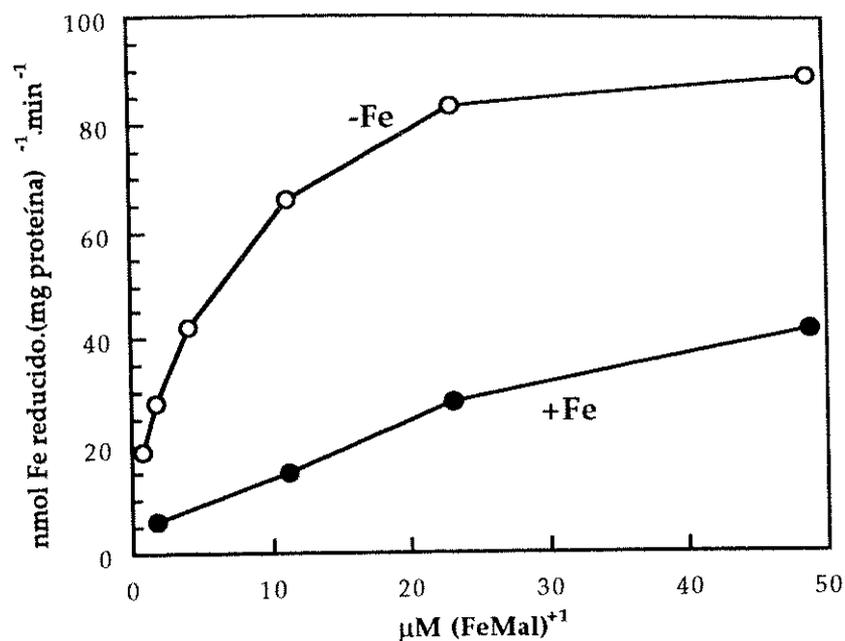
Especie $[\text{FeMal}]^{+1}$ 

Figura A27: Actividad reductasa de la membrana plasmática de hoja con las concentraciones estimadas de la especie $[\text{FeMal}]^{+1}$ en el complejo de Fe : malato (relación 1 : 25) a pH 5,5.

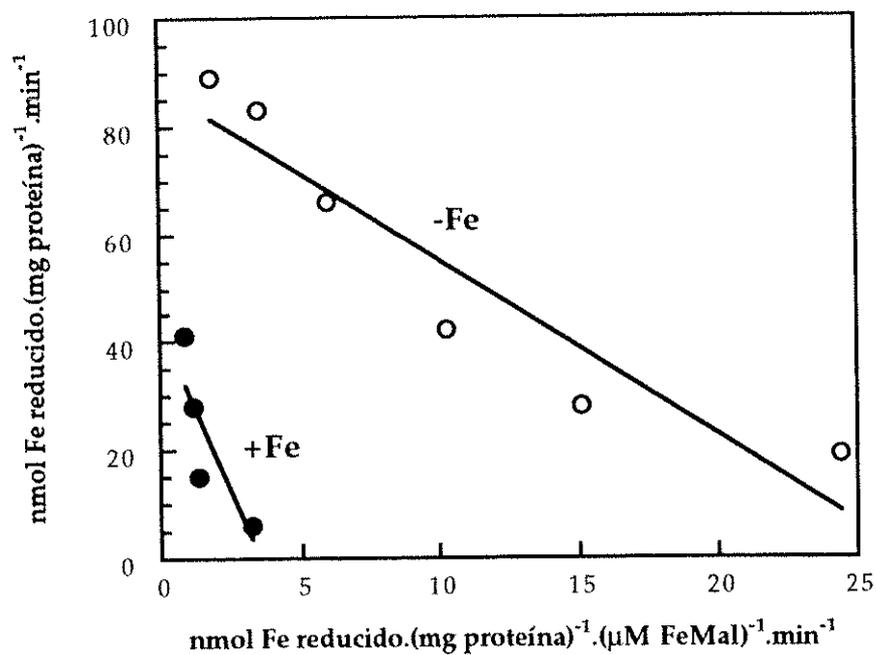


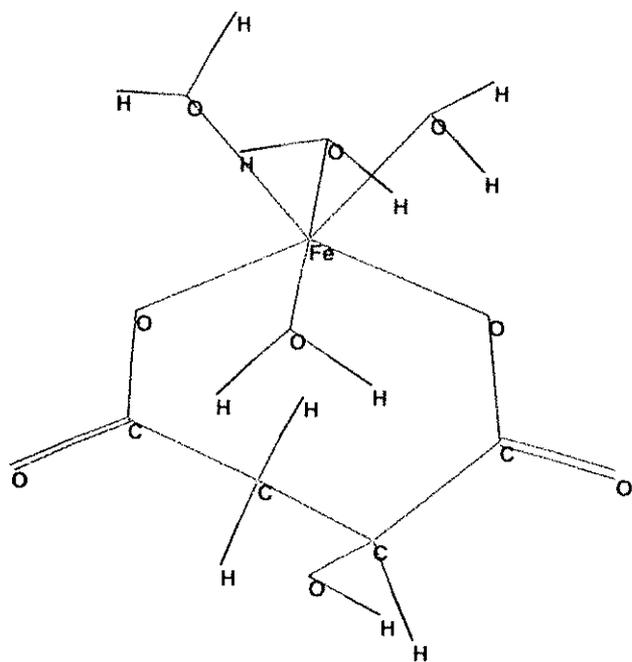
Figura A28: Ajuste de Eadie-Hofstee de los datos de actividad con las concentraciones estimadas de la especie $[\text{FeMal}]^{+1}$ en el complejo de Fe : malato (relación 1 : 25) a pH 5,5 (Figura A27).

ANEXO II

Estructuras de las especies mayoritarias de los complejos de Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato

En este anexo se muestran las estructuras de las especies mayoritarias del complejo Fe(III)-citrato ($[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$, $[\text{FeOHCit}]^{-1}$ y $[\text{FeCit}_2]^{-3}$) y del complejo Fe(III)-malato ($[\text{FeOHMal}]^0$ y $[\text{FeMal}]^{+1}$) obtenidas tal y como se describe en el apartado 3.6.3 de Materiales y Métodos.

1.- (Fe-Mal)⁺¹



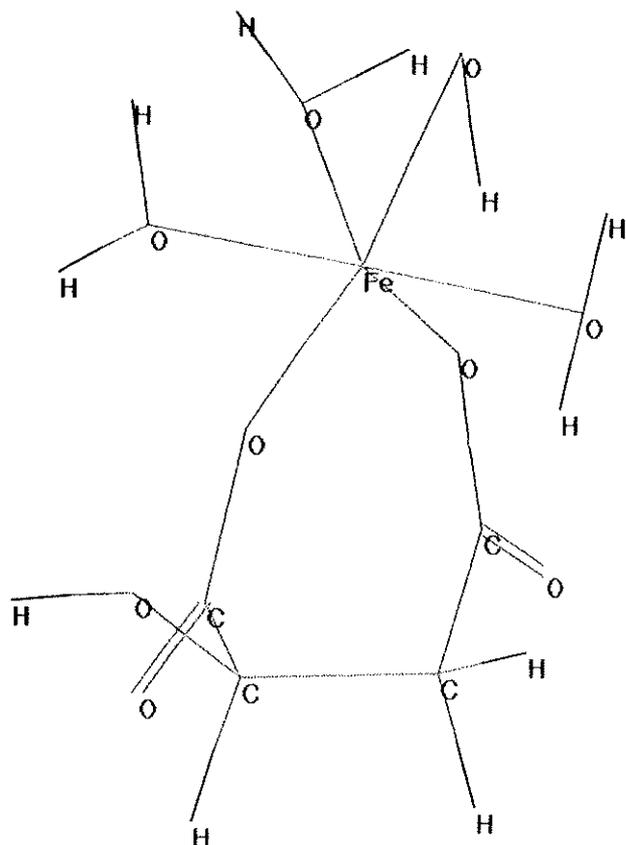
Energía: -417,7 Kcal

Gradiente: 0,5 10⁻⁶ (0,000273)

Converge: Sí (5,4 10⁻⁶ Kcal / Å mol)

2.- (Fe-OH-Mal)

2.1.- Fe-OH. 3H₂O⁺² + Mal⁻². Enlace Fe-OH posición nº 4.

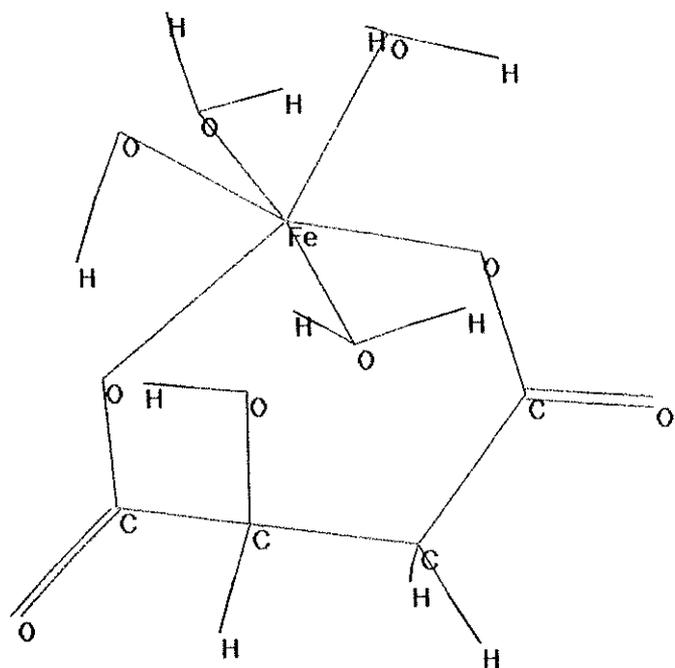


Energía: -1073,4 Kcal

Gradiente: 0,049

Converge: Sí (0,05 Kcal / A mol)

2.2.- Fe-OH. $3\text{H}_2\text{O}^{+2} + \text{Mal}^{-2}$. Enlace Fe-OH posición nº 6.

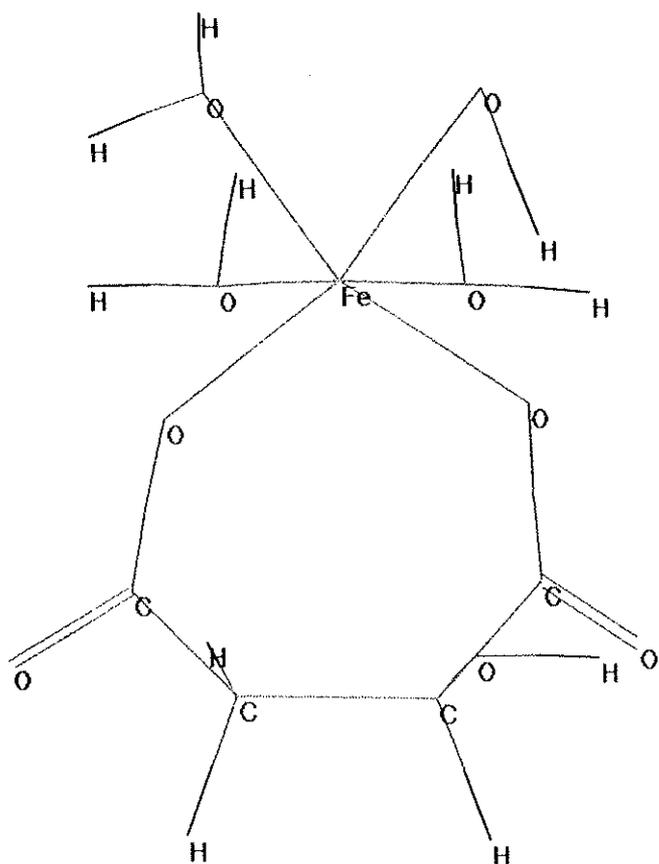


Energía: -2.220,25 Kcal

Gradiente: 0,00005 total (0,000249)

Converge: Sí ($5 \cdot 10^{-6}$ Kcal/Å mol)

2.3.- Fe-OH. $3\text{H}_2\text{O}^{+2} + \text{Mal}^{-2}$. Enlace Fe-OH posición nº 3.

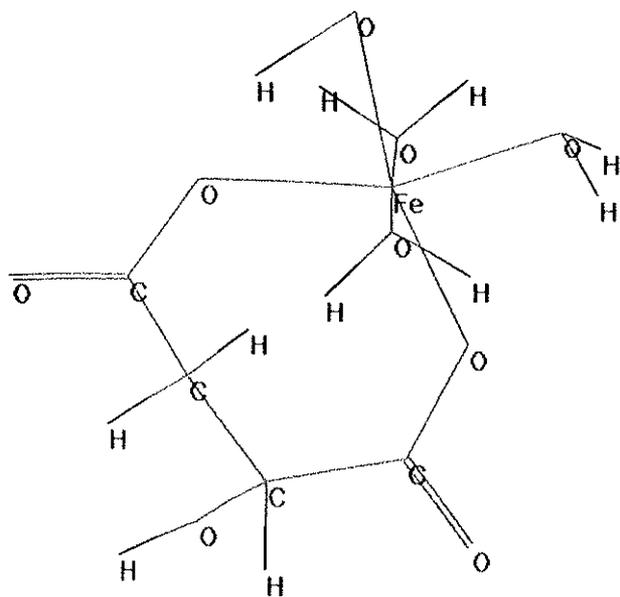


Energía: -1.772,4 Kcal

Gradiente: 0,000005 total (0,000144)

Converge: Sí ($5 \cdot 10^{-6}$ Kcal /Å mol)

2.4.- Fe-OH. $3\text{H}_2\text{O}^{+2} + \text{Mal}^{-2}$. Enlace Fe-OH posición n° 7.



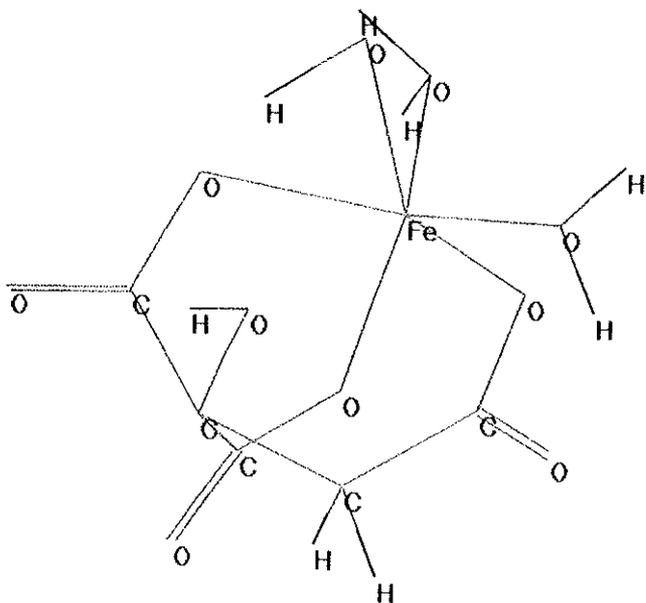
Energía: -1.449,1 Kcal

Gradiente: 0,000005 (0,000187)

Converge: Sí ($5 \cdot 10^{-6}$ Kcal / Å mol)

3.- [Fe-OH-Cit]⁻¹

3.1.- Fe-OH. $2\text{H}_2\text{O}^{+2} + \text{Cit}^{-3}$ (3 -COO⁻). Enlace Fe-OH posición n° 3.

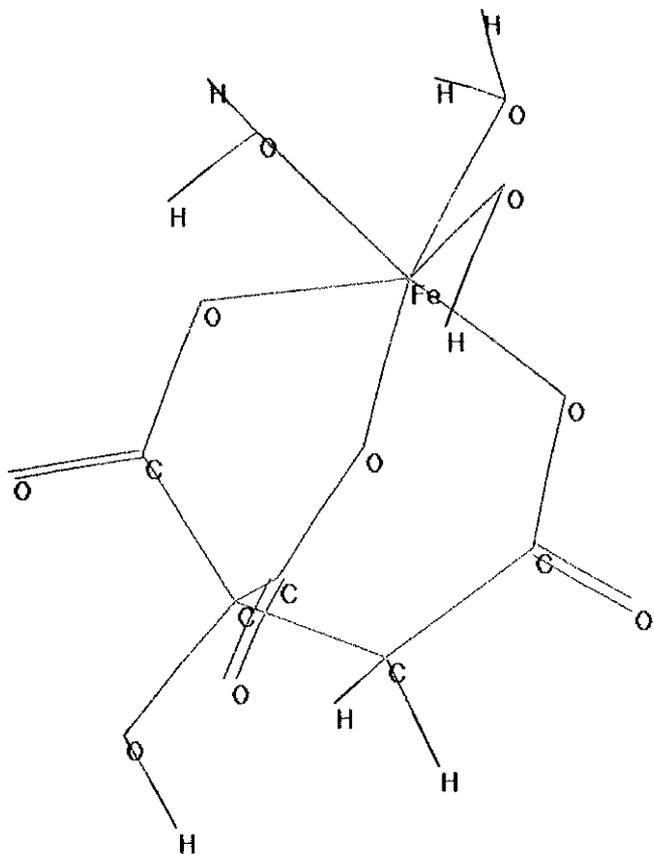


Energía: -1411,0 Kcal.

Gradiente: 0,000005 (0,000574)

Converge: Sí ($5 \cdot 10^{-6}$ Kcal/ Å mol)

3.2.- Fe-OH. 2H₂O⁺² + Cit⁻³ (3 -COO⁻). Enlace Fe-OH posición n° 6

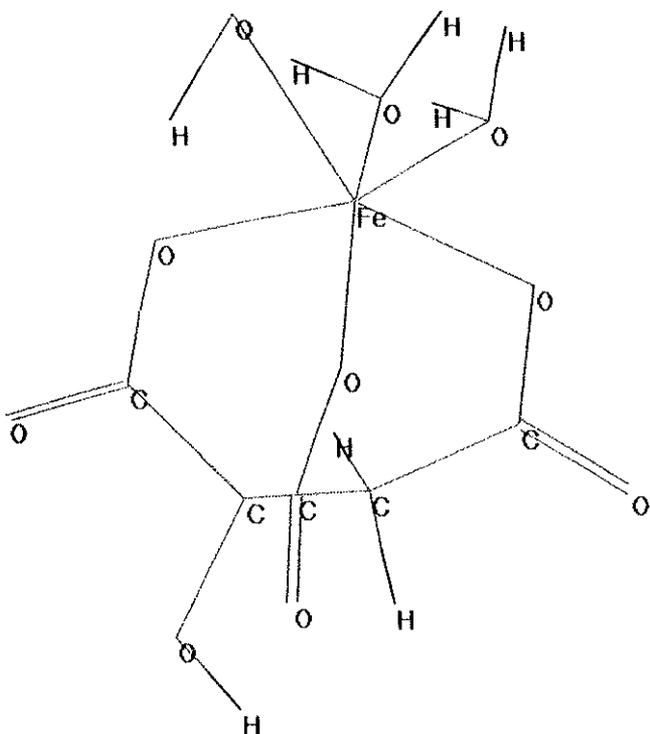


Energía: -1.971,3 Kcal

Gradiente: 0,018

Converge: Sí (0,02 Kcal/ A mol)

3.3.- Fe-OH. 2H₂O⁺² + Cit⁻³ (3 -COO⁻). Enlace Fe-OH posición n° 4

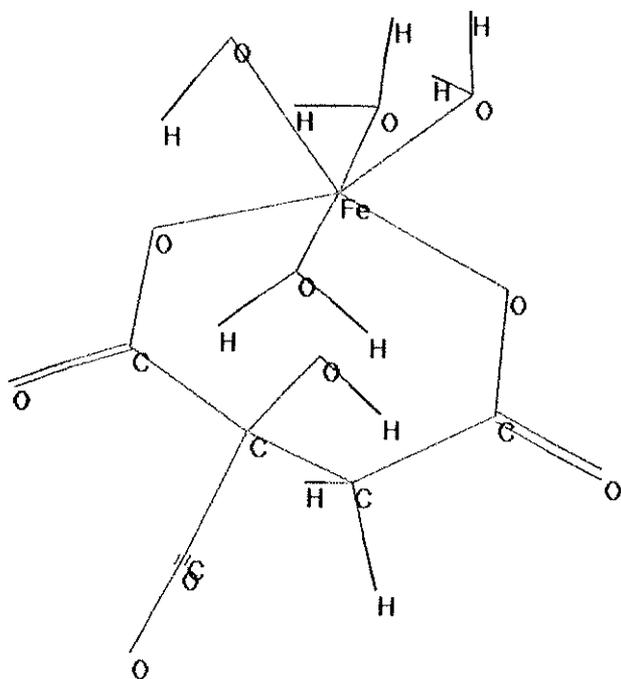


Energía: -817,3 Kcal

Gradiente: 0,0327

Converge: Sí (0,1 Kcal/ A mol)

3.4.- Fe-OH. 3H₂O⁺² + Cit⁻³ (2 -COO⁻). Enlace Fe-OH posición n° 10. Enlace Fe-Cit posiciones n° 14 y 21.

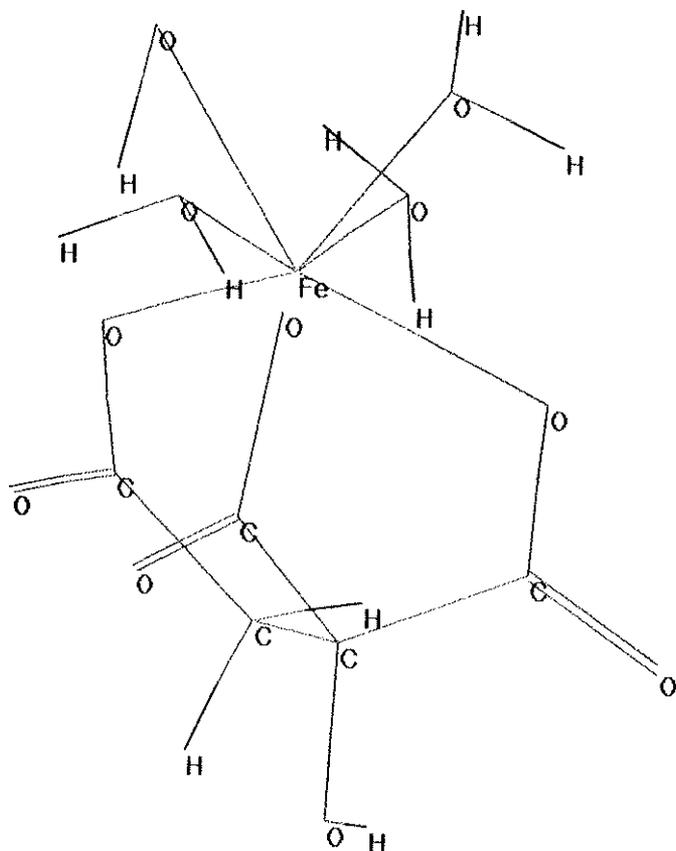


Energía: -1.649,9 Kcal.

Gradiente: 0,00793

Converge: Sí (0,008 Kcal/ A mol)

3.5.- Fe-OH. 3H₂O⁺² + Cit⁻³ (2 -COO⁻). Enlace Fe-OH posición n° 4. Enlace Fe-Cit posiciones n° 26 y 21.

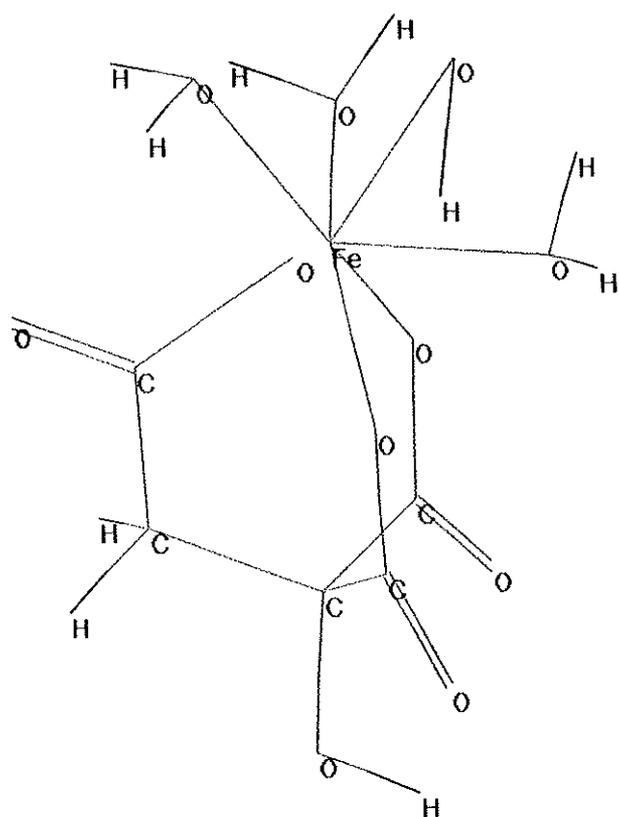


Energía: -1.834,2 Kcal.

Gradiente: 0,197

Converge: Sí (0,2 Kcal/A mol)

3.6.- $\text{Fe-OH} \cdot 3\text{H}_2\text{O}^{+2} + \text{Cit}^{-3} (2-\text{COO}^-)$. Enlace Fe-OH posición n° 4. Enlace Fe-Cit posiciones n° 26 y 14.



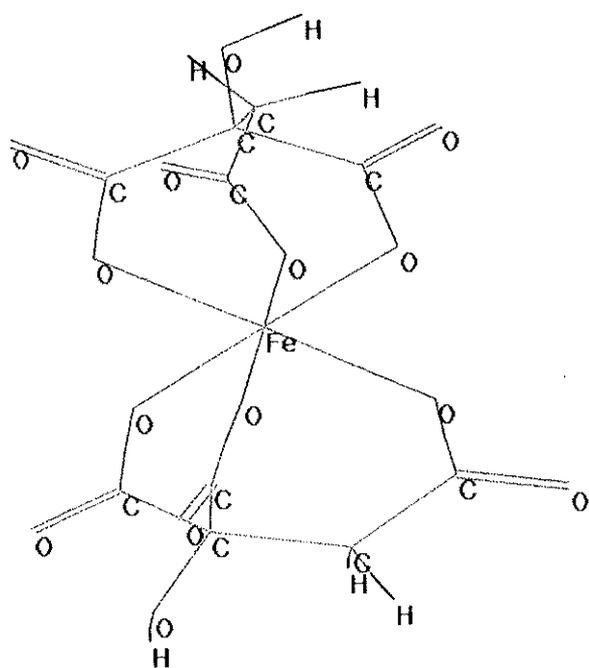
Energía: -1.995,4 Kcal.

Gradiente: 0,11

Converge: Sí (0,12 Kcal/A mol)

4.- $[\text{Fe-Cit}_2]^{-3}$

4.1.- $\text{Fe}^{+3} - (2 \text{ Cit})^{-6} (6-\text{COO}^-)$.

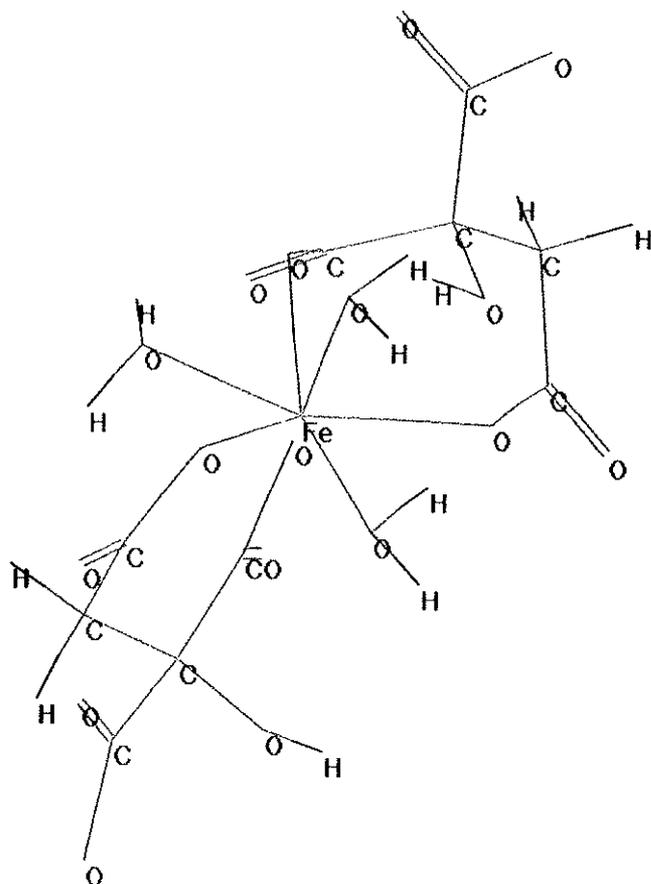


Energía: 1591,6 Kcal.

Gradiente: 0,0074

Converge: Sí (0,05 Kcal/A mol)

4.2.- Fe. $3\text{H}_2\text{O}^{+3} - (2 \text{Cit})^{-6} (3\text{-COO}^-)$. Enlace Fe-Cit posiciones, 34-28 y 21-17.



Energía: -1981,2 Kcal.

Gradiente: 0,00998

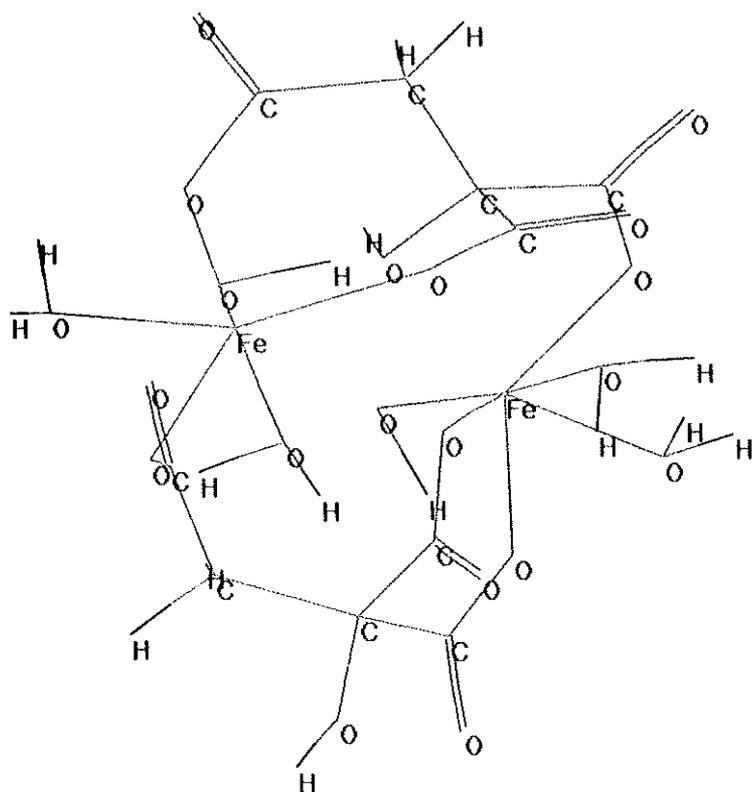
Converge: Sí (0,1 Kcal/ Amol)

5.- $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{Cit}_2]^{-2}$

5.1.- $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} (2 \times 2\text{H}_2\text{O})]^{+4} + 2\text{Cit}^{-6}$. Posiciones de los diferentes enlaces;

Fe-Cit: 27, 20, 42.

Fe-Cit: 32, 36, 47.



Energía: -3.331,3 Kcal.

Gradiente: (0,47)

Converge: Sí (0,5Kcal/Amol)

DISTANCIAS (EN Å) ENTRE LOS DIFERENTES ENLACES.

ENLACE	DISTANCIA
Fe - OH ₂	1,85
Fe - OH	1,85 - 2,01
Fe - OCO ⁻	1,90 - 2,07
C - C	1,55
C - O	1,35 - 1,40
C = O	1,21
O - H	0,94
C - H	1,11

PUBLICACIONES

PUBLICACIONES

Trabajos de investigación

- 1 **González-Vallejo EB, Susín S, Abadía A, Abadía J**
(1998)
Changes in sugar beet leaf plasma membrane Fe(III)-chelate reductase activities mediated by Fe-deficiency, assay buffer composition, anaerobiosis and the presence of flavins.
Protoplasma 205: 163-168

- 2 **González-Vallejo EB, González-Reyes JA, Abadía A, López-Millán AF, Yunta F, Lucena JJ, Abadía J**
(1999)
Reduction of ferric chelates by leaf plasma membrane preparations from Fe-deficient and Fe-sufficient sugar beet.
Enviado a **Australian Journal of Plant Physiology**

- 3 **González-Vallejo EB, Morales F, Abadía A, Abadía J**
(1999)
Iron deficiency decreases the Fe(III)-chelate reducing activity of leaf protoplasts
Enviado a **Plant Physiology**

- 4 **González-Vallejo EB, González-Reyes JA, Abadía A, Abadía J**
(1999)
Effects of Brij-58 on the Fe(III)-chelate reducing activity of sugar beet leaf plasma membranes
En preparación para enviar a **FEBS Letters**
- 5 **González-Vallejo EB, Abadía J, Abadía A**
(1999)
Effects of Fe deficiency on the polypeptide composition of sugar beet leaf plasma membranes
En preparación
- 6 **González-Vallejo EB, Abadía J, Abadía A**
(1999)
Effects of Fe deficiency on the polypeptide composition of sugar beet root tips
En preparación

Trabajos presentados en congresos

- 1997 9th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants.** Hohenheim, Germany.

González-Vallejo EB, Abadía A, González-Reyes JA, Abadía J. Characterization of the Fe(III)-chelate reductase activities of plasma membrane preparations isolated from leaves of iron-sufficient and iron-deficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.). (*Comunicación / Poster*).

- 1998 International Conference "Plasma membrane redox systems and their role in biological stress and disease".** Antwerp, Bélgica.

González Vallejo EB, Abadía A, González-Reyes JA, Lucena JJ, Abadía J. Fe(III)-chelate reductase activities of plasma membrane preparations affected by iron deficiency in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. (*Comunicación / Poster*)

- 1998 VII Simposio Nacional-III Ibérico sobre Nutrición Mineral de las Plantas.** Madrid, España.

González-Vallejo EB, Abadía A, Herbig A, Stephan U, Rémy R, Abadía J. Determinación de patrones polipeptídicos de raíz de remolacha (*Beta vulgaris* L.) en condiciones de deficiencia de Fe. (*Comunicación / Poster*)