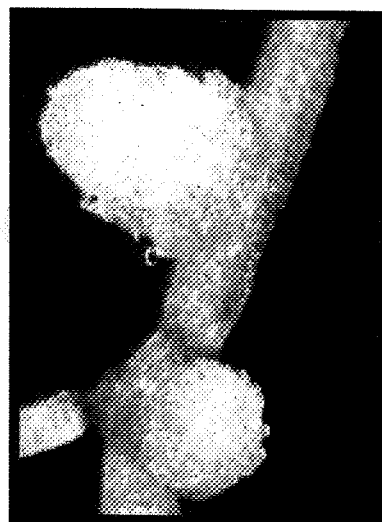


Tesis Doctoral

Enzimas Antioxidantes en Leguminosas



María Rebeca Clemente Gallardo

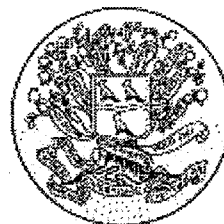


1104524
CB 401746

TD-2005-



Consejo Superior de Investigaciones Científicas



Departamento de Nutrición Vegetal
Estación Experimental de Aula Dei
Zaragoza



Tesis Doctoral

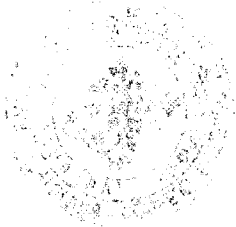
Enzimas Antioxidantes en Leguminosas

Memoria presentada por Dña. María Rebeca Clemente Gallardo

Licenciada en Ciencias, Sección Químicas, para optar al grado de
Doctor en Ciencias

Zaragoza, Octubre de 2005

R-11.957



Portada:

parte superior: nódulos fijadores de nitrógeno de alfalfa (Mark Dudley) <http://cmgm.stanford.edu/~mbarnett/genome.htm>.

parte inferior (de izda a dcha):

Pisum sativum (Steve Reynolds) <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/gallery/pictures/pisumsat/pisumsat>.

Lotus japonicus <http://www.cilr.uq.edu.au/resources/infosheets/Lotus%20S4.pdf>.

Medicago sativa (Dr. M. Halling) <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/gallery/pictures/medsat/medsat.htm>

Contraportada (comenzando por la parte superior):

Flor de *M. sativa* (©1998, Oregon St. Univ) <http://alfalfa.okstate.edu/images/flowers/alfalfa-08.htm>.

Flor de *L. japonicus* (Makoto Endo) <http://www.cilr.uq.edu.au/resources/infosheets/Lotus%20S4.pdf>.

Flor de *P. sativum* (Hugh Wilson) <http://botany.cs.tamu.edu/FLORA/dcs420/b/hdw070699ks.jpg>.

D. Manuel Becana Ausejo, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Enzimas Antioxidantes en Leguminosas” ha sido realizada por la Licenciada en Ciencias Químicas Dña. María Rebeca Clemente Gallardo 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, Octubre de 2005

Dr. Manuel Becana Ausejo

“...el principio nunca ha sido la punta nítida y precisa de un hilo, el principio es un proceso lentísimo, demorado, que exige tiempo y paciencia para percibir en qué dirección quiere ir, que tantea el camino como un ciego, el principio es sólo el principio, lo hecho vale tanto como nada...”

José Saramago. La caverna

Agradecimientos

Estas páginas no son, en absoluto, un fiel reflejo de mis sentimientos hacia todos los que con su esfuerzo y su cariño han hecho posible este trabajo. Espero que todos sepan disculpar mi pudor a la hora de expresar explícitamente mi afecto por ellos; sobre todo, algunos de los compañeros a los que más he querido, que son mis amigos, mi segunda familia. Ojalá en el futuro tenga la oportunidad de agradecerles como se merecen, no sólo con unas palabras inevitablemente pobres, todo lo que he podido aprender y crecer gracias a ellos estos años.

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Manuel Becana Ausejo sus enseñanzas y su gran capacidad de trabajo. Él ha sido mi director de tesis y el investigador principal de los proyectos de investigación que han contribuido a la financiación de este trabajo: 2FD97-1101, PB98-0522 (por el que obtuve una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador FP99-25170699) y AGL2002-02876. Estos proyectos y las ayudas para las estancias en el extranjero fueron financiados por el Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) y Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER). También he de citar el proyecto E33 (Grupo de Investigación Consolidado) financiado por el Gobierno de Aragón-Fondo Social Europeo. Asimismo, quiero agradecer a la Estación Experimental de Aula Dei el haberme permitido utilizar sus instalaciones para la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio deseo agradecerles TODO; con ellos he compartido muchísimo tiempo (siempre maravilloso) y muchísimas conversaciones personales y científicas. Sin embargo, fundamentalmente, les quiero pedir perdón porque el nombre de muchos de ellos debería figurar en la portada de este trabajo en letras muy grandes. Por orden de incorporación al grupo fueron/son: Fer, Gloria, Iñaki I., Manu, MC, Javier, Carmen, Loreto y Jorge L. A Fer y Manu les quiero agradecer ser mis primeros maestros cuando llegué al laboratorio, a Gloria su ánimo los primeros años, a Iñaki (y a Bego, claro) su apoyo al comenzar a trabajar con proteínas recombinantes, a MC su AYUDA (con mayúsculas enormes) en Minneapolis, a Javier una parte de los resultados de este trabajo, a Carmen su esfuerzo con el HPLC y la maquetación de esta memoria (pero sobre todo tener a Víctor...), a Loreto su entrega en todos los sentidos y a Jorge L., a quien tuve que enseñar alguna cosilla cuando llegó a Aula Dei, ser una de las personas de quien más he aprendido aquí.

También deseo hacer constar mi gratitud a todos los grupos/investigadores con los que hemos colaborado durante este tiempo. Al Dr. Euan James (Centre for High Resolution, Imaging and Processing, University of Dundee, Reino Unido) quiero agradecerle sus maravillosas imágenes de microscopía electrónica. Al Dr. J. Abián (Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Barcelona) sus análisis por espectrometría de masas para confirmar la identidad de las PCs y hPCs. A M. Viribay (Applied Biosystems), su ayuda con nuestras primeras qRT-PCRs. Al equipo del Dr. Tabata (DNA Research Institute, Kazusa, Japón) la valiosísima información que nos han proporcionado sobre secuencias génicas y de cDNA de *Lotus*. Y por

último, y muy especialmente, al Dr. Carroll P. Vance y a todo su grupo (Department of Agronomy and Plant Genetics, University of Minnesota, EEUU) el darme la oportunidad de conocerles y de trabajar con ellos en su laboratorio, de saber qué se siente por debajo de -20°C y, por encima de todo, de encontrar a Xilitl M^a Ángeles y Alonso. De todo su grupo de investigación, la Dra. Maria Fedorova y, ¡cómo no!, Dra. Bruna Bucciarelli se merecen ocupar un lugar muy, muy especial por su inestable ayuda con hibridaciones *in situ*.

Al resto de mis compañeros de la Estación Experimental de Aula Dei les quiero agradecer todo su apoyo siempre imprescindible, y tantas charlas en el 28. Con todos ellos he compartido equipos e instalaciones y aprendido que el trabajo de cada uno, sin excepción, es valioso. Sofia A. y Raquel, me han acompañado animado desde que llegué, juntas atravesamos el “pequeño trance” del DEA. Con Victoria y Olfa, compañeras de despacho, he compartido poco tiempo, pero la calidad (su calidez) hace que la cantidad importe. A todos los que han sufrido estoicamente que terminase de comerme el yoghurt, también les quiero agradecer (además de admirar) la paciencia. Muchos me recibieron a mí: Fermín, Ana Flor, Yolanda, Tamara Mariví L. y Miguel ya estaban aquí cuando yo llegué. También estaban David M., Ajmi, Roberto, Yolanda Marta,... bueno, y Pili, Susana, M^a Ángeles, André y Maya; todos ellos se marcharon ya. A otros los recuerdo, hace ya bastante tiempo en algunos casos: Yi-Chieh, Rebeca y Curra (que tampoco están ya), Ana Píluca, María B, Sergio, Meriam y Jorge af. Otros llegaron hace menos tiempo (aunque a alguno le parezca una eternidad): Manuel, Rubén, mi prima Irene, Iñaki T., Ade, Víctor, Sofia y Bea. A los que han estado a mi lado tantas veces el rato de una infusión a media mañana o después de comer, quiero agradecerles estupenda compañía: Aurora, Mariví R., M^a Ángeles G., y Tere. Aquí tampoco puedo olvidarme de: Mar Sara, María S. y Ruth, ni de Merche, María M., Samia y Alfonso. No puedo terminar sin agradecer a Dra. Ana Casas toda su generosidad y sus consejos, y a la Dra. Ana Castillo su interés y su apoyo con células Sf21. Finalmente, gracias al trabajo del personal de la unidad de apoyo de biblioteca, del servicio de informática y del de administración y servicios y (cómo olvidarla) gracias al trabajo de Conchita, porque el esfuerzo de todos ellos el mío no hubiera sido posible.

A todas las personas que han colaborado en algún momento con “FJI-Precarios” (“Ningún Investigador sin Contrato”), les agradezco su esfuerzo por reivindicar los derechos laborales de los investigadores que están empezando; y digo empezar porque formarse también lo hacen todos los buenos investigadores conozco por mucha experiencia que hayan acumulado. Para muchas personas la investigación nunca es sólo un trabajo; pero eso no justificará jamás que quienes empiezan sólo puedan decir que tienen mucho trabajo (Investigar es Trabajar) pero no que tienen UN TRABAJO. Mi gratitud pero, fundamentalmente a amistad a: Miguel (“maguado”), Ana, Yago, M^a José, Álvaro, Laura, José Luis, David G. (y Caro, “preca consorte-amiga siempre) y, por supuesto, Esther.

Victor Hugo escribió “ La dicha suprema de la vida es la convicción de que somos amados, amados nosotros mismos; mejor dicho, amados a pesar de nosotros;...”. A mi familia, a quienes dedico este trabajo con todo mi amor, les agradezco que me hayan permitido tener siempre esa convicción y aprender sufriendo unidos crecen los amores...

Abreviaturas

DDC	Dietilditiocarbamato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DPI	Difenileniodonio
DTE	Ditioeritritol
DTPA	Ácido dietilentriaminopentaacético
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPDS	Ácido <i>N</i> -[2-hidroxi-etil]piperacina- <i>N'</i> -3-propanosulfónico
EtBr	Bromuro de etidio
EtOH	Etanol
γ EC	γ -glutamilcisteína
γ ECS	γ -glutamilcisteína sintetasa
Ac	Acetato
(h)GSH	(Homo)glutación
(h)GSHS	(Homo)glutación sintetasa
(h)PC	(Homo)fitoquelatina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosido
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
P _i	Tampón fosfato
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MBB	Monobromobimano
MBP	Proteína de unión a la maltosa
MOPS	Ácido 3-(<i>N</i> -Morpholino)propanosulfónico
MTm	Millones de toneladas métricas
OASTL	<i>O</i> -acetilserina (tiol)liasa
ORF	Marco abierto de lectura
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCS	Fitoquelatina sintasa
PF	Peso fresco
<i>psl</i>	<i>"phytochelatín synthase-like"</i>
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SOD	Superóxido dismutasa
TAC	<i>Transformation-competent Artificial Chromosome</i>
TFA	Ácido trifluoroacético

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Fijación biológica de nitrógeno.....	3
1.1.1. Consideraciones generales sobre la fijación de nitrógeno.....	3
1.1.2. Organismos fijadores de nitrógeno.....	4
1.1.2.1. Fijadores de vida libre y en simbiosis.....	4
1.1.2.2. Simbiosis rizobio-leguminosa.....	5
1.1.2.3. Leguminosas modelo.....	6
1.1.3. Estructura del nódulo de las leguminosas.....	7
1.1.3.1. Interacción rizobio-leguminosa.....	7
1.1.3.2. Desarrollo del nódulo.....	8
1.1.3.3. Nódulos determinados e indeterminados.....	9
1.1.4. Fisiología del nódulo.....	11
1.1.4.1. Fijación y asimilación de nitrógeno.....	11
1.1.4.2. El problema del oxígeno.....	13
1.2. Especies reactivas de oxígeno.....	14
1.2.1. Generación de especies reactivas de oxígeno.....	14
1.2.1.1. Cloroplasto.....	15
1.2.1.2. Mitocondria.....	16
1.2.1.3. Peroxisoma.....	16
1.2.1.4. Apoplasto.....	17
1.2.2. Efectos de las especies reactivas de oxígeno.....	18
1.2.2.1. Daño oxidativo.....	19
1.2.2.2. Señalización molecular.....	20
1.2.3. Especies de oxígeno en leguminosas.....	22
1.3. Sistemas antioxidantes en plantas.....	24
1.3.1. Metabolitos antioxidantes.....	24
1.3.1.1. Metabolitos hidrofóbicos.....	24
1.3.1.2. Ascorbato.....	25

1.3.1.3. Glutati3n.....	25
1.3.2. Prote3nas antioxidantes.....	27
1.3.2.1. Super3xido dismutasas.....	27
1.3.2.2. Ciclo ascorbato-glutati3n.....	27
1.3.2.3. Catalasas.....	28
1.3.2.4. Glutati3n peroxidasas.....	28
1.3.2.5. Peroxirredoxinas.....	28
1.3.2.6. Ferritina.....	29
1.3.3. Prote3nas antioxidantes en el n3dulo.....	29
1.4. Metabolismo de tioles.....	31
1.4.1. Bios3ntesis de ciste3na.....	31
1.4.2. Bios3ntesis de glutati3n y homoglutati3n.....	32
1.4.2.1. Tiol sintetetas.....	32
1.4.2.2. Regulaci3n de la s3ntesis de (homo)glutati3n.....	33
1.4.3. Funciones del glutati3n.....	34
1.4.4. Bios3ntesis de fitoquelatinas.....	37
1.4.4.1. Metales pesados: toxicidad y tolerancia.....	37
1.4.4.2. Fitoquelatinas.....	37
1.4.4.3. Fitoquelatinas sintetas.....	38
1.4.4.4. Regulaci3n de la bios3ntesis de fitoquelatinas.....	39
1.5. Super3xido dismutasas.....	39
1.5.1. La familia de las super3xido dismutasas.....	39
1.5.2. Localizaci3n de las super3xido dismutasas.....	40
1.5.2.1. FeSODs.....	41
1.5.2.2. MnSODs.....	41
1.5.2.3. CuZnSODs.....	42
1.5.3. Efecto de los estreses ambientales.....	43
2. OBJETIVOS.....	47
3. MATERIALES Y M3TODOS.....	51
3.1. Reactivos qu3micos, bioqu3micos y de biolog3a molecular.....	51
3.2. Material biol3gico.....	51
3.3. Cultivo de plantas y rizobios.....	52
3.3.1. Plantas.....	52
3.3.1.1. <i>Lotus</i>	52
3.3.1.2. Otras leguminosas.....	53
3.3.2. Rizobios.....	53
3.4. Cultivos de <i>E. coli</i>	55
3.5. Determinaci3n del contenido de tioles y fitoquelatinas en <i>Lotus</i>	55
3.5.1. Contenido de tioles.....	55
3.5.2. Contenido de fitoquelatinas.....	56
3.6. Determinaci3n de actividades de enzimas implicados en s3ntesis de tioles en <i>Lotus</i>	56
3.6.1. Actividades glutati3n y homoglutati3n sintetasa.....	56
3.6.2. Actividad fitoquelatina sintasa.....	57
3.7. Aislamiento y caracterizaci3n de los cDNAs de las tiol sintetetas de <i>Lotus</i>	58

3.7.1. Secuencias de cDNA de las glutatión y homoglutatión sintetetasas.....	58
3.7.1.1. Análisis por PCR de genotecas de cDNA.....	58
3.7.1.2. 5'RACE.....	61
3.7.2. Secuencia de cDNA de la γ - glutamilcisteína sintetasa.....	62
3.8. Análisis de las secuencias de cDNA y proteínas.....	63
3.9. Aislamiento de secuencias de genes <i>tiol sintetasa</i> y <i>fitoquelatinas sintasa</i> de <i>Lotus</i>	63
3.10. Análisis de la expresión génica en plantas de <i>Lotus</i>	64
3.11. Expresión de γ -glutamylcisteína sintetasa recombinante y producción de anticuerpo policlonal monoespecífico.....	66
3.11.1. Clonación de γ -glutamylcisteína sintetasa.....	66
3.11.2. Expresión heteróloga de γ -glutamylcisteína sintetasa recombinante.....	67
3.11.3. Purificación de γ -glutamylcisteína sintetasa recombinante.....	68
3.12. Western-blot de γ -glutamylcisteína sintetasa en raíces de <i>Lotus</i> expuestas a cadmio.....	70
3.13. Clonación de cDNAs que codifican fitoquelatina sintetasas hipotéticas de <i>Lotus</i> y expresión de las proteínas recombinantes.....	71
3.13.1. Aislamiento del ORF de LjPSL1.....	72
3.13.2. Aislamiento del ORF de LjPCS1.....	72
3.13.3. Expresión de las proteínas recombinantes.....	72
3.14. Localización de transcritos de superóxido dismutasas en nódulos.....	73
3.14.1. Preparación del tejido.....	73
3.14.2. Preparación de las sondas.....	74
3.14.3. Hibridación <i>in situ</i>	77
3.14.4. Autorradiografía.....	79
3.15. Localización inmunohistoquímica de superóxido dismutasas en nódulos.....	80
3.16. Localización citoquímica de peróxido de hidrógeno en nódulos y estudios con inhibidores.....	81
3.16.1. Localización de peróxido de hidrógeno.....	81
3.16.2. Análisis con inhibidores.....	82
4. RESULTADOS.....	85
4.1. Distribución de compuestos tiólicos y actividades tiol sintetasa en la leguminosa modelo <i>Lotus japonicus</i>	85
4.2. Aislamiento y caracterización de cDNAs de las tiol sintetetasas de <i>Lotus</i>	86
4.3. Caracterización de los genes de las tiol sintetetasas de <i>Lotus</i>	91
4.4. Expresión de los genes de las tiol sintetetasas de <i>Lotus</i>	93
4.4.1. RT-PCR convencional.....	93
4.4.2. RT-PCR cuantitativa en tiempo real.....	93
4.5. Efecto del cadmio sobre la biosíntesis de tioles y (homo)fitoquelatinas en raíces de <i>Lotus</i>	94
4.5.1. Contenido de tioles y (homo)fitoquelatinas, y actividades de los enzimas biosintéticos.....	95
4.5.2. Expresión de los enzimas involucrados en la síntesis de (homo)fitoquelatinas en raíces de <i>Lotus</i>	98
4.6. Identificación de genes tipo <i>fitoquelatina sintasa</i> de <i>Lotus</i> con homología a los de <i>Arabidopsis</i>	100

4.6.1. Genes homólogos a <i>fitoquelatina sintasas</i> funcionales.....	100
4.6.2. Otros genes que codifican proteínas con dominios <i>fitoquelatina sintasa</i>	106
4.7. Expresión y caracterización de PCS1 y PSL1 recombinantes.....	106
4.8. Localización de transcritos de superóxido dismutasas en nódulos.....	108
4.9. Localización inmunohistoquímica de superóxido dismutasas en nódulos.....	108
4.10. Localización citoquímica de peróxido de hidrógeno en nódulos y estudios con inhibidores.....	114
5. DISCUSIÓN.....	121
5.1. Biosíntesis de tioles en la leguminosa modelo <i>L. japonicus</i>	121
5.2. Biosíntesis de tioles en plantas de <i>Lotus</i> sometidas a estrés por cadmio.....	125
5.3. Biosíntesis de fitoquelatinas en plantas de <i>Lotus</i> sometidas a estrés por cadmio	127
5.4. Localización de superóxido dismutasas y peróxido de hidrógeno en nódulos...	129
6. CONCLUSIONES.....	137
7. BIBLIOGRAFÍA.....	141

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Fijación biológica de nitrógeno

1.1.1. Consideraciones generales sobre la fijación de nitrógeno

En los seres vivos, el nitrógeno es el cuarto elemento más abundante después del carbono, hidrógeno y oxígeno. Representa el 8-16% de la materia viva y forma parte de biomoléculas esenciales como aminoácidos, nucleótidos, proteínas, ácidos nucleicos, porfirinas y alcaloides. En los ecosistemas terrestres, la mayoría del nitrógeno orgánico forma parte de la materia inerte y tan sólo un 4% ($1,3 \cdot 10^4$ MTm) integra la biomasa. Alrededor del 95% de este nitrógeno está en las plantas, que son capaces de absorber y asimilar el nitrógeno inorgánico del suelo (Rodríguez-Barrueco y cols., 1985). Aunque la cantidad de nitrógeno total en el suelo oscila normalmente entre el 0,02% y el 0,5%, sólo un 1-2% de dicha cantidad se encuentra en forma asimilable (NO_3^- ó NH_4^+) (Ramos y Bisseling, 2003). Por esta razón, el nitrógeno es un factor limitante para el crecimiento de plantas y animales en muchos ecosistemas (Socolow, 1999).

En la época preindustrial la fijación biológica de nitrógeno (FBN, ver 1.1.2.1. y 1.1.4.1.) era el proceso principal por el que el N_2 se transformaba en una forma asimilable (NH_4^+). En los ecosistemas terrestres se fijaban 90-130 MTm N/año, de los cuales la mayor parte regresaba de nuevo a la atmósfera en forma de N_2 . Aparte de la FBN, una pequeña cantidad de N_2 (<10 MTm N/año) era transformado en óxido nítrico por acción de las descargas eléctricas de las tormentas. No obstante, había un equilibrio entre la generación y la desaparición de

nitrógeno en forma reducida y la redistribución de este nitrógeno una vez fijado era limitada (Galloway y cols., 1995).

Para lograr satisfacer las demandas nutricionales y energéticas de una población en constante aumento, la producción de nitrógeno combinado se ha incrementado. En la actualidad, la producción de nitrógeno combinado resultante de la actividad humana se ha igualado la producción natural. La producción de origen humano (130-150 MTm N/año) tiene tres grandes componentes, dos de los cuales están relacionados con la agricultura. El primero es la síntesis de amoníaco para la producción de fertilizantes nitrogenados (78 MTm N/año), mediante el proceso Haber-Bosch. El segundo es el uso del suelo que potencia la fijación biológica por medio del cultivo de leguminosas (43 MTm N/año). El tercero está relacionado con la producción de energía (21 MTm N/año); los procesos de combustión donde la temperatura excede los 1500°C, y la quema de combustibles fósiles generan óxidos de nitrógeno. A diferencia de lo que ocurría en la época preindustrial, en la actualidad grandes cantidades de nitrógeno combinado son redistribuidas a través de la atmósfera y de los ríos. Se ha estimado que de los 140 MTm N/año producidos 60 MTm N/año se transportan a ecosistemas marinos, y allí una parte se elimina por desnitrificación y el resto se acumula en los sedimentos. También hay quien sostiene que parte de las 80 MTm N/año restantes no se elimina completamente por desnitrificación sino que se acumula dentro de los ecosistemas terrestres en suelos, vegetación y aguas subterráneas (Galloway y cols., 1995).

El impacto de la actividad humana sobre el ciclo del nitrógeno se concreta en varios riesgos evidentes. La acumulación de nitrógeno reactivo en la atmósfera en forma de óxidos de nitrógeno (NO_x) aumenta las deposiciones ácidas, y el N_2O potencia el efecto invernadero. En ecosistemas acuáticos uno de los principales riesgos de esta acumulación es la eutrofización de las aguas. Asimismo, la acumulación de NO_3^- en aguas subterráneas puede aumentar los casos de metahemoglobinemia en humanos y animales. Finalmente, la redistribución de nitrógeno fijado puede fertilizar ecosistemas que antes eran deficitarios en este elemento, con la consiguiente alteración de la biodiversidad de estas regiones. Todo esto obliga a plantearse una gestión más eficaz y responsable de este recurso (Galloway y cols., 1995; Socolow, 1999).

1.1.2. Organismos fijadores de nitrógeno

1.1.2.1. Fijadores de vida libre y en simbiosis

Sólo un pequeño grupo de procariotas tienen la capacidad para reducir nitrógeno atmosférico generando amoníaco. Este proceso recibe el nombre de fijación biológica de nitrógeno. La

fijación de nitrógeno está catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa y requiere una gran cantidad de ATP, proveniente de la fosforilación oxidativa, para romper el triple enlace covalente de la molécula de N_2 . Una limitación de la actividad nitrogenasa es que se inactiva con el O_2 , por lo que la fijación tiene lugar sólo bajo condiciones anaerobias o microaerobias (Loomis y Connor, 2002; Ramos y Bisseling, 2003).

Los microorganismos diazótrofos pueden clasificarse en fijadores de vida libre y simbióticos. Dentro de los organismos de vida libre hay bacterias heterótrofas capaces de explotar ambientes bajos en N y ricos en C reducido. Casi todas necesitan condiciones anaerobias o casi anaerobias (*Clostridium*, *Klebsiella*, *Azospirillum*), con excepciones notables como *Azotobacter* (Loomis y Connor, 2002). Otro tipo son las cianobacterias, autótrofos de gran importancia ecológica (Rodríguez-Barrueco y cols., 1985) que pueden fijar nitrógeno tanto en condiciones anaerobias como aerobias. Entre estas últimas se distinguen las que separan temporalmente la fotosíntesis de la fijación de N_2 y las que lo hacen espacialmente desarrollando células especializadas denominadas heterocistos (Aparicio-Tejo y cols., 2000). Sin embargo, los microorganismos que establecen asociaciones simbióticas mutualísticas con plantas representan el sistema de fijación de nitrógeno más eficiente. Las cianobacterias del género *Nostoc* establecen simbiosis con hongos, con algunas gimnospermas y con angiospermas del género *Gunnera* (Bergman y cols., 1992; Ramos y Bisseling, 2003), y *Anabaena* hace lo mismo con helechos del género *Azolla* que se emplean como fuente de nitrógeno en cultivos de arroz (Loomis y Connor, 2002). Las bacterias del género *Frankia* establecen simbiosis poco específicas con plantas leñosas no leguminosas, denominadas plantas actinorrhizas, que son organismos pioneros en suelos pobres en nitrógeno o climas adversos. Las actinorrizas desarrollan nódulos en las raíces y el simbionte queda confinado en el córtex nodular (Aparicio-Tejo y cols., 2000; Ramos y Bisseling, 2003).

Sin embargo, de todas las asociaciones simbióticas mutualísticas planta-microorganismo fijadoras de nitrógeno, la simbiosis rizobio-leguminosa es, sin lugar a dudas, la más conocida y también la más importante desde un punto de vista agronómico. Los apartados siguientes están dedicados exclusivamente a la descripción de los aspectos más relevantes de dicha simbiosis.

1.1.2.2. Simbiosis rizobio-leguminosa

Las leguminosas forman una amplia y heterogénea familia de angiospermas que está integrada por más de 650 géneros y 18000 especies. Representan la tercera familia más grande de plantas superiores y la segunda, después de las gramíneas, más importante agronómicamente. Entre los organismos que pertenecen a esta familia encontramos desde hierbas diminutas a árboles

gigantes que dominan muchas selvas tropicales. Son el principal fertilizante de origen biológico y un componente esencial en la mayor parte de las rotaciones agrícolas. Asimismo, constituyen la principal fuente de proteína vegetal en la alimentación humana y animal. Incluso se ha sugerido un posible efecto anticancerígeno de algunos de sus componentes, como los flavonoides (Young y cols., 2003).

Muchas especies de leguminosas son capaces de establecer simbiosis con bacterias fijadoras, a las que nos referiremos genéricamente como rizobios, que les permiten fijar nitrógeno atmosférico y ser menos dependientes del nitrógeno del suelo. Los rizobios tienen la capacidad de infectar las raíces (o en algunos casos los tallos) de estas leguminosas de un modo específico e inducir el desarrollo de tumoraciones benignas denominadas nódulos. Las leguminosas pueden dar lugar a dos tipos de nódulos, determinados e indeterminados, que describiremos más adelante. Esta propiedad ha sido estudiada en aproximadamente un 60% de las leguminosas, y el porcentaje de especies susceptibles de nodular varía en función de la familia: 23% en *Caesalpinioideae*, 90% en *Mimosoideae* y 97% *Papilionoideae* (Ramos y Bisseling, 2003). Al margen de las leguminosas, sólo se ha descrito una planta, *Parasponia* (*Ulmaceae*), capaz de establecer una relación simbiótica con rizobios (Trinick, 1979).

Los rizobios son bacterias aerobias gram-negativas que habitualmente sólo pueden fijar nitrógeno en simbiosis, aunque algunos son fijadores también en vida libre. Viven como saprofitos en el suelo compitiendo con bacterias quimioheterótrofas y pueden moverse gracias a la presencia de uno o más flagelos (Aparicio-Tejo y cols., 2000). Los rizobios integran un grupo taxonómicamente heterogéneo. A principios de 2003 se habían descrito 44 especies, pertenecientes a 12 géneros, de bacterias fijadoras capaces de establecer simbiosis con leguminosas. El análisis filogenético basado en las secuencias 16S rDNA mostró que se distribuían en 2 clases (α -proteobacterias y β -proteobacterias) y en 9 grupos monofiléticos, que aparecen en la **Tabla 1.1**. Dichos grupos incluyen también especies de bacterias no simbióticas (Sawada, 2003).

1.1.2.3. Leguminosas modelo

La selección de *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula* como leguminosas modelo está favoreciendo el estudio molecular de la simbiosis rizobio-leguminosa con nódulos determinados e indeterminados, respectivamente (Barker y cols., 1990; Handberg y Stougaard, 1992; Udvardi 2001). Ambas especies tienen un genoma diploide (*L. japonicus*, $2n=12$; *M. truncatula*, $2n=16$) pequeño (~470 Mb/C) (Young y cols., 2003). Además, son autógamas, tienen un tiempo corto de generación, una gran producción de semillas, son fáciles de

transformar y se dispone de mutantes simbióticos. El genoma cloroplástico de *L. japonicus* (Kato y cols., 2000) y los genomas de los correspondientes microsimbiontes *Mesorhizobium loti* y *Sinorhizobium meliloti* se han secuenciado completamente (Kaneko y cols., 2000, Galibert y cols., 2001), y es previsible que los genomas nucleares de los huéspedes vegetales estén completamente secuenciados dentro de uno o dos años.

Tabla 1.1 Grupos de bacterias fijadoras que establecen simbiosis con leguminosas.

Grupo	Especie(s)
1	<i>Rhizobium</i> sp., y <i>Allorhizobium</i> sp.
2	<i>Sinorhizobium</i> sp., <i>Ensifer</i> sp.
3	<i>Mesorhizobium</i> sp.
4	<i>Bradyrhizobium</i> sp. y <i>Blastobacter denitrificans</i>
5	" <i>Methylobacterium nodulans</i> "
6	<i>Azorhizobium</i> sp.
7	" <i>Devosia neptuniae</i> "
8	Algunas <i>Burkholderia</i> sp.
9	<i>Ralstonia taiwanensis</i>

1.1.3. Estructura del nódulo de las leguminosas

1.1.3.1. Interacción rizobio-leguminosa

Los rizobios proliferan en el suelo, donde su crecimiento está favorecido por la composición química de los exudados de la raíz. Por ejemplo, la secreción de homoserina por las raíces de guisante estimula el crecimiento de *R. leguminosarum* (Van Egeraat, 1975). Los exudados de la raíz también contienen flavonoides que a concentración nanomolar atraen por quimiotaxis a los rizobios hacia la superficie radical (Caetano-Anolles y cols., 1988).

Los flavonoides a concentraciones micromolares también activan en el rizobio los genes responsables de la nodulación o genes *nod* (Zuanazzi y cols., 1998; Aparicio-Tejo y cols., 2000), implicados en la síntesis de los llamados factores Nod. Los rizobios producen factores Nod con una estructura similar lipoquitín-oligosacárido (Ramos y Bisseling, 2003), cuya núcleo consta de oligómeros *N*-acilados de tres a cinco residuos de *N*-acetilglucosamina y un ácido graso unido al residuo terminal no reducido. Los diversos factores Nod difieren en dicho ácido graso y en los sustituyentes de los residuos terminales. La especificidad es una característica típica de la interacción rizobio-leguminosa que, en parte, está determinada por los factores Nod.

Las leguminosas son capaces de reconocer rápidamente concentraciones picomolares de factores Nod (Heidstra y cols., 1994). Varios estudios indican que en la percepción de estos compuestos está implicado más de un receptor y que éstos contienen dominios LysM (Radutoiu y cols., 2003; Madsen y cols., 2003; Limpens y cols., 2003). Los factores Nod inducen respuestas en la epidermis, el córtex y el periciclo de la raíz: en la epidermis, el aumento de la concentración de calcio (Shaw and Long, 2003 b) y la deformación de los pelos radicales (Heidstra y cols., 1994), así como la alcalinización y la despolarización de la membrana (Ehrhardt y cols., 1992); en el córtex, la formación de cordones de preinfección y la división celular, que culmina con la formación del primordio (Hadri and Bisseling, 1998).

1.1.3.2. Desarrollo del nódulo

La formación de un nódulo es un proceso controlado por la planta en el que las células del córtex de la raíz se desdiferencian para formar un primordio que será infectado por los rizobios. Para que la infección culmine con éxito, es imprescindible que el rizobio produzca factores Nod, exopolisacáridos y lipopolisacáridos compatibles con la leguminosa (Becker y Pühler, 1998; Kannenberg y cols., 1998). Cuando la leguminosa dispone ya de suficientes nódulos, o tiene acceso a suficiente nitrógeno fijado, inhibe por “feed-back” la formación de nuevos nódulos. El mecanismo de autorregulación no ha llegado a elucidarse pero se sabe que hay involucrado un “diálogo molecular” con la parte aérea (Ramos y Bisseling, 2003).

En la mayoría de las leguminosas conocidas la infección por las bacterias comienza de la siguiente manera. Primero, los rizobios se adhieren a la superficie radicular formando microcolonias o películas sobre la epidermis. En esta adhesión intervienen adhesinas, lectinas y fibrillas de celulosa. Las bacterias invaden pelos radicales y éstos se curvan generando una estructura en forma de cayado. A continuación, las bacterias hidrolizan la pared vegetal y la membrana plasmática experimenta una invaginación. Dentro del pelo radical comienza a desarrollarse una estructura tubular, denominada cordón de infección, que crece hacia la base. El cordón o canal de infección es externo a la célula, está rodeado de membrana y contiene una matriz de origen bacteriano y glicoproteína de origen vegetal (Brewin, 1998). Esta estructura penetra en el córtex a través de “puentes citoplasmáticos” llamados cordones de preinfección (Van Brussel y cols., 1992).

Cuando los cordones de infección alcanzan el primordio nodular, las células comienzan a diferenciarse dando lugar al nódulo. La planta, y no el rizobio, es quien determina qué tipo de nódulo se desarrollará. Las leguminosas pueden dar lugar a dos tipos de nódulos, determinados e indeterminados, cuyas diferencias morfológicas y fisiológicas se resumen en la **Tabla 1.2**.

Ambos tipos de nódulos poseen un zona central con células infectadas que contienen los bacteroides, rizobios fijadores de nitrógeno. En la zona central, también hay células no-infectadas o intersticiales, esenciales en la asimilación del nitrógeno fijado en los nódulos determinados. La zona central está rodeada de una zona externa constituida por el córtex, la endodermis y el parénquima. El córtex es la parte más externa y está constituido por las células corticales de la raíz que rodeaban el primordio nodular. El parénquima es la región más proxima a la zona central y contiene haces vasculares. Entre el córtex y el parénquima se encuentra la endodermis, con unas pocas capas de células, entre las que apenas hay espacios intercelulares y cuyas paredes están fuertemente lignificadas.

Los bacteroides expresan nitrogenasa y citocromos que no estaban presentes en los rizobios de vida libre. Una célula infectada del nódulo puede llegar a contener varios miles de bacteroides confinados en simbiosomas. En estos compartimentos los bacteroides están rodeados de una membrana peribacteroidal o simbiosomal. Dicha membrana tiene material provenientes de tres orígenes diferentes: cordón de infección, retículo endoplásmico y síntesis *de novo* de membrana (Roth y Stacey, 1989). Además, comparte propiedades con la membrana vacuolar y tiene una gran importancia en la simbiosis (Whitehead y Day, 1997). En los simbiosomas de los nódulos indeterminados hay sólo un bacteroide que puede llegar a ser 30 veces mayor que el rizobio del que deriva; en cambio, en los nódulos determinados puede haber varios bacteroides por simbiosoma (Cermola y cols., 2000). El intercambio de metabolitos entre ambos simbiosomas está controlado por las membrana bacteroidal y peribacteroidal (Udvardi y Day, 1997).

1.1.3.3. Nódulos determinados e indeterminados

En este apartado describimos básicamente las diferencias estructurales (Sprent, 1980; Franssen y cols., 1992; Hirsh, 1992) más importantes entre ambos tipos de nódulos; en el apartado siguiente detallaremos las fisiológicas. Las principales diferencias morfológicas y fisiológicas entre ambos tipos de nódulos se enumeran en la **Tabla 1.2**.

Los nódulos determinados tienen forma esférica y la zona infectada está formada por células que se encuentran en un estadio similar de desarrollo. Las divisiones en la zona central concluyen 12-18 días después de la inoculación y a partir de ese momento el aumento del tamaño del nódulo se produce sólo por crecimiento celular. Algunas células de la zona central permanecen sin infectar y constituyen las llamadas células intersticiales, de menor tamaño y con gran cantidad de vacuolas, que son esenciales en el metabolismo del nódulo (**Figura 1.1**).

Tabla 1.2 Características de los nódulos de crecimiento determinado e indeterminado

	Determinado	Indeterminado
Planta huésped	Soja, judía, "cowpea"	Alfalfa, guisante, haba
Origen geográfico	Tropical y subtropical	Templado
Forma del nódulo	Esférica	Cilíndrica, a menudo ramificada
Inicio de divisiones celulares	Córtex externo	Córtex interno
Crecimiento nodular	Expansión celular	División celular, meristemo persistente
Flavonoides inductores de genes <i>nod</i>	Isoflavonas	Flavonas, flavononas
Producto exportado	Ureidos	Amidas

Los nódulos indeterminados se desarrollan en el córtex interno de la raíz y los determinados lo hacen en el córtex externo. Sin embargo, la diferencia estructural más importante entre los dos tipos de nódulos radica en que sólo los indeterminados poseen un meristemo persistente en el ápice. El meristemo determina que nuevas capas de células se estén añadiendo continuamente en el extremo distal del nódulo (el más alejado de la raíz). Por eso, estos nódulos tienen forma cilíndrica y diferentes regiones en la zona central, con células que se encuentran en etapas distintas de desarrollo.

La zona central de un nódulo indeterminado consta de cuatro zonas (Vasse y cols., 1990) (**Figura 1.1**). El meristemo, situado en el ápice, está formado por células no vacuoladas, libres de bacteroides y constituye la llamada zona I. A continuación encontramos la zona de infección y la zona de simbiosis temprana, que constituyen conjuntamente la zona fijadora o zona II. La zona de infección, adyacente al meristemo, está caracterizada por la liberación de los rizobios desde los cordones de infección y el comienzo de la diferenciación celular. La zona fijadora temprana está integrada por células más grandes, vacuoladas y densamente pobladas por bacteroides más alargados que los de la zona de infección. En el borde proximal de la zona fijadora temprana se encuentra la interzona II-III, una región integrada por células grandes y con un gran número de amiloplastos. La interzona es una zona de transición, en la que todavía no se produce fijación de nitrógeno pero se expresan genes necesarios para el inicio de dicho proceso. En esta zona también hay células que permanecen sin infectar y no presentan todos estos cambios. En el borde distal de la zona III encontramos la zona de fijación de nitrógeno, donde las células infectadas están llenas de bacteroides que fijan activamente y muestran una heterogeneidad citoplásmica todavía más marcada que la que se aprecia en la interzona II-III (Hirsh, 1992). La zona III presenta un intenso color rojizo debido a la abundancia de leghemoglobina, una proteína transportadora de O₂ (ver más abajo). En la región proximal de la zona III la actividad nitrogenasa se encuentra bastante reducida y el

citoplasma de los bacteroides vuelve a ser más homogéneo. Finalmente, en la zona basal del nódulo se localiza la zona senescente o zona IV, donde tanto las células vegetales como los bacteroides comienzan a degradarse. Esta zona tiene color verdoso por la presencia de productos de degradación de la leghemoglobina tipo biliverdina. En los nódulos de alfalfa y quizás también en otros nódulos indeterminados existe una zona V, contigua a la raíz, donde el rizobio vive como saprofito y no se diferencia a bacteroide (Timmers y cols., 2000).

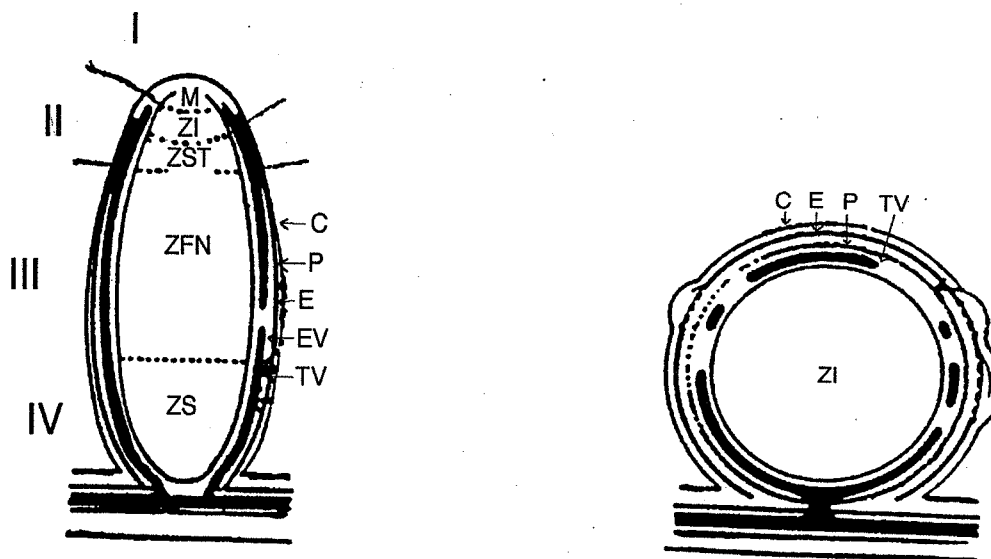
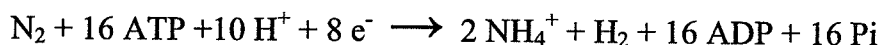


Figura 1.1 Estructura general de un nódulo indeterminado (izquierda) y uno determinado (derecha). Nódulo indeterminado: M, meristemo; ZI, zona de invasión; ZST, zona de simbiosis temprana; ZFN, zona de fijación de nitrógeno; ZS, zona senescente; C, córtex nodular; P, parénquima nodular; E, endodermis; TV, tejido vascular. Nódulo determinado: ZI, zona infectada. C, córtex nodular; P, parénquima nodular; E, endodermis; TV, tejido vascular (Vasse y cols., 1990; Hirsch, 1992).

1.1.4. Fisiología del nódulo

1.1.4.1. Fijación y asimilación de nitrógeno

La reducción de N_2 a NH_3 está catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa.



La nitrogenasa está compuesta de dos ferrosulfoproteínas: la dinitrogenasa y la dinitrogenasa reductasa. La dinitrogenasa o FeMo-proteína (componente I) es un tetrámero de estructura $\alpha_2\beta_2$ y 220 kD. La dinitrogenasa reductasa o Fe-proteína (componente II) es un dímero de estructura α_2 y 62 kD. El O_2 inactiva de manera irreversible la Fe-proteína y el FeMo-proteína. Por esa razón, el complejo enzimático actúa en un ambiente microaerobio.

La reacción requiere, por tanto, un dador de electrones, ATP, Mg^{2+} y una concentración baja de O_2 . El reductor fisiológico de la Fe-proteína de bacteroides es la ferredoxina, una proteína de potencial redox muy negativo, también muy sensible al O_2 . La regulación de este proceso se produce a diversos niveles: transcripcional, traduccional, por disponibilidad de sustrato, por modificación covalente o por moduladores alostéricos. El nitrógeno combinado en diversas formas, el ADP-Mg y el H_2 inhiben la actividad nitrogenasa.

Parte del flujo de electrones que atraviesa la nitrogenasa no se invierte en la reducción de N_2 sino en la de H^+ . La eficiencia relativa es la proporción del flujo total de electrones que atraviesa la nitrogenasa y que se emplea realmente en la reducción de N_2 . Se ha observado que aquellas simbiosis con eficiencias relativas más altas expresan una hidrogenasa capaz de reciclar total o parcialmente el H_2 producido. En la simbiosis *G. max-B. japonicum* ya se ha comprobado la implicación de esta proteína en el aumento de la biomasa vegetal y del nitrógeno total (Aparicio-Tejo y cols., 2000).

La energía necesaria (~ 960 kJ/mol) para llevar a cabo el proceso de fijación de nitrógeno proviene de la fotosíntesis. Desde la parte aérea, vía floema, se transporta sacarosa hasta los nódulos, donde se hidroliza a monosacáridos y se transforma en fosfoenolpiruvato. La fosfoenolpiruvato carboxilasa cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato en oxalacetato, que se reduce rápidamente a malato, principal fuente de energía para el bacteroide y la mitocondria. La planta también suministra aminoácidos al bacteroide para suprimir la asimilación de amonio del microsimbionte y facilitar el acceso de este metabolito al huésped vegetal (Ramos y Bisseling, 2003).

El amonio, tóxico para la planta, es incorporado inmediatamente a esqueletos carbonados, principalmente, a través del ciclo de la glutamina sintetasa/glutamato sintasa. La glutamina puede donar también su grupo amida al aspartato formando asparagina, principal amida transportada por el xilema a la parte aérea en algunas leguminosas. El NH_4^+ , una vez asimilado, puede ser exportado en forma de amidas o ureidos. Las leguminosas de climas templados (de nódulo indeterminado) exportan el nitrógeno en forma de las amidas: glutamina, asparagina y 4-metilenglutamina. Las leguminosas de origen tropical y subtropical (de nódulo determinado) exportan el nitrógeno en forma de ureidos: alantoína, ácido alantoico y citrulina. La síntesis de ureidos se realiza a partir de las amidas glutamina y asparagina e implica la síntesis y la subsiguiente oxidación de purinas. Parte de este proceso tiene lugar en las células intersticiales de la zona central del nódulo determinado. Es generalmente aceptado que la oxidación de la xantina a ácido úrico (xantina deshidrogenasa) transcurre en el citosol, la

síntesis de alantoína (uricasa) en los peroxisomas y la de ácido alantoico (alantoinasa) en el retículo endoplásmico (Aparicio-Tejo y cols., 2000).

1.1.4.2. El problema del oxígeno

Los nódulos tienen una gran demanda de ATP (que se genera por fosforilación oxidativa) y por tanto de O₂. No obstante, ya hemos comentado que el O₂ inactiva de forma irreversible el complejo nitrogenasa. Consiguientemente, el nódulo dispone de mecanismos para mantener la concentración de O₂ extremadamente baja en las células infectadas y al mismo tiempo garantizar los requerimientos metabólicos del bacteroide. Básicamente, son tres los mecanismos implicados: una alta actividad respiratoria de los bacteroides y mitocondrias, la “barrera de difusión de O₂” y la leghemoglobina.

La “barrera de difusión de O₂” está localizada principalmente en el parénquima nodular pero su mecanismo exacto se desconoce. Muy probablemente, éste implique la entrada de agua en los espacios intercelulares, lo que hace que la difusión gaseosa a través de ellos sea mucho más lenta por tratarse de una fase líquida. Asimismo, la barrera de O₂ puede deberse a oclusiones de los espacios intercelulares, en las que intervienen glicoproteínas, isoflavonoides y lectinas, que pueden formar un gel rígido con gran resistencia a la difusión gaseosa (Minchin, 1997).

La leghemoglobina es una proteína similar a la mioglobina, que está presente a concentraciones de 1-5 mM en el citosol de las células infectadas y que transporta O₂ desde la membrana plasmática hasta la membrana peribacteroidal. Consta de un polipéptido de 16 kD y un grupo protohemo IX que se une reversiblemente al O₂. Dada la alta afinidad de la leghemoglobina por el O₂ (K_{dis}=48-60 nM), prácticamente todo el O₂ que alcanza la membrana peribacteroidal es transportado como oxileghemoglobina y sólo una pequeña parte lo hace por difusión. Para que la leghemoglobina sea funcional, el Fe de su grupo hemo ha de estar reducido; es decir, la proteína tiene que estar en forma de ferroleghemoglobina. Puesto que la leghemoglobina oxidada no es funcional, en los nódulos existen mecanismos para mantener la proteína reducida: las flavinas reducidas o determinadas reductasas son capaces de reducir la ferrileghemoglobina (Aparicio-Tejo y cols., 2000).

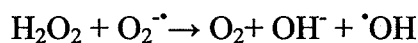
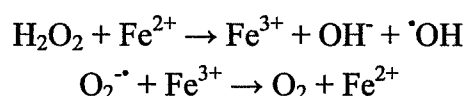
1.2. Especies reactivas de oxígeno

1.2.1. Generación de especies reactivas de oxígeno

Con la aparición de las cianobacterias y el desarrollo de la fotosíntesis oxigénica, que utiliza agua como fuente de poder reductor y libera oxígeno como subproducto, se transformó la composición de la atmósfera. Ésta pasó de ser un ambiente reductor (rico en H₂) o neutro (CO₂ ó N₂) a convertirse en uno oxidante. La presión evolutiva que supuso este cambio motivó la aparición de un complejo mecanismo para la utilización del O₂ como aceptor electrónico terminal en la cadena respiratoria ($O_2 + 4 e^- + 4 H^+ \rightarrow 2H_2O$) e indujo también el desarrollo de sistemas que permitieran combatir el efecto tóxico de las especies reactivas de oxígeno (ROS, "Reactive Oxygen Species") (Gille y Sigler, 1995). Dichas especies se generan a partir de la molécula de O₂ (muy poco reactiva), a través de reacciones de transferencia de energía, o bien de reacciones de transferencia electrónica univalente, que producen intermediarios parcialmente reducidos.

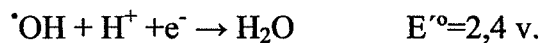
Por transferencia de energía, el O₂ en estado basal triplete (³O₂) se transforma en O₂ singlete (¹O₂), que posee un par de electrones en un estado energéticamente inestable. A su vez, las reacciones de transferencia de un único electrón generan sucesivamente: anión radical superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radical hidroxilo (•OH) y finalmente H₂O (la forma totalmente reducida). En un ambiente hidrofóbico el superóxido es relativamente estable y reactivo; por el contrario, en un ambiente hidrofílico tiene una reactividad baja y desaparece rápidamente transformándose en H₂O₂. La reactividad del H₂O₂ en soluciones acuosas también es baja pero esta especie puede penetrar en cualquier membrana biológica y alcanzar lugares muy alejados de aquél donde se formó.

El H₂O₂ puede reaccionar con Fe²⁺, produciendo el radical hidroxilo en la denominada reacción Fenton. El radical superóxido puede actuar como reductor, regenerando el Fe²⁺ y permitiendo que la reducción del H₂O₂ a hidroxilo continúe. La suma de las dos reacciones se conoce como reacción de Haber-Weiss (Dalton, 1995):



La reacción Fenton se considera la fuente principal de radicales hidroxilo en sistemas biológicos (Halliwell y Gutteridge, 1999). El principal catalizador *in vivo* de esta reacción es el Fe, aunque otros metales de transición, como el Cu, pueden remplazar al Fe.

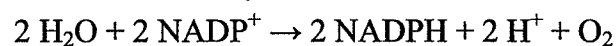
El radical hidroxilo es la ROS más oxidante y dañina, y es capaz de reaccionar con todo tipo de biomoléculas casi instantáneamente (Halliwell y Gutteridge, 1990).



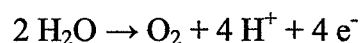
En condiciones fisiológicas, las plantas producen continuamente ROS como subproductos de varias rutas metabólicas localizadas en diferentes compartimentos: la fotosíntesis en el cloroplasto, la respiración en la mitocondria, parte del ciclo de la fotorrespiración en el peroxisoma y la fijación de nitrógeno en los simbiosomas. Asimismo, varios factores adversos pueden provocar un incremento en la formación de ROS. Estos factores se conocen como estreses ambientales y se clasifican, en función de su origen, en abióticos (sequía, salinidad, temperaturas extremas, exceso de luz y agentes contaminantes como ozono, metales pesados y xenobióticos) y bióticos (ataque de microorganismos e insectos). A continuación describimos brevemente los mecanismos por los que se generan las ROS en los distintos compartimentos. Más adelante hablaremos de la formación de ROS que tiene lugar en los nódulos fijadores de nitrógeno (ver 1.2.3.).

1.2.1.1. Cloroplasto

Durante las reacciones de absorción de energía de la fotosíntesis en las que hay transporte electrónico desde el H_2O al NADP^+ para formar poder reductor:



el oxígeno se produce continuamente según la reacción de Hill:

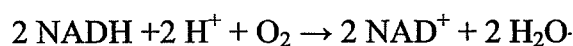


Como consecuencia de la presencia de O_2 y las condiciones fuertemente reductoras del cloroplasto se están produciendo continuamente ROS a través de diversos mecanismos. La reacción de Mehler consiste en la fotorreducción de O_2 por los componentes reducidos del fotosistema I dando lugar a superóxido. Este proceso es esencial para evitar la sobrerreducción de los componentes del fotosistema II y la consiguiente inhibición de la fotosíntesis en aquellas

situaciones en las que la intensidad luminosa desborda la capacidad de asimilación de CO₂, como son las situaciones de estrés por sequía o bajas temperaturas. Parte de los electrones que alcanzan la ferredoxina también pueden desviarse y producir superóxido. Asimismo, durante la fotosíntesis se está produciendo continuamente ¹O₂ en el fotosistema II. En aquellas situaciones de estrés por exceso de luz la producción de ¹O₂ se incrementa (Apel y Hirt, 2004).

1.2.1.2. Mitocondria

La producción de ROS es una consecuencia inevitable del metabolismo aerobio. En la mitocondria tiene lugar la fosforilación oxidativa, consistente en la síntesis de ATP asociada al transporte de electrones desde el NADH o FADH₂ hasta el O₂.

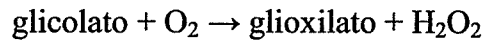


En las células animales la mitocondria es una de las mayores fuentes de ROS. El O₂, en lugar de ser reducido completamente por la citocromo oxidasa (complejo IV), puede interaccionar con formas reducidas de los componentes de la cadena respiratoria tales como flavinas y ubiquinona, y generar superóxido. Los principales sitios de producción de ROS son el complejo I (NADH deshidrogenasa) y el complejo III (complejo del citocromo *bc*₁ o citocromo reductasa). La cadena de transporte mitocondrial de las células vegetales, no obstante, es diferente del de las células animales. Además de los complejos I-IV, poseen una oxidasa terminal alternativa cuya actividad no está asociada al bombeo de electrones al espacio intermembrana; asimismo, posee dos NAD(P)H deshidrogenasas (insensibles a rotenona) a cada lado de la membrana interna (Møller, 2001). La oxidasa alternativa reduce la producción de ROS a través de dos mecanismos: desvía parte de los electrones que de este modo no pasan por el complejo III y reduce la concentración de O₂ susceptible de ser parcialmente reducido. Se ha visto que la sobreexpresión de la oxidasa alternativa mitocondrial contribuye a reducir eficazmente la concentración de ROS (Maxwell y cols., 1999). A pesar de esto, aproximadamente el 1-2% del consumo de O₂ de las células vegetales se destina a la producción de ROS (Puntarulo y cols., 1988).

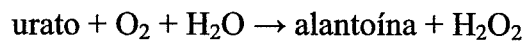
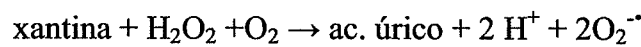
1.2.1.3. Peroxisoma

Después de la fotorreducción directa de O₂ a superóxido por los componentes reducidos de la cadena de transporte electrónico fotosintético, el principal proceso implicado en la formación de ROS asociado a la fotosíntesis es el ciclo de la fotorrespiración. La rubisco cataliza una reacción competitiva en la que se incorpora O₂ en lugar de CO₂. En el ciclo de la

fotorrespiración están implicados varios compartimentos celulares: el cloroplasto, el peroxisoma y la mitocondria. Como resultado de la actividad oxigenasa de la rubisco se produce glicolato que se transloca desde el cloroplasto al peroxisoma. En el peroxisoma el glicolato se oxida por la glicolato oxidasa, enzima responsable de la producción de la mayor cantidad de H_2O_2 durante la fotosíntesis.



El peroxisoma también produce ROS por acción de la xantina oxidasa y la uricasa. La xantina oxidasa de la matriz peroxisomal cataliza la reacción de oxidación de xantina e hipoxantina a ácido úrico. La uricasa cataliza la conversión de ácido úrico a alantoína.



Hay además varias NAD(P)H deshidrogenasas en la membrana peroxisomal capaces de producir superóxido. Una de estas proteínas es una flavoproteína de 32 kD que se ha identificado como una monodeshidroascorbato reductasa. Se han descrito además otras dos proteínas de 18 y 29 kD con actividad citocromo *c* reductasa (del Río y cols., 2002).

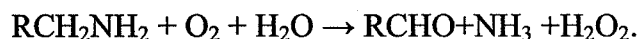
1.2.1.4. Apoplasto

Durante las reacciones incompatibles planta-patógeno, se inducen respuestas de defensa y se genera H_2O_2 en dos fases: hay un primer y rápido aumento de H_2O_2 al que sigue otra “explosión oxidativa” más prolongada. En cambio, durante las interacciones compatibles, en las que un patógeno consigue superar la líneas de defensa e infecta sistémicamente la planta huésped, sólo se produce el primer pico en la acumulación de H_2O_2 (Lamb y Dixon, 1997). La generación de H_2O_2 también se produce en respuesta a heridas (Orozco-Cardenas y Ryan, 1999). Hasta la fecha se han descrito básicamente dos mecanismos principales implicados en la generación de ROS fuera de la célula: las oxidasas y las peroxidasas.

Oxidasas dependiente de NADPH. Estan asociadas a la membrana plasmática y catalizan la producción de superóxido por la reducción univalente de O_2 utilizando NADPH como dador de electrones. Desencadenan la respuesta hipersensible y la muerte celular de las células infectadas. Varios indicios sugieren su homología a la oxidasa presente en los neutrófilos de mamíferos.

Peroxidasas apoplásticas. Están unidas a la pared celular e intervienen en la síntesis de lignina y otros polímeros fenólicos. Sin embargo, también poseen actividad NADH-oxidasa generadora de H₂O₂ (Lamb y Dixon, 1997). De forma similar a la reacción Haber-Weiss, catalizada por metales de transición, se ha descrito que este tipo de enzima es capaz de producir radicales hidroxilo (Chen y Schopfer, 1999). La producción de radicales hidroxilo es importante no sólo durante la respuesta hipersensible sino también para la reorganización de las paredes celulares que tiene lugar durante el desarrollo de la planta (Frahry y Schopfer, 2001).

Amino oxidasas. Se encuentran generalmente en el apoplasto, asociadas a la pared celular. La oxidación de aminas, diaminas y poliaminas presentes en el apoplasto produce H₂O₂ (Grant y Loake, 2000), que se requiere para la lignosuberización y en el entrecruzamiento de macromoléculas extracelulares como las extensinas. También pueden estar implicadas en respuestas de defensa. La reacción catalizada es:



Oxidasas tipo germina. La germina es una oxalato oxidasa apoplástica extraordinariamente estable que está implicada en la defensa contra el estrés biótico y abiótico (Lane y cols., 1993). Cataliza la reacción :



La proteína es un hexámero y tiene unido un átomo de Mn por monómero. Se ha observado que tiene también actividad tipo MnSOD (Woo y cols., 2000).

Todos estos enzimas poseen diferentes valores de K_m para O₂, y distinta sensibilidad a inhibidores como cianuro, azida y difenileniodonio (DPI).

1.2.2. Efectos de las especies reactivas de oxígeno

Generalmente, se ha propuesto que las ROS intervienen en las respuestas de las plantas al estrés a través de dos vías. Por un lado, las ROS reaccionan con una amplia variedad de biomoléculas pudiendo causar daño oxidativo y en último término la muerte celular. Por otro lado, las ROS de menor reactividad también desempeñan funciones importantes en las células, como la regulación de genes y la transducción de señales (Dat y cols., 2000; Mittler, 2002, Mittler y cols., 2004).

1.2.2.1. Daño oxidativo

Daño a lípidos

Los ácidos grasos poliinsaturados son particularmente susceptibles a la peroxidación y ésta, una vez iniciada, transcurre como un proceso en cadena de radicales libres. Un único evento de iniciación puede producir cientos de hidroperóxidos lipídicos (Gutteridge y Halliwell, 1990). La peroxidación lipídica en las membranas biológicas afecta al funcionamiento y la fluidez de la membrana, inactiva receptores y enzimas unidos a membranas y aumenta la permeabilidad no específica a iones como el Ca^{2+} . Además, los hidroperóxidos lipídicos se descomponen dando lugar a alcanos, radicales alcoxilo que inducen a su vez peroxidación y compuestos carbonilo citotóxicos, como el malondialdehído (marcador de daño oxidativo a lípidos) (Gutteridge y Halliwell, 1990). Estos compuestos carbonilo citotóxicos pueden difundir hacia otros compartimentos subcelulares y formar aductos con proteínas (Uchida y Stadtman, 1993; Uchida y cols., 1993) y DNA (Chaudhary y cols., 1994), lo que conlleva mutaciones y alteraciones de la expresión génica.

Daño a proteínas

La modificación de proteínas se inicia principalmente por reacción con el radical hidroxilo. Las ROS causan la oxidación de las cadenas laterales de los aminoácidos, el entrecruzamiento de cadenas polipeptídicas y la oxidación del esqueleto carbonado que culmina finalmente en la fragmentación de los polipéptidos. Todos los aminoácidos son susceptibles de experimentar procesos de oxidación pero los más vulnerables son los que contiene azufre (Cys, Met) o los aromáticos (Trp, Phe, Tyr, His) (Berlett y Stadtman, 1997). De este modo, el sulfóxido de metionina y la 2-oxohistidina son productos importantes del ataque de las ROS sobre las proteínas (Ferguson y Burke, 1994). La oxidación directa de residuos de Lys, Arg, Pro y Thr, así como la reacción de las proteínas con aldehídos producidos en la peroxidación lipídica, da lugar a grupos carbonilo (marcadores de daño oxidativo a proteínas). En plantas sometidas a estrés se ha descrito un aumento del contenido total de grupos carbonilo de las proteínas solubles (Escuredo y cols., 1996; Gogorcena y cols., 1997; Morán y cols., 1994).

Daño a DNA

Las reacciones Fenton mediadas por Fe constituyen la principal causa del daño oxidativo. El daño puede producirse en la base nitrogenada o bien en la desoxirribosa. El daño en la desoxirribosa conduce en muchos casos a la rotura de la hebra y a la liberación de la base nitrogenada y de malondialdehído (Janicek y cols., 1985). El ataque de ROS a la base nitrogenada produce la adición de $-\text{OH}$ a los dobles enlaces ricos en energía, como el enlace N-7-C-8 de las purinas y el enlace 5,6 de las pirimidinas (Henle y cols., 1996; Luo y

cols., 1996). Entre las pirimidinas oxidadas cabe destacar la 5-hidroxicitosina y el glicol de la timidina. Entre las purinas oxidadas, cabe destacar las formamidopirimidinas y la 8-hidroxi guanina (marcador de daño oxidativo a DNA). Se ha descrito que el estrés por exposición a O₃ provoca un aumento del contenido de 8-hidroxi guanina en el DNA cloroplástico de guisante y judía (Floyd y cols., 1989).

1.2.2.2. Señalización molecular

Expresión génica

Cada vez hay más pruebas que evidencian que el H₂O₂ funciona como una señal de estrés en plantas y que induce respuestas adaptativas frente a varios estreses (Desikan y cols., 2001). Las ROS pueden afectar a la expresión génica como segundos mensajeros a través de tres vías: la activación de rutas de transducción de señales, la regulación de estas rutas de señalización a través de la oxidación de alguno de sus componentes y finalmente la alteración de la actividad de factores de transcripción (Apel y Hirt, 2004). Se ha demostrado que enzimas tipo MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) están implicadas tanto en la inducción de respuestas a estreses y hormonas como en la división celular. Varios estreses (frío, salinidad, estrés oxidativo) inducen la generación de ROS que a su vez inducen cascadas de señalización MAPK. El H₂O₂ activa varias MAPK pero no se ha conseguido elucidar ni el mecanismo de activación ni la diana de las MAPK (Jonak y cols., 2002). Puesto que el H₂O₂ puede oxidar residuos tiol, se ha sugerido que en la percepción de esta molécula puede estar implicada la modificación de grupos tiol de ciertas proteínas. En *Arabidopsis* se ha descrito una tirosín fosfatasa (PTP1) que se inactiva por H₂O₂ y que, a su vez, puede inactivar la MAPK6 (Gupta y Luan, 2003). En bacterias y levaduras las ROS pueden regular la actividad de factores de transcripción a través de la modificación covalente de grupos tiol. Además, diferentes tipos de ROS pueden reaccionar con distintos aminoácidos y originar varios productos, lo que explicaría cómo las ROS pueden inducir la expresión de diferentes conjuntos de genes a través del mismo factor de transcripción (Delaunay y cols., 2000). De forma similar a las levaduras, las plantas han desarrollado una ruta MAPK y fosfatasas para la percepción de ROS y aunque no han conseguido identificarse factores de transcripción sensibles a ROS, es probable que existan. Además de su papel directo como segundos mensajeros, las ROS podrían actuar indirectamente en las vías de señalización en plantas. Una forma es a través de su citotoxicidad. Los ácidos grasos poliinsaturados son una diana para el ataque de las ROS. Varios de los productos resultantes son biológicamente activos y pueden alterar la expresión génica (Apel y Hirt, 2004). Otra vía es la alteración del estado redox celular: la desintoxicación de ROS en el cloroplasto conlleva la oxidación de grandes cantidades de reductores (ascorbato y glutatión) y la consiguiente alteración del estado redox. Dichos cambios durante el ciclo

luz-oscuridad modulan la actividad de muchos enzimas e influyen en la transcripción de varios genes (Foyer y Noctor, 2000; Neill y cols., 2002).

La influencia de las ROS sobre la expresión génica se ha estudiado en detalle en *Arabidopsis* y tabaco. El tratamiento de células de *Arabidopsis* con H_2O_2 altera el nivel de expresión de 175 genes (1-2% de los 11000 genes estudiados). De los 113 que se indujeron, varios codificaban proteínas con función antioxidante o estaban asociados con respuestas de defensa u otros estreses. También se encontraron genes con función de señalización (Desikan y cols., 2001). Asimismo, en hojas de tabaco aclimatadas a metil-viológeno (generador del radical superóxido) se modificó el nivel de expresión de un 2% de los genes. Entre los genes que se indujeron se encuentran antioxidantes, genes implicados en defensa frente a estrés, protección celular, desintoxicación, metabolismo de carbohidratos, síntesis proteica *de novo* y transducción de señales; en definitiva, una compleja variedad de respuestas celulares (Vranova y cols., 2002). La expresión génica en respuesta a estrés oxidativo parece estar coordinada a través de la interacción de factores de transcripción con elementos *cis* de los promotores de esos genes. Hay pruebas de que hay elementos *cis* sensibles a estrés oxidativo en levaduras, animales y plantas (Apel y Hirt, 2004). El análisis de la zona situada 1,1 kb por delante de la región 5' de todos los genes inducidos por H_2O_2 en *Arabidopsis* no reveló la presencia de sitios de unión comunes. Sin embargo, se identificaron regiones que son sitios potenciales de unión para factores de transcripción sensibles al estado redox (Desikan y cols., 2001).

Respuesta a estrés biótico y abiótico

Las ROS desempeñan un papel fundamental en la defensa planta-patógeno. Durante esta respuesta, las ROS se producen a través de la actividad potenciada de oxidasas y peroxidasas apoplásticas (ver 1.2.1.4.). El H_2O_2 producido difunde dentro de las células y junto con el ácido salicílico y el óxido nítrico (NO) activa muchas defensas vegetales (Klessig y cols., 2000). La planta produce más ROS y simultáneamente disminuye su capacidad para destruirlas, lo que motiva su acumulación y la activación de la muerte celular programada. No basta que la producción de ROS aumente para activar la muerte celular programada; es necesario que se inhiban los mecanismos de destrucción de ROS y que se active la síntesis de NO (Mittler y cols., 1999; Delledonne y cols., 2001). La función desempeñada por las ROS durante la muerte celular programada parece ser opuesta a la que desempeñan durante los estreses abióticos, donde mecanismos responsables de destruir las ROS se inducen para poder reducir así la concentración intracelular de dichas especies. Hay, por tanto, un aparente conflicto en lo que respecta al metabolismo de las ROS durante los estreses bióticos y abióticos que todavía no ha logrado resolverse. Dependiendo del tipo de estrés las plantas potencian la liberación de distintas ROS y/o éstas se generan en un compartimento distinto. De este modo,

durante la interacción incompatible planta-patógeno se producen enzimáticamente radicales superóxido que se convierten rápidamente en H_2O_2 que cruza la membrana plasmática. Las mismas ROS se producen en cloroplastos expuestos a un exceso de luz, sólo que a través de un mecanismo diferente, y las reacciones de estrés que inducen en cada caso son también distintas (Bray y cols., 2000; Hammond-Kosack y Jones, 2000). Hay muy pocos estudios que sugieren un efecto de señalización selectivo de una ROS (Jabs y cols., 1996) principalmente porque los estudios se han centrado en H_2O_2 y en menor medida en el radical superóxido. No obstante, se ha descrito que el oxígeno singlete induce un conjunto específico de respuestas (op den Camp y cols., 2003). Incluso se ha sugerido que el radical hidroxilo puede ser algo más que un subproducto tóxico del metabolismo del oxígeno (Apel y Hirt, 2004).

Respuesta a hormonas

Se ha demostrado que las ROS son esenciales como señales que median el cierre estomático inducido por el ácido abscísico. El H_2O_2 es un componente endógeno de la ruta de señalización de ácido abscísico en las células oclusivas de *Arabidopsis*. La acumulación de ROS inducida por ácido abscísico provoca el cierre estomático a través de la activación de canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática (Pei y cols., 2000). La fosforilación proteica también está implicada en la señalización de las células oclusivas, recientemente se ha identificado una quinasa que interviene entre la percepción del ácido abscísico y la señalización de ROS (Mustilli y cols., 2002). También se ha identificado una nueva función para el H_2O_2 en raíces de maíz: la señalización relacionada con auxina y gravitropismo (Joo y cols., 2001). La aplicación asimétrica de auxina induce la generación de ROS y la aplicación asimétrica de ROS provoca gravitropismo.

1.2.3. Especies de oxígeno en leguminosas

Los nódulos de las leguminosas tienen una enorme capacidad para producir ROS a pesar de que la concentración de O_2 libre en la zona central es sólo 5-60 nM (Appleby 1984, Hunt y Layzell, 1993). Las altas tasas de respiración mitocondrial y bacteroidal justifican en parte la gran capacidad del nódulo para producir ROS. No obstante, hay además otras causas por las que el nódulo es especialmente proclive a generar ROS: la abundancia de leghemoglobina, de proteínas sensibles a la oxidación y de Fe no proteico, así como la presencia de enzimas que producen superóxido y H_2O_2 . La oxileghemoglobina se autooxida espontáneamente a la forma férrica generando superóxido, especialmente a pH ácido. Además, cuando la proporción de H_2O_2 frente a la ferrileghemoglobina es mayor de 5:1 el grupo hemo se degrada y libera Fe libre que puede catalizar reacciones tipo Fenton generando hidroxilo. La ferredoxina puede reducir el O_2 a superóxido. Igualmente, el cofactor FeMo de la nitrogenasa, las proteínas

nitrogenasa y dinitrogenasa reductasa y la hidrogenasa se inactivan por el oxígeno y el proceso implica muy probablemente la formación de ROS. Las ROS también son el producto de enzimas como la xantina oxidasa, uricasa y lipoxigenasa. Esta última cataliza la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y produce hidroperóxidos y radicales superóxido (Lynch y Thompson, 1984). A su vez, los numerosos isozimas de SOD producen H_2O_2 . También es necesario comentar que los nódulos son extraordinariamente ricos en Fe, constituyente esencial de la nitrogenasa, la ferritina y la leghemoglobina (Ragland y Theil, 1993). El Fe unido a proteínas no suele participar en la formación de ROS; no obstante, el llamado “Fe catalítico” que engloba el Fe libre y el Fe quelado (como el Fe del grupo hemo) catalizan la descomposición de H_2O_2 en hidroxilo.

Las ROS son importantes en la formación y el desarrollo del nódulo, así como en la senescencia. La infección de las raíces de las leguminosas por los rizobios induce una reacción hipersensible que puede estar implicada en el control de la infección y la nodulación (Vasse y cols., 1993). Las células de la raíz responden a la infección con un aumento en la producción de ROS (Santos y cols., 2001). Uno de los genes que se induce más rápidamente en respuesta a rizobios o factores Nod compatibles, *rip1*, codifica una peroxidasa y tiene elementos *cis* en la región promotora que pueden responder a ROS. Dado que la aplicación exógena de H_2O_2 basta para activar la transcripción de *rip1* en ausencia de factores Nod, se piensa que las ROS pueden actuar en la ruta de transducción de señales de dichos compuestos (Ramu y cols., 2002). La acumulación de H_2O_2 en etapas más tardías de la formación del nódulo puede estar relacionada con la formación de la pared celular y el entrecruzamiento de glicoproteínas, dos procesos esenciales para que la infección culmine con éxito. Todavía no se ha logrado establecer qué enzimas son los responsables del aumento de ROS durante la infección y posterior organogénesis del nódulo. Por lo que respecta al origen de H_2O_2 , las enzimas responsables de su síntesis podrían ser peroxidasas unidas a membrana, oxalato oxidasas tipo germina y diamina oxidasas (Wisniewski y cols., 2000). No obstante, la posible implicación que las SODs pueden tener en este proceso todavía no se ha estudiado. Durante la senescencia se ha descrito la acumulación de una gran cantidad de H_2O_2 en las células y el apoplasto de la zona central del nódulo de soja (Alesandrini y cols., 2003). Como resultado de la producción incontrolada de ROS durante este periodo, se produce daño oxidativo a lípidos, proteínas y DNA en la senescencia natural (Evans y cols., 1999) e inducida por estrés (Matamoros y cols., 1999).

1.3. Sistemas antioxidantes en plantas

Para contrarrestar los efectos nocivos de las ROS, los organismos aerobios disponen de sistemas antioxidantes. Bajo esta denominación se engloba un conjunto de metabolitos y enzimas capaces de destruir eficazmente las ROS o prevenir su formación. Si en cualquier compartimento celular hay una producción excesiva de ROS, porque no existe un equilibrio entre la generación y la destrucción de estas especies, se produce una situación denominada estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 1999). El estrés oxidativo es una característica común en los procesos de estrés biótico y abiótico. No obstante, aunque las ROS pueden resultar tóxicas, también actúan como señales de gran importancia en el metabolismo celular. Por esta razón, las plantas necesitan al menos dos tipos de mecanismos para regular la concentración intracelular de ROS: uno que permita una fina regulación de los niveles de ROS en procesos de señalización y otro que permita destruir el exceso de ROS, producidos durante el estrés, para preservar los componentes celulares del daño oxidativo (Mittler, 2002; Matamoros y cols., 2003).

1.3.1. Metabolitos antioxidantes

1.3.1.1. Metabolitos hidrofóbicos

La protección frente a la peroxidación lipídica de las membranas se consigue por medio de varios compuestos hidrofóbicos. El β -caroteno es un pigmento fotosintético capaz de destruir el $^1\text{O}_2$. La zeaxantina es otro carotenoide e interviene en el ciclo de la xantofila, que permite disipar un exceso de energía de excitación en condiciones de alta intensidad luminosa. El α -tocoferol (vitamina E) es un componente ubicuo en los cloroplastos de todas las plantas superiores así como de las algas. Desempeña distintas funciones como antioxidante: destruir e inactivar el $^1\text{O}_2$, finalizar el proceso de peroxidación lipídica, y reparar formas de radicales libres de aminoácidos hidrofóbicos, especialmente Trp, Tyr, Met y His (Dalton, 1995). Los flavonoides y otros compuestos fenólicos también son capaces de inhibir la peroxidación lipídica interceptando los radicales peroxilo formados en las membranas.

Para proteger las membranas celulares de la peroxidación lipídica, el nódulo contiene α -tocoferol y flavonoides. En nódulos de soja la concentración de α -tocoferol es de $15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Evans y cols., 1999). Los flavonoides y otros polifenoles se encuentran a concentraciones de 0,4-1 mM y, además de actuar como moléculas señal en el inicio de la formación del nódulo, actúan como antioxidantes.

1.3.1.2. Ascorbato

El ascorbato (vitamina C) es un reductor y un antioxidante universal, esencial en el ciclo ascorbato-GSH (ver 1.3.2.2.). Sin embargo, también tiene efectos beneficiosos que no requieren de la presencia de ascorbato peroxidasa. El ascorbato puede destruir directamente ROS y regenerar el α -tocoferol oxidado. También está implicado en la hidroxilación de la prolina, la regulación del ciclo celular y numerosos procesos fundamentales del crecimiento y desarrollo vegetal (Noctor y Foyer, 1998). Se ha descrito que el ascorbato apoplástico es capaz de alterar las propiedades de la membrana plasmática e inhibir el entrecruzamiento de proteínas ricas en hidroxiprolina (Horemans y cols., 2000). A pesar de su importancia biológica, la ruta biosintética del ascorbato se elucidó recientemente (Wheeler y cols., 1998) y el enzima L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa (GLDH), que cataliza la etapa final de la síntesis, se ha localizado en la membrana interna mitocondrial (Horemans y cols., 2000).

El ascorbato se encuentra en los nódulos a concentraciones 1-2 mM (Dalton y cols., 1986; Gogorcena y cols., 1997) y su presencia está correlacionada con la efectividad del nódulo (Dalton y cols., 1993). Es un metabolito esencial para la ruta ascorbato-GSH, puede secuestrar directamente ROS y es capaz de reducir formas oxidadas de la leghemoglobina (Moreau y cols., 1995). El aporte de ascorbato a plantas de soja aumentó cuatro veces la actividad nitrogenasa y retrasó la senescencia nodular (Bashor y Dalton, 1999), lo que constituye una prueba inequívoca del efecto beneficioso que tiene este metabolito en el funcionamiento del nódulo.

1.3.1.3. Glutación

El tripéptido GSH (γ Glu-Cys-Gly) es el tiol no proteico más importante en plantas. Algunas plantas contienen homólogos de GSH, en los cuales la Gly del extremo carboxilo, se ha reemplazado por otros aminoácidos. Se ha descrito hGSH (γ Glu-Cys- β Ala) en leguminosas (Klapheck, 1988), hidroximetilglutación (γ Glu-Cys-Ser) en gramíneas (Klapheck y cols., 1992) y γ Glu-Cys-Glu en maíz (Meuwly y cols., 1993). Es un antioxidante muy estable y versátil que puede destruir ROS directamente y participar en el ciclo ascorbato-GSH para la eliminación de H_2O_2 . Su función como antioxidante reside en el grupo sulfhidrilo de la Cys, el cual tras oxidarse establece un puente disulfuro con el grupo tiol de una segunda molécula de GSH para formar GSSG (Figura 1.2). En los apartados 1.4.2. y 1.4.3. se describen la biosíntesis del GSH y el hGSH y las funciones desempeñadas por estos metabolitos.

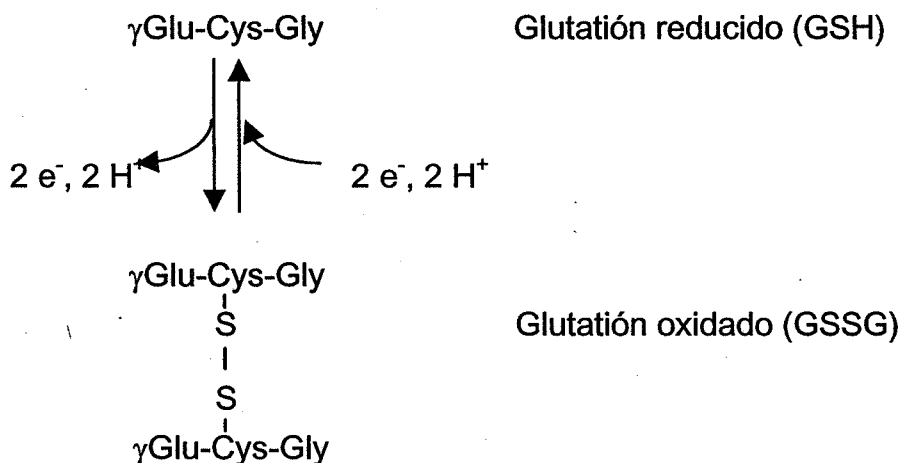


Figura 1.2 Estructura de las formas reducida y oxidada del GSH

Puesto que la concentración de tripéptidos tiólicos (GSH + hGSH) en nódulos efectivos es 3-4 veces superior que en nódulos no efectivos (Dalton y cols., 1993), se cree que el GSH y el hGSH desempeñan papeles protectores durante la fijación de nitrógeno. El GSH es el principal tiol no proteico en nódulos indeterminados y el hGSH en los determinados (Matamoros y cols., 1999). La concentración de GSH (0,4-1 mM) y hGSH (0,4-0,6 mM) son, en promedio, 2,2 y 6 veces mayores que en las hojas y raíces de las mismas plantas. Los tioles precursores, cisteína (30-120 μM) y γ -glutamilcisteína (7-50 μM) son también más abundantes en nódulos que en hojas o en raíces. La abundancia relativa de GSH y hGSH en diferentes tejidos y especies de leguminosas está determinada por las correspondientes tiol sintetetasas (Frendo y cols., 1999; Matamoros y cols., 1999). Durante la senescencia de los nódulos ya sea natural o inducida, por nitrato u oscuridad, los niveles de GSH y hGSH disminuyen. El envejecimiento causa una caída del 50% en el contenido de hGSH en nódulos de soja y judía y del 82% en el contenido de GSH en nódulos de guisante. La zona senescente de los nódulos de guisante posee un 49% menos de GSH que las zonas meristemática e infectada. Esta disminución puede deberse tanto a la inhibición de la síntesis como al aumento de la degradación de tioles dependiente de ROS (Matamoros y cols., 1999). Recientemente, se ha demostrado que la deficiencia en la síntesis de GSH y hGSH inhibe el adecuado desarrollo del nódulo en *Medicago truncatula*. Un nivel bajo de GSH o hGSH no altera el número de eventos de infección, pero reduce drásticamente la aparición de primordios nodulares (Frendo y cols., 2005).

1.3.2. Proteínas antioxidantes

Las principales proteínas antioxidantes de las que disponen las plantas para destruir las ROS son las superóxido dismutasas (SOD), la ascorbato peroxidasa (APX) y otros enzimas del ciclo ascorbato-glutación, catalasas, glutación peroxidasas (GPX), peroxirredoxinas y la ferritina (Mittler y cols., 2004).

1.3.2.1. Superóxido dismutasas

Las SODs constituyen una familia de metaloproteínas que se describirá en detalle en el apartado 1.5.

1.3.2.2. Ciclo ascorbato-glutación

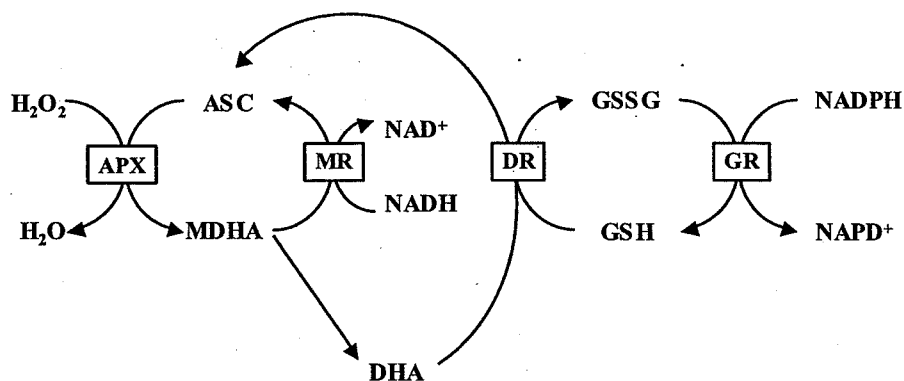


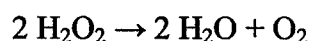
Figura 1.3 Esquema del ciclo ascorbato-GSH. DHA, deshidroascorbato; MDHA monodeshidroascorbato; APX, ascorbato peroxidasa; DR, deshidroascorbato reductasa; GR, glutación reductasa; MR, monodeshidroascorbato reductasa.

El hecho de que el ciclo ascorbato-GSH esté presente en el cloroplasto, citosol, mitocondria, peroxisoma y apoplasto, así como la gran afinidad de la APX por el H_2O_2 , sugieren que este ciclo desempeña un papel fundamental en la regulación del nivel de H_2O_2 en toda la célula (Mittler, 2002). El agente reductor en la primera reacción, catalizada por la APX, es el ascorbato, que se oxida a monodeshidroascorbato (MDHA). La monodeshidroascorbato reductasa (MR) reduce MDHA a ascorbato utilizando NAD(P)H. El deshidroascorbato (DHA) se produce espontáneamente a partir de MDHA y puede ser reducido a ascorbato por la deshidroascorbato reductasa (DR) utilizando GSH que se oxida a GSSG. El ciclo se cierra con la glutación reductasa (GR) que convierte GSSG de nuevo a GSH consumiendo NAD(P)H. La glutación reductasa es un enzima ubicuo en bacterias, hongos, protozoos, animales y plantas

debido a que el mantenimiento de una relación GSH/GSSG elevada resulta fundamental en el control del estado redox celular (Smith y cols., 1989).

1.3.2.3. Catalasas

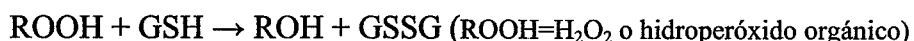
La catalasa es una hemoproteína tetramérica que cataliza la reacción:



En las plantas el enzima está localizado principalmente en los peroxisomas, donde elimina el H_2O_2 que producen la glicolato oxidasa o la uricasa. Está ausente en el citosol y en los cloroplastos, donde la eliminación de H_2O_2 se lleva a cabo fundamentalmente por la APX. Su afinidad por el H_2O_2 es muy baja ($K_m=1 \text{ M}$) lo que sugiere que la catalasa está implicada en la eliminación del exceso de ROS durante el estrés (Mittler, 2002). De hecho, se ha observado que este enzima es indispensable para la tolerancia al estrés oxidativo ya que plantas de tabaco transgénicas deficitarias en catalasa experimentan un incremento en el nivel de ROS en respuesta a estreses bióticos y abióticos (Willekens y cols., 1997).

1.3.2.4. Glutación peroxidasas

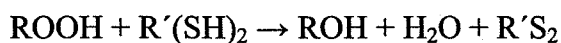
Las GPXs utilizan GSH como agente reductor y catalizan la reducción no sólo de H_2O_2 , sino también de hidroperóxidos orgánicos e hidroperóxidos lipídicos.



Inicialmente se pensó que este enzima no estaba presente en plantas, hasta que se describió actividad GPX en cítricos (Beeor-Tzahar y cols., 1995). A diferencia de lo que ocurre con las GPXs de mamíferos que son selenoproteínas, las enzimas de plantas poseen Cys en su sitio activo en la posición ocupada por la selenocisteína de las GPXs de animales. Las secuencias de las GPX descritas apuntan una localización plastidial; sin embargo, en cebada se han encontrado isoformas que previsiblemente están en el citosol y peroxisomas (Churin y cols., 1999).

1.3.2.5. Peroxirredoxinas

Las peroxirredoxinas (Prx) son pequeñas proteínas que funcionan como peroxidasas capaces de eliminar el H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos (Rouhier y Jacquot, 2002).



[R'(SH)₂=Tiorredoxina o Glutarredoxinas; ROOH=H₂O₂ o hidroperóxido orgánico]

Estas proteínas son peroxidases que carecen de grupo hemo. Para compensar la carencia de grupo prostético requieren un dador de electrones, frecuentemente las tiorredoxinas reducidas y en algunos casos también las glutarredoxinas. Todas las isoformas de peroxirredoxinas contienen al menos una Cys catalítica conservada. Existen cuatro subclases de peroxirredoxinas que se diferencian en el número de Cys catalíticas y su mecanismo enzimático. Los enzimas de la subclase 1-Cys Prx poseen una señal que dirige al núcleo, las subclases 2-CysPrx y Prx Q son cloroplásticas y dentro de las Prx tipo II se han descrito distintos tipos; incluídos varios citosólicos, uno cloroplástico y otro mitocondrial (Rouhier y Jacquot, 2002; Dietz, 2003).

1.3.2.6. Ferritina

Las plantas disponen de una proteína con efectos antioxidantes denominada ferritina, que evita que el hierro intervenga en reacciones tipo Fenton. Las ferritinas vegetales constan de una cavidad central donde se almacena el hierro rodeada de la envoltura proteica que consta de 24 subunidades idénticas. Esta proteína tiene la capacidad de almacenar hasta 4500 átomos de hierro en una forma inactiva evitando, de este modo, sus efectos perjudiciales y garantizando, al mismo tiempo, la disponibilidad de este elemento en aquellos procesos metabólicos en los que es esencial el hierro: síntesis de feroproteínas, DNA y algunas hormonas. Las ferritinas se acumulan en plastidios como los proplastidios, etioplastos y amiloplastos (Briat y Lobréaux, 1997).

1.3.3. Proteínas antioxidantes en el nódulo

El nódulo es un lugar especialmente proclive para la formación de ROS y debe estar provisto de mecanismos de defensa antioxidante que contrarresten el efecto de estas especies y permitan que la fijación de nitrógeno transcurra de manera eficiente (Becana y cols., 2000). En la **Figura 1.4** y en la **Tabla 1.3** se enumeran las proteínas antioxidantes presentes en los nódulos de las leguminosas, sus propiedades bioquímicas y su localización intracelular.

Tabla 1.3 Proteínas antioxidantes de nódulos de leguminosas

Proteína	Propiedades bioquímicas
CuZnSOD	En el citosol y los plastidios. Dímero (32 kD, 2 Cu, 2 Zn). Se inhibe por KCN y H ₂ O ₂ .
MnSOD	En mitocondria y bacteroides. El enzima vegetal es un tetrámero (82 kD, 4 Mn). El enzima bacteriano es un dímero (43 kD, 2 Mn) y puede ser cambialístico (Mn ó Fe). Resistente a KCN y H ₂ O ₂ .
FeSOD	En plastidios y citosol. Dímero (56-58 kD, 2 Fe). Estructuralmente relacionado con las MnSODs. Se inhibe por H ₂ O ₂ pero es resistente a KCN.
Catalasa	En peroxisomas y bacteroides. El enzima vegetal es un tetrámero (220 kD, 4 hemo). Se inhibe por KCN y aminotriazol. El tamaño de la subunidad del enzima bacteriano es 63 kD.
APX	Principalmente en el citosol (0,9% de la proteína soluble total del nódulo) y probablemente en plastidios. Existen isoformas unidas a membrana en mitocondria y posiblemente en peroxisomas. Dímero (subunidades de 27 kD, 2 hemo). Son inactivadas por <i>p</i> -cloromercuribenzoato y fuertemente inhibidas por KCN. La isoforma citosólica se distingue de la cloroplástica en que es estable en ausencia de ascorbato e inmunológicamente distinta. Todas las isoformas utilizan ascorbato como reductor a diferencia de las GPXs.
GPX ^a	En plastidios y citosol. Probablemente, monómeros (20-25 kD). No son selenoproteínas.
Monodeshidroascorbato reductasa	Principalmente en la pared celular, también en mitocondria y posiblemente en peroxisomas y membrana plasmática. Monómero (40 kD, 1 FAD, grupos tiol activos). 2 isoformas
Deshidroascorbato reductasa ^b	En citosol. Monómero (23 kD, grupos tiol activos). Lábil si no está en presencia de un tiol protector.
Glutación reductasa	En citosol, plastidios y mitocondria. Probablemente, un tetrámero (135-190 kD, subunidades de 32-60 kD)
γEC ^a	En plastidios. Los datos bioquímicos sugieren que es un dímero (58-60 kD). Muy lábil. Dependen de ATP, Mg ²⁺ y K ⁺ . Se inhibe <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> por butionina sulfoximina. Experimenta inhibición feed-back <i>in vitro</i> por GSH.
(h)GSHS ^c	En citosol y plastidios. Dímero (113-120 kD, subunidades de 56-61 kD). Depende de ATP y Mg ²⁺ . K _m =20-70 mM para γEC y 0,2-1 mM para Gly (GSHS). K _m = 1,9 mM para βAla (hGSHS).
Ferritina	En plastidios. Proteína multimérica (550-600 kD, subunidades de 23-28 kD). Al menos tres isoproteínas.

^a Masa molecular estimada a partir de secuencias de cDNA. ^b No hay datos disponibles para el enzima de nódulos. Los datos corresponden al enzima citosólico de tubérculo de patata (Dipierro y Borraccino, 1991).

^c Masa molecular del dímero para enzimas de plantas superiores (Rennenberg, 1997). Masa molecular de la subunidad estimada a partir de secuencias de cDNA de los enzimas del nódulo de guisante y judía. (Matamoras y cols., 2003)

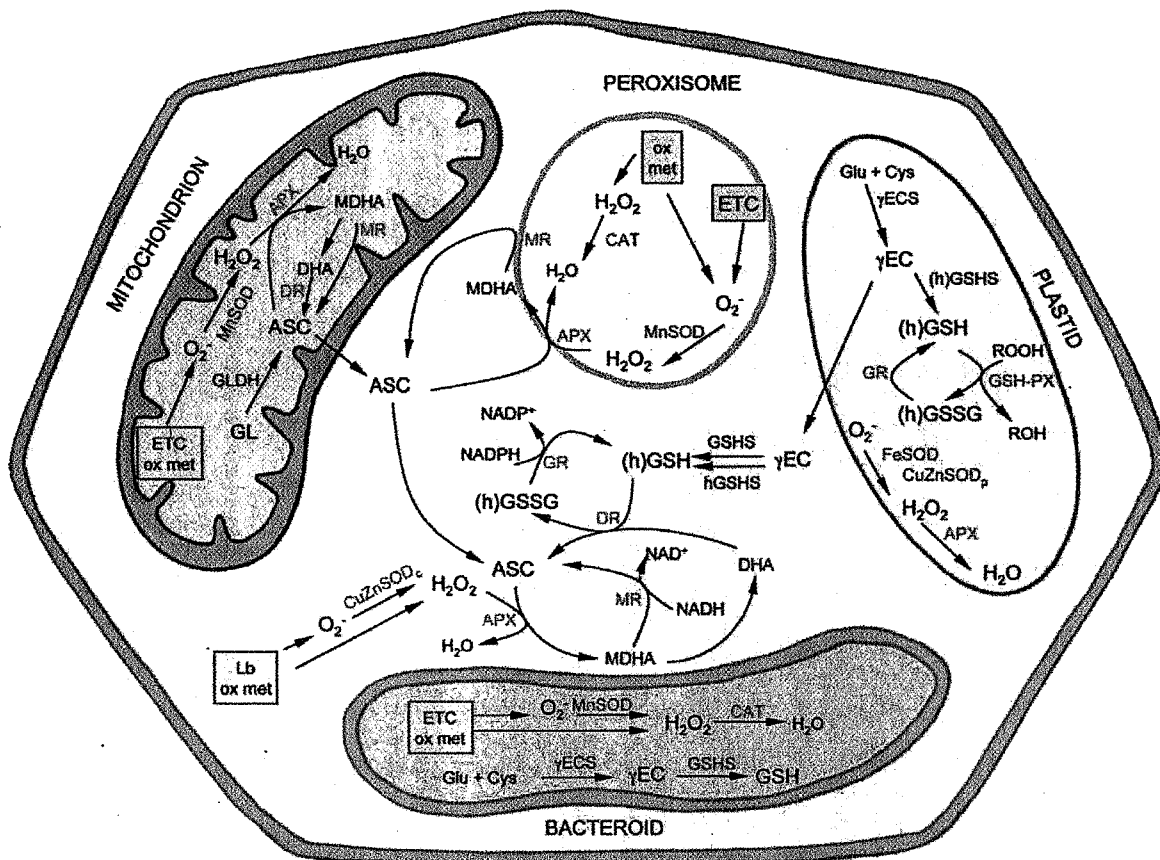


Figura 1.4 Enzimas antioxidantes de nódulos de leguminosas. ASC, ascorbato; CAT, catalasa; CuZnSODc, CuZnSOD citosólica; CuZnSODp, CuZnSOD plastidial; DHA, deshidroascorbato; deshidroascorbato reductasa; γ EC, γ -glutamylcisteína; γ ECS, γ -glutamylcisteína sintetasa; ETC, cadena de transporte electrónico; GL, L-galactono- γ -lactona; GLDH, L-galactono- γ -lactona deshidrogenasa; GR, glutatió reductasa; (h)GSH, (homo)glutatió, forma reducida; (h)GSHS, (homo)glutatió sintetasa; (h)GSSG, (homo)glutatió, forma oxidada; Lb, leghemoglobina; MDHA, monodeshidroascorbato; MR, monodeshidroascorbato reductasa; Ox met, metabolismo oxidativo (Matamoros y cols., 2003).

1.4. Metabolismo de tioles

1.4.1. Biosíntesis de cisteína

La síntesis de GSH de las células vegetales está regulada por el suministro de azufre de las plantas. En plantas sometidas a deficiencia de azufre la concentración de GSH se reduce. (Nikiforova y cols., 2003). Concretamente, la concentración de Cys es el factor que limita la biosíntesis de GSH. La síntesis de este aminoácido a partir de Ser y sulfuro transcurre en dos etapas catalizadas por la serina acetil transferasa (SAT) y la *o*-acetilserina(tiol)liasa (OASTL) (Saito 2000). La SAT sintetiza el producto intermedio *o*-acetilserina (*o*-AcSer) a partir de acetil-CoA y Ser, que posteriormente se combina con el sulfuro por la OASTL para dar Cys. Aunque la reducción de sulfato a sulfuro tiene lugar casi exclusivamente en el cloroplasto, la

SAT y la OASTL están localizadas en los tres compartimentos en los que se produce síntesis de proteínas: citosol, cloroplasto y mitocondria.

En *Arabidopsis* se ha observado que la exposición a Cd aumenta la expresión de los diferentes genes de SAT, así como la isoforma citosólica de la OASTL a nivel transcripcional (Domínguez-Solís y cols., 2001; Howarth y cols., 2003). Es decir, en respuesta al estrés por metales pesados se observa una activación generalizada de la maquinaria biosintética de Cys para satisfacer las demandas de la biosíntesis de fitoquelatinas (apartado 1.4.4.).

1.4.2. Biosíntesis de glutatión y homoglutatión

1.4.2.1. Tiol sintetetasas

La ruta biosintética del GSH es parecida en plantas, animales y microorganismos. Los aminoácidos constituyentes del tripéptido se unen en dos etapas dependientes de ATP catalizadas por la γ -glutamilcisteína sintetasa (γ ECS) y la glutatión sintetasa (GSHS), respectivamente (May y cols., 1998 b). La existencia en leguminosas de una homoglutatión sintetasa (hGSHS), que añade β Ala en lugar de Gly al extremo C-terminal de la γ EC, es lo que determina la presencia de hGSH en estas plantas (Klapheck y cols., 1988). Ninguno de los enzimas γ ECS y (h)GSHS ha sido purificado y caracterizado como resultado de las bajas actividades γ ECS y (h)GSHS en plantas y de la labilidad de estos enzimas. Por esta razón, los conocimientos sobre la bioquímica de la biosíntesis del GSH y el hGSH en plantas son escasos. La mayor parte de lo que se conoce de estos enzimas proviene de técnicas moleculares y de transformación vegetal. Los genes que codifican la γ ECS y la GSHS en la planta modelo *Arabidopsis* se aislaron por complementación funcional en *E. coli* (May y Leaver, 1994; Rawlins y cols., 1995). Se había especulado sobre la posible localización plastidial (y/o mitocondrial) de ambas proteínas en función de las secuencias de sus respectivos péptidos señal. Recientemente, se ha demostrado que en las hojas y en cultivos celulares de *Arabidopsis* y *B. juncea* la GSHS está localizada mayoritariamente en el citosol, aunque una pequeña cantidad se encuentra también en los plastidios. Por el contrario, la γ ECS es una proteína localizada enteramente en el cloroplasto. Según esta hipótesis el precursor de todo el GSH sintetizado en la célula vegetal es γ EC, exclusivamente plastidial, que debe ser exportado a otros compartimentos celulares. Dicho dipéptido puede representar también una vía para exportar Cys desde el cloroplasto al citosol (Wachter y cols., 2005). En la leguminosa modelo *M. truncatula* se han detectado dos genes que codifican GSHS y hGSHS. Se ha sugerido que dichos genes provienen de una duplicación génica que tuvo lugar después de la divergencia entre las Fabales, Solanales y Brassicales (Frendo y cols., 2001).

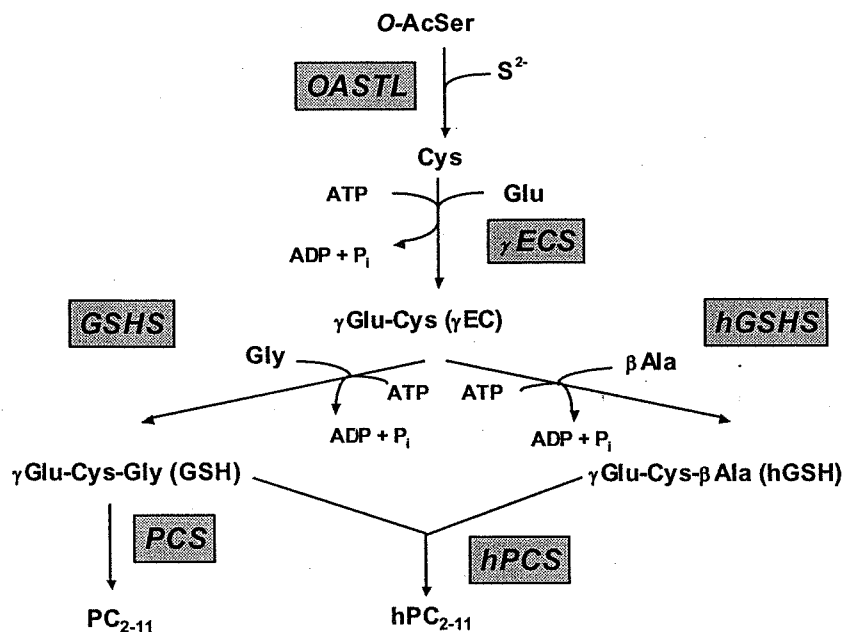


Figura 1.5 Biosíntesis de tioles y fitoquelatinas en leguminosas

1.4.2.2. Regulación de la biosíntesis de (homo)glutatión

La síntesis de GSH está controlada principalmente por la actividad γ ECS y la disponibilidad de Cys (ver apartado 1.4.1.). Así, el contenido de GSH en el mutante *cad-2* de *Arabidopsis*, que posee una mutación en el gen *γecs*, es sólo un tercio del presente en plantas control (Cobbett y cols., 1998). La supresión antisentido de la γ ECS en *Arabidopsis* reduce sustancialmente el nivel de GSH (Xiang y cols., 2001). En tejidos tratados con Cd la actividad γ ECS aumenta para satisfacer las demandas de GSH que precisa la síntesis de PCs (Rüegsegger y Brunold, 1992). La sobreexpresión de la γ ECS de *E. coli* (pero no la de la GSHTS) en álamo o tabaco aumenta claramente el contenido de GSH en hoja (Strohm y cols., 1995; Noctor y cols., 1996; Creissen y cols., 1999). El mismo resultado se obtiene como consecuencia de la sobreexpresión homóloga de la γ ECS de *Arabidopsis*. En este último caso, se ha observado que la reserva de Cys no se reduce, sino que aumenta ligeramente, en respuesta al aumento de la actividad γ ECS, lo que refleja una regulación coordinada entre la síntesis de GSH y Cys (Xiang y cols., 2001). En las plantas de álamo que sobreexpresan la γ ECS bacteriana aumenta la captación de azufre por las raíces para satisfacer la demanda de este elemento (Herschbach y cols., 2000). En discos de hoja de álamo incubados con Cys aumenta el contenido de GSH, especialmente a la luz; esto sugiere que el suministro de Cys es una limitación importante para la síntesis de GSH (Strohm y cols., 1995; Noctor y cols., 1996,1997).

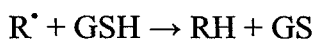
Se conoce poco acerca de la regulación coordinada de los genes *γecs* y *gshs* en plantas. La abundancia de ambos transcritos aumenta en respuesta a Cd en *B. juncea* (Schäfer y cols., 1998) y a Cd y Cu en *Arabidopsis* (Xiang y Oliver, 1998). Otro agente que induce la expresión de *γecs* y *gshs* es el ácido jasmónico (Xiang y Oliver, 1998). No obstante, aunque los metales pesados y el ácido jasmónico inducen la expresión de genes *γecs* y *gshs*, es necesario que se den condiciones de estrés oxidativo para inducir la traducción de los transcritos. Esto implica que el cociente GSH/GSSG y el H₂O₂ pueden estar implicados en el control postranscripcional de los genes de la ruta biosintética del GSH (Xiang y Oliver, 1998). De hecho, se ha encontrado que a la región 5'UTR del gen *γecs* de *Arabidopsis* se une una proteína represora que es liberada por cambios en el cociente GSH/GSSG o en presencia de H₂O₂. El control traduccional de la γ ECS puede estar basado, por tanto, en la formación de un complejo de unión a 5'UTR sensible al estado redox (Xiang y Bertrand, 2000).

La regulación postraduccional de la γ ECS a través de la inhibición por producto final (GSH) parece ser un factor importante para controlar la concentración de GSH de animales y plantas. La γ ECS de plantas de tabaco es inhibida por GSH de manera competitiva respecto al Glu (Hell y Bergmann, 1990). La modificación covalente también puede ser un factor importante. Hay pruebas que sugieren que la γ ECS de rata está regulada por fosforilación (Sun y cols., 1996) pero todavía no se ha encontrado nada similar en plantas. También hay evidencias de que en el control postraduccional hay implicados factores proteicos que son imprescindibles para lograr la actividad enzimática máxima (May y cols., 1998 b). En la γ ECS de mamíferos hay una subunidad reguladora que actúa incrementando la actividad de la subunidad catalítica. La subunidad reguladora actúa aumentando la K_i para el GSH y reduciendo la K_m para el glutamato, con lo que disminuye la restricción "feedback" y el enzima puede operar *in vivo* (Huang y cols., 1993). La subunidad catalítica puede ejercer su función sin la subunidad reguladora aunque sin alcanzar valores máximos (Mulcahy y cols., 1995). La síntesis de GSH en levadura o *E. coli* transformada con γ ECS de *Arabidopsis* es muy poco eficiente, quizás por la ausencia de proteínas reguladoras presentes sólo en plantas (May y cols., 1998 a).

1.4.3. Funciones del glutatión

Antioxidante

El GSH reacciona directamente con el radical superóxido, aunque en este sentido es mucho más efectivo el ascorbato. Asimismo, el GSH es capaz de eliminar el radical hidroxilo y "reparar" los radicales orgánicos (Halliwell y Gutteridge, 1999):



No obstante, la función más conocida del GSH como antioxidante es su participación en el ciclo ascorbato-GSH para la destrucción del H_2O_2 , especialmente en cloroplastos. Además, el GSH interviene en la eliminación del H_2O_2 a través de la GPX que también es capaz de eliminar hidroperóxidos lipídicos. Asimismo, se ha descrito la participación del hGSH en la eliminación del H_2O_2 (Zopes y cols., 1993).

Sensor redox en estreses ambientales

El nivel y estado redox del GSH actúan como un sensor que induce respuestas adaptativas a estreses ambientales. En condiciones fisiológicas el GSH está mayoritariamente en su forma reducida (>95%). En condiciones de estrés la concentración de GSSG aumenta y consiguientemente se reduce la relación GSH/GSSG. Aunque la formación de GSSG sirve de estímulo para algunos enzimas sujetos a modulación redox, la mayor parte de los enzimas sometidos a regulación tiol-disulfuro se activan por reducción. La ruta fotosintética de asimilación de carbono, por ejemplo, se activa a través de la reducción de grupos -SH (Leegood, 1990). Por tanto, si la relación GSH/GSSG disminuye, muchos enzimas pueden inactivarse a través de la formación de disulfuros mixtos con GSSG. De este modo se evita, además, la oxidación irreversible de grupos -SH y la subsiguiente degradación de las proteínas.

Defensa frente a patógenos

Se ha descrito la activación de genes de defensa inducida por el GSH en respuesta a patógenos (Wingate y cols., 1988; Edwards y cols., 1991). Se ha observado que, en algunos casos, el GSH puede emular los efectos del H_2O_2 durante la “explosión oxidativa”. Este fenómeno se explica si el H_2O_2 induce la síntesis de GSH (May y Leaver, 1993; Shi y cols., 1994) y ese aumento de GSH media los efectos de señalización del H_2O_2 . A su vez, los cambios en los niveles de GSH en células adyacentes a una célula infectada inducen la expresión de glutatión-*S*-transferasas y GPX (Mauch y Dudler, 1993; Levine y cols., 1994). Ambos tipos de enzimas están implicados en la eliminación de productos de peroxidación lipídica resultantes de la interacción incompatible planta-patógeno (May y cols., 1996). Niveles elevados de ROS pueden ser esenciales para inducir la muerte celular y evitar la propagación del patógeno en las células infectadas, mientras que niveles adecuados de GSH en células adyacentes a la infectada pueden contrarrestar los efectos del daño producido por la explosión oxidativa (May y cols., 1998 b). Por otro lado, el NO puede reaccionar con el GSH y formar *S*-nitrosoglutatión (GSNO), una especie de nitrógeno reactiva. En plantas, el GSNO es un potente inductor de

genes de defensa que puede funcionar además como una molécula señal que transporta NO unido a GSH a través de toda la planta (Durner y cols., 1998; Durner y Klessig, 1999).

Progresión del ciclo celular y desarrollo vegetal

En las células vegetales expuestas a estrés oxidativo se detiene la progresión del ciclo en la fase G1 y cesa la replicación del DNA. Se sabe que la detención del ciclo celular está correlacionada con una disminución de la reserva de antioxidantes reducidos y que el tratamiento con antioxidantes puede inducir mitosis en células quiescentes (Foyer y cols., 1997). También hay evidencias de que el GSH, está involucrado en la transición G1/S (Russo y cols., 1995), en la síntesis de DNA que tiene lugar después del estímulo proliferativo (Suthanthiran y cols., 1990) y en la elongación celular (Sánchez-Fernández y cols., 1997).

Transporte y almacenamiento de azufre

Entre las funciones del GSH, destacan también las relacionadas con el metabolismo del azufre. Se ha descrito que el GSH regula la captación de sulfato por la raíz (Herschbach y Rennenberg., 1994). Asimismo, es la principal forma en la que el azufre reducido se almacena y transporta para satisfacer las demandas de los distintos órganos durante el crecimiento y desarrollo vegetal. El GSH se transloca desde las hojas maduras o las semillas a la raíz, y también desde las hojas maduras a las más jóvenes (Rennenberg, 1995). El hGSH, a su vez, también actúa como una molécula transportadora de azufre reducido en plantas de *Vigna radiata* (Macnicol y Bergmann, 1984).

Desintoxicación de xenobióticos y metales pesados

Las glutatión-*S*-transferasas constituyen una familia multigénica heterogénea que se expresa fundamentalmente en el citosol y que ha evolucionado por duplicación génica para desarrollar varias funciones en las que el GSH actúa como cosustrato (Dixon y cols., 2002). La reacción más conocida es la transferencia de GSH a un xenobiótico electrofílico, típicamente un herbicida, dando lugar a un conjugado *S*-glutathionilado que es transportado rápidamente desde el citosol a la vacuola.

El GSH y hGSH también son los precursores sintéticos de las PCs y hPCs implicadas en la desintoxicación de metales pesados, especialmente Cd. La estructura y la biosíntesis de estos compuestos así como el mecanismo de desintoxicación de Cd se describen en el apartado 1.4.4.

1.4.4. Biosíntesis de fitoquelatinas

1.4.4.1. Metales pesados: toxicidad y tolerancia

Concentraciones altas de micronutrientes esenciales (Cu, Zn), así como de metales pesados no esenciales (As, Cd, Pb, Hg), conducen a reacciones con los grupos tiol de las proteínas y de algunos coenzimas, al desplazamiento de cofactores metálicos endógenos de sus sitios de unión y a la formación de ROS. Los iones Cd^{2+} , en concreto, pueden desplazar a Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} y Ca^{2+} de proteínas que requieren estos metales como cofactores (Stoys y Bagchi, 1995). El único caso descrito en el que el Cd actúa como un metal pesado esencial es la anhidrasa carbónica dependiente de Cd de diatomeas marinas (Lane y Morel, 2000).

Para combatir los efectos nocivos que causan los metales pesados, las plantas disponen de mecanismos de desintoxicación. No existe un único mecanismo que pueda explicar la tolerancia frente a un amplio número de metales. Entre los mecanismos propuestos se incluyen: la limitación del movimiento de los metales pesados hacia la raíz por acción de las micorrizas; la unión de dichos metales a la pared celular; la reducción de la captación del metal a través de la membrana plasmática y su expulsión al apoplasto; la formación de complejos en el citosol con ligandos como las PCs, las metalotioninas, así como algunos ácidos orgánicos (ácidos cítrico y málico) y aminoácidos (histidina, nicotianamina); y la compartimentación en la vacuola a través de transportadores localizados en el tonoplasto (Clemens, 2001; Hall, 2002).

1.4.4.2. Fitoquelatinas

Las PCs forman una familia de polipéptidos de estructura general $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, donde $n=2-11$. La síntesis de PCs se induce rápidamente después del tratamiento con metales pesados, especialmente con Cd (Rauser, 1995; Zenk, 1996; Cobbett 2000 a). Las PCs han sido identificadas en una amplia variedad de especies vegetales y microorganismos, así como en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Clemens y cols., 2001). Además, se han identificado variantes estructurales en algunas plantas: homo-PCs, $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{Ala}$; hidroximetil-PCs, $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Ser}$ e iso-PCs $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Glu}$ (Zenk, 1996). Hay numerosos estudios que han confirmado que el GSH es el sustrato para la síntesis de PCs. La exposición de cultivos celulares o plantas intactas a un inhibidor de la biosíntesis de GSH, la butionina sulfoximina, produce un aumento en la sensibilidad al Cd y la inhibición de la síntesis de PCs, que se restablecen tras la adición de GSH exógeno. Asimismo, mutantes de *Schizosaccharomyces pombe* y *Arabidopsis* deficientes en GSH también son deficientes en PCs e hipersensibles al Cd. Esto es especialmente notorio en el mutante *cad2-1* de *Arabidopsis*, que es parcialmente

deficiente en GSH y en actividad γ ECS como consecuencia de una delección de 6 pb en un exón del gen *γecs* (Cobbett y cols., 1998).

Los complejos PC-Cd que se forman entre los grupos sulfhidrilo de la PC y el metal son transportados a la vacuola. En extractos de *S. pombe* se pueden distinguir por cromatografía de filtración en gel dos tipos de complejos, uno de alto y otro de bajo peso molecular. Se cree que los complejos de bajo peso molecular funcionan como transportadores citoplasmáticos mientras que los de alto peso molecular actúan como una forma de almacenamiento del metal en la vacuola (Ortiz, 1995).

1.4.4.3. Fitoquelatinas sintasas

El enzima que cataliza la síntesis de PCs a partir de GSH, o de otras PCs sintetizadas previamente, se denomina fitoquelatina sintasa (PCS) y fue descubierto por Grill y cols. (1989). El gen *pcs* se identificó primero en *Arabidopsis* (Howden y cols., 1995). Los mutantes *cad1* son deficientes en PC y en actividad PCS pero tienen niveles de GSH equiparables al control, lo que sugiere un defecto en el gen de la PCS. El aislamiento de los primeros genes *pcs* se llevó a cabo simultáneamente por tres grupos, que trabajaban de forma independiente, en *Arabidopsis* (Vatamaniuk y cols., 1999; Ha y cols., 1999), trigo (Clemens y cols., 1999) y *S. pombe* (Ha y cols., 1999). Estos genes, que codifican polipéptidos de 50-55 kD, tienen un 40-50% de homología. La comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas muestra que esta homología no es uniforme a lo largo de toda la secuencia, sino que las regiones N-terminales son muy similares (40-50% de identidad), mientras que las regiones C-terminales están muy poco conservadas. Dichas regiones C-terminales tienen múltiples residuos Cys, que aparecen con frecuencia contiguos o muy próximos entre sí, como ocurre en el caso de las metalotioninas.

La existencia de los mutantes de *Arabidopsis* y *S. pombe*, deficientes en PCS y que muestran un fenotipo sensible al Cd y deficiente en PCs, pone de manifiesto la importancia de las PCs en la desintoxicación del Cd. Hay otros metales y metaloides (Hg, Pb, Ag, Cu, Zn) que activan *in vitro* la PCS de *Arabidopsis*, pero no hay evidencias experimentales que prueben la implicación del enzima en su desintoxicación. Dado que la presencia de Cd en el medio ambiente está motivada principalmente por la actividad humana (di Toppi y Gabbrielli, 1999) y que la PCS es un enzima constitutivo, las PCs deben de tener alguna otra función natural en las plantas y quizás también en otros organismos. Se ha propuesto que intervienen en la homeostasis de iones metálicos esenciales y en el metabolismo del hierro y el azufre, pero todavía no hay pruebas experimentales que corroboren esta hipótesis (Cobbett, 2000 b).

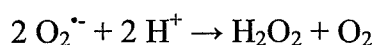
1.4.4.4. Regulación de la biosíntesis de fitoquelatinas

Los mecanismos de regulación de la biosíntesis de las PCs son múltiples. En plantas de *B. juncea* transgénicas que sobreexpresan los enzimas de la ruta biosintética del GSH aumenta la síntesis de PCs y la tolerancia al Cd (Zhu y cols., 1999 a,b). La exposición a Cd también provoca en esta especie un aumento del nivel de transcrito de la γ ECS (Schäfer y cols., 1998). Asimismo, la exposición de plantas de *Arabidopsis* a Cd y Cu produce un aumento del transcrito de los dos genes de la ruta biosintética de GSH y de la glutatión reductasa (Xiang y Oliver, 1998). Sin embargo, un punto clave en la regulación de la síntesis de PCs es la actividad PCS. El enzima parece expresarse de forma constitutiva independientemente de la exposición al metal puesto que se ha detectado en células de *Silene cucubalis* (Grill y cols., 1989), tomate (Chen y cols., 1997) y *Arabidopsis* (Howden y cols., 1995) en presencia tan sólo de cantidades traza de metales. Hay estudios de expresión en *Arabidopsis* que muestran que los niveles de mRNA de PCS1 no se ven afectados por la exposición a Cd u otros metales, lo que sugiere que este enzima no está regulado transcripcionalmente (Ha y cols., 1999; Vatamaniuk y cols., 2000). Estudios cinéticos con cultivos de células vegetales demuestran que la biosíntesis de PCs tiene lugar minutos después de la exposición a Cd y que es independiente de la síntesis de proteínas (Cobbett, 2000 a). Estos resultados sugieren que el enzima está regulado fundamentalmente por activación postraducciona en presencia de metales (Cobbett y Goldsbrough, 2002). Sin embargo, estudios más recientes indican que el transcrito del gen *Atpcs1* se incrementa con el Cd y que existe regulación transcripcional (Lee y Korban, 2002). Asimismo, el mRNA de la PCS1 de trigo se incrementa en raíces tras la exposición a Cd (Clemens y cols., 1999) lo que sugiere que la biosíntesis de PCs está regulada a nivel transcripcional y postraducciona.

1.5. Superóxido dismutasas

1.5.1. La familia de las superóxido dismutasas

Las SODs son enzimas ampliamente distribuidos en todos los organismos aerobios, anaerobios aerotolerantes y algunos anaerobios (Fridovich, 1986). Constituyen una familia de metaloenzimas multiméricos que eliminan el radical superóxido específica y rápidamente produciendo H_2O_2 y O_2 , por lo que constituyen una primera defensa frente a las ROS.



Hay múltiples pruebas que ponen de manifiesto la relevancia de este tipo de enzimas en el metabolismo de los organismos aerobios. Mutantes de *E. coli* y levadura deficientes en SODs son hipersensibles al oxígeno (Carlioz y Touati, 1986; Bilinski y cols., 1985; Van Loon y cols., 1986). Mutaciones en la CuZnSOD de *Drosophila* producen infertilidad y una reducción de la vida media de los organismos afectados (Phillips y cols., 1989). A su vez, hay evidencias de que la sobreexpresión de SODs puede proteger a las plantas frente a condiciones medioambientales adversas (Bowler y cols., 1992). No obstante, la prueba de su enorme importancia es que está presente, prácticamente, en la totalidad de los organismos aerobios y en todos los compartimentos celulares donde hay riesgo de estrés oxidativo (Bannister y cols., 1987; Fridovich, 1989).

En las plantas coexisten tres clases de SODs que se diferencian en los metales del centro catalítico (MnSOD, FeSOD y CuZnSOD), y todas ellas se han encontrado en la fracción vegetal del nódulo (Rubio y cols., 2001). Las tres SODs presentan distintas propiedades moleculares, incluyendo diferente sensibilidad a inhibidores, y están localizadas en distintos compartimentos celulares; sin embargo, todas están codificadas en el núcleo y son sintetizadas en el citoplasma. El mecanismo de reacción también es el mismo para las tres SODs: el centro catalítico del enzima se encuentra rodeado de residuos aminoacídicos cargados positivamente que atraen electrostáticamente los radicales superóxido. Posteriormente, el metal de transición en el sitio activo transfiere un electrón entre los dos radicales superóxido por medio de la alternancia de su estado redox (Bowler y cols., 1994). La actividad SOD se puede detectar específicamente en geles de poliacrilamida (Beauchamp y Fridovich, 1971). Estos geles se pueden utilizar para distinguir los distintos tipos de SODs basándose en la diferente sensibilidad que presentan frente a H_2O_2 y KCN (Kanematsu y Asada, 1990; Van Camp y cols., 1990). La CuZnSOD es inhibida por H_2O_2 y KCN, la FeSOD sólo por H_2O_2 y la MnSOD es resistente a ambos inhibidores. Por medio de este tipo de estudios se ha demostrado que existe una enorme variación en el número y tipo de SODs en las diferentes especies vegetales (Bridges y Salin, 1981).

1.5.2. Localización de las superóxido dismutasas

Las MnSODs y FeSODs son estructuralmente muy similares; de hecho, en algunos casos, las apoenzimas pueden funcionar indistintamente con cualquiera de los dos metales en el sitio activo (Meier y cols., 1982; Stallings y cols., 1984). Las CuZnSODs no muestran este tipo de relación estructural por lo que se cree que evolucionaron independientemente. Esto se refleja en el patrón de distribución filogenético. Las procariotas poseen MnSOD, FeSOD o ambas y, con algunas pocas excepciones (Steinman y Ely, 1990), carecen de CuZnSOD. La CuZnSOD

está presente en la mayor parte de los organismos eucariotas examinados, constituyendo la principal forma de SOD en angiospermas, gimnospermas, pteridofitas y briofitas (Kanematsu y Asada, 1990). Puesto que la CuZnSOD no está presente ni en cianobacterias ni en la mayor parte de algas verdes, se cree que los organismos fotosintéticos adquirieron este enzima en los últimos estadios de evolución de las algas verdes (Kanematsu y Asada, 1990; Steinman, 1982). La existencia de SODs con diferentes requerimientos en lo que respecta al cofactor metálico está relacionada, posiblemente, con la diferente disponibilidad en la biosfera de metales de transición en forma soluble. Esta disponibilidad fue variando en función del contenido de O₂ en la atmósfera a lo largo de las distintas eras geológicas (Bannister y cols., 1991; Alscher y cols., 2002).

1.5.2.1. FeSODs

Las FeSODs constituyen probablemente el grupo de SODs más antiguo y continúa siendo el más enigmático. Las FeSODs se han encontrado tanto en procariotas como en eucariotas, la información respecto a su distribución en plantas superiores es contradictoria. Los genes FeSOD (*sodB*) están ampliamente distribuidos en plantas pero, aparentemente, sólo se expresan en ciertas condiciones todavía poco conocidas. En todas las especies vegetales examinadas hasta ahora la FeSOD es homodimérica y está localizada mayoritariamente en el estroma cloroplástico. Se han encontrado FeSODs en los nódulos de la mayor parte de las leguminosas examinadas y se han conseguido aislar los cDNAs de algunas especies. Este hallazgo indica que las FeSODs desarrollan importantes funciones antioxidantes que no están relacionadas con la fotosíntesis. Se han identificado dos tipos de FeSODs en nódulos: la FeSOD típica localizada en los plastidios y otra inusual que se encuentra en el citosol (Morán y cols., 2003).

1.5.2.2. MnSODs

Las MnSODs se encuentran en procariotas y en las mitocondrias y peroxisomas de eucariotas. Pueden ser homodiméricas u homotetraméricas (Alscher y cols., 2002). Las MnSODs vegetales son homotetraméricas, se encuentran localizadas en la matriz mitocondrial, tienen aproximadamente un 65% de homología entre ellas y muestran una gran homología con las MnSODs bacterianas (Bowler y cols., 1994), lo que avala el origen endosimbiótico de estos orgánulos. Se han descrito MnSODs, en la matriz de peroxisomas de hojas de guisante (Palma y cols., 1998) y en la membrana de peroxisomas de sandía (Sandalio y del Río, 1988; Pator y cols., 1996). Las secuencias aminoacídicas derivadas de cuatro genes que codifican MnSOD en maíz (Zhu y Scandalios, 1993) poseen péptidos señal que dirigen la proteína a la mitocondria.

Sin embargo, ninguna de las secuencias MnSOD conocidas poseen un péptido señal que dirija a peroxisoma (Bowler y cols., 1994). Por lo que respecta a los nódulos de leguminosa, la MnSOD de mitocondrias de nódulos de soja es un tetrámero de 82 kD (Puppo y cols., 1987). Los bacteroides también contienen MnSODs pero, a diferencia de las mitocondriales, son homodímeros de 40-45 kD (Dimitrijevic y cols., 1984; Becana y cols., 1989). Algunas bacterias pueden utilizar la misma proteína SOD con Fe o Mn en el sitio activo, y a estas se las denomina cambialísticas. El enzima puede funcionar con cualquiera de los dos metales sin que se requiera ningún cambio conformacional en la estructura proteica del apoenzima (Alscher y cols., 2002). La MnSOD de *S. meliloti* es un enzima cambialístico (Santos y cols., 1999) resistente a H₂O₂, independientemente del metal presente en su centro activo. Estudios con mutantes han revelado que el gen que codifica la MnSOD (*sodA*) es esencial en el establecimiento de la simbiosis (Santos y cols., 2000).

1.5.2.3. CuZnSODs

Las CuZnSODs están presentes en diversos compartimentos de la célula eucariota y en el espacio periplásmico de algunas procariontas. Las CuZnSODs de plantas son generalmente proteínas homodiméricas que están presentes en el citosol, los cloroplastos y el espacio extracelular (Streller y cols., 1994; Streller y Wingsle, 1994). Las secuencias aminoacídicas deducidas de las dos isoformas más importantes en plantas, la citosólica y la cloroplástica, muestran aproximadamente un 68% de similitud, mientras que hay aproximadamente un 90% entre las isoformas cloroplásticas y un 80-90% entre las citosólicas (Alscher y cols., 2002). La isoforma cloroplástica es un enzima soluble localizado en el estroma (Asada y Kiso, 1973; Asada y cols., 1973) que también aparece asociado a la membrana tilacoidal donde está localizado el PSI (Ogawa y cols., 1995). Los estudios de inmunolocalización han demostrado, además, que dos CuZnSODs de espinaca supuestamente "citoplasmáticas" se encuentran realmente en el apoplasto y en el núcleo (Ogawa y cols., 1996). Se ha propuesto que la forma apoplástica de la CuZnSOD está implicada en la lignificación de la pared celular y que la nuclear preserva el DNA de posibles mutaciones provocadas por el superóxido. También ha conseguido aislarse una CuZnSOD de la matriz peroxisomal de sandía (Bueno y cols., 1995) que posiblemente esté implicada en la eliminación del superóxido producido por la xantina oxidasa evitando así la inactivación de la catalasa (Kono y Fridovich, 1982). En los nódulos de leguminosas también hay una CuZnSOD citosólica y otra plastidial. La isoenzima citosólica presenta una elevada actividad en nódulos jóvenes y, probablemente, esté implicada en la protección de la fijación de N₂ (Puppo y cols., 1982; Becana y cols., 1989). La CuZnSOD de *S. meliloti* se expresa durante la infección (Ampe y cols., 2003) aparentemente, en respuesta a los radicales superóxido producidos por la planta.

1.5.3. Efecto de los estreses ambientales

Los estreses ambientales tienen un efecto importante sobre la expresión y actividad de las SODs en plantas (Bowler y cols., 1992). Los estudios realizados también sugieren que hay una regulación diferencial frente al estrés oxidativo de los distintos tipos e isoformas de SODs en función de cual sea el estrés aplicado y el orgánulo más afectado durante la aplicación de dicho estrés (Scandalios y cols., 1997). En *Arabidopsis* este fenómeno puede justificarse, al menos en parte, a través del análisis bioinformático de los promotores de los siete genes que codifican SODs (3 FeSODs, 3 CuZnSODs y 1 MnSOD). Este análisis ha permitido distinguir la existencia de distintos patrones de secuencias consenso asociadas con la respuesta a diversos estreses (Alscher y cols., 2002). Sin embargo, hay evidencias de que la regulación de la expresión y la actividad no se produce exclusivamente a nivel transcripcional. La utilización de plantas de alfalfa transgénicas que sobreexpresan una MnSOD mitocondrial o una FeSOD plastidial también ha revelado la existencia de un mecanismo postraducciona l de compensación en la actividad SOD. Dicha compensación produce que los niveles de actividad SOD total en las hojas sean similares en las plantas no transformadas y en las transformadas, independientemente del transgen que sobreexpresen (Rubio y cols., 2001). Este mismo efecto de compensación ya se había descrito anteriormente en relación con la disponibilidad de cofactores metálicos presentes en el medio de cultivo (del Río y cols., 1978; Ayala y Sandmann, 1988), otro factor que también afecta a la expresión y actividad de las distintas SODs (Kurepa y cols., 1997).

Objetivos

2. OBJETIVOS

Los objetivos propuestos en esta Tesis son:

1. Estudiar la ruta de biosíntesis de tioles en la leguminosa modelo *Lotus japonicus* mediante la determinación de los niveles de mRNAs, proteínas y actividades de los enzimas implicados, así como de los correspondientes metabolitos.
2. Determinar el efecto del cadmio sobre la biosíntesis de tioles y (homo)fitoquelatinas en *Lotus* y obtener así información sobre los mecanismos de regulación de los enzimas implicados.
3. Identificar y caracterizar los genes que codifican las tiol sintetasas y (homo)fitoquelatina sintetasas de *Lotus*.
4. Expresar y purificar una γ -glutamilcisteína sintetasa recombinante, enzima clave de la biosíntesis de tioles. Asimismo, producir un anticuerpo policlonal monoespecífico y utilizarlo para estudiar los mecanismos de regulación de la proteína.
5. Localizar los mRNAs de las superóxido dismutasas por hibridación *in situ* e inmunolocalizar las proteínas por microscopía electrónica en nódulos.
6. Localizar H_2O_2 en nódulos por microscopía electrónica, utilizando una técnica basada en la acumulación de hidroperóxidos de cerio y estudiar el mecanismo de generación de H_2O_2 utilizando inhibidores enzimáticos.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos químicos, bioquímicos y de biología molecular

La solución de riego de las plantas se preparó con agua desionizada por ósmosis reversa. En los análisis experimentales se utilizó siempre agua Milli-Q (Millipore, Bedford, EEUU). Los reactivos utilizados para preparar la solución nutritiva de las plantas fueron de grado analítico y proceden de Panreac. Los disolventes orgánicos utilizados en la cromatografía líquida eran de grado HPLC y provienen igualmente de Panreac. El monobromobimano utilizado en la determinación de los tioles y las actividades tiol sintetasa era de Calbiochem (San Diego, EEUU). El resto de los reactivos empleados fue de la máxima calidad disponible de Sigma-Aldrich-Fluka (St. Louis, EEUU). Los enzimas de restricción empleados eran de Gibco (Invitrogen, Carlsbad, EEUU) o Amersham Biosciences (Little Chalfont, Reino Unido). La procedencia del resto de los reactivos de biología molecular que empleamos figura en el texto junto a cada producto.

3.2. Material biológico

Las diferentes simbiosis rizobio-leguminosa que se han utilizado a lo largo de este estudio se especifican en la **Tabla 3.1**. Las semillas de guisante y alfalfa se obtuvieron comercialmente. Las semillas de *Lotus* y las cepas bacterianas utilizadas fueron cedidas amablemente por diversos grupos: *L. japonicus* (Dra. J. Webb, Institute of Grassland and Environmental Research, Aberystwyth, Reino Unido); *M. loti* NZP 2235 (Dr. P. Gresshoff, Center for Legume Research, Australia); *R. leguminosarum* NLV8 (Dr. P. Aparicio-Tejo, Universidad Pública de



Navarra, Pamplona) y *S. meliloti* 102F78 (Dr. M. Sánchez-Díaz Universidad de Navarra, Pamplona).

Tabla 3.1 Simbiosis rizobio-leguminosa empleadas

Nombre común	Simbiosis
Lotus	<i>Lotus japonicus</i> 'Gifu' B-129 × <i>Mesorhizobium loti</i> NZP 2235
Alfalfa	<i>Medicago sativa</i> L. cv Aragón × <i>Sinorhizobium meliloti</i> 102F78
Guisante	<i>Pisum sativum</i> L. cv Lincoln × <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> NLV8

3.3. Cultivo de plantas y rizobios

3.3.1. Plantas

Las semillas se esterilizaron en 70% EtOH agitando suavemente durante 5 min y se lavaron con abundante agua destilada. Las de *Lotus* se escarificaron antes de esterilizarse. Las semillas germinaron a la luz en placas Petri sobre un papel humedecido. Transcurridos 2 d (*Lotus*) ó 3-6 d (otras leguminosas) las plántulas se transfirieron a macetas cuyo sustrato estaba lavado con solución nutritiva y se inocularon con el rizobio correspondiente. Las plantas crecieron en cámaras de ambiente controlado (ASL, Madrid) con una temperatura de 25/20 °C día/noche, 60-70% de humedad relativa y 16 h de fotoperiodo. La intensidad luminosa fue de 300-400 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (radiación fotosintéticamente activa), suministrada por una mezcla de lámparas fluorescentes (Sylvania WHO "coolwhite", 215 W) e incandescentes (Mazda, 60 W).

3.3.1.1. *Lotus*

Las plantas de *Lotus* crecieron sobre vermiculita, se regaron una vez por semana con solución B&D (Broughton y Dilworth, 1971) suplementada con 0,25 mM NH_4NO_3 (Tabla 3.2) y se cosecharon a los 44-50 d de la germinación. Se recogieron separadamente los nódulos, la raíz completa y los folíolos sin peciolo; se pesaron, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Tratamiento con cadmio de las plantas de *Lotus*

Durante los cuatro días previos a la cosecha, las plantas tratadas se regaron con una solución de 100 ó 200 μM de CdCl_2 . Como control se utilizaron plantas no tratadas con Cd.

Tabla 3.2 Composición de la solución nutritiva empleada para el cultivo de *Lotus*

Nutriente	Concentración (mg·L ⁻¹)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147
KH ₂ PO ₄	68
MgSO ₄ ·7H ₂ O	62
K ₂ SO ₄	44
Sequestrene 330Fe (6% Fe)	25
NH ₄ NO ₃	20

Nutriente	Concentración (µg·L ⁻¹)
MnSO ₄ ·H ₂ O	169
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	144
H ₃ BO ₃	124
CuSO ₄ ·5H ₂ O	50
Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	24
CoCl ₂ ·H ₂ O	24

El pH se ajustó a 6,5-6,7 con 2 M KOH

3.3.1.2. Otras leguminosas

Las plantas de guisante y alfalfa se cultivaron sobre perlita:vermiculita (1:1) y se regaron tres días por semana alternando agua destilada y solución nutritiva con 0,5 mM NH₄NO₃ (Tabla 3.3, Gogorcena y cols., 1997). Los nódulos de estas plantas se cosecharon a los 30-35 d (guisante) y 56 d (alfalfa), y el material se fijó inmediatamente. La composición del tampón de fijación utilizado varió en función del propósito para el que se destinó el tejido: hibridación *in situ* de RNA (apartado 3.14.), inmunolocalización (3.15.) o localización citoquímica de H₂O₂ (3.16.).

3.3.2. Rizobios

Las bacterias utilizadas para la nodulación de las plantas se cultivaron en medio líquido, preparado a base de manitol y extracto de levadura (Vincent, 1970; Tabla 3.4), a 28°C y 140 rpm en un agitador Innova 4000 (New Brunswick Scientific, Edison, EEUU). La inoculación de las plantas se realizó cuando los cultivos estaban al final de la fase de crecimiento logarítmica.

Tabla 3.3 Composición de la solución nutritiva empleada para el cultivo de guisante y alfalfa

Nutriente	Concentración (mg·L ⁻¹)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	800
KH ₂ PO ₄	540
K ₂ HPO ₄	90
CaSO ₄ ·2H ₂ O	500
NH ₄ NO ₃	40
Sequestrene 330Fe (6% Fe)	25

Nutriente	Concentración (µg·L ⁻¹)
MnSO ₄ ·H ₂ O	423
CuSO ₄ ·5H ₂ O	63
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	73
H ₃ BO ₃	775
NaCl	1.475
Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	30
CoCl ₂ ·H ₂ O	13

El pH se ajustó a 6,5 con 2 M KOH

Tabla 3.4 Composición del medio líquido empleado para el crecimiento de rizobios

Nutriente	Concentración (g·L ⁻¹)
Manitol	10,0
KH ₂ PO ₄	0,4
K ₂ HPO ₄	0,1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
Extracto de levadura	0,4

El pH se ajustó a 6,5 con azul de bromotimol 5% (p/v) en 2 M KOH

Tabla 3.5 Medios utilizados en cultivos de *E. coli*

Medio	Concentración	Componente
Luria-Bertani (LB)	1,0%	Triptona
	0,5%	Extracto de levadura
	1,0%	NaCl
Placas de LB	1,5%	LB + agar
SOC	2%	Triptona
	0,5%	Extracto de levadura
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂ ·6H ₂ O
	10 mM	MgSO ₄ ·7H ₂ O
	20 mM	glucosa

3.4. Cultivos de *E. coli*

Todos los cultivos en medio líquido crecieron, de no especificarse lo contrario, a 37°C y 225 rpm en un incubador orbital (New Brunswick Scientific). La composición de los medios de cultivo utilizados con *E. coli* se detallan en la **Tabla 3.5**.

En los experimentos de transformación se utilizaron placas de selección de LB que contenían 100 µg·mL⁻¹ de ampicilina o kanamicina, dependiendo del plásmido recombinante. En el caso de los vectores pCRII, pCRII-TOPO (Invitrogen) y pGEM-T Easy (Promega, Madison, EEUU), el examen de los transformantes se realizó en placas de LB que contenían el correspondiente antibiótico y sobre las que se había extendido 20 µL de 200 mM IPTG (Invitrogen) y 20 µL de 80 mg mL⁻¹ X-Gal (Invitrogen) en *N,N*'dimetilformamida.

3.5. Determinación del contenido de tioles y fitoquelatinas en *Lotus*

3.5.1. Contenido de tioles

Los tioles se extrajeron a 0°C en un tubo Eppendorf a partir de 20-40 mg de nódulos ó 50-100 mg de hojas o raíces con 10 µL·mg⁻¹ PF de 200 mM ácido metanosulfónico conteniendo 0,5 mM DTE. El extracto se centrifugó (13000g × 15 min) en frío y se reservó el sobrenadante, que fue utilizado como muestra en el análisis. A continuación, 200 µL de dicha muestra se mezclaron con 92 µL de 8 mM DTE, 400 µL de tampón 200 mM EPPS (pH 8,0), que contenía además 5 mM DTPA, y 8 µL de 5 M NaOH. Esta mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente para reducir los grupos sulfhidrilo oxidados. Transcurrido este tiempo se añadieron 200 µL de 7 mM MBB para derivatizar los tioles (Fahey and Newton, 1987) y la mezcla resultante se incubó durante 15 min más en oscuridad, ya que el MBB es fotosensible. La reacción de derivatización se detuvo añadiendo 350 µL de 20% HAc (v/v). Tras la derivatización las muestras se almacenaron a -80°C (Matamoros y cols., 1999).

Antes del análisis, las muestras derivatizadas se descongelaron, se centrifugaron durante 5 min, se filtraron usando Ultrafree-MC 0,45 µm (Amicon, Millipore) y una alícuota de 10 µL se inyectó en el HPLC donde los derivados del MBB se separaron en una columna C-18 (3,9 × 150 mm, 4 µm; Nova-Pak, Waters, Milford, EEUU). La composición de la fase móvil era 15% metanol / 0,25% HAc (pH 3,5) y el flujo 1 mL·min⁻¹ (modo isocrático). La detección fue por fluorescencia (detector modelo 474, Waters) con excitación a 380 nm y emisión a 480 nm (Klapheck, 1988). Los tiempos de retención y las áreas de los picos se determinaron

con el programa Millennium³² (Waters). La titulación de las soluciones concentradas de estándares, que se usaron tanto para la determinación de tioles como para la medida de las actividades tiol sintetasas (cuyo protocolo detallamos más adelante), se realizó mediante el reactivo de Ellman [ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)] utilizando un coeficiente de extinción de $13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 412 nm (Ellman,1959).

3.5.2. Contenido de fitoquelatinas

Las raíces (100-150 mg) se extrajeron a 0°C en un tubo Eppendorf con $2 \mu\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$ PF de 0,1% TFA y 0,5 mM DTPA. El extracto se centrifugó ($13000g \times 15 \text{ min}$) a 4°C, se filtró y una alícuota de 100 μL se inyectó en el HPLC. Las PCs se separaron en una columna C-18 ($4,6 \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$; Bakerbond Standard, Baker, Phillipsburg, EEUU) con un flujo de $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Se trabajó con dos solventes, A (0,1% TFA) y B (20% acetonitrilo en 0,1% TFA), con el siguiente gradiente: de 0 a 50% de B en 3 min, de 50-100% de B en 27 min, 100% de B durante 5 min, de 100 a 0% de B en 3 min y finalmente 100% de A durante 12 min para reequilibrar la columna. El eluyente se derivatizó a la salida de la columna (Grill y cols., 1987) con $75 \mu\text{M}$ ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) en tampón 80 mM KP_i (pH 7,8) con un flujo de $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La reacción de derivatización (específica para los grupos sulfhidrilo) tuvo lugar en un capilar metálico de 3,05 m de longitud y 2,5 mL de volumen total con un flujo de $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, y un tiempo de residencia de 94 s a 50°C. La absorbancia del material derivatizado se midió a 412 nm con un detector de fotiodo (PDA-996,Waters).

La identificación de las diferentes (h)PCs se realizó por coelución con estándares. El Dr. M.H. Zenk (Halle, Alemania) nos suministró generosamente una mezcla de PCs que contenía PC_2 , PC_3 y PC_4 . La síntesis de hPC_2 y hPC_3 se encargó a un servicio especializado. La identidad de las PCs y hPCs fue confirmada por espectrometría de masas mediante colaboración con el Dr. J. Abián (Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Barcelona).

3.6. Determinación de actividades de enzimas implicados en síntesis de tioles en *Lotus*

3.6.1. Actividades glutatión y homoglutatión sintetasas

La extracción y los ensayos de la GSHS y hGSHS se realizaron modificando métodos ya descritos (Hell and Bergmann, 1988; Kocsy y cols., 1996). Los enzimas se extrajeron de 50-100 mg de tejido con $10 \mu\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$ PF de un medio que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 8,0),

0,2 mM EDTA, 10% glicerol y 10 mM MgCl₂. El extracto se centrifugó (13000g × 15 min) y el sobrenadante se diluyó cinco veces con medio de extracción y se concentró de nuevo hasta el volumen inicial con membranas de ultrafiltración (Centricon C-10, Amicon, Millipore) con el fin de eliminar los metabolitos de bajo peso molecular que pudieran inhibir los ensayos enzimáticos. En dichos ensayos se cuantificó la cantidad de GSH o hGSH formados tras su derivatización con MBB. La mezcla de reacción contenía (volumen final, 200 µL): 100 mM Tris-HCl (pH 8,5), 50 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM fosfoenol piruvato, 5 U piruvato kinasa, 5 mM DTE, 0,5 mM γEC y 5 mM Gly para ensayar GSHS, o bien 5 mM βAla para hGSHS. La reacción se inició con 100 µL de muestra, tras preincubar la mezcla de reactivos 3 min, y se detuvo después de 0 y 60 min a 30°C. Para detener la reacción se tomaron 80 µL de mezcla de ensayo y se añadieron 300 µL de un tampón 200 mM EPPS (pH 8,0), que contenía además 5 mM DTPA, y 120 µL de 7 mM MBB. La reacción de derivatización se llevó a cabo durante 15 min en oscuridad y se detuvo añadiendo 97 µL de 40% HAc (v/v). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su análisis por HPLC.

3.6.2. Actividad fitoquelatina sintasa

Los protocolos para las extracciones y los ensayos de PCS están basados en trabajos publicados (Grill y cols., 1989; Oven y cols., 2002). El fundamento del ensayo consiste en cuantificar la cantidad formada de PCs. La PCS se extrajo de 100-150 mg de raíz con 2 µL·mg⁻¹ PF de un medio que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10% glicerol y 10 mM β-mercaptoetanol. El extracto se centrifugó (13000g × 15 min) y el sobrenadante se utilizó para el ensayo. La mezcla de reacción contenía (volumen final, 150 µL): 120 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM β-mercaptoetanol, 0,5 mM CdCl₂ y 5 mM GSH. La reacción se inició añadiendo 50 µL de muestra, tras preincubar la mezcla de reactivos 3 min, y se detuvo después de 0 y 60 min a 35°C. Para detener la reacción se tomaron 70 µL de mezcla de ensayo y se añadieron 20 µL de 2,5% TFA para que la muestra tuviera pH 2 (como el solvente A). En el caso del blanco, que contenía tampón de extracción en lugar de extracto, fueron necesarios 28 µL de 0,5% TFA.

Para ensayar actividad PCS de enzimas recombinantes (ver apartado 3.13.3.) en extractos de *E. coli* se partió de cultivos de 100 mL de LB. Cuando la A₆₀₀ alcanzó 0,8-0,9 se indujeron con 100 µM IPTG a 18°C durante la noche. Se ensayó la actividad de alícuotas de 20 mL. El pellet de células se resuspendió en 1 mL de 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM NaCl y 10 mM β-mercaptoetanol, se sonicó 4 × 30 s, se centrifugó (13000g × 10 min) en frío y el sobrenadante se dializó en columnas HiTrap Desalting 5 mL (Amersham Biosciences). La mezcla de reacción contenía 120 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM β-mercaptoetanol,

0,5 mM CdCl₂ y 5 mM GSH. La reacción se inició añadiendo 100 µL de muestra, tras preincubar la mezcla 3 min, y se paró después de 0 y 30 min a 35°C. La reacción se detuvo añadiendo 16 µL de 2,5% TFA (para AtPCS1) o 5% TFA (para LjPCS1), a 70 µL de mezcla. Después de parar la reacción, la mezcla de reacción se centrifugó (13000g × 10 min), se filtró y una muestra de 50 µL se inyectó en el HPLC para cuantificar las PCs sintetizadas durante el ensayo.

Para ensayar actividad PCS de enzimas recombinantes a partir del enzima recombinante purificado se partió de cultivos de 500 mL crecido en las mismas condiciones. Se ensayó la actividad de alícuotas de 30 mL. El pellet de células se resuspendió en 1 mL de 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl, 10% glicerol, 50 mM imidazol y 10 mM β-mercaptoetanol. Se sonicó 4 × 30 s, se centrifugó (13000g × 10 min) en frío y el sobrenadante se cargó en columnas HiTrap Chelating 1 mL (Amersham Biosciences). La columna se lavó con 5 mL del mismo medio empleado para resuspender las células. A continuación, la proteína se eluyó con 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl, 10% glicerol, 250 mM imidazol y 10 mM β-mercaptoetanol. Posteriormente, la muestra se dializó en columnas HiTrap Desalting 5 mL (Amersham Biosciences) utilizando 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl, 10% glicerol y 1 mM β-mercaptoetanol. Se recogió 2 mL de eluido, se concentró con membranas de ultrafiltración (Centricon C-10) hasta 500 µL y se determinó la actividad PCS tal y como se ha descrito en el caso de los extractos de *E. coli*.

Los dos siguientes apartados se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Tabata (DNA Research Institute, Kazusa, Japón) en el marco del proyecto de secuenciación del genoma de *L. japonicus*.

3.7. Aislamiento y caracterización de los cDNAs de las tiol sintetasas de *Lotus*

3.7.1. Secuencias de cDNA de la glutatión y homoglutatión sintetasas

3.7.1.1. Análisis por PCR de genotecas de cDNA

Para aislar la secuencia de cDNA de la GSHS, se examinó por PCR una genoteca λ-Uni-ZAP XR (λ-ZAP digerido con *Eco* RI and *Xho* I) de nódulos de *Lotus* suministrada por el Dr. J. Stougaard (University of Aarhus, Aarhus, Dinamarca) utilizando “cebadores degenerados” (*gshs* sentido y *gshs* antisentido) que permitían amplificar un fragmento interno de la secuencia. Dichos cebadores estaban basados en cDNAs de GSHS de diversas plantas:

Arabidopsis (U22359 y AJ243813), tomate (AF017984), mostaza india (Y10984) y *Medicago truncatula* (AF075699 y AF075700). Las secuencias de los oligonucleótidos eran:

gshs sentido 5'-CG[A/C]AACATGTA[C/T]GA[C/T]CA[A/G]CATT-3'
gshs antisentido 5'-CCTTCTCT[C/T]TG[A/G]GG[C/T]TTCAT-3'

La mezcla de PCR contenía 0,5 μ M de cada cebador, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 0,05% (v/v) de detergente W-1 y 1,5 U de *Taq* polimerasa (Gibco) en un volumen final de 25 μ L. El programa de PCR constó de las siguientes etapas: 3 min \times 95°C, 6 ciclos (75 s \times 95°C, 60 s \times 59°C disminuyendo 0,5°C cada ciclo, 90 s \times 72°C), 35 ciclos (75 s \times 95°C, 60 s \times 56°C, 90 s \times 72°C) y 10 min \times 72°C. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-200 (MJ Research, Waltham, EEUU), obteniéndose un fragmento de 460 bp que se subclonó en pCRII (Invitrogen) y se secuenció.

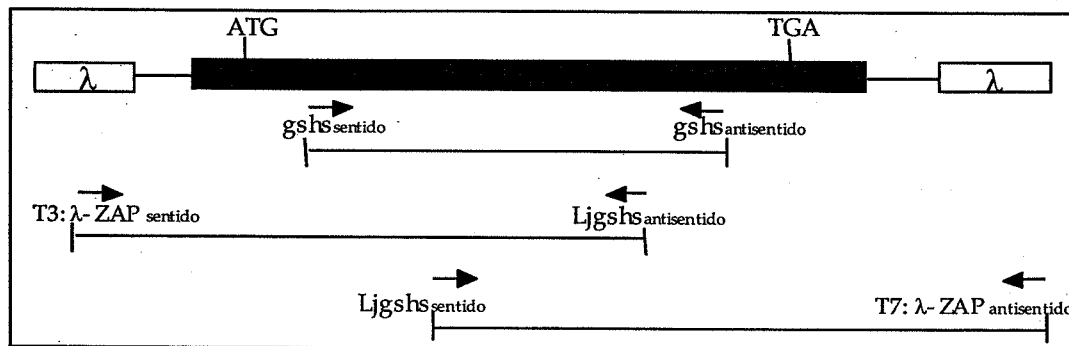


Figura 3.1 Esquema de la elucidación de la secuencia de cDNA de las GSHS y hGSHS de Lotus

Para amplificar los extremos 5' y 3' se diseñó una nueva pareja de cebadores, basándonos en la secuencia interna ya obtenida, y se utilizaron en combinación con los oligonucleótidos T7 y T3. El tamaño de los amplicones era 1012 bp en el caso del extremo 5' y 1193 en el caso del extremo 3'.

T3	5'-GCAATTAACCCTCACTAAAGGG-3'
<i>Ljgshs sentido</i>	5'-GGCAGAAGTTGATCGAGAAGG-3'
<i>Ljgshs antisentido</i>	5'-GTAGTCTGGCTCTCCATTCTG-3'
T7	5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

La mezcla de PCR contenía 0,2 μ M de cada cebador, 0,24 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 0,05% (v/v) detergente W-1 y 1,25 unidades de *Taq* polimerasa en un volumen final de 25 μ L. El programa constó de una etapa de desnaturalización de 3 min \times 95°C, 40 ciclos (45 s \times 95°C, 45 s \times gradiente 50-65°C y 90 s \times 72°C) y una etapa de elongación de 10 min \times 72°C. Los

mismos cebadores se emplearon en combinación con T7 y T3 para aislar el cDNA de la hGSHS, esta vez, de una genoteca de cDNA de hojas de *Lotus*.

Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa (Pronadisa, Madrid) al 1% (con $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ EtBr, opcionalmente). El tampón de electroforesis y el gel se prepararon en TBE [90 mM Tris (pH 8,0), 90 mM H_3BO_3 , 2 mM EDTA]. Las muestras se mezclaron en una proporción 5:1 (muestra:tampón) con un stock de tampón concentrado 6×: 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol y 30% glicerol, antes de ser cargadas en el gel. Como mezcla de marcadores de peso molecular se utilizó 1 kb Plus DNA ladder (Gibco) o bien DNA de fago λ (Sigma) digerido con *Pst* I. Las electroforesis se llevaron a cabo en el sistema Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, Hercules, EEUU) de electroforesis horizontal, a 100 V durante 60-75 min. A continuación, los geles que no contenían EtBr se tiñeron durante 45 min con una solución de $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ EtBr en TBE (Sambrook y cols., 1989) y posteriormente se aclararon en agua para reducir el ruido de fondo. Las bandas se visualizaron usando un equipo Gel-Doc 2000 (Bio-Rad) y el programa Quantity One 4.1.1 (Bio-Rad).

Subclonación de fragmentos de cDNA

Se recortaron las bandas del tamaño molecular esperado, se purificaron con el Concert Matrix Gel Extraction System (Gibco) o Agarosa Gel DNA Extraction Kit (Roche, Basel, Suiza) y se eluyeron con 10 μL de TE [10 mM Tris-HCl (pH 8,0-8,5), 0,1 mM EDTA]. Para subclonar los fragmentos amplificados en pCRII se utilizaron 6 μL de inserto, 1 μL de tampón de ligación 10× [660 mM Tris-HCl (pH 7,6), 66 mM MgCl_2 , 100 mM DTT, 660 μM ATP], 50 ng de vector linearizado y 3 U de T4 DNA ligasa. La ligación se realizó por la noche en un baño termostático a 16°C. Al día siguiente, se mezclaron cuidadosamente 2 μL de esta mezcla con 50 μL de células competentes TOP 10F' (previamente descongeladas en hielo). Seguidamente, las células se mantuvieron en hielo durante 30 min más antes de realizar un choque térmico a 42°C durante 30 s. A continuación, se pusieron en hielo inmediatamente durante 2 min, se añadió 250 μL de medio SOC (Tabla 3.5), se incubaron a 37°C con agitación (200 rpm) durante 1 h y se sembraron en placas de selección con kanamicina, IPTG y X-Gal. Las placas se incubaron a 37°C toda la noche. Para confirmar que las colonias estuviesen realmente transformadas con plásmidos recombinantes usamos dos estrategias alternativas:

Lisis alcalina

Se partió de un cultivo de 3 mL de LB del clon crecido por la noche. El pellet de células se resuspendió en 50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) y 10 mM EDTA. La lisis se llevó a cabo en 0,2 M NaOH / 1% SDS, y a continuación se neutralizó con KAc / HAc (5 M Ac^- ,

3 M K⁺). El lisado se centrifugó (15500g × 10 min) para eliminar desechos celulares y al sobrenadante se le añadió 0,1 vol de 3 M NaAc (pH 5,2) y 2,5 vol de EtOH absoluto para precipitar el DNA. Se centrifugó (15500g × 15 min) a 4°C, el pellet se lavó con 70% EtOH y se resuspendió en TE (pH 8,0) con 20 µg·mL⁻¹ RNasa A. Finalmente, una alícuota se digirió a 37°C con *Eco* RI para comprobar que se liberaba el inserto del tamaño esperado (Sambrook, 1989). Los resultados se visualizaron en un gel de agarosa.

PCR de colonia

Se preparó una mezcla que contenía tampón de PCR 10×, 0,5 mM dNTPs, 0,2 µM cebadores *M13 sentido* (-20) y *M13 antisentido* (secuencias de pCRII) y *Taq* polimerasa 1U /50 µL de mezcla de reacción. Con ayuda de una punta estéril se resembró cada clon en una nueva placa de selección que se incubó toda la noche a 37°C. Antes de desecharla, dicha punta se introdujo en 25 µL de mezcla de PCR y se agitó arriba y abajo varias veces para liberar células en la mezcla. El programa de PCR fue 10 min × 94°C para romper las células e inactivar las nucleasas, 20-30 ciclos de amplificación (1 min × 94°C, 1 min × 55°C, 1 min × 72°C) y finalmente 10 min × 72°C. Los resultados se visualizaron en un gel de agarosa. Escogimos colonias de las que se hubiera amplificado un fragmento del tamaño esperado.

El DNA plasmídico se purificó con GFX Purification System (Amersham Biosciences) o bien High Pure Plasmid Isolation kit (Roche) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Se utilizó una alícuota para realizar un análisis de restricción con *Eco* RI y el resto de la muestra se secuenció en ambas direcciones. Las secuencias de los fragmentos de cDNA clonados se procesaron con el programa DNAid 1.8 (Dardel y Bensoussan, 1988).

3.7.1.2. 5'RACE

La elucidación de la secuencia del extremo 5' del cDNA de mayor longitud de la GSHS (ver apartado 4.2.) se llevó a cabo por 5'RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*). Se extrajo RNA de nódulos con el kit TRIR (*Total RNA Isolation Reagent*; ABgene, Epsom, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, para sintetizar la primera hebra de cDNA, purificar los productos obtenidos, agregar una cola poli(dC) en el extremo 3' del cDNA sintetizado y amplificar la región de interés se empleó el kit "5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends. Version 2.0" (Invitrogen), tal y como recomendaba el fabricante. En la síntesis de la primera hebra de cDNA se empleó el cebador: 5'-AACCATTGCGCATCAAAACT-3'.

Para amplificar la región de interés se llevó a cabo una PCR sobre el cDNA con poli(dC). La composición de la mezcla de PCR fue (volumen final, 50 μ L): 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 μ M de cada cebador, 200 μ M de cada dNTP y 2,5 U *Taq* DNA polimerasa. El programa constó de una etapa de desnaturalización de 3 min \times 94°C, 45 ciclos de amplificación (45 s \times 94°C, 45 s \times 60°C y 90 s \times 72°C) y una etapa de elongación de 10 min \times 72°C. Los cebadores empleados en esta PCR fueron *AAP* (*Abridged Anchor Primer*; suministrado en el kit): 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGII GGGIIG-3' y *Ljgshs antisentido*: 5'-GTAGTCTGGCTCTCCATTCTG-3' como oligonucleótido específico. La colocación selectiva de desoxiinosinas en la región 3' de *AAP* mantiene una baja estabilidad en dicho extremo del oligonucleótido y establece una temperatura de fusión para la región correspondiente a las últimas 16 bp del cebador comparable a la del oligonucleótido específico. Al mismo tiempo, se promueve la hibridación específica de este oligonucleótido con la cola poli(dC) y se minimiza la posible hibridación inespecífica con regiones internas ricas en citosinas.

Para aumentar la cantidad de DNA obtenida se llevó a cabo una "nested PCR" a partir del producto amplificado pero con los siguientes oligonucleótidos (0,2 μ M): *AAP*: 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' y *Ljgshs 5'UTR antisentido*: 5'-TGGAACCGTTACCA TTGACA-3' como oligo específico. Los resultados se visualizaron en un gel de agarosa. La banda del tamaño esperado (>200 pb) se extrajo de la agarosa y se secuenció con el cebador 5'-TGGAACCGTTACCATTGACA-3'.

3.7.2. Secuencia de cDNA de la γ -glutamilcisteína sintetasa

A partir de una genoteca de cDNA de raíz de *Lotus* se obtuvo una EST que codificaba una región de la γ ECS. No se encontraron ESTs equivalentes en genotecas de hoja o nódulo. A continuación, se diseñó un cebador directo basado en el extremo 3' de dicha EST y la secuencia completa de cDNA se elucidó por el método "primer walking" (Voss y cols., 1993). Se obtuvieron dos cebadores directos más en el "walking" y las secuencias generadas en cada ronda se ensamblaron para obtener la secuencia definitiva. Los tres cebadores utilizados fueron:

5'-TAAACTCCCACGTAGAC-3'

5'-AGAAGTCCCTGAATGTC-3'

5'-TCAGCACAAGTCTGATG-3'

3.8. Análisis de las secuencias de cDNA y proteínas

Los alineamientos de secuencia y análisis de homología se realizaron utilizando los programas PileUp y Gap, respectivamente, del Genetics Computer Group (Madison, EEUU) o bien con los programas Emma-Showalign de Emboss (EMBO Open Software Suite, EMBO, Heidelberg, Alemania). Los análisis filogenéticos se realizaron con CLUSTAL W 1.7 (Thompson y cols., 1994). La representación gráfica de las reconstrucciones filogenéticas se realizó con Phylodendron's Phylogenetic tree printer (Phylodendron versión 0,8d, Genome Informatics Lab, Indiana University, Bloomington, EEUU). Los elementos reguladores en las regiones promotoras se buscaron con PLACE (Higo y cols., 1999) y PlantCARE (Lescot y cols., 2002). Las predicciones de la localización subcelular y análisis de péptidos señal se realizaron con MitoProtII (Claros, 1995), PSORT (Nakai y Kanehisa, 1992) y ChloroP y TransitP (Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark, Lyngby, Dinamarca) siguiendo las recomendaciones de Von Heijne y cols., (1989).

3.9. Aislamiento de secuencias de genes *tiol sintetasa* y *fitoquelatinas sintetasa* de *Lotus*

Se generó una genoteca genómica de *L. japonicus* "Miyakojima" MG-20 en TACs (*Transformation-competent Artificial Chromosomes*) (Liu y cols., 1999). Para el aislamiento de los genes de las tiol sintetetas se diseñaron oligonucleótidos basándose en las correspondientes secuencias de cDNA. En el caso de los genes *pcs* el diseño de los cebadores se basó en la secuencia *pcs1* de *Glycine max* (AF411075). Con los cebadores (Tabla 3.6) se realizó un escrutinio por PCR de la genoteca TAC de acuerdo con el método "three-dimensional pooling" (Sato y cols., 2001). Los productos de PCR se secuenciaron para confirmar su identidad. La secuencia de nucleótidos de cada inserto TAC se determinó utilizando el método "bridging shotgun" y los genes se localizaron utilizando marcadores de las secuencias TAC (Sato y cols., 2001) por medio de los oligos que aparecen a continuación (Tabla 3.6). La secuencia del gen *γecs* se encontró en el clon LjT04E19, las de *gshs* y *hgshs* en el clon LjT44N05 y las de *pcs* en LjT27M11. En este último caso, se encontraron tres genes *pcs* con homología a las secuencias de *Arabidopsis* (AF135155) y *G. max*.

Tabla 3.6 Cebadores usados en el estudio de los genes de las tiol sintetasas de *Lotus*

Gen diana	Cebador	Uso
<i>yeccs</i>	5'-AACTTCTATTTTCCTCAAGTATCAGC-3' 5'-TGCTTATTAATCACGTCTACGTGGG-3'	Aislamiento del gen en el clon LjT04E19
	5'-TCATCTCTAATTATAAACCACTCC-3' 5'-GACTGAGTCAATCAAAATGTG-3'	Localización de LjT04E19 en el genoma
<i>gshs</i>	5'-TCGACTCACACTTICTCTACCG-3' 5'-TGGAACCGTTACCATTGACA-3'	Aislamiento del gen en el clon LjT44N05
<i>hgshs</i>	5'-AGGTGGATGTGGATCTGGTT 3' 5'-TCGAAGCTGGAAGAATCGTT-3'	
<i>gshs/hgshs</i>	5'-AAGTACTTAAGTTTGTGTTAATGAC-3' 5'-AAATGATTATTAATATTGACCTTTG-3'	Localización de LjT44N05 en el genoma

3.10. Análisis de la expresión génica en plantas de *Lotus*

Se aisló el RNA total de nódulos, raíces y hojas de *Lotus* usando el RNAqueous kit (Ambion, Austin, EEUU). Para RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*), el RNA total (5 µg) se trató con DNasa I (Roche) y la transcripción inversa se realizó utilizando cebadores poli-T₁₇ y MMLVR (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, Promega) en presencia de inhibidor de RNasa (Roche). Se comprobó que el RNA estaba libre de DNA genómico realizando reacciones control con cebadores de ubiquitina de *L. japonicus*, en las cuales se había omitido la etapa correspondiente a la transcripción inversa. La ausencia de DNA genómico contaminante también se confirmó en la RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), cuyas curvas de disociación mostraban un único producto de PCR para cada gen.

Para el análisis de expresión por RT-PCR, a diferente número de ciclos de amplificación, la mezcla de PCR contenía 0,5 mM dNTPs, 0,2 µM cebadores (Tabla 3.7) y 1 U de DNA polimerasa de *Thermus thermophilus* (Biotools, Madrid) en un volumen final de 25 µL. Las condiciones de la PCR fueron 5 min × 94°C, n ciclos (30 s × 94°C, 40 s × 54°C, 30 s × 72°C) y 10 min × 72°C. El valor de n se especifica en la leyenda de la Figura 4.5. Los geles teñidos con EtBr se visualizaron con Gel Doc 2000 (Bio-Rad) y el software Quantity One 4.1.1.

Tabla 3.7 Cebadores empleados en el estudio de la expresión de los genes de las tiol sintetetas de Lotus por RT-PCR

Gen diana	Secuencia	Amplicón (bp)
<i>γecs</i>	5'-ATGCTGCCCTTTGTTTTTG-3'	534
	5'-AACACCTCCGCTACCTCAT-3'	
<i>gshs</i>	5'-TGGCTCAACAACAACAACAT-3'	535
	5'-GTGACAAGACTCCCTAAACCA-3'	
<i>hgshs</i>	5'-ATGGGGGTAGGTGGATGT-3'	408
	5'-CAGTAACTTTCAGGTAATGG-3'	
<i>ubiquitina</i>	5'-ATGCAGAT ^C / _T TTTGTGAAGAC-3'	
	5'-ACCACCACG ^G / _A AGACGGAG-3'	

Para qRT-PCR, se diseñaron cebadores por medio de Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, EEUU). La mezcla de PCR contenía 0,3 μM cebadores (Tabla 3.8) y 10 μL de SYBR Green I PCR Master Mix en un volumen total de 20 μL. Las reacciones para el análisis de los genes de las tiol sintetetas se llevaron a cabo en un “ABI Prism 7000 Sequence Detection System” (Applied Biosystems) utilizando un protocolo estándar 10 min × 95°C y 40 ciclos (15 s × 95°C, 1 min × 60°C). Las curvas de disociación revelaron que se había amplificado un único producto de PCR para cada gen y que no se había producido hibridación cruzada entre *gshs* y *hgshs*. Las temperaturas de fusión fueron 76,1°C para el producto de PCR de *hgshs* y 71,2°C para el de *gshs*. En el caso de los genes *pcs* las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador “iCycler IQ” (Bio-Rad). El programa de PCR constó de una etapa inicial para activar la polimerasa (5 min × 95°C), 45 ciclos de amplificación y cuantificación (15 s × 95°C, 1 min × 60°C) y finalmente una curva de fusión (55 a 95°C).

Tabla 3.8 Cebadores empleados en el estudio de la expresión de los genes tiol sinteteta de Lotus por qRT-PCR.

Gen diana	Secuencia	Amplicón (bp)
<i>γecs</i>	5'-GGCATGCTGCCCTTTGTTT-3'	107
	5'-TCGATATATTTGTGTTTCCGATAGACA-3'	
<i>gshs</i>	5'-AACACTATTTCTCTTCATTTGCTGG-3'	53
	5'-TGAAGTTCAGTGACAAGACTCCCTAA-3'	
<i>hgshs</i>	5'-AAAAGTTCCTGGTGTGGGCTT-3'	77
	5'-GCTTCCAGTAACTTTCAGGTAATGG-3'	
<i>β-actina</i>	5'-GCATTGTTGGTCGTCCTCGT-3'	79
	5'-TGTGCCTCATCCCCAACATA-3'	

Tabla 3.8 (continuación) Cebadores empleados en el estudio de la expresión de los genes pcs de Lotus por qRT-PCR.

Gen diana	Secuencia	Amplicón (bp)
<i>pcs1</i>	5'-TTGCTGTCGTGAAACATGCA-3'	50
	5'-GGCTTGTCATCTTCCGCTTT-3'	
<i>pcs2</i>	5'-AAGCAGAGTTGGTGACTTCAGCT-3'	50
	5'-TATAGACTTACGCTCGCCATGG-3'	
<i>pcs3</i>	5'-TTGCATACCACCATGGCAAG-3'	50
	5'-AGAAGGGAGGACTCTGCGGT-3'	
<i>psl1</i>	5'-GCCCAAAAATTTACCCTCA-3'	50
	5'-GGGCCACAAGTATAGCCAGGT-3'	
<i>ubiquitina</i>	5'-TTCACCTTGTGCTCCGTCTTC-3'	50
	5'-AACAAACAGCACACAGACAA-3'	

3.11. Expresión de γ -glutamylcisteína sintetasa recombinante y producción de anticuerpo policlonal mono específico

3.11.1. Clonación de γ -glutamylcisteína sintetasa

El ORF correspondiente a la γ ECS de *Phaseolus vulgaris* sin el péptido señal (PvECS) fue amplificado por PCR usando cebadores específicos (*sentido*: 5'-CCATGGCGAGCCCGCCCACTG-3' y *antisentido*: 5'-GCGGCCGCTAAGACACCCTTAATAAAG-3'). El producto se clonó en el vector pCRII (Invitrogen), el fragmento amplificado se escindió del plásmido recombinante por digestión con los enzimas *Nco* I y *Pst* I y se clonó en un plásmido de expresión modificado a partir de pMAL-c2 (New England Biolabs, Beverly, EEUU). El plásmido modificado (pMAL-c2*) contenía una secuencia, inserta en el punto de corte *Xmn* I del sitio de clonaje múltiple del vector comercial, que codificaba una secuencia de 6 \times His, un sitio de corte para trombina y un sitio de corte para *Nco* I. La proteína recombinante de fusión (MBP-poliHis-PvECS) contenía en el extremo amino la MBP (42,5 kD), proveniente del vector, seguida de una secuencia de 6 \times His y la PvECS madura (51 kD). Finalmente, la construcción pMAL-c2*:PvECS se utilizó para transformar células *E. coli* DH5 α competentes obtenidas por el método del RbCl y un clon positivo, aislado de placas de selección con ampicilina 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, fue secuenciado.

3.11.2. Expresión heteróloga de γ -glutamylcisteína sintetasa recombinante

La construcción recombinante pMAL-c2^{*}:PvECS se introdujo en células de *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, Madison, EEUU). Para verificar la expresión de la proteína de fusión se inocularon 100 mL de LB (ampicilina 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) con una alícuota de 200 μL de un cultivo de 3 mL del clon recombinante crecido toda la noche a 37°C. Cuando la A_{600} del cultivo de 100 mL alcanzó 0,7-0,8, la expresión de la proteína se indujo con una concentración y tiempo óptimos de IPTG (250 μM , 2 h a 37°C). Como controles negativos se utilizaron un cultivo que contenía células BL21(DE3) sin transformar crecidas en LB sin antibiótico y otro del clon recombinante pero sin inducir con IPTG. De cada cultivo se tomaron alícuotas de 1-1,5 mL, se cosecharon las células a 15000g, se desechó el sobrenadante y los pellets de células se guardaron a -80°C hasta su utilización. Las células fueron lisadas en 100 μL de 8 M urea, 0,1 M NaH_2PO_4 y 10 mM Tris-HCl (pH 8). Esta suspensión se centrifugó a 15000g y se determinó proteína total del sobrenadante por el método de Bradford (Bio-Rad).

Electroforesis de proteína en geles de poliacrilamida con SDS

Se empleó un sistema Mini-PROTEAN II o III (Bio-Rad), de electroforesis vertical, y geles SDS-PAGE (Laemmli, 1970) de 0,75 mm de espesor (Tabla 3.9). Se cargaron 10 μg de proteína por pocillo en un gel que contenía 4,6% (concentrador) y 7,5% (separador) de poliacrilamida. Las muestras se mezclaron con un stock de tampón concentrado [62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% glicerol, 2,3% SDS y 5% β -mercaptoetanol] en una proporción mínima 4:1 (muestra:tampón) y se hirvieron durante 5 min. El tampón de electroforesis fue 25 mM Tris (pH 8,3), 192 mM glicina y 0,1% SDS. Para controlar el progreso de la electroforesis y la subsiguiente electrotransferencia se usaron "Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range" (Bio-Rad).

Tabla 3.9 Composición de los geles empleados en SDS-PAGE

Reactivo (Bio-Rad) (calidad electroforesis)	Concentrador	Separador	
	4,6%	7,5%	10%
Acrilamida/Bisacrilamida (40% T, 3% C)	0,58 mL	1,69 mL	2,25 mL
Agua bidestilada	3,00 mL	4,31 mL	3,75 mL
1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS (pH 8,8)	-	3,00 mL	3,00 mL
0,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS (pH 6,8)	1,43 mL	-	-
TEMED	10 μL	10 μL	10 μL
Persulfato de amonio 10% (p/v)	50 μL	50 μL	50 μL
Volumen total de la mezcla	5 mL	9 mL	9 mL

$T = [(g \text{ acrilamida} + g \text{ bisacrilamida}) / \text{volumen total}] \cdot 100$. Concentración total de monómero

$C = [g \text{ bisacrilamida} / (g \text{ acrilamida} + g \text{ bisacrilamida})] \cdot 100$. Proporción de bisacrilamida

Electrotransferencia e inmunoblot frente a poliHis

La mezcla de proteínas, una vez separada en el gel, se transfirió a una membrana BioTrace™PVDF (Pall Corporation, Ann Arbor, EEUU). La electrotransferencia tuvo lugar durante toda la noche a 4 °C y 15 V en 25 mM Tris, 192 mM glicina y 20% metanol. La membrana con las proteínas se bloqueó durante 1 h en leche desnatada al 5% en 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) y 500 mM NaCl. Como anticuerpo primario en el análisis western se empleó un anticuerpo monoclonal que reconocía la secuencia de 6×His, “Monoclonal Anti-polyhistidine Clone His-1” (Sigma). La dilución utilizada fue 1:3000 y la incubación se llevó a cabo en 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl y 0,05% Tween-20 durante 1 h. Como anticuerpo secundario se empleó “Anti-mouse IgG Alkaline Phosphatase Conjugate” (Sigma) a una dilución 1:30000 (en el mismo tampón) durante 1 h. Para visualizar las bandas inmunoreactivas se usó “BCIP/NBT Blue Liquid Substrate for Membranes” (Sigma), que dio lugar a un producto insoluble de color violáceo allí donde estaba presente la fosfatasa alcalina.

Solubilidad de γ -glutamylcisteína sintetasa recombinante

Para comprobar el grado de solubilidad de la proteína, el pellet de células correspondiente a un cultivo de 100 mL de pMAL-c2*:PvECS (inducido 2 h con IPTG 250 μ M) se resuspendió en 1 mL de 20 mM NaP_i (pH 7,4) y NaCl 0,5 M. La lisis celular se llevó a cabo con un ciclo de congelación (N₂ líquido)-descongelación (37°C) seguido de sonicación 4×30 s con un sonicador Heat systems XL2020™ (Heat Systems Incorporated, Farmingdale, EEUU). El lisado se centrifugó (15500g × 15 min) a 4°C y se reservó tanto el sobrenadante como el pellet, que se resuspendió en un tampón 8 M urea. El contenido de proteína recombinante tanto del sobrenadante como del pellet se analizó por western-blot. Como control se utilizó el extracto completo de *E. coli* que expresaba la proteína de fusión MBP-poliHis-PvECS.

3.11.3. Purificación de γ -glutamylcisteína sintetasa recombinante

Condiciones empleadas en la expresión de la proteína

La cantidad necesaria de MBP-poliHis-PvECS para producir un anticuerpo policlonal monoespecífico se obtuvo partiendo de cultivos de 500 mL. Como inóculo se usó una alícuota de un cultivo de 3 mL de LB (100 μ g·mL⁻¹ ampicilina) del clon recombinante crecido toda la noche a 37°C. Se añadió 1 mL de dicho cultivo a un matraz erlenmeyer de 2 L que contenía 500 mL de LB (100 μ g·mL⁻¹ ampicilina) y el nuevo cultivo se mantuvo a 37°C hasta que la A₆₀₀ alcanzó 0,7-0,8, momento en el que se indujo con 250 μ M IPTG durante 2 h a 37 °C. Las células se cosecharon (5000g × 15 min), se lavaron con 20 mM NaP_i (pH 7,4) y 0,5 M NaCl se volvieron a centrifugar a 5000g y el pellet se resuspendió en 5 mL del mismo medio usado en

el lavado [20 mM NaP_i (pH 7,4) y 0,5 M NaCl], se congeló en N₂ líquido y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

Para aislar la proteína, la suspensión de células recombinantes se descongeló a 37°C y se sonicó 6×30 s. El lisado se centrifugó en frío (25000g × 40 min) y el pellet se resuspendió en 5 mL de 20 mM NaP_i (pH 7,4), 0,5 M NaCl, 25 mM imidazol y 6 M guanidina. Se volvió a centrifugar en frío (25000g × 20 min), se reservó el sobrenadante (S1) y el pellet se volvió a resuspender en 5 mL del mismo medio. Esta suspensión se sonicó otros 30 s, se centrifugó en frío (25000g × 20 min) y el sobrenadante (S2) se mezcló con S1 hasta homogeneidad.

Cromatografía sobre metal inmovilizado

La proteína MBP-poliHis-PvECS se purificó en un solo paso a partir de la mezcla S1+S2 por cromatografía de afinidad sobre metal inmovilizado utilizando HiTrap Chelating HP 5 mL (Amersham Biosciences). El flujo fue de 2,5 mL·min⁻¹ cuando la fase móvil contenía 6 M guanidina; con el resto de los medios fue 5 mL·min⁻¹, tal como recomienda el fabricante. Tanto las muestras como los medios utilizados se filtraron (0,45 µm) antes de usarse. Después de lavar la columna con 2-3 vol de agua se hicieron pasar 5 vol de 100 mM NiSO₄ y el exceso de Ni²⁺ se eliminó con 2 vol de agua. A continuación, la columna se equilibró con 5 vol de 20 mM NaP_i (pH 7,4), 0,5 M NaCl, 25 mM imidazol y 6 M guanidina; es decir, el mismo medio en el que se hallaba disuelta la muestra. Este medio contenía 6 M guanidina para solubilizar agregados proteicos insolubles (como cuerpos de inclusión), una alta concentración de NaCl para evitar fenómenos de intercambio iónico y 25 mM imidazol para minimizar uniones inespecíficas de proteínas. Posteriormente, se cargó la muestra y la columna se lavó con 7 vol del mismo medio con el que se había equilibrado para eliminar lo que no hubiese quedado retenido de forma específica. Para eluir la proteína se utilizaron 5 vol de 20 mM NaP_i (pH 7,4), 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol y 6 M guanidina. Finalmente, la columna se limpió con 5 vol de 20 mM NaP_i (pH 7,4), 50 mM EDTA y 6 M guanidina para eliminar el metal, y a continuación con 20 vol de agua para eliminar cualquier traza de EDTA.

Muestra utilizada en la producción del anticuerpo

La proteína eluida fue concentrada desde 25 mL hasta 100-150 µL con membranas de ultrafiltración (Centricon C-30). Se estimó la pureza de la proteína por SDS-PAGE y análisis western, puesto que debía ser del 70% como mínimo. El rendimiento por cada 500 mL de cultivo fue de 1-1,5 mg. La composición del medio de elución era inadecuada para llevar a cabo el proceso de inmunización por las elevadas concentraciones de NaCl, imidazol y guanidina. Por esta razón, la proteína se precipitó en tubos Eppendorf añadiendo 15-20 vol de NaP_i 20 mM (pH 7,4). Posteriormente, se centrifugó en frío (15500g × 15 min) y los pellets se

lavaron dos veces con el mismo medio que se había utilizado para la precipitación. Una alícuota de la muestra se resuspendió en 4% SDS, y el resto se liofilizó (Savant Instrument, Holbrook, EEUU). La proteína de la alícuota resuspendida en 4% SDS se cuantificó con el “DC Protein Assay kit” (Bio-Rad) y se analizó por SDS-PAGE (10 μ g) y western (0,5 μ g). Las proteínas separadas por SDS-PAGE se visualizaron tiñendo los geles durante 0,5-2 h en 0,05% (p/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma), 40% EtOH, 10% Hac, y para desteñir 1-2 h en 40% EtOH, 10% HAC. La proteína liofilizada se envió a un servicio especializado (Biogenes, Berlin, Alemania) para producir un anticuerpo policlonal mono específico. En total se precisaron 6-7 mg de proteína para inmunizar dos conejos (siguiendo protocolos estándar) y preparar una columna de afinidad para purificar las IgGs específicas a partir de los antisueros.

Para comprobar que el anticuerpo producido reconocía una genuina γ ECS utilizamos un antisuero policlonal producido frente a la γ ECS de *Brassica juncea* (Wachter, 2005). El análisis western-blot de extractos de *B. juncea*, reveló que nuestro anticuerpo y el antisuero policlonal frente a la γ ECS de *B. juncea* reconocían una misma banda del tamaño esperado (51-53 kD). Por otro lado, para comprobar que la banda que reconocía el anticuerpo obtenido frente a la proteína de fusión no era atribuible a la MBP se utilizó antisuero anti-MBP comercial como control negativo (New England Biolabs).

3.12. Western-blot de γ -glutamylcisteína sintetasa en raíces de *Lotus* expuestas a cadmio

Se analizaron raíces completas de *Lotus* (100-150 mg de tejido), control o tratadas durante 4 d con 100 ó 200 μ M CdCl₂. La extracción se realizó a 0°C en tubos Eppendorf con 5 μ L·mg⁻¹PF de 50 mM KP_i (pH 7,8), 0,1 mM EDTA y 0,1% Triton X-100. Los extractos se centrifugaron (15500g \times 15 min) y el sobrenadante se concentró 5x con membranas de ultrafiltración (Centricon C-10). Se prepararon geles SDS-PAGE con 4,6% (concentrador) y 10% (separador) de poli acrilamida. La electroforesis se realizó tal y como se describe en el apartado 3.11.2, cargando 50 μ g de proteína por pocillo. Posteriormente, se llevó a cabo la electrotransferencia a PVDF y el bloqueo de la membrana, tal como se describe en el apartado 3.11.2.

En el estudio de la expresión de la γ ECS se utilizó una dilución 1:1000 del anticuerpo que habíamos producido (0,71 mg·mL⁻¹) a partir de la proteína recombinante MBP-poliHis-PvECS. Después de incubar las membranas con el anticuerpo primario, se lavó 3 veces con 100 mL de 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl y 0,05% Tween-20. Como anticuerpo secundario se empleó “Anti-rabbit IgG (whole molecule) Peroxidase Conjugate” (Sigma) diluido 1:20000. Se

incubó durante 1 h en 20 mL de 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 0,05% Tween-20 y 5% leche desnatada en polvo. Seguidamente, la membrana se lavó 3 veces con 100 mL de 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl y 0,05% Tween-20.

La detección se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit “Supersignal® West Pico Chemiluminescent Substrate” (Pierce, Rockford, EEUU). Se mezclaron volúmenes iguales de solución con peróxido y de la que contenía luminol-potenciador, y las membranas se incubaron en esta mezcla durante 5 min. Posteriormente, se expuso una película fotográfica “CL-Xposure™ Film. Clear Blue X-Ray Film” (Pierce) durante 10-20 min encima de la membrana. Para evitar que la mezcla de reactivos entrase en contacto directo con la película y la velase, la membrana se colocó bajo una película de plástico transparente. La peroxidasa unida al anticuerpo secundario, en presencia de la mezcla de reactivos, redujo el peróxido a expensas de oxidar el luminol. El efecto de esta oxidorreducción fue liberar luz e impresionar la película fotográfica. Para visualizar los resultados obtenidos se utilizó como revelador “Neutol Liquid NE” (Agfa-Gevaert AG, Leverkusen, Alemania) diluído 1:8 y como fijador “Agefix” (Agfa-Gevaert AG) diluído 1:6. La película se sumergió primero en revelador durante 90 s, se aclaró en agua y después se sumergió en fijador durante otros 60 s. La película fotográfica se dejó secar al aire y se superpuso a la membrana para estimar el peso molecular aproximado de las proteínas que reconocían los anticuerpos. Como referencia utilizamos el peso molecular aparente de los marcadores preteñidos “Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range” (Bio-Rad). Las películas fotográficas se escanearon con “FX Molecular Imager” y se analizaron con el programa Quantity One 4.1.1. (Bio-Rad).

3.13. Clonación de cDNAs que codifican fitoquelatina sintasas hipotéticas de *Lotus* y expresión de las proteínas recombinantes

Los ORFs correspondientes a la LjPCS1 y la LjPSL1 (*phytochelatín synthase-like*) sin péptido señal se amplificaron utilizando los cebadores de la **Tabla 3.10**. En la región 5' los cebadores *sentido* contenían la secuencia de corte de *Nde* I y los *antisentido* de *Xho* I. Los ORFs se aislaron por PCR a partir de cDNA de raíz de *Lotus*, obtenido tal y como se describe en el apartado **3.10**.

Tabla 3.10 Cebadores para la clonación de los ORFs de la PCS1 y la PSL1 de *Lotus*

<i>LjPCS1</i> sentido	5'-AACATATGGCGATGGCGGGGTTG-3'
<i>LjPCS1</i> antisentido	5'-TACTCGAGCTAAGACAAAGGTACACC-3'
<i>LjPSL1</i> sentido	5'-GACATATGGAGTCTATGAGGTTATC-3'
<i>LjPSL1</i> antisentido	5'-TTCTCGAGTTAGTTTAATAAGATTACCAAATATG-3'

3.13.1. Aislamiento del ORF de *LjPSL1*

La amplificación del cDNA de *LjPSL1* se realizó con “Platinum *Pfx* enzyme” (Invitrogen). La composición de las mezclas era la recomendada por el fabricante. El programa que se utilizó constó de una etapa de desnaturalización de 2 min × 94°C, seguida de 40 ciclos de amplificación (15 s × 94°C, 30 s × 50°C, 90 s × 68°C). Las mezclas de reacción se cargaron en geles de agarosa y la banda del tamaño esperado (1,2 Kb) se cortó y se extrajo utilizando “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (Amersham Biosciences). El DNA se resuspendió en 20 µL de agua estéril. Para poder clonar estos fragmentos en pCRII-TOPO (clonación TA) hubo que incorporar dAMP en los extremos 3' de la doble hebra. La mezcla formada por 4 µL de DNA, 200 µM dATP y 0,5 U *Taq* DNA Polimerasa (Biotools) se incubó 35 min × 70°C en el tampón del enzima. Para clonar, a 4 µL de esta mezcla se añadieron 10 ng de vector pCRII-TOPO linearizado y 1 µL de solución salina (1,2 M NaCl y 0,06 M MgCl₂). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30-35 min.

3.13.2. Aislamiento del ORF de *LjPCS1*

La amplificación del cDNA de *LjPCS1* se realizó con “Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity” (Invitrogen) y el protocolo consistió en una etapa de desnaturalización de 2 min × 94°C seguida de 40 ciclos de amplificación (15 s × 94°C, 30 s × 61°C, 2 min × 68°C). El fragmento se clonó en pCRII-TOPO.

3.13.3. Expresión de las proteínas recombinantes

Con los vectores recombinantes se transformaron células TOP10F' (apartado 3.7.1.1). Las colonias positivas se verificaron por PCR de colonia. Se aisló el DNA plasmídico de colonia positivas y se secuenció para confirmar que las secuencias clonadas eran idénticas a las originales. A continuación, los ORFs se clonaron en el plásmido de expresión pET 28 a(+) (Novagen). De este modo, las proteínas recombinantes se expresaron con una etiqueta de His en su extremo amino terminal. Los vectores recombinantes pCRII-TOPO y el plásmido

pET 28 a(+) se digirieron con los enzimas *Nde* I y *Xho* I. La ligación se llevó a cabo con T4 DNA ligasa (USB, Amersham Biosciences) a 16°C durante toda una noche. Las mezclas contenían 50 ng tanto de inserto como de vector linearizado (el inserto 5 veces en exceso) y 1 U de ligasa en el tampón 10×, que suministra el fabricante, previamente diluido. Con los plásmidos recombinantes se transformaron primero células competentes que no contuviesen el gen de la T7 RNA polimerasa: LjPSL1 se introdujo en XL1blue'F y LjPCS1 en DH5α. Posteriormente, las construcciones se introdujeron en células BL21(DE3) (apartado 3.7.1.1.). Para ensayar actividad PCS de enzimas recombinantes se procedió tal y como está descrito en el apartado 3.6.2.

3.14. Localización de transcritos de superóxido dismutasas en nódulos

3.14.1. Preparación del tejido

Fijación e inclusión de los nódulos

Los nódulos se cortaron junto con un pequeño trozo de raíz (para poder orientarlos correctamente una vez incluidos en resina) y se sumergieron inmediatamente en viales con 10 mL de tampón de fijación: 4% (p/v) formaldehído (preparado fresco a partir de paraformaldehído), 0,25% (p/v) glutaraldehído (grado microscopía electrónica), 0,1% (v/v) Tween-20, 50 mM NaP_i (pH 7,2). Los viales se introdujeron en un desecador y se aplicó vacío durante 15 min. Posteriormente, el desecador cerrado se colocó a 4 °C y permaneció así toda la noche. Al día siguiente, los nódulos se lavaron varias veces con agua estéril y, a continuación, el agua se reemplazó por 10 mL 20% EtOH (preparado también con agua estéril). Los nódulos se mantuvieron en esta disolución durante 30-60 min y después se deshidrataron gradualmente en 30%, 50% y 70% EtOH. (En esta fase del proceso de deshidratación el mRNA es estable durante meses a 4°C). Los nódulos fijados y parcialmente deshidratados se almacenaron en frío hasta la fecha en la que se incluyeron definitivamente en resina.

Dado que la deshidratación decolora el tejido, antes de incluir los nódulos en una resina blanca, era necesario teñirlos para poder orientarlos (una vez incluidos) y obtener así buenas secciones. Para ello, los nódulos se incubaron durante 1 h en 10 mL de 100% EtOH, después se sumergieron 1 h en 10 mL de 100% EtOH con 0,1% eosin Y (Eastman Kodak Company, Rochester, EEUU), y finalmente se lavaron 2-3 veces con 100% EtOH. Los nódulos se incubaron 30-60 min en 10 mL de cada una de las siguientes diluciones: 25% xileno-75% EtOH, 50% xileno-50% EtOH, 75% xileno-25% EtOH y finalmente

100% xileno. Se retiró el xileno y 0,25 vol del vial se llenó con xileno fresco (5 mL aprox.). El resto se relleno con lentejas de resina Paraplast (Oxford Labware, St Louis, EEUU) y se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente el vial se introdujo en una estufa apagada que después se calentó hasta 60°C. La inclusión se llevó a cabo durante 4-6 d a 60°C cambiando la parafina 2 veces al día. Finalmente, se vertió el contenido del vial en una placa Petri, se dejó que la parafina solidificase a temperatura ambiente y la placa Petri se guardó a 4°C.

Sección de los nódulos fijados

Empleamos portaobjetos Goldseal Rite-On (Pelco Int., Redding, EEUU) de 7,5 × 2,5 cm y 1 mm de grosor. Se lavaron con detergente, se sumergieron 10 min en EtOH absoluto y se mantuvieron a 180 °C durante toda una noche para inactivar las RNAsas. Posteriormente, se recubrieron de poli-L-Lys para que actuase de adhesivo, sumergiéndolos 10 min en una disolución preparada en agua con DEPC, que contenía 0,01% (p/v)poli-L-Lys en 10 mM Tris (pH 8) y que se había filtrado (0,45 µm) antes de utilizarse. Finalmente los portas se secaron al aire en una campana de flujo laminar y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

La placa Petri en la que se hallaban incluidos los nódulos se dejó a temperatura ambiente antes de cortar la parafina. Ésta se cortó en bloques que contuvieran sólo un nódulo y se fijaron a pequeños cubos de madera colocándolos sobre una gota líquida de parafina para que se adhirieran bien. Se obtuvieron secciones longitudinales de 10 µm de grosor con un microtomo. Se depositaron sobre una gota de agua con DEPC colocada en un porta recubierto de poli-L-Lys. El lado más brillante de cada sección fue el que quedó en contacto con el portaobjetos. Cada porta se colocó cuidadosamente sobre una placa histológica calefactora precalentada a 42°C y se dejaron durante toda la noche para que el agua se evaporara y las secciones se adhirieran al porta. Al día siguiente los portas se almacenaron a 4°C o a -20°C (para periodos prolongados).

3.14.2. Preparación de las sondas

Construcciones

Las sondas para la detección de los transcritos de la CuZnSOD citosólica (CuZnSODc), CuZnSOD plastidial (CuZnSODp) y la MnSOD mitocondrial se obtuvieron de una genoteca λ-ZAP de cDNA de nódulos de guisante suministrada por el Dr. C. Vance (USDA-University of Minnesota, St. Paul, EEUU). Se diseñaron cebadores específicos basados en las secuencias M63003 (*sodCc*) J04087 (*sodCp*) y X60170 (*sodA*), respectivamente.

En el caso de *sodA* los oligos empleados fueron: 5'-GGATCTCGCTTACGA CTACGGAG-3' (*sentido*) y 5'-GGCATGTTCCCAAACATCTATCC-3' (*antisentido*). Por PCR convencional se obtuvo un fragmento interno de 490 pb. La mezcla de reacción contenía 0,24 μ M de cada cebador, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 0,05% (v/v) detergente W-1 y 2,5 unidades *Taq* DNA Polimerasa (Gibco), en un volumen final de 50 μ L de tampón de reacción [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl]. El protocolo de la reacción constó de una etapa de desnaturalización 3 min \times 95°C, seguida de 40 ciclos de amplificación (45 s \times 95°C, 45 s \times 62°C, 60 s \times 72°C) y una etapa de elongación final de 10 min \times 72°C. El amplicón se subclonó en pCRII-TOPO y se introdujo en células competentes TOP10F' (Invitrogen).

Para *sodC* las secuencias de los cebadores fueron: 5'-CATTGAACAATGGTG AAGGCTGTG-3' (*sentido*) y 5'-CAACAGCACGCACAGTGGAGAG-3' (*antisentido*). Por PCR (idénticas condiciones) se amplificó un fragmento interno de 497 pb. El amplicón se subclonó en pGEM-T Easy (Promega). El plásmido recombinante se introdujo en células competentes DH5 α obtenidas por el método del RbCl (Qiagen Bench Guide, Qiagen, Hilden, Alemania). Para *sodCp* las secuencias de los cebadores fueron: 5'-CCCCAATTCTCAACCC TTGCAAC-3' (*sentido*) y 5'-GGCTGGTGCAAAGCATTGAAGC-3' (*antisentido*). Se amplificó un fragmento interno de 544 pb por PCR (idénticas condiciones) y el amplicón se subclonó en pCRII-TOPO (Invitrogen) y se introdujo en células competentes TOP10F' (Invitrogen).

Sólo está descrita una secuencia parcial (300 pb) de cDNA correspondiente a la MnSOD de alfalfa (AY145894). Sin embargo, la identidad entre dicha secuencia y el fragmento del cDNA de guisante que utilizamos como sonda de la MnSOD es \approx 90%, lo que significa que la sonda de guisante podía ser utilizada para reconocer el transcrito de la MnSOD de alfalfa. Asimismo, la identidad entre el cDNA de la CuZnSODp de alfalfa (AF056621) y la correspondiente secuencia de guisante que empleamos como sonda también es del 90%. Por otra parte, entre los genes *sodA* que codifican la MnSOD mitocondrial y la bacteroidal apenas hay homología por lo que no podía haber hibridación cruzada.

Un clon positivo de cada construcción, aislado de placas de selección, fue secuenciado completamente en ambos sentidos para confirmar su identidad. Como control se utilizó un cDNA de 0,9 kb de leghemoglobina de alfalfa (*Mslb3*, M91077) clonado en pBluescriptIIKS por el grupo de la Dra. A. Hirsch (University of California, Los Angeles, EEUU). Se utilizó para comprobar que el RNA del tejido no se había degradado en ningún punto del proceso.

La purificación de los plásmidos con los que se prepararon las sondas se realizó a partir de cultivos de 30 mL de LB. Para aislar el plásmido se utilizó el método clásico de lisis celular en 0,2 M NaOH / 1% SDS, seguida de neutralización con KAc (Sambrook y cols., 1989). El DNA se precipitó y se lavó en 70% EtOH y se volvió a resuspender en agua estéril. El RNA contaminante que había coprecipitado junto al DNA se eliminó por precipitación en 2,5 M LiCl. También se efectuó una digestión con 70 ng·µL⁻¹ RNasa A para eliminar las trazas de RNA que pudieran quedar.

Transcripción *in vitro*

Las sondas usadas en este estudio fueron preparadas transcribiendo en ambas direcciones los plásmidos ya descritos, linearizados con enzimas de restricción apropiados que generaran extremos 5' protuberantes. Estas digestiones tuvieron lugar durante toda una noche. Una vez linearizado, el DNA se extrajo dos veces con fenol:cloroformo (1:1) y una con cloroformo, se precipitó en 70% EtOH, se lavó con 80% EtOH (libre de RNasas) y finalmente se resuspendió en agua con DEPC. En la **Tabla 3.11** se especifican las enzimas de restricción utilizadas en las linearizaciones y la RNA polimerasa que se utilizó posteriormente en la síntesis de cada sonda.

Tabla 3.11 Enzimas de restricción y RNA polimerasas empleadas en la síntesis de las ribosondas

Sonda	Enzima de restricción	RNA polimerasa
<i>CuZnSODc antisentido</i>	<i>Sal</i> I	T7
<i>CuZnSODc sentido</i>	<i>Nco</i> I	SP6
<i>CuZnSODp antisentido</i>	<i>Bam</i> HI	T7
<i>CuZnSODp sentido</i>	<i>Not</i> I	SP6
<i>MnSOD antisentido</i>	<i>Not</i> I	SP6
<i>MnSOD sentido</i>	<i>Bam</i> HI	T7
<i>Leghemoglobina antisentido</i>	<i>Not</i> I	T3
<i>Leghemoglobina sentido</i>	<i>Xho</i> I	T7

El transcrito antisentido sirvió para detectar el correspondiente mRNA diana y el transcrito sentido fue usado como control para comprobar que la señal era resultado de una hibridación específica. Se utilizó marcaje con ³⁵S-UTP (Amersham Biosciences). El ³⁵S, a diferencia del ³H o el ³²P, permite alcanzar un compromiso entre resolución y eficiencia autorradiográfica, o dicho de otro modo, nitidez de la señal a nivel celular y tiempo de exposición requerido para que dicha señal sea suficientemente intensa. El resto de los reactivos utilizados en la transcripción *in vitro* fueron de Promega y el protocolo seguido también está basado en el manual "Riboprobe® *in vitro* Transcription Systems" (Promega). La mezcla de reacción

contenía: 10 mM DTT, 20 U RNasin, NTPs (500 μ M ATP, 500 μ M GTP, 500 μ M CTP, 12,5 μ M UTP), 1,5 μ g de DNA linearizado, 15-20 U RNA polimerasa y 50-60 μ Ci 35 S-UTP (>1000 Ci \cdot mmol $^{-1}$, 20 μ Ci \cdot μ L $^{-1}$) en un volumen final de 20 μ L de tampón de transcripción [40 mM Tris-HCl (pH 7,5), 6 mM MgCl $_2$, 2 mM espermidina, 10 mM NaCl]. La mezcla se incubó a 40-41°C durante 2 h. A continuación, se añadió 1 U de DNasa (libre de RNasas) y se incubó a 37°C durante 15 min para degradar el DNA molde. Posteriormente, para aislar el RNA radiomarcado se añadió 50 μ g tRNA de levadura (adyuvante en la precipitación del RNA sintetizado), 0,3 M NH $_4$ Ac (concentración final) y 2,5 vol EtOH absoluto. Esta mezcla se incubó a -20°C durante 30 min y se centrifugó en frío (15000g \times 15 min). Se desechó el sobrenadante y el pellet se volvió a resuspender en 1 M NH $_4$ Ac. Se añadieron 3 vol de EtOH absoluto, se incubó a -20°C durante 30 min y se volvió a centrifugar en frío (15000g \times 15 min). El pellet de RNA se lavó primero con EtOH al 80% y después con EtOH absoluto antes de resuspenderlo finalmente en 50 μ L de agua con DEPC + 10 mM DTT.

Las ribosondas radiomarcadas se hidrolizaron parcialmente hasta obtener fragmentos de una longitud promedio aproximada igual a 150 pb. Para ello se calentó a 60°C en 100 μ L de 0,06 M Na $_2$ CO $_3$ / 0,04 M NaHCO $_3$ durante un periodo de tiempo determinado por la siguiente fórmula (Cox and Goldberg, 1988):

$$T_H = (L_0 - L_d) / (k \cdot L_d \cdot L_0)$$

T_H = tiempo de hidrólisis
 L_0 = longitud original de la ribosonda en kb
 L_d = longitud deseada de la ribosonda en kb
 $k = 0,11 \text{ kb} \cdot \text{min}^{-1}$

En todos los casos $T_H \approx 45$ min excepto en el caso de las sondas de leghemoglobina que fue $T_H \approx 50$ min. Las reacciones se detuvieron haciendo las mezclas 90 μ M NaAc y 0,5% HAc. El volumen final fue 108 μ L. Finalmente, se determinó la actividad de las sondas y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. En el caso de periodos de almacenamiento prolongados, se volvió a medir la radiactividad antes de utilizar la sonda.

3.14.3. Hibridación *in situ*

Prehibridación

A partir de este momento, y hasta concluir la hibridación, fue esencial que todas las disoluciones que entraran en contacto con las secciones de tejido estuviesen preparadas en agua tratada con DEPC y que todo el material metálico y de vidrio se hubiese calentado a 180°C durante una noche para inactivar las RNasas. El procedimiento fue el siguiente:

(i) Se eliminó la parafina del tejido y se rehidrató a través de las siguientes disoluciones: 100% xileno \times 15 min, de nuevo 100% xileno \times 15 min, 50% xileno / 50% EtOH \times 2 min, 100% EtOH \times 2 min, 75% EtOH/25% agua \times 2 min, 50% EtOH/50% agua \times 2 min, 25% EtOH/75% agua \times 2 min, agua 5 min, de nuevo agua 5 min. (ii) Para favorecer la accesibilidad del mRNA diana a la sonda radiomarcada se llevó a cabo una digestión con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ proteinasa K en 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA. Este tratamiento duró 30 min y se llevó a cabo a 37°C. (iii) Para preservar mejor la integridad del tejido se llevó a cabo un tratamiento de “postfijación”. Para ello, se introdujo el tejido durante 10 min en una disolución fresca de formaldehído 10% (v/v) en 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA. (iv) Se bloquearon aquellos grupos cargados que pudieran reaccionar con la ribosonda y aumentar el ruido de fondo. Con este propósito, se incubaron las secciones de tejido 10 min en una disolución de 0,1 M trietanolamina (pH 8), después se incubaron 10 min en una disolución fresca de 0,25% (v/v) anhídrido acético en 0,1 M trietanolamina (pH 8) para acetilar grupos potencialmente reactivos, y finalmente, se incubaron 5 min en $2\times$ SSC [SSC: 150 mM NaCl + 15 mM citrato de sodio (pH 7)]. (v) El tejido volvió a deshidratarse a través de la siguiente serie de disoluciones: agua \times 5 min, de nuevo agua \times 5 min, 25% EtOH / 75% agua \times 2 min, 50% EtOH / 50% agua \times 2 min, 75% EtOH / 25% agua \times 2 min, 100% EtOH \times 2 min, de nuevo 100% EtOH \times 2 min. Finalmente, las secciones se secaron al aire durante 30-60 min en un lugar estéril.

Hibridación

La hibridación se realizó en aceite mineral durante toda una noche en una estufa precalentada a 42°C. Sobre cada porta con secciones de tejido se aplicaron $500\cdot 10^3$ cpm en 50 μL de solución de hibridación. Esta solución contenía formamida para reducir la temperatura de fusión del híbrido, solución Denhardt para bloquear la hibridación no específica, sulfato de dextrano para aumentar la eficiencia de la hibridación; además de tRNA y poliA, capaces de interactuar con sitios inespecíficos de unión de ácidos nucleicos, para reducir el ruido de fondo. Esta solución se preparó tal y como se detalla a continuación. La correspondiente alícuota de ribosonda se diluyó hasta 2,5 μL con agua tratada con DEPC y se añadió 2,5 μL de solución B (0,6 M DTT, $3 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ tRNA, $10 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ poliA). La sonda se linearizó a 80°C durante 10 min y se enfrió rápidamente en hielo. Se añadieron 45 μL de una mezcla que contenía 25 μL de formamida y 20 μL de solución A (precalentada a 37°C durante 10 min). La composición de la solución A era 0,75 M NaCl, 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) 2,5 mM EDTA, $2,5\times$ solución Denhardt (0,05% Ficoll 400, 0,05% PVP, 0,05% seroalbúmina bovina), 25% (p/v) sulfato de dextrano y 75 mM DTT. La solución de hibridación se incubó 10 min \times 37°C y se añadió 50 μL sobre cada porta. Se colocó un cubreobjetos (40 mm \times 24 mm) sobre el porta sin que quedase atrapada ninguna burbuja. Finalmente, los portas se colocaron en aceite mineral

precalentado en una estufa a 42°C para evitar la evaporación de la solución de hibridación y se mantuvieron allí durante toda la noche.

Lavado

A partir de este momento ya no fue necesario que las disoluciones estuviesen preparadas con agua tratada con DEPC, ni el material metálico y de vidrio esterilizado a 180°C. El procedimiento de lavado fue el siguiente:

(i) Para eliminar el aceite mineral que recubría los portas, éstos se lavaron 3 veces, durante 10 min cada vez, en cloroformo. Después, los portas se dejaron secar durante 10 min para que el cloroformo se evaporase. (ii) Se realizaron cuatro lavados en 4×SSC + 5 mM DTT, cada uno de 5-10 min, para retirar los cubreobjetos y eliminar la solución de hibridación. (iii) Se llevó a cabo una digestión de 30 min × 37 °C con 0,5 µg·µl⁻¹ RNasa en tampón de RNasa [0,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA]. La RNasa digirió el RNA de hebra sencilla sin afectar al híbrido RNA ribosonda : mRNA diana. A continuación, los portas se lavaron 3 × 30 min × 37°C, en tampón de RNasa. (iv) Se realizaron un par de lavados más. El primero en 2×SSC a temperatura ambiente durante 30 min. El segundo en 0,1×SSC a 50°C durante 20 min. (v) El tejido se deshidrató a través de una serie de disoluciones alcohólicas: 25% (2 min), 50% (2 min) y 75% (2 min) de EtOH con 0,3M NH₄Ac y finalmente EtOH 100% (2 × 2min). Por último, las secciones se secaron al aire durante 30-60 min.

3.14.4. Autorradiografía

Fotoemulsión y revelado

Para localizar la posición de la ribosonda sobre el tejido, los portas se recubrieron de una fina capa de una fotoemulsión sensible a la radiación emitida por la sonda marcada. La señal observada consistió en una gran concentración de granos de plata en el área donde se encontraba el híbrido ribosonda: mRNA diana.

En total oscuridad, los portas se recubrieron de la fotoemulsión NBT-2 (Eastman Kodak) diluida 1:1 en NH₄Ac 0,3 M y precalentada a 42°C. Se secaron durante 1 hora y se almacenaron en completa oscuridad durante 4 semanas a 4°C. Transcurrido ese tiempo, los portas se incubaron primero 5 min en revelador (Kodak D-19), 1 min en agua destilada, 3 min en fijador (Kodak) y 3 min en agua destilada de nuevo. Revelador y fijador se prepararon siguiendo las recomendaciones del fabricante. Fue esencial que todas las las incubaciones se realizaran a 15°C. Los portas después del revelado se mantuvieron en agua destilada durante 30 min.

Tinción y microscopía

El tejido se tiñó para poder ver su ultraestructura por el microscopio. Con este propósito, los portas se incubaron en 0,05% azul de toluidina O durante 10 min. Se hicieron dos lavados en agua destilada de 10-20 s cada uno y, a continuación, se incubaron, también durante 10-20 s, en cada una de las siguientes disoluciones EtOH-agua (25, 50, 75 y 100%) para eliminar el exceso de colorante y deshidratar de nuevo el tejido. Finalmente, los portas con el tejido deshidratado se transfirieron a una solución 50% EtOH-50% xileno durante 10-20 s y a una solución 100% xileno. Antes de que el xileno se evaporara se añadieron 25-35 μ l de Permout (Fischer Scientific Co., Fair Lawn, EEUU) y se colocó un cubreobjetos 24×50mm. Se esperó una noche para que el Permout se secase y los cubres quedasen firmemente sellados antes de ver los resultados por el microscopio. Por último, se retiraron de la parte trasera del porta los restos de fotoemulsión que hubiesen quedado adheridos rascando suavemente con una cuchilla afilada. Para ver los resultados se utilizó un microscopio Labophot (Nikon, Garden City, EEUU) provisto de un filtro de campo oscuro para poder visualizar los granos de plata en las áreas donde había hibridado la sonda.

Los resultados descritos en los dos siguientes apartados se obtuvieron gracias a la valiosa colaboración del Dr. Euan James (Centre for High Resolution, Imaging and Processing, University of Dundee, Reino Unido).

3.15. Localización inmunohistoquímica de superóxido dismutasas en nódulos

Los nódulos recién cosechados de guisante y alfalfa se fijaron inmediatamente en 2,5% de glutaraldehído y 0,1 M de cacodilato de sodio. Se obtuvieron secciones de 200 μ M de cinco nódulos de cada especie por medio de un vibratomo (Vibratome 1000 Agar Scientific Stansted, Reino Unido), se mantuvieron sumergidas en 1,8 M sacarosa (crioprotector) durante toda una noche y al día siguiente se congelaron rápidamente en N₂ líquido. Las muestras congeladas fueron sometidas a un proceso de criosustitución para reemplazar el agua del tejido por un disolvente orgánico capaz de solubilizar una resina. Este proceso tuvo lugar en una disolución de metanol, que contenía 0,5% de acetato de uranilo (Sigma), a -90, -65 y -45°C durante 68,5 h. El acetato de uranilo se añadió para conseguir contraste y poder visualizar la estructura del tejido. Finalmente, los nódulos se incluyeron en resina Lowicryl HM23 (Polysciences, Warrington, EEUU) a -45°C con luz ultravioleta usando un equipo "EM AFS freeze-substitution" (Leica, Viena, Austria). Se obtuvieron secciones ultrafinas con el microtomo Leica Ultracut E, se recogieron sobre una rejilla de níquel recubierta de pioloformo y carbono, y se marcaron con anticuerpos y oro coloidal (James y cols., 1996). Se

utilizaron anticuerpos policlonales producidos en conejo frente a la CuZnSODc y CuZnSODp de espinaca (Kanematsu y Asada, 1990) y frente a la MnSOD mitocondrial de arroz (Kanazawa y cols., 2000).

Las secciones se incubaron durante 1 h en un tampón para bloquear que contenía 1% Tween-20, 1% seroalbúmina bovina y 1% suero normal de cabra (Sigma) en un tampón salino de Tris con 14 mM azida de sodio y $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de polietilenglicol-20 K. A continuación, las secciones se incubaron durante 2 h en una dilución 1:500 del anticuerpo primario, también en tampón salino. Como control, algunas secciones listas para ser tratadas con el anticuerpo primario se incubaron con suero preinmune a una dilución 1:500 y después se sometieron al mismo proceso que el resto de las muestras. Las rejillas se lavaron y se incubaron durante 1 h en una dilución 1:50 de anticuerpos anti-conejo producidos en cabra conjugados con partículas de oro de 15 nm (Amersham Biosciences). Las secciones una vez marcadas con partículas de oro se tiñeron durante 10 min con una solución acuosa al 2% de acetato de uranilo. Finalmente, las secciones de los nódulos se visualizaron y fotografiaron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200 EX (Jeol, Tokio, Japón).

3.16. Localización citoquímica de peróxido de hidrógeno en nódulos y estudios con inhibidores

3.16.1. Localización de peróxido de hidrógeno

Los nódulos se cosecharon e inmediatamente se cortaron en pequeñas trozos ($<1 \text{ mm}$) y se sumergieron durante 1 h en 10 mM CeCl_3 y 50 mM de MOPS (pH 7,0) para perfundir esta solución en el tejido. Como control negativo se utilizaron nódulos sin tratar con cerio. El tejido se fijó entonces en un medio que contenía 2,5% de glutaraldehído y 0,1 M cacodilato de sodio, y a continuación, se mantuvo 1 h en una disolución 1% tetróxido de osmio y 0,1 M cacodilato. Posteriormente, el material se deshidrató a temperatura ambiente a través de una serie de soluciones de EtOH y se incluyó a 55°C en resina Agar 100 epoxi (Agar Aids, Stansted, Reino Unido) Secciones ultrafinas de tejido fueron teñidas con citrato de plomo durante 5 min y con acetato de uranilo durante 10 min antes de localizar por microscopía electrónica los depósitos de hidroperóxido de cerio (Bestwick y cols., 1997).

3.16.2. Análisis con inhibidores

Los nódulos recién cosechados se cortaron tal y como hemos indicado anteriormente y se preincubaron durante 30 min en 50 mM MOPS (pH 7,0) (control) o en soluciones preparadas en 50 mM MOPS (pH 7,0) pero que contenían 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ catalasa o los inhibidores enzimáticos 3 mM KCN, 1 mM NaN_3 , 10 μM cloruro de difenileniodonio (DPI) ó 5 mM dietilditiocarbamato (DDC).

Estas soluciones se sustituyeron por 5 mM de CeCl_3 durante 1 h en los mismos medios de preincubación, es decir, 50 mM MOPS (pH 7,0) sólo o con el correspondiente inhibidor. A continuación, se fijaron y procesaron tal y como se ha descrito en el apartado anterior. Se utilizaron controles en los que se omitió la preincubación para comprobar que esta etapa del proceso no era la responsable de la generación de H_2O_2 .

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Distribución de compuestos tiólicos y actividades tiol sintetasa en la leguminosa modelo *Lotus japonicus*

El primer objetivo de nuestro trabajo ha sido la determinación de la abundancia relativa de los tripéptidos tiólicos (GSH y hGSH) y las correspondientes actividades enzimáticas (GSHS y hGSHS) en la leguminosa modelo *L. japonicus* (Tabla 4.1). Esto se ha debido a dos razones. Primero, no se había realizado hasta la fecha un estudio en profundidad sobre la composición de antioxidantes de *Lotus*. Segundo, está probada la abundancia de tripéptidos tiólicos en los nódulos de las leguminosas y la importancia que estos compuestos tienen en el desarrollo y funcionamiento del nódulo (Dalton y cols., 1993; Frendo y cols., 2005).

Los tioles se extrajeron en medio ácido para precipitar las proteínas y minimizar la oxidación. Aunque la extracción de la fracción vegetal se realizó rápidamente no podemos descartar la posible contribución de una pequeña proporción del GSH bacteroidal al contenido total de GSH en las muestras de nódulos.

Los enzimas se extrajeron con un medio optimizado que contenía glicerol para presevar la actividad enzimática y la integridad de los bacteroides. Utilizando enzimas marcadores se ha comprobado que, en las condiciones descritas, la contaminación de la fracción vegetal del nódulo con bacteroides (que poseen igualmente GSHS) es despreciable (Morán y cols., 2000).

Tabla 4.1 Distribución de tripéptidos tiólicos y actividades tiol sintetasa en *Lotus*

Tiol o enzima ^a	Nódulos	Raíces	Hojas
GSH	188 ± 11	7 ± 3	22 ± 3
hGSH	102 ± 10	194 ± 19	540 ± 26
GSHS	10,3 ± 0,9	0,6 ± 0,0	0
hGSHS	12,4 ± 0,6	9,0 ± 1,6	11,1 ± 1,0

^a Los contenidos de tioles (nmol g⁻¹ PF) son medias ± ES (*n* = 12-16 plantas). Las actividades enzimáticas (nmol min⁻¹ g⁻¹ PF) son medias ± ES (*n* = 8-12 plantas).

En plantas de *Lotus*, cosechadas en la etapa vegetativa de desarrollo, el hGSH representa el 96% del total de tripéptidos tiólicos en raíces y hojas, pero sólo el 35% en nódulos. Asimismo, la actividad hGSHS representa el 94% de la actividad tiol sintetasa total (GSHS + hGSHS) en raíces y hojas, mientras que las actividades GSHS y hGSHS en nódulos son similares. La correlación entre el contenido de tioles y los valores obtenidos de las correspondientes actividades enzimáticas está en consonancia con la propuesta de que el GSH y el hGSH se generan en los tejidos de las leguminosas por acción de sintetetasas específicas (Frendo y cols., 1999; Matamoros y cols., 1999; Morán y cols., 2000). De los resultados obtenidos se deduce que el principal tiol sintetizado por *Lotus* es el hGSH y que sólo la fracción vegetal del nódulo produce cantidades significativas de GSH.

4.2. Aislamiento y caracterización de cDNAs de las tiol sintetetasas de *Lotus*

Después de conocer el patrón de distribución de GSH y hGSH y de las correspondientes sintetetasas GSHS y hGSHS, nos propusimos aislar los cDNAs que codifican estas enzimas en *Lotus*. Para ello partimos de genotecas de cDNA de hojas y nódulos. En las bases de datos sólo estaba descrita una EST para el gen *hgshs* (GenBank AV429187) y ninguna para el gen *gshs*, lo que sugiere que la abundancia de estos transcritos es muy baja.

Se secuenciaron varios clones correspondientes a cada uno de los dos genes. Al menos cuatro clones de cada tipo se analizaron por 5'RACE para verificar los codones de iniciación. En la región 5' de los clones hGSHS se localizaron dos codones ATG en el mismo marco de lectura; por el contrario, sólo se encontró el segundo ATG en los clones GSHS. Posteriormente, se analizaron genotecas de cDNA de nódulo (o cDNA preparado a partir de RNA de nódulo) utilizando cebadores diseñados frente al fragmento de secuencia genómica de la GSHS, localizada por delante del hipotético primer ATG. De este modo, se lograron aislar dos tipos de clones de la GSHS que se diferenciaban en que el codón de iniciación era uno de

los dos codones ATG homólogos a los clones de la hGSHS. En la **Tabla 4.2** se describen las propiedades de estos cDNAs.

También conseguimos aislar un clon de cDNA que codifica γ ECS a partir de una única EST (MR068f07) obtenida de una genoteca de cDNA de raíz, en el marco del proyecto de secuenciación del genoma de *Lotus* del Instituto de Investigación de DNA de Kazusa (Japón). No se encontró ninguna secuencia EST que codificase γ ECS en genotecas de cDNA de hojas o nódulos. Esto indica que el transcrito de *yees*, al igual que los transcritos de *gshs* y *hgshs*, es muy escaso en nódulos, raíces y hojas.

Tabla 4.2 Propiedades teóricas de las tiol sintetasas de *Lotus*

Enzima	Masa molecular ^a	pI ^b	Longitud ^c	Localización subcelular ^d	Observaciones
γ ECS	55,9	6,22	495	Sólo en plastidios	Péptido señal ambiguo
GSHS ^e	55,0/61,3	6,17	493/550	Plastidios y citosol	Péptido señal supuestamente cloroplástico de 58 aa
hGSHS	61,0	6,04	545	Plastidios y citosol	Péptido señal supuestamente cloroplástico de 54 aa

^a Masa molecular teórica en kD. ^b Punto isoeléctrico de la preproteína calculada por ExPASy (Expert Protein Analysis System). ^c Número de aminoácidos de la preproteína. ^d Localización subcelular deducida basada en los programas ChloroP, Target P, PSORT y MitoProt. ^e Valores deducidos para los productos GSHS a partir de los dos tipos de transcritos.

En nódulos existen, por tanto, dos poblaciones de transcritos de *gshs*. El cDNA de mayor tamaño tiene un ORF de 1.653 pb y codifica una proteína de 550 aminoácidos y 61,3 kD, y el cDNA de hGSHS tiene un ORF de 1.638 pb y codifica una proteína de 545 aminoácidos y 61,0 kD. Las secuencias aminoacídicas muestran una identidad del 71% entre sí y >75% de identidad con los enzimas homólogos de otras leguminosas. Las secuencias GSHS y hGSHS contienen un dominio rico en Gly (KPQREGGGNNXYG) en el extremo carboxilo terminal que está altamente conservado entre las proteínas GSHS de levaduras, plantas y animales (Ullmann y cols., 1996). Este dominio corresponde a un bucle flexible que supuestamente interviene en el sitio catalíticamente activo del enzima (Wang y Oliver, 1997). El cDNA completo de la γ ECS tiene un ORF de 1.488 pb que codifica una proteína de 495 aminoácidos y 55,9 kD. La secuencia de la proteína deducida comparte una identidad del 83-88% con los enzimas de otras plantas superiores. Los programas de predicción de la localización subcelular indican que GSHS y hGSHS contienen un péptido señal típicamente cloroplástico; por el

contrario, la proteína GSHS deducida que comienza en el segundo residuo Met carece de cualquier péptido señal reconocible y, por tanto, es previsible que esté localizada en el citosol. Estas predicciones, relativas a la localización subcelular, están apoyadas por la presencia de isoformas GSHS citosólica y plastidial en guisante y espinaca (Hell y Bergmann 1990; Rennenberg 1997). Recientemente, se ha conseguido aislar en *Arabidopsis* una población heterogénea de transcritos que codifican GSHS. La mayor parte de los transcritos codifican proteínas GSHS citosólicas y uno de ellas una GSHS presumiblemente plastidial (Wachter y cols., 2005). Por lo que respecta al cDNA de la γ ECS, la proteína teórica contiene un péptido señal aparentemente plastidial. Esta misma localización se propuso para la γ ECS de guisante y espinaca (Hell y Bergmann, 1990). Asimismo, se han aislado dos tipos de transcritos en *Arabidopsis* que codifican proteínas γ ECS plastidiales (Wachter y cols., 2005).

Las secuencias de la γ ECS, GSHS y hGSHS se utilizaron para construir árboles filogenéticos (ver **Figura 4.1** y **4.2**). Las figuras son fenogramas correspondientes a árboles calculados utilizando un método de distancias (“neighbor-joining”). Este método utiliza alineamientos múltiples de secuencias, a partir de los cuales se genera una matriz. Los valores de la matriz expresan la proporción de aminoácidos que difieren entre cada pareja de secuencias; es decir, cada valor está relacionado con el porcentaje de homología de las distintas parejas de secuencias que se pueden formar. En los valores de dicha matriz se basa la distribución y la longitud de las distintas ramas de los árboles filogenéticos. En los árboles representados se asume que cuanto antes divergieran dos secuencias de un ancestro común, menor será la homología entre ambas. No obstante, esta asunción aparentemente lógica no es siempre correcta, porque no contempla el fenómeno de las sustituciones múltiples; es decir, cambios evolutivos que anulan las posibles variaciones entre dos secuencias dadas.

Según estas representaciones las proteínas γ ECS se distribuyen en función de su homología en tres clados. Por cada uno de ellos, se indica entre paréntesis el porcentaje de identidad relativo a la γ ECS de *Lotus*: proteobacterias (56-60%), *Arabidopsis* y mostaza (83%), leguminosas y otros cultivos importantes (80-90%). Las secuencias γ ECS de *E. coli* y *Salmonella typhimurium* (18%), levadura (27%) y animales (26%) tuvieron que ser excluidos del análisis por sus bajas homologías. Por otro parte, las secuencias de la GSHS y hGSHS también se distribuyen en tres grupos monofiléticos. Los porcentajes de identidad con la GSHS y hGSHS de *Lotus* se indican entre paréntesis: leguminosas (70-90%), otras plantas superiores (63-70%) y levaduras y animales (37-44%).

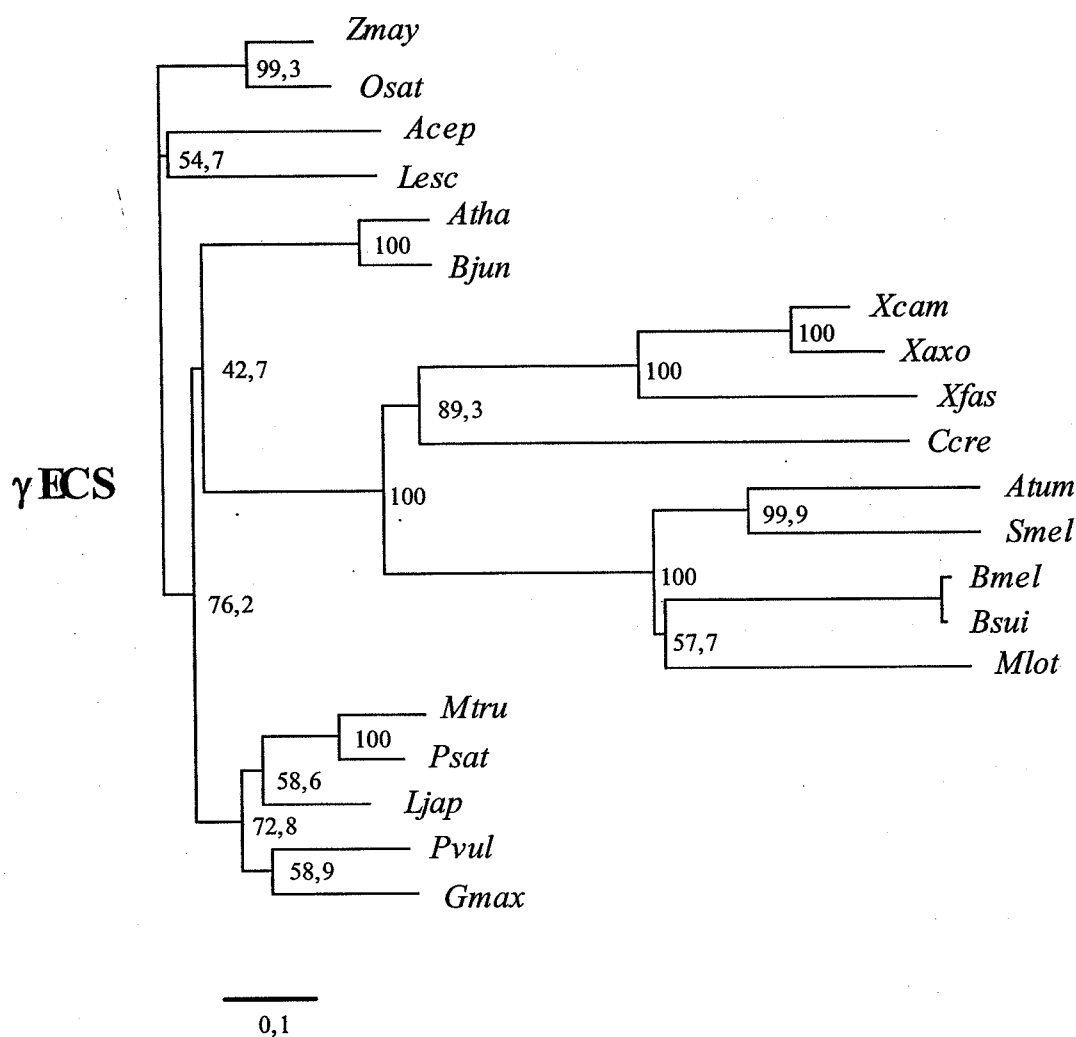


Figura 4.1 Análisis filogenético de la γ -glutamylcisteína sintetasa (γ ECS). El árbol se calculó a través del algoritmo “neighbor-joining” utilizando el programa CLUSTAL W. Los números corresponden a porcentajes de 1.000 “bootstraps” y la barra representa 0,1 sustituciones por sitio. Para construir el árbol se utilizaron las siguientes secuencias: *Acep*, *Allium cepa* (AAL61610); *Atha*, *Arabidopsis thaliana* (CAA71075); *Atum*, *Agrobacterium tumefaciens* (NP_353679); *Bjun*, *Brassica juncea* (O23736); *Bmel*, *Brucella melitensis* (NP_541506); *Bsui*, *Brucella suis* (NP_699940); *Ccre*, *Caulobacter crescentus* (NP_422208); *Gmax*, *Glycine max* (AAG13459); *Lesc*, *Lycopersicon esculentum* (O22493); *Ljap*, *Lotus japonicus* (AAO45821); *Mlot*, *Mesorhizobium loti* (NP_107315); *Mtru*, *Medicago truncatula* (Q9ZNX6); *Osat*, *Oryza sativa* (CAD48598); *Psat*, *Pisum sativum* (AAF22137); *Pvul*, *Phaseolus vulgaris* (AAF22136); *Smel*, *Sinorhizobium meliloti* (NP_384876); *Zmay*, *Zea mays* (CAC83005).

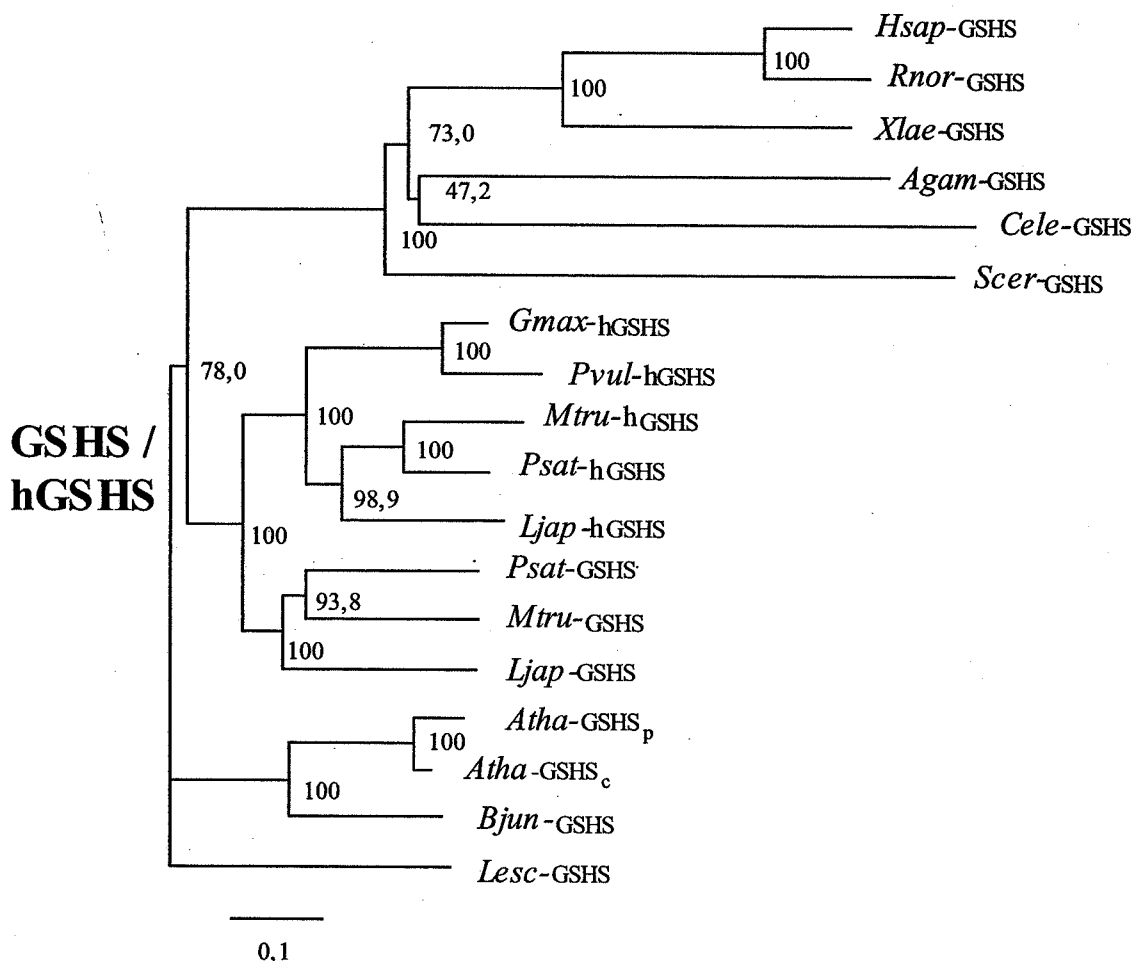


Figura 4.2 Análisis filogenético de la glutatión sintetasa (GSHS) y la homoglutatión sintetasa (hGSHS). Los árboles se calcularon utilizando el algoritmo "neighbor-joining" con el programa CLUSTAL W. Los números corresponden a porcentajes de 1.000 "bootstraps" y la barra representa 0,1 sustituciones por sitio. Para construir el árbol se utilizaron las siguientes secuencias: *Agam*, *Anopheles gambiae* (EAA06258); *Atha-GSHS_c*, GSHS citosólica de *A. thaliana* (AAA99146); *Atha-GSHS_p*, GSHS plastidial de *Arabidopsis thaliana* (CAB51027); *Bjun*, *Brassica juncea* (CAA71878); *Cele*, *Caenorhabditis elegans* (NP_063610); *Gmax-hGSHS*, *Glycine max* (CAB91078); *Hsap*, *Homo sapiens* (NP_000169); *Lesc*, *Lycopersicon esculentum* (AAB71231); *Ljap-GSHS*, *Lotus japonicus* (AAK77663); *Ljap-hGSHS*, *L. japonicus* (AAO92441) *Mtru-GSHS*, *Medicago truncatula* (AAK93946); *Mtru-hGSHS*, *M. truncatula* (AAD29849); *Psat-GSHS*, *Pisum sativum* (AAF98121); *Psat-hGSHS*, *P. sativum* (AAF98156); *Pvul-hGSHS*, *Phaseolus vulgaris* (AAF98157); *Rnor*, *Rattus norvegicus* (P46413); *Scer*, *Saccharomyces cerevisiae* (NP_014593); *Xaxo*, *Xanthomonas axonopodis* (NP_641081); *Xcam*, *X. campestris* (NP_638742); *Xfas*, *Xylella fastidiosa* (NP_298717); *Xlae*, *Xenopus laevis* (P35668).

4.3. Caracterización de los genes de las tiol sintetetas de *Lotus*

Secuencias parciales de cDNAs que codifican γ ECS, GSHS y hGSHS se utilizaron para analizar genotecas TAC. Por comparación de secuencias genómicas y de cDNA (ver **Figura 4.3**) se identificaron los genes y se determinaron sus estructuras.

El gen *yec*s se localizó en el brazo largo del cromosoma 4 (70,0 cM) y consta de 15 exones (69-245 pb, sin incluir las regiones UTRs) interrumpidos por 14 intrones (71-846 pb). Los genes *gsh*s y *hgsh*s se localizaron en el cromosoma 1 (81,3 cM), dispuestos en tándem con una separación de 8 kb. Los dos genes constan de 12 exones de idéntico tamaño (70-193 pb, sin incluir las UTRs), excepto en el caso del exon 1, que es muy similar. Sin embargo, hay diferencias significativas en el tamaño de los intrones; concretamente en los intrones 1 y 9. Todas las uniones exón-intrón de los tres genes se ajustan a la regla GT/AG descritas para el “splicing” de los genes eucariotas (Shapiro y Senapathy, 1987), excepto en el caso del intrón 6 de *gsh*s y *hgsh*s, que muestra un “splicing” AT/AC.

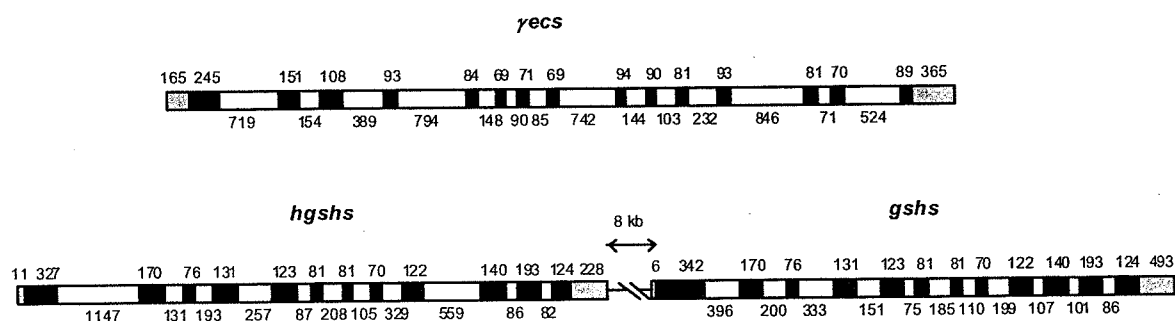


Figura 4.3 Estructura de los genes de la *yec*s, *gsh*s y *hgsh*s. Las longitudes de los exones (ORFs en recuadros negros, UTRs en gris) y las de los intrones (recuadros blancos) se indican en pares de bases.

Hasta ahora no se había estudiado el promotor de los genes *yec*s, *gsh*s y *hgsh*s de ninguna leguminosa. Puesto que se desconoce el lugar exacto donde comienza la transcripción, analizamos *in silico* solamente las primeras 800 bp situadas antes del codón de iniciación para localizar elementos reguladores *cis*. Las regiones promotoras de uno o más de los tres genes contienen elementos que pueden estar involucrados en la respuesta de las plantas a hormonas y otros reguladores del crecimiento (auxinas, etileno, giberelinas y ácidos abscísico, salicílico y metil jasmónico), así como a condiciones de estrés (agua, calor, frío, estrés oxidativo, patogénesis, anoxia y heridas). Los promotores también contienen elementos habituales en genes regulados por la luz (GT-1 y motivos GATA) y en muchos otros genes eucariotas (TATA y CAAT) (**Figura 4.4**).

4.4. Expresión de los genes de las tiol sintetetas de *Lotus*

4.4.1. RT-PCR convencional

Para analizar la expresión de los genes *ycs*, *gshs* y *hgshs* se diseñaron cebadores específicos basados en las correspondientes secuencias de cDNA (ver **Tabla 3.7**). Dichos cebadores se emplearon para estudiar la expresión de *ycs*, *gshs* y *hgshs* en nódulos, raíces y hojas. Los cebadores de *gshs* y *hgshs* se diseñaron para amplificar productos de cDNA de diferente tamaño y confirmar así su especificidad (*gshs* 535 pb, *hgshs* 408 pb). Como se esperaba, los cebadores amplificaron un único producto y no reconocieron el gen *gshs* del bacteroide.

Se llevaron a cabo experimentos preliminares por RT-PCR variando el número de ciclos de amplificación. No hubo diferencias reseñables en la expresión de los genes *ycs* y *hgshs* mientras que el transcrito del gen *gshs* fue claramente más abundante en nódulos que en raíces o en hojas (ver **Figura 4.5**). Curiosamente, en hojas se detectó el transcrito *gshs* y no la correspondiente actividad enzimática.

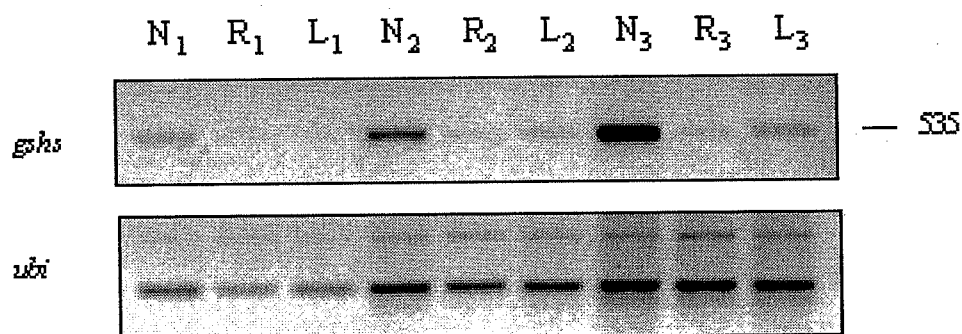


Figura 4.5 Expresión elevada del gen *gshs* en nódulos de *Lotus*. La RT-PCR de RNA aislado de nódulos (N), raíces (R) y hojas (H) se realizó tal y como se detalla en el **apartado 3.10**. Para el análisis de expresión del gen *gshs* (amplicón de 535 pb), las reacciones se detuvieron después de 32 (1), 34 (2) ó 36 (3) ciclos de amplificación. Para asegurar que se cargaba la misma cantidad de RNA se utilizaron cebadores frente a *ubiquitina (ubi)* y las reacciones se detuvieron después de 24 (1), 26 (2) ó 28 (3) ciclos de amplificación.

4.4.2. RT-PCR cuantitativa en tiempo real

Posteriormente, recurrimos a la qRT-PCR para cuantificar la expresión de las tres tiol sintetetas y, más concretamente, para verificar que la expresión de *gshs* es claramente mayor en nódulos que en el resto de los órganos de la planta. Como en el caso de las RT-PCR

convencionales se utilizaron cebadores específicos. El tamaño (en pb) de los correspondientes amplicones fue: 107 (*γecs*), 53 (*gshs*) y 77 (*hgshs*).

La abundancia del transcrito de *γecs* en hojas fue aproximadamente 4 veces mayor que en raíces y 9 veces mayor que en nódulos (Tabla 4.3). La abundancia del transcrito de *hgshs* fue mayor en raíces y similar en los otros dos órganos. Por el contrario, el nivel de transcrito de *gshs* en nódulos fue 22 veces mayor que en raíces y 15 veces mayor que en hojas (Tabla 4.3). Estos resultados confirman los obtenidos por RT-PCR convencional. Asimismo, cabe destacar que el nivel de expresión de *hgshs* en raíces no está de acuerdo con los correspondientes valores de actividad hGSHS o del contenido de hGSH, lo que sugiere regulación postranscripcional.

Tabla 4.3 Análisis de expresión génica (RT-PCR) de tior sintetasas en raíces (R), nódulos (N) y hojas (H) de *Lotus*.

Gen	Órgano	C _t ^a	ΔC _t ^b	ΔΔC _t ^c	R ^d
<i>γecs</i>	R	32,51	3,39	0	1
	N	32,96	4,45	1,06	0,4
	H	27,62	3,73	0,35	3,7
<i>gshs</i>	R	34,56	5,44	0	1
	N	29,50	0,99	-4,45	21,8
	H	32,88	4,88	-0,56	1,5
<i>hgshs</i>	R	31,04	1,91	0	1
	N	31,22	2,71	0,80	0,6
	H	31,29	3,29	1,38	0,4
<i>β-actina</i>	R	29,13
	N	28,51
	H	28,00

^a Número del ciclo umbral promedio. ^b Diferencia en el número de ciclos entre los genes de las tior sintetasas y el gen control (*β-actina*). ^c Diferencia en el número de ciclos relativo a las raíces. ^d Abundancia relativa de transcrito calculada como $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

4.5. Efecto del cadmio sobre la biosíntesis de tioles y (homo)fitoquelatinas en raíces de *Lotus*

Se analizó por HPLC el efecto del Cd sobre las actividades de los enzimas implicados en la síntesis de (h)PCs y de los correspondientes metabolitos en plantas de *Lotus* tratadas con 100 ó 200 μM de Cd durante 3-96 h (Figura 4.6). Se realizaron experimentos preliminares que pusieron de manifiesto que la síntesis de (h)PCs en nódulos era baja en comparación con el valor alcanzado en las raíces (<12%) y que en el caso de las hojas era indetectable. Por tanto,

el estudio se centró solamente en raíces. Se verificó que la contaminación de las raíces con primordios nodulares era despreciable (0,4%) mediante la cuantificación de los mRNAs de la nitrogenasa (*nifH*) y leghemoglobina (*lb_c*), que son específicos de nódulo. Las raíces de plantas control (no tratadas) contienen 170 nmol·g⁻¹ de hGSH y 9 nmol·g⁻¹ de GSH y Cys (Figura 4.7), lo que confirma que el hGSH es el principal tiol producido por *Lotus* (Matamoros y cols., 1999). Por tanto, esta leguminosa es muy útil para estudiar la regulación de la ruta biosintética de hPCs. Ninguna de las plantas tratadas presentó síntomas de toxicidad por metales pesados, tales como una reducción del crecimiento de la raíz o del brote, o clorosis foliar.

4.5.1. Contenido de tioles y (homo)fitoquelatinas, y actividades de los enzimas biosintéticos

El tratamiento con 100 μM de Cd durante 3-6 h produjo una reducción del 30% en el contenido de hGSH pero no tuvo ningún efecto sobre la Cys o el GSH (Figura 4.7). El contenido de hGSH se restableció hasta alcanzar niveles control después de 96 h de tratamiento; por el contrario, el contenido de Cys aumentó 2 veces y el de GSH 2,8 veces. Sin embargo, el efecto más llamativo de la exposición a Cd fue un incremento en los niveles de γEC y (h)PCs. El contenido de γEC en raíces control fue tan sólo 0,8 nmol·g⁻¹, pero aumentó 12 veces después de 6 h con 100 μM de Cd y llegó a ser 106 veces mayor después de 96 h en plantas expuestas a 200 μM de Cd (Figura 4.7).

Las raíces de plantas control no contenían (h)PCs pero comenzaron a sintetizar estos polipéptidos tras 3 h de exposición a Cd. El contenido total de hPCs fue 3 nmol·g⁻¹ después de 3 h con 100 μM y alcanzó 250 nmol·g⁻¹ después de 96 h con 200 μM de Cd. Las raíces también sintetizaron rápidamente cantidades significativas de PCs (18-25% de hPCs). Curiosamente, los polipéptidos hPC₃ y PC₃ representaron el 70-80% y el 94-97% de la cantidad total de hPCs y PCs sintetizadas. Por otra parte, no hemos sido capaces de detectar actividad PCS en extractos de raíz de *Lotus* utilizando HPLC con derivatización precolumna o postcolumna. Sin embargo, en controles paralelos utilizando otras leguminosas (*Pisum sativum* o *Phaseolus vulgaris*) tratadas con Cd se consiguió detectar actividad lo que prueba que el protocolo experimental utilizado era válido. Esta observación y la acumulación de (h)PCs en raíces de *Lotus* demuestran que las raíces contienen PCS funcional pero que su actividad está por debajo del límite de detección.

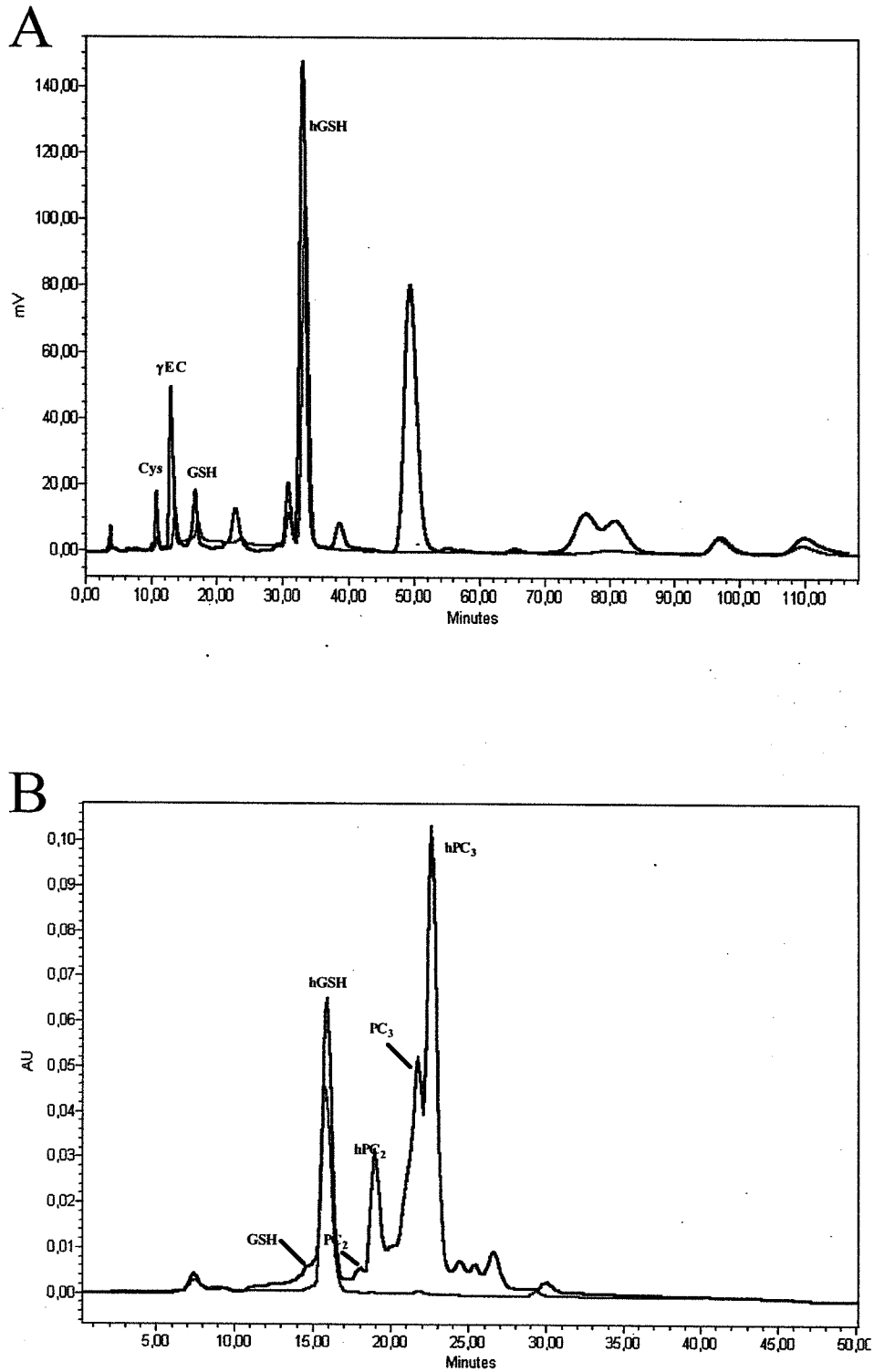


Figura 4.6. Cromatograma de HPLC con derivatización (A) precolumna o (B) postcolumna. Los tioles derivatizados precolumna con MBB se detectaron por fluorescencia (exc. 380 nm, em. 480 nm) y los derivatizados postcolumna con ácido 5,5'ditiobis-(2-nitrobenzoico) se detectaron por absorbancia (412 nm). En negro se muestran los resultados de plantas tratadas con 200 μ M de Cd durante 96 h y en rojo los de plantas control.

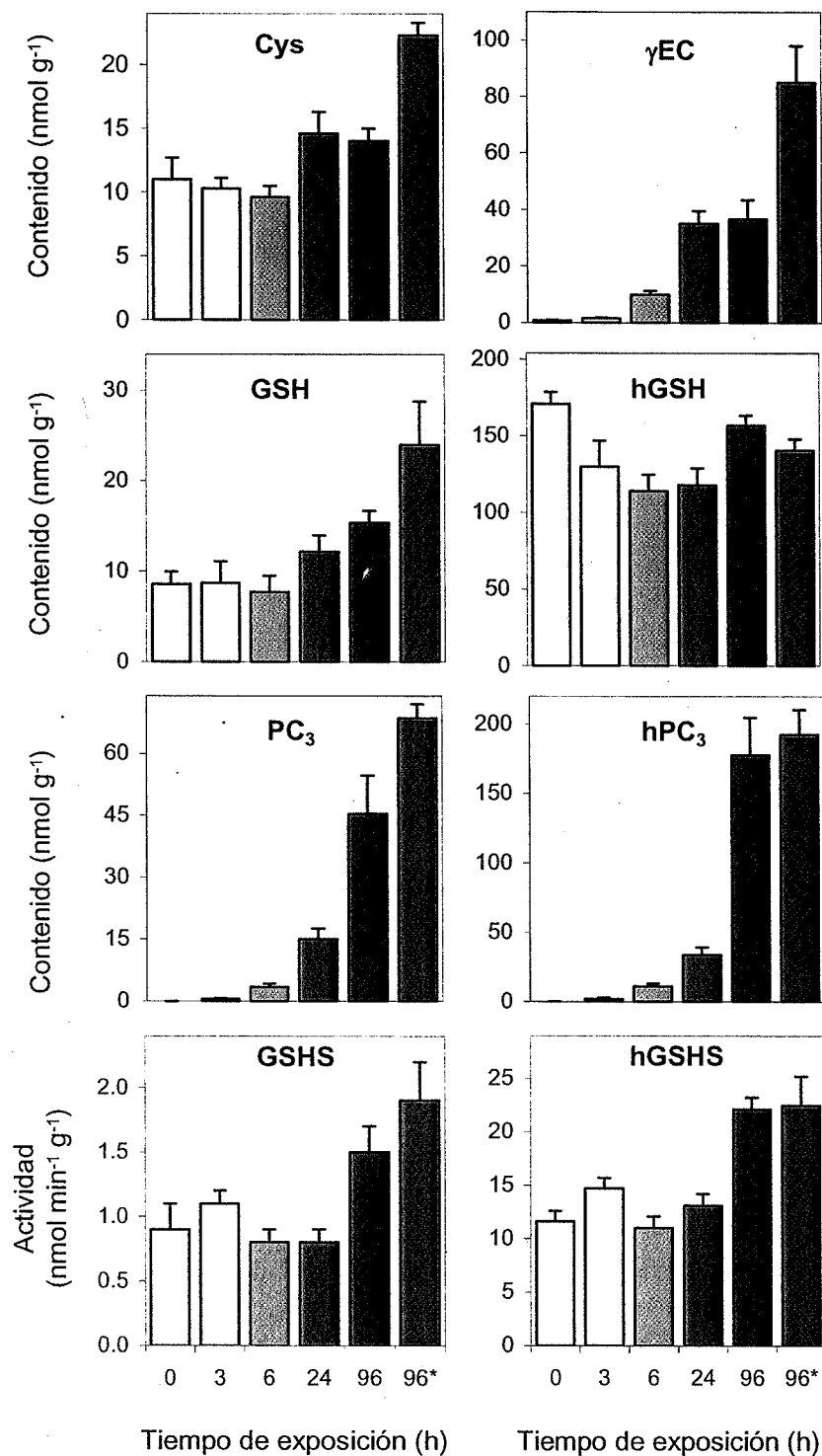


Figura 4.7 Efecto del Cd sobre los contenidos de tioles y (h)PCs y sobre las actividades tiol sintetasa en raíces de *Lotus*. Las macetas, que contenían de seis a ocho plantas, se separaron al azar en seis grupos. Uno de los grupos se usó como control (blanco) y los otros se trataron con 100 μM de CdCl_2 durante 3 h (amarillo), 6 h (naranja), 24 h (rojo) o 96 h (marrón), o bien con 200 μM de CdCl_2 durante 96 h (azul). El contenido de tioles se expresa en $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ PF los valores representan medias \pm ES ($n = 5-12$ plantas). Los contenidos máximos en raíces de PC_2 , PC_4 , hPC_2 , y hPC_4 fueron 1,7, 2,6, 33,9 y 24,2 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente. Las actividades enzimáticas se expresan en $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ PF y representan medias \pm ES ($n = 4-8$).

4.5.2. Expresión de los enzimas involucrados en la síntesis de (homo)fitoquelatinas en raíces de *Lotus*

La utilización de qRT-PCR nos ha permitido cuantificar con elevada sensibilidad y especificidad los niveles de mRNA de los enzimas involucrados en la síntesis de (h)PCs. Recurrimos a esta técnica porque los niveles de mRNA eran, en general, bajos (*γecs* y *hgshs*) o muy bajos (*gshs* y *pcs*). El umbral promedio relativo a la ubiquitina fue de 10-11 ó 13-15 ciclos, respectivamente. Los cebadores específicos para cada gen se diseñaron a partir de secuencias de genes descritas previamente (*γecs*, *gshs*, *hgshs*) u obtenidas recientemente (*pcs1*, *pcs2* y *pcs3*; ver apartado 4.6.). La especificidad del cebador se comprobó a través de la detección de un único pico en las curvas de fusión. Los genes *gshs* y *hgshs* de *Lotus* están estrechamente relacionados evolutivamente pero mostraron una expresión diferencial dependiendo del órgano de la planta (Matamoros y cols., 2003). Los dos genes también respondieron de distinto modo frente al Cd. El nivel de mRNA de *hgshs* no se vio afectado respecto del control; sin embargo, el de *gshs* aumentó 6 veces después de 3 h de tratamiento, llegando a ser 25 veces superiores después de 6 h y posteriormente 4,5 veces superior al control (Figura 4.8). Las actividades GSHS y hGSHS aumentaron dos veces pero sólo después de 96 h en presencia de Cd (Figura 4.7).

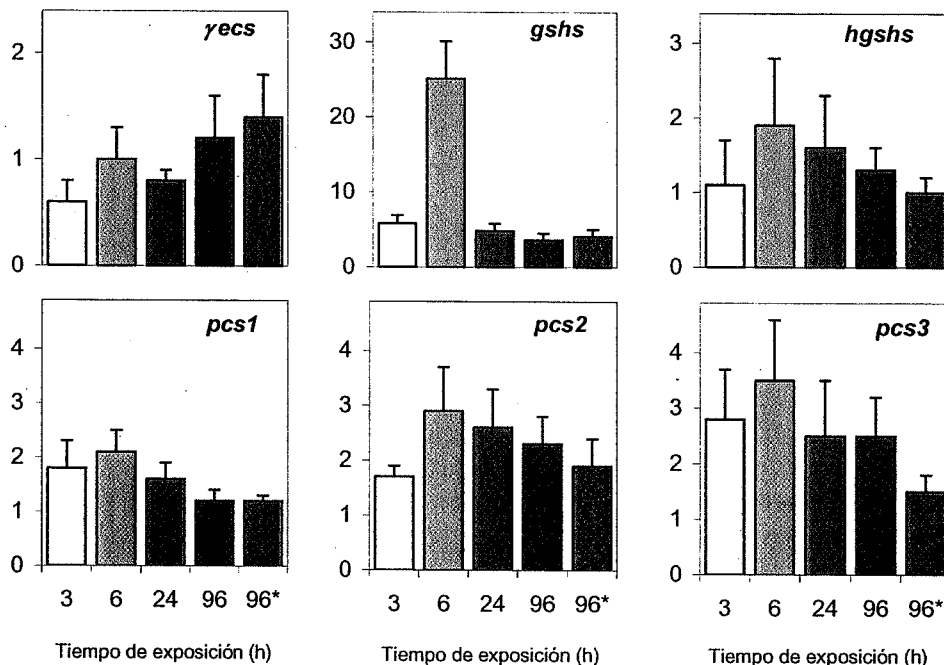


Figura 4.8 Efecto del Cd sobre los niveles de transcritos “steady-state” de los enzimas implicados en la síntesis de (h)PCs en raíces de *Lotus*. Los niveles de mRNA de las raíces tratadas con Cd están normalizados con respecto a los de las plantas control, se expresan en unidades relativas y representan medias ± ES. Los tratamientos fueron: 100 μM de CdCl₂ durante 3 h (amarillo), 6 h (naranja), 24 h (rojo) o 96 h (marrón), o bien 200 μM de CdCl₂ durante 96 h (azul).

El contenido de γ EC en las raíces control fue muy bajo; sin embargo, aumentó enormemente en raíces tratadas con Cd. Este resultado sugiere una rápida activación del enzima *in vivo*. El nivel de mRNA de *γecs* no se vio afectado por el tratamiento con Cd; por ello, decidimos estudiar si el aumento en actividad era debido a un aumento en el nivel de proteína o estaba causado por modificaciones postraduccionales. Las γ ECS de plantas presentan una baja homología con respecto a las de bacterias y los anticuerpos generados contra ellas no presentan hibridación cruzada. Por tanto, obtuvimos un anticuerpo específico (ver apartado 3.11.) frente a una γ ECS de leguminosa expresada de forma heteróloga (el esquema de la purificación aparece en la **Figura 4.9**) y lo utilizamos para cuantificar la proteína en raíces tratadas con Cd. El contenido de γ ECS aumentó dos veces después de 96 h con 100 ó 200 μ M de Cd (**Figura 4.10**). Consiguientemente, el aumento de 100 veces en el contenido de γ EC fue el resultado de una activación postraducciona de la γ ECS. No obstante, el hecho de que el contenido de proteína γ ECS aumentara dos veces también sugiere un control de la actividad enzimática a nivel traduccional. En este estudio también se han identificado tres genes *pcs* (ver apartado siguiente) y se han cartografiado agrupados en el genoma de *Lotus*. Los genes, designados *pcs1*, *pcs2* y *pcs3* en virtud de su posición en el cromosoma, se expresaban de forma diferencial en las raíces en respuesta a Cd. Mientras que el nivel de mRNA de *pcs1* permaneció prácticamente constante, el de *pcs2* y *pcs3* aumentó entre 2,3 y 3,5 veces, respectivamente, con 100 μ M de Cd a las 24-96 h (**Figura 4.8**).

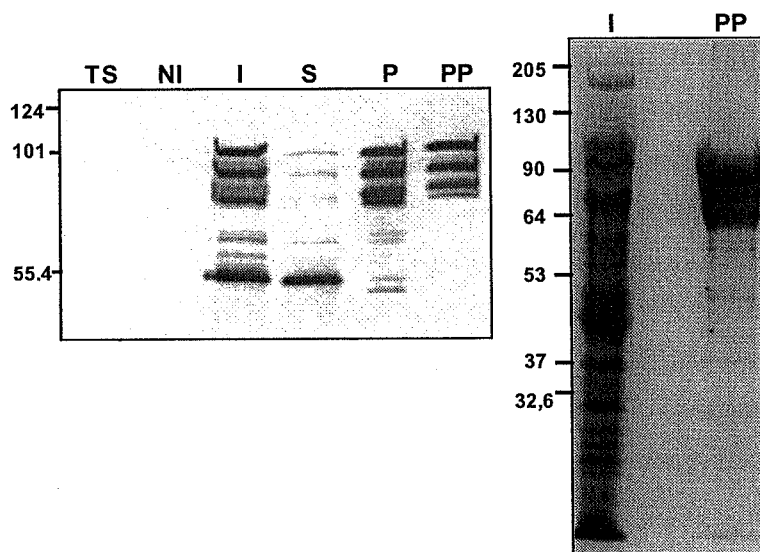


Figure 4.9. Expresión y purificación de la proteína de fusión MBP-poliHis-PvECS. (**Izda**) Western-blot usando un anticuerpo monoclonal anti-poli(His). TS: 10 μ g de extracto de *E. coli* BL21 sin transformar, NI: 10 μ g de BL21 transformada sin inducir, I: 10 μ g de BL21 transformada e inducida con IPTG, S: 10 μ g de sobrenadante del lisado BL21 inducido, P: 2,5 μ g de pellet del lisado BL21 inducido, PP: 0,5 μ g de proteína recombinante purificada. (**Dcha**) SDS-PAGE teñido con azul Coomassie. I: 50 μ g de lisado de BL21 transformado e inducido, PP: 10 μ g de proteína recombinante purificada. La masa molecular esperada de la proteína de fusión es aproximadamente 95 kD (ver apartado 3.11.).

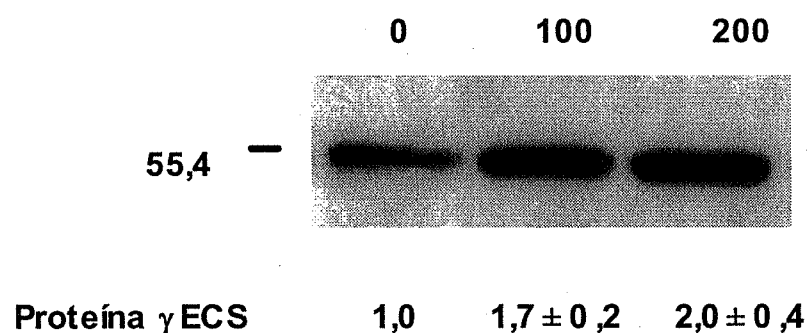


Figura 4.10 Contenido de γ ECS en raíces de *Lotus* tratadas con 100 ó 200 μ M de Cd durante 96 h. La masa molecular estimada de la proteína es 55,4 kD y la esperada por análisis *in silico* 52,4 kD. Los contenidos de proteína representan medias \pm ES, calculados densitométricamente a partir de seis western-blots y se normalizaron con respecto al valor de plantas control. No hubo cambios significativos en el contenido de proteína entre las 3 y 24 h de tratamiento con Cd (datos no mostrados).

4.6. Identificación de genes tipo *fitoquelatina sintasa* de *Lotus* con homología a los de *Arabidopsis*

4.6.1. Genes homólogos a *fitoquelatina sintasas* funcionales

La estructura y la función de los genes *pcs* han sido estudiados en detalle sólo en *Arabidopsis* (Ha y cols., 1999; Cazalé y Clemens, 2001). Se han identificado dos genes funcionales que comparten un 84% de identidad, en diferentes cromosomas (*At5g44070* y *At1g03980*). Dado que no hay estudios comparables para ninguna planta productora de hPCs, nos propusimos identificar genes *pcs* en *Lotus*. No existía ninguna secuencia EST en las bases de datos TIGR y NCBI, por lo que iniciamos una búsqueda en genotecas genómicas. Como resultado, se aisló un clon TAC (LjT27M11) que contenía un grupo de tres genes *pcs* putativos y se localizó a 69.0 cM en el cromosoma 1 (**Figura 4.11**). Para elucidar las estructuras génicas, se sintetizaron cDNAs a partir de RNAs de raíces utilizando cebadores específicos. A diferencia de *Atpcs1* (Ha y cols., 1999) y *Atpcs2* (Cazalé y Clemens, 2001), que contienen 9 exones, los genes *pcs* de *Lotus* constan de 8 (*Ljpcs1*) y 7 exones (*Ljpcs2* y *Ljpcs3*). Los ORFs de *Ljpcs1*, *Ljpcs2* y *Ljpcs3* codifican proteínas putativas de 501 (55,5 kD), 477 (53,0 kD) y 479 (53.2 kD) aminoácidos, respectivamente, que están en el rango (421-504) descrito para las PCS de otras plantas superiores.

La comparación de estructuras de los genes *pcs* conocidos revelaron rasgos interesantes. Los exones 1 al 6 de los dos genes *Arabidopsis* y de los tres genes de *Lotus* tienen tamaños

idénticos excepto el exón 1 de la *Atpcs2* (3 pb más corto) y el exón 2 de la *Ljpcs2* (15 pb más corto). Los intrones de la *Ljpcs2* y *Ljpcs3* también son de un tamaño muy parecido y muestran una gran identidad de secuencia (77-94%), excepto en el caso del intrón 1 (62%). Por el contrario, tanto el tamaño de los intrones como las correspondientes secuencias difirieron enormemente entre la *Ljpcs1* y las otras *pcs* de *Lotus*. Por todo ello, pensamos que los tres genes *pcs* de *Lotus* provienen de dos eventos de duplicación génica. La primera duplicación probablemente se produjo en todas las plantas superiores y originó *Ljpcs1* y otro gen que experimentó una segunda duplicación. Ésta dio lugar a *Ljpcs2* y *Ljpcs3*, y probablemente tuvo lugar una vez que las leguminosas habían divergido de otras plantas vasculares. La hipótesis de la doble duplicación también está apoyada por el análisis filogenético de las proteínas PCS deducidas. Dicha representación filogenética refleja agrupaciones taxonómicas con la excepción de LjPCS2 y LjPCS3 (**Figura 4.12**). Los árboles muestran diferentes clados para las PCS de nemátodos, cianobacterias, levaduras, helechos y las familias de plantas superiores Typhaceae, Liliaceae, Poaceae, Leguminosae, Brassicaceae y Solanaceae.

La alta identidad existente entre las secuencias LjPCS1 y la PCS descrita recientemente de *G. max* (Oven y cols., 2002), así como la capacidad de ambas enzimas para catalizar la síntesis de PCs y hPCs, indica que ambas enzimas son homólogos funcionales. Por el contrario, las proteínas LjPCS2 y LjPCS3 comparten un 90% de identidad entre sí, pero sólo un 60% de identidad con las PCSs de *Arabidopsis* y *G. max*. La posición y organización de los residuos Cys, concretamente en el dominio N-terminal, son importantes para la actividad PCS y la tolerancia al Cd (Cobbett y Goldsbrough, 2002; Maier y cols., 2003). Las tres proteínas de *Lotus* contienen todos los residuos aminoacídicos que son esenciales para la actividad (numeración basada en AtPCS1): Cys-56, His-162, Asp-180 (presente en todas las PCS), así como Cys-90, Cys-91 y Cys-109 (presente en todas las PCS excepto las de cianobacterias) (Maier y cols., 2003; Rea y cols., 2004). Sin embargo, LjPCS2 y LjPCS3 carecen de Cys-144, Cys-363, Cys-366 y Cys-471 (presente en todos o la mayoría de las PCS de plantas superiores), pero contienen Cys-139, Cys-347, Cys-352 y Cys-353 (presente sólo en LjPCS2 y LjPCS3) (ver **Figura 4.13**). Estos cambios pueden afectar a las propiedades bioquímicas de las enzimas.

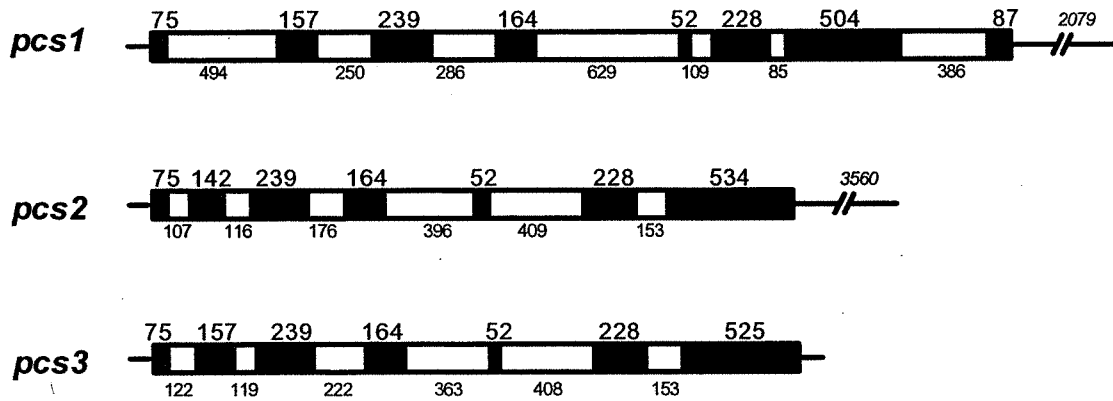


Figura 4.11 Composición de exones e intrones de los tres genes *pcs*. Tanto las longitudes de los exones (ORFs en recuadros negros) como las de los intrones (recuadros blancos) se dan en pares de bases.

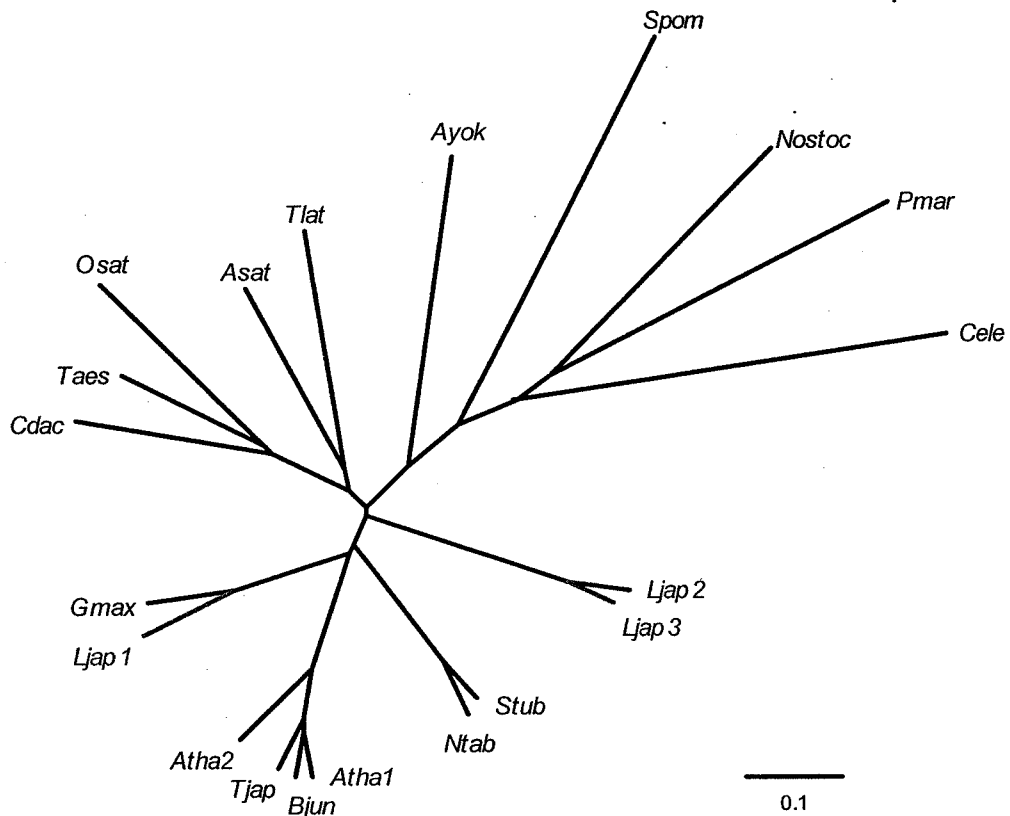


Figura 4.12 Análisis filogenético de proteínas PCS de cianobacterias, hongos, plantas y nemátodos. Las secuencias completas de aminoácidos se apilaron utilizando el programa PileUp de GCG. El árbol se calculó a través del algoritmo “neighbor-joining” utilizando el programa CLUSTAL W. Los números corresponden a porcentajes de 1.000 “bootstraps” y la barra representa 0,1 sustituciones por sitio. Para construir el árbol se utilizaron las siguientes secuencias: *Asat* (*Allium sativum*, AAO13809), *Atha1* (AtPCS1, AAD41794), *Atha2* (AtPCS2, AAK94671), *Ayok* (*Athyrium yokoscense*, BAB64932), *Bjun* (*B. juncea*, CAC37692), *Cdac* (*Cynodon dactylon*, AAO13810), *Cele* (*Caenorhabditis elegans*, NP496475), *Gmax* (*G. max*, AAL78384), *Ljap1* (LjPCS1), *Ljap2* (LjPCS2), *Ljap3* (LjPCS3), *Ntab* (*Nicotiana tabacum*, AAO74500), *Nostoc* (*Nostoc*, NP_485018), *Osat* (*Oryza sativa*, AAO13349), *Pmar* (*Prochlorococcus marinus*, NP_894844), *Taes* (*Triticum aestivum*, AAD50592), *Tjap* (*Thlaspi japonicum*, BAB93119), *Tlat* (*Typha latifolia*, AAG22095), *Spom* (*Schizosaccharomyces pombe*, CAA92263), *Stub* (*Solanum tuberosum*, CAD68109).

Figura 4.13 (páginas 104-105) Fragmentos relevantes del apilamiento de las secuencias de aminoácidos de las PCS de cianobacterias, hongos, plantas y nemátodos utilizadas en la construcción del árbol filogenético de la Figura 4.10. La numeración está basada en la secuencia de *Arabidopsis* AtPCS1. Las secuencias completas de aminoácidos se apilaron utilizando el programa PileUp de GCG. Los residuos aminoacídicos esenciales para la actividad se muestran en rojo. Los residuos Cys de los que carecen LjPCS2 y LjPCS3 pero que están presentes en todas o en la mayoría de las PCS de plantas superiores se muestran en azul. Las Cys presentes sólo en LjPCS2 y LjPCS3 se muestran en naranja. Las regiones conservadas se muestran en verde.

Cdac-AAO13810	PAVDFNSPEG	KRLFSEALAA	GTMEGFFSLI	SCFQTQSEPA	FCGLASLAAV	
Taes-AAD50592	PAVEFASAEG	KRLFABALQG	GTMEGFFNLI	SYFQTQSEPA	FCGLASLSVV	
Osat-AAO13349	PAVEFASAEG	RRLFABALQG	GTMQGFSSLV	SVFQTQSEPA	FCGLATLAVV	
	LjPCS2	PAIDFASQEG	KKIFVEALGQ	GTMEGFFKLI	SYFQTQSEPA	YCGLATLSVV
	LjPCS3	PAIDFASPEG	KKIFVEALGQ	GTMEGFFKLV	SYQTQSEPA	YCGLATLTVV
Atha-AAD41794	PAIDFSSAEG	KLIFNEALQK	GTMEGFFRLI	SYFQTQSEPA	YCGLASLSVV	
Bjun-CAC37692	PAIDFSSSEG	KKIFNEALQK	GTMEGFFRLI	SYFQTQSEPA	YCGLASLSVV	
Tjap-BAB93119	PAIDFSSAEG	KLIFNEALQK	GTMEGFFRLI	SYFQTQSEPA	FCGLASLSVV	
Atha-AAK94671	PAIDFASFEG	KQIFNEALQK	GTMEGFFGLI	SYFQTQSEPA	FCGLASLSMV	
Stub-CAD68109	PAIDFASNEG	KQLFLEAIQN	GTMEGFFKLI	SYFQTQSEPA	YCGLASLSMV	
Ntab-AAO74500	PAVDFASLEG	KQLFLEAIQN	GTMEGFFKLI	SYFQTQSEPA	YCGLASLSMV	
	LjPCS1	PAVDFASSQG	KQLFLEAVQN	GTMESFYRLV	SYFQTQSEPA	FCGLASLSMV
Gmax-AAL78384	PAVEFASSQG	KQLFLESIQN	GTMEGFYKLV	SYFQTQSEPA	FCGLASLSMV	
Asat-AAO13809	PAVEFASTEG	KKLFABALQN	GTMEGFFKLI	SCFQTQSEPA	YCGLASLSMV	
Tlat-AAG22095	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
Ayok-BAB64932	PAIEFASQEG	KVLFABALS	GTMNGFFRLI	STFQTQAEP	YCGLSTLTVV	
Spom-CAA92263	QCLAFDSSLG	KDVFLRALQE	GRMENYFSLA	QQMVTQNEPA	FCGLGTLTCMI	
Nostoc-NP485018	NLIGFNSNEG	EKLLLTSL...	RSREDFPPLS	MQFVTQVNA	YCGVASIIMV	
Pmar-NP894844	KLVPIITSEG	MVLLQRS...	KSVSDYGLSM	EAFLTQSNLA	YCVGASIVMV	
Cele-NP496475	TCIEFSSELG	KKLFTEALVR	GSANIYFKLA	SQFRTQDEPA	YCGLSTLVMV	

90

Cdac-AAO13810	LNALALID.PV	RRWKGPWRWF	DESML.....	.DCCEPLDKV	KAQGITFGKV	
Taes-AAD50592	LNALALID.PG	RPWKGPWRWF	DESML.....	.DCCEPLHKV	KAEGITFGKV	
Osat-AAO13349	LNALRID.PG	RRWKGPWQWF	DESML.....	.DCCEHLDTV	RAEGITFGKV	
	LjPCS2	LNALALID.PGPWRWF	DDSML.....	.DCCEPLEKV	KVQGITFGKV
	LjPCS3	LNALSID.PG	RKWKGPWRWF	DDSML.....	.DCCEPLEKI	KVQGITFGKV
Atha-AAD41794	LNALSID.PG	RKWKGPWRWF	DESML.....	.DCCEPLEVU	KEKGISFGKV	
Bjun-CAC37692	LNALSID.PG	RKWKGPWRWF	DESML.....	.DCCEPLEVU	KEKGISFGKV	
Tjap-BAB93119	LNALSID.PG	RKWKGPWRWF	DESML.....	.DCCEPLEVU	KDKGISFGKV	
Atha-AAK94671	LNLSID.PG	RKWKGPWRWF	DESML.....	.ECCEPLEIV	KDKGISFGKV	
Stub-CAD68109	LNALALID.PG	RKWKGPWRWF	DESML.....	.DCCEPLEKV	KAKGISFGKV	
Ntab-AAO74500	LNALALID.PG	RKWKGPWRWF	DESML.....	.DCCEPLEKV	KAKGISFGKV	
	LjPCS1	LNALALID.PG	RKWKGPWRWF	DESML.....	.DCCEPLDKI	KARGISFGKL
Gmax-AAL78384	LNALALID.PG	RKWKGPWRWF	DESML.....	.DCCEPLETV	KARGITFGKL	
Asat-AAO13809	LNALALID.PG	RKWKGPWRWF	DESML.....	.DCCEPLEKV	KEEGITFGKV	
Tlat-AAG22095	~~~~~	~~~~~	~~~~~ML.....	.DCCEPLEKI	KAEGITFGKV
Ayok-BAB64932	LNALSID.PG	RKWKGPWRWF	DESML.....	.DCCEPLEKV	KKNGITFTKV	
Spom-CAA92263	LNLSLKV.D.PG	RLWKGSWRWY	DQYML.....	.DCCRSLSDI	EKDGVTLEEF	
Nostoc-NP485018	LNSLGINAPE	TAQYSPYRVF	TQDNFFSNEK	TKAVIAPEVU	ARQGMTLDEL	
Pmar-NP894844	LNSLAIAPP	VDGFRNYHFW	TQDNIFNSDS	SQVVISPAKI	RRQGMTLQEL	
Cele-NP496475	LNALALID.PE	KVWKAPWRFY	HESML.....	.DCCVPLENI	RKSGINLQQF	

109

144

Cdac-AAO13810	ALLAHCAGAD	VQTFRANRIT	..LEDLRRHL	VRCASSQDCH	LIASYHRKAF	
Taes-AAD50592	VCLAHCAGAR	VQSFRADQTT	..IHDFAHL	TRCASSQDCH	LISYHRSPF	
Osat-AAO13349	ACLAHCSGAD	VRTFRAAQAT	..LADLRRHL	LRCASSQDCH	LVASYHRKLL	
	LjPCS2	ACLARCNCAK	VEAFRSNEST	..VSDFRNRV	ISCCSSEDH	AIVSYHRSGL
	LjPCS3	ACLARCNCAH	VEAFRSNEST	..VSDFRDRV	ISCCSSEDH	LIVSYHRSGL
Atha-AAD41794	VCLAHCSGAK	VEAFRTSQST	..IDDFRKFV	VKCTSENCH	MISTYHRGVF	
Bjun-CAC37692	VCLAHCSGAK	VEAFRTNQTT	..IDDFRKL	MKCSTSENCH	MISTYHRGVF	
Tjap-BAB93119	VCLAHCSGAK	VEAFRTNQST	..IDNFRNFV	VKCTSDNCH	MISTYHREIF	
Atha-AAK94671	VCLAHSSGAK	VEAFRTNQST	..IDDFRKYV	VKCTSDNCH	MISTYHRQVL	
Stub-CAD68109	VCLAHCSGAK	VEAFRSNLST	..IDDFRKHV	MACTTSDCH	LISYHRGLF	
Ntab-AAO74500	VCLAHCSGAK	VEAFRSNHST	..IDDFRQV	MACTTSDNCH	LISYHRGLF	
	LjPCS1	VCLAHCSGAK	VEAFHASHSS	..IDHFRKYV	MKCSTSDCH	VISYHREAL
Gmax-AAL78384	VCLAHCSGAK	VEAFHATHSS	..IDDFRKYV	KKCSMSDDCH	VISYHRAAL	
Asat-AAO13809	ACLAHCSGAK	VQAIRTSQGS	..LEDFRQHI	IRCTSDCH	VITSYNRCAF	
Tlat-AAG22095	ACLAHCSGAK	VEAFRANQST	..IDDFRKHV	IQCTSDCH	LVSYSRKL	
Ayok-BAB64932	TCLAQCSGAS	VQAFRANQSS	..LDLFRSFV	ETCVSDDH	LIVSYDRRPL	
Spom-CAA92263	SCLANCNGLR	TITKCVKDV	..FDFRQV	ISCSSTENKI	MAISFCRKL	
Nostoc-NP485018	GRLIASYGVK	KVNHASDTN	..IEDFRQV	AEENLQDGNF	VIVNYLRKEI	
Pmar-NP894844	QNLLSHHGVS	SKRLHGDILS	..LQAFRSLI	KANLDDSSDR	LIVNYDRKVI	
Cele-NP496475	SCLAKCNRLK	STVSYGDN	DFLKKFRSL	VNSVRSDDQV	LVASYDRSVL	

162

180

Cdac-AAO13810	KQTGTGHFSP	IGGYHAGQDM	ALILDVARFK	YPPHWVPLSL	LWEAMNTTDE	
Taes-AAD50592	KQTGTGHFSP	IGGYHAEKDM	ALILDVARFK	YPPHWVPLTL	LWDAMNTTDE	
Osat-AAO13349	KQTGTGHFSP	IGGYHAGQDM	ALILDVARFK	YPPHWVPLPL	LWEAMNTIDE	
	LjPCS2	KQTGEGHFSP	LGYYHAERDM	VLILDVTRYK	YPPHWVPLTL	LWNAMNTIDR
	LjPCS3	KQTGEGHFSP	IGGYHAERDM	VLILDVTRYK	YPPHWVPLTL	LWDAMNTIDR
Atha-AAD41794	KQTGTGHFSP	IGGYNAERDM	ALILDVARFK	YPPHWVPLKL	LWEAMDSIDQ	
Bjun-CAC37692	KQTGTGHFSP	IGGYNAERDM	ALILDVARFK	YPPHWVPLKL	LWEAMDSIDQ	
Tjap-BAB93119	KQTGTGHFSP	IGGYNAERDM	ALILDVARFK	YPPHWVPLKL	LWEAMDSIDE	
Atha-AAK94671	KQTGTGHFSP	IGGYNAERDM	ALILDVARFK	YPPHWVPLKL	LWDAMDSIDQ	
Stub-CAD68109	KQTGTGHFSP	IGGYHAEKDM	ALILDVARFK	YPPHWVPLPL	LWEAMNTIDE	
Ntab-AAO74500	KQTGTGHFSP	IGGYHVGKDM	ALILDVARFK	YPPHWVPLPL	LWEAMNTIDE	

LjPCS1 KQTGTGHFSP IGGYHAGKDM ALILDVARFK YPPHWIPLTH LWEGMNYVDE
 Gmax-AA178384 KQTGTGHFSP IGGYHVRGDM ALILDVARFK YPPHWIPLKL LWEGMNYIDE
 Asat-AA013809 GQTGTGHFSP IGGYHKGSDM ALILDVARFK YPPHWVPLQL LWEAMKYEDP
 Tlat-AAG22095 KQTGTGHFSP IGGYHSGKDM VLILDVARFK YPPHWVPLEL LWEAMNTVDK
 Ayok-BAB64932 KQTGTGHFSP LGGYHRQKDM ALILDVARFK YPPHWVPLSL LWDAMNTIDE
 Spom-CAA92263 GQTGTGHFSP VGGFSESDNK ILILDVARFK YPCYVVDLKL MYESMFPIDK
 Nostoc-NP485018 GOERGGHISP LAAYNEQTR FLIMDVSRYK YPPVWVKTTD LWKAMNTVDS
 Pmar-NP894844 GQKGGGHFSP LAAYDAVTDK VLILDVARYR YPSVWVKTHD LWRAMRTLDG
 Cele-NP496475 GQTGTGHFSP LAAYHEDSDQ VLIMDVARFK YPPHWVKLET LQKALCSVDV

363

Cdac-AA013810 GRRFYCLKLQ VAVCCQEAM LSGSIASNNG FCCRETCFSS VQANGNGVK.
 Taes-AAD50592 DEDSLA.EIA ATVCCQAAF LSGNLVSRDG FCCRETCKIC IEANGDGLK.
 Osat-AA013349 DEDSIS.QIA ASVCCEATAL LSGNLSSRDG LFFSETCSGC TQVNDGLK.
LjPCS2 QDKDMLPELA ARVCCQACL LTGCCLSGGK .CCQIDVKH LNVDSKNLAT
LjPCS3 QDRDMLPELA AGVCCQACL LTGCCLPGGK .CCSQIDVKH LNVDHKNI.V
 Atha-AAD41794 GYEDSLTYAA AKACCQAEI LSG..SPSKE FCCRETVCVK IKGPDDS.EG
 Bjun-CAC37692 GYEDSLTYAA AKACCQAEI LSG..CSSKE FCCRETVCVC VKGPGEA.EG
 Tjap-BAB93119 GYEDSLAYAA AKACCQAEI LSG..TSSKE FCCRETVCVK VKGPGEA.EG
 Atha-AAK94671 .YEDNLPYVA AKVYCDGDEI LSG..YESDE SCCKETCVKC IKGLGEE.KV
 Stub-CAD68109 EMESSLTNVA ASICCGADI FAGRSGLSDR FCCRQTCVRC YRATGDN.PA
 Ntab-AA074500 ASDSSLANVA ANICCGAGL FAGRSGSSDR FCCLQTCVRC YRATGDN.SA
LjPCS1 GDRDTPFVIA ASVCCQAEI LGGKISSAE YCCRETCKIC WKAEDDK.PI
 Gmax-AA178384 GDGDTLPIIA ASVCCQAEI LGGK.PSSAG YCCRETCKIC WKAEDDK.PI
 Asat-AA013809 SGKDSLTDIA ASVCCQGALL LAGNLGRDNK SCLKETCVNN VKSNGGG.PI
 Tlat-AAG22095 NNKDFLPEIA ATVCCQGAL LTGKVGKKEE FCCKSTSVKC FTTNGNG.PT
 Ayok-BAB64932 SVNESLPNVI MQACCQAAA FTGIKCSSNI TCIKKEGAE VRLNEDRGDT
 Spom-CAA92263 ALKKQLDSLH .CCKTD..TGCCSSS..CCKNT~~~~
 Nostoc-NP485018 ~~~~~~
 Pmar-NP894844 ~~~~~~
 Cele-NP496475 NEFSAETMNE MNQLTTQIRT LISCSKPPV ININKPDATS NKCKKNKIGQ

464

Cdac-AA013810 VLTVLLLALH PSTWLGKDE SLKAEFQALV STDNLPEVLK QEILHLR.RQ
 Taes-AAD50592 VLTVLLLVLQ PNTWLGKDE NVKAEFQSLV STDNLPDLLK QEILHLR.RQ
 Osat-AA013349 ILTVLLLSLH PSTWLCIEDE KLKAEFQSLV STDDLDPDLK LEVCLTPRT
LjPCS2 VLTVLLLALP LHTWSGIKEE KLRAEVTSLV TTEDLPSLLQ BEVILYMEPV
LjPCS3 VLTVLLLALP LHTWSGIKEE KLCAEVTSLV TTENLPPLQ BEVRSLETV
 Atha-AAD41794 VFTALLLALP PQTWSGIKDQ ALMHMCKQLI SMASLPTLLQ EEV.LHLRRQ
 Bjun-CAC37692 VFTVLLLALP PQTWSGIKDQ ALMQEMKQLI SMASLPTMLQ EEV.LHLRRQ
 Tjap-BAB93119 VFTVLVLLALP AQTWSGIKDP ALMQEMKQLI SMASLPTMLQ EEV.LHLRRQ
 Atha-AAK94671 VFTALLLALP PQTWSGIKDQ SLLQEMKQLI SMVSHPTLLQ QEV.LHLRRQ
 Stub-CAD68109 VLTALLLALP PQTWSHIKDM KVLQEIENLV SAENLPPLQ EEI.LHLRGQ
 Ntab-AA074500 VLTALLLALP PHTWSRIKDT KVLQEIENLV SAENLPPLQ EEI.LHLRGQ
LjPCS1 VLTVLLLSLP TSTWAGIAD KLLSEIHDLV SIENLPALLQ EEV.LHLRRQ
 Gmax-AA178384 VLTVLLLSLP STTWAGITDE QLLAEIHDLV SIENLPALLQ EEV.LHLRRQ
 Asat-AA013809 VLTILSLALP TNSWFDISNK KLLDEIRALV SFQNLDPVLQ EEV.LHLRRQ
 Tlat-AAG22095 VLTVLLLALP PRTWLDIEDK SLLAEIQGLV STENLPDVLQ HEV.LHLRRQ
 Ayok-BAB64932 LLAAILLALP TSMWEDIPIR EVHSEICRIV SREELPFELR LEVE.HLWEQ
 Spom-CAA92263 ~~~~~~
 Nostoc-NP485018 ~~~~~~
 Pmar-NP894844 ~~~~~~
 Cele-NP496475 ~~~~~~

471

Cdac-AA013810 LCYLKS.CK. EEECEDPVPP SH~~~~
 Taes-AAD50592 LHLAG.CKG QEACQEPSP ~~~~~~
 Osat-AA013349 LH~~~~~
LjPCS2 LQFF~~~~~
LjPCS3 LF~~~~~
 Atha-AAD41794 LQLLKR.CQE NKEEDDLAAP AY~~~~
 Bjun-CAC37692 LQLLKR.CQE NKEEDFAAP AF~~~~
 Tjap-BAB93119 LQLLKR.CQE NKEEDDLAAP AF~~~~
 Atha-AAK94671 LEMLLKR.CQE NKEEELSAP A~~~~~
 Stub-CAD68109 FLLLKR.CKD NKVEEDLAAP PF~~~~
 Ntab-AA074500 FLLLKK.CKD NKVEEDLAAP PF~~~~
LjPCS1 LHLLKR.CQE GKVEDDLGVP LS~~~~
 Gmax-AA178384 LHLLKR.CQE GKVEDDLGAP LS~~~~
 Asat-AA013809 LMFLKK.CKD KEVDGDVLLP SISMV~
 Tlat-AAG22095 FDFLKR.CKN NEVDDDPILP PHSQPF
 Ayok-BAB64932 ANLVSRSCSE ET~~~~~
 Spom-CAA92263 ~~~~~~
 Nostoc-NP485018 ~~~~~~
 Pmar-NP894844 ~~~~~~
 Cele-NP496475 ~~~~~~

4.6.2. Otros genes que codifican proteínas con dominios *fitoquelatina sintasa*

Inicialmente encontramos descrita en el genoma de *Arabidopsis* una secuencia de DNA (locus *At5g60920*), cuya proteína teórica posee dominios tipo PCS. Esta proteína está anotada en las bases de datos GenBank/EMBL/DDBJ como una posible PCS. Posteriormente, observamos que no es una secuencia aislada ya que pertenece a una familia multigénica integrada por al menos cuatro genes. Buscando secuencias homólogas a la hallada inicialmente (*At5g60920*) en genotecas de *Lotus*, encontramos una secuencia, a la que nos referiremos como *psl1* (*phytochelatin synthase-like*), que corresponde a la TC8555. Existen también homólogos de dicha secuencia en otras especies como maíz (AAF24189) y *M. truncatula* (TC95140, TC102062, TC106344, TC99602). La secuencia de *Lotus* codifica una proteína de 453 aminoácidos con residuos Cys en las posiciones: 128, 139, 161, 162, 212, 242, 255, 256, 270, 273, 275, 277, 287, 315, 320 y 443. Además de carecer de Cys-56, tampoco poseen los residuos aminoácidos esenciales para la actividad de las PCS clásicas: His-162 y Asp-180. Como en el caso de *Ljpcs1*, *Ljpcs2* y *Ljpcs3*, diseñamos oligos específicos para qRT-PCR (Tabla 3.8) y analizamos la expresión de este gen en respuesta a Cd. Comprobamos que el nivel de transcrito aumenta transcurridas 24 h.

4.7. Expresión y caracterización de PCS1 y PSL1 recombinantes

Escogimos *pcs1* y *psl1* de *Lotus* como miembros de los dos grupos de familias multigénicas encontradas para caracterizar la actividad PCS de las correspondientes proteínas. Pretendíamos caracterizar el producto del gen *Ljpcs1* como primera PCS descrita en *Lotus* y estudiar también la posible actividad PCS del producto de *Ljpsl1*. Diseñamos oligonucleótidos específicos para amplificar los ORFs de los genes *Ljpcs1* y *Ljpsl1* a partir de RNA de raíz. Los ORFs se clonaron en el plásmido de expresión pET28 a(+) que inserta una cola de 6xHis en el extremo 5' de la proteína recombinante y las correspondientes proteínas recombinantes se expresaron en células BL21(DE3). Finalmente, se determinó la actividad PCS a partir de extractos crudos de las correspondientes células de *E. coli* recombinantes, o bien a partir de la proteína purificada, utilizando las condiciones experimentales descritas en el apartado 3.6.2. (Figura 4.14).

Los valores de actividad de la proteína poli(His)-PCS1 se detallan en la Tabla 4.4. Por el contrario, no pudimos detectar actividad PCS en el caso de la proteína recombinante poli(His)-PSL1 empleando las mismas condiciones de ensayo. Como control (Tabla 4.5)

empleamos la proteína recombinante poli(His)-AtPCS1 (Oven y cols., 2002) obtenida como resultado de la expresión del cDNA de la PCS1 de *Arabidopsis* AF135155 (Ha y cols., 1999).

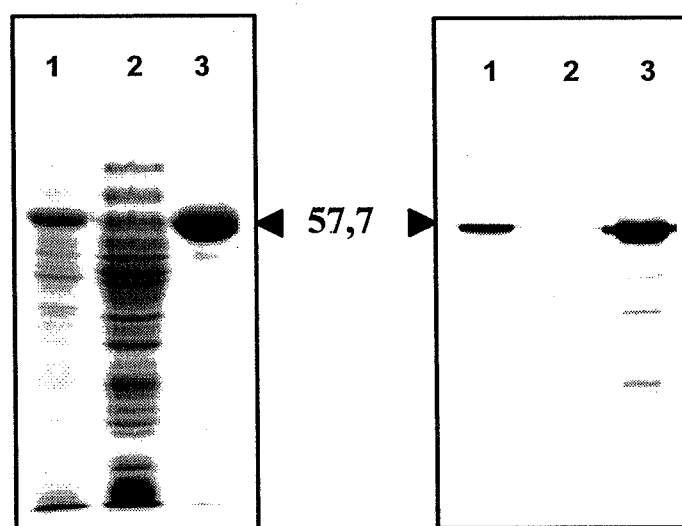


Figura 4.14 Purificación del enzima LjPCS1 recombinante por cromatografía de afinidad sobre metal inmovilizado (ver apartado 3.6.2.). (Izda) SDS-PAGE teñido con azul Coomassie. 1: Extracto dializado de células BL21 que expresan LjPCS1. 2: Proteínas eluidas con 50 mM de imidazol. 3: LjPCS1 eluida con 250 mM de imidazol. 15 μ g de proteína por carril. (Dcha) Western-blot de los mismos extractos usando un anticuerpo monoclonal anti-poli(His). 2 μ g de proteína por carril. El tamaño esperado de la proteína recombinante era 57,7 kD.

Tabla 4.4 Actividad PCS de poli(His)-LjPCS1

	Dializada	Purificada y dializada
PC ₂	20,0 \pm 4,3	83,1 \pm 7,0
PC ₃	17,3 \pm 3,3	18,4 \pm 2,6
PC ₄	17,0 \pm 3,6	6,2 \pm 1,1
Σ (PC ₂ +PC ₃ +PC ₄)	54,3	107,7

La actividad PCS está expresada en nmol-de PCs producidas (equivalentes de GSH): min⁻¹ mg⁻¹ proteína

Tabla 4.5 Actividad PCS de poli(His)-AtPCS1

	Dializada	Purificada y dializada
PC ₂	31,9 \pm 2,4	35,5 \pm 6,6
PC ₃	16,1 \pm 2,2	10,1 \pm 1,6
PC ₄	11,7 \pm 1,5	3,9 \pm 0,4
Σ (PC ₂ +PC ₃ +PC ₄)	59,7	49,5

La actividad PCS está expresada en nmol-de PCs producidas (equivalentes de GSH): min⁻¹ mg⁻¹ proteína

4.8. Localización de transcritos de superóxido dismutasas en nódulos

Finalmente, hemos estudiado la localización de transcritos que codifican la CuZnSODc y la MnSOD mitocondrial utilizando sondas de RNA, marcadas con ^{35}S -UTP, transcritas en orientación antisentido y sentido (control). En aquellas zonas de tejido donde se produjo hibridación específica con la sonda radiomarcada, utilizando un microscopio óptico en campo oscuro se vieron cúmulos brillantes de granos de plata. La hibridación de las sondas se llevó a cabo sobre secciones longitudinales de nódulos de guisante (*Pisum sativum*) y alfalfa (*Medicago sativa*) incluidos en resina (Figura 4.15). Para esta parte del trabajo hemos escogido como objeto de estudio nódulos de desarrollo indeterminado porque, como ya comentamos en el apartado 1.1.3.3., la zona central posee diferentes regiones que reproducen la ontogenia del nódulo. El nódulo de *Lotus* es de tipo determinado y, por tanto, no constituye un material idóneo para lograr nuestros objetivos. Para la descripción estructural se ha utilizado la nomenclatura de Vasse y cols., (1990): meristemo (zona I), zona de invasión (zona II), interzona II-III, zona infectada o fijadora de nitrógeno (zona III) y zona senescente (zona IV). El transcrito de la CuZnSODc se expresa fundamentalmente en la región apical de los nódulos de guisante y alfalfa, más concretamente, en las zonas I y II y en la interzona II-III (Figura 4.15 A B, C, D, I y J). También se detectó señal en la zona III, aunque de menor intensidad. No hubo diferencias importantes en lo que respecta a la intensidad de la señal de hibridación entre las células infectadas y las no infectadas. La sonda del gen *sodCp* (que codifica la CuZnSODp), sin embargo, no produjo señal. Por último, la expresión del transcrito de la MnSOD fue más intensa en la zona III (Figura 4.15 E, F, G y H), particularmente en las células infectadas (Figura 4.15 K y L). En la región apical del nódulo, así como en las células no infectadas, la señal fue débil o indetectable. En los controles realizados, usando sondas sentido CuZnSODc y MnSOD sobre secciones de tejido equivalentes, no se detectó señal.

4.9. Localización inmunohistoquímica de superóxido dismutasas en nódulos

La CuZnSODc y la MnSOD se localizaron en nódulos de alfalfa y guisante por microscopía electrónica mediante inmunomarcado con oro coloidal (“immunogold”). La incubación de los nódulos de guisante y alfalfa con el anticuerpo de la CuZnSODc reveló que la proteína se localizaba principalmente en las zonas I y II, interzona II-III y la parte más distal de la zona III (Figura 4.16). Se detectó una densa señal en el citosol, concentrada fundamentalmente en pequeñas regiones junto a las paredes de las células de las zonas I y II (Figura 4.16 A) y asociada a los cordones de infección (Figura 4.16 B y C). También se detectó señal, aunque más débil, en las vacuolas de las células de las zonas I y II, así como cerca de (y en) los

espacios intercelulares del córtex adyacente a las zonas I, II y III y en las paredes celulares adyacentes a los espacios intercelulares de la zona III. Para descartar una posible reactividad cruzada entre las CuZnSODc y CuZnSODp, se utilizó como control un anticuerpo policlonal producido frente a la CuZnSODp de espinaca. La señal de la CuZnSODp fue débil, especialmente en alfalfa, y se encontró asociada a los amiloplastos. La CuZnSODc no dio señal en los amiloplastos, ni la CuZnSODp en el citosol, lo que indica que ambos anticuerpos son altamente específicos para los correspondientes isozimas y que, por tanto, los resultados obtenidos con la CuZnSODc no se deben a la reacción cruzada con la CuZnSODp. Se realizó el mismo estudio con el anticuerpo de la MnSOD mitocondrial. En ambas leguminosas se detectó una fuerte señal de las bacterias dentro de los cordones de infección (**Figura 4.17 A y B**) y de las membranas de los bacteroides (**Figura 4.17 D**). Asimismo, como era previsible, también se observó señal en las mitocondrias de las células infectadas (**Figura 4.17 C**).

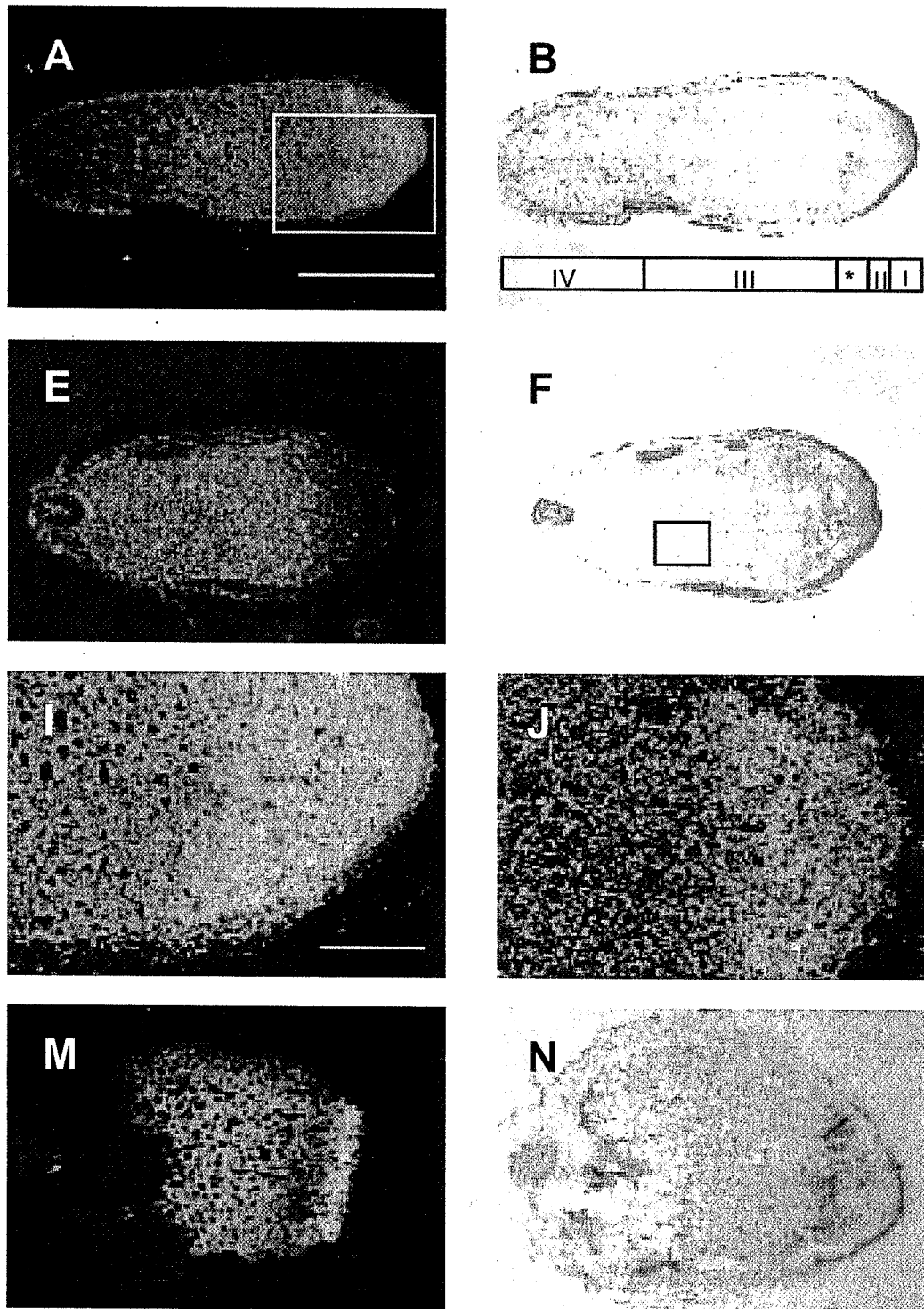


Figura 4.15 Localización *in situ* de transcritos de CuZnSODc y MnSOD mitocondrial en nódulos de alfalfa (de 7 semanas) y guisante (de 3 semanas). A - L, Secciones longitudinales de nódulos de alfalfa (A, B, E, F, I y K) y guisante (C, D, G, H, J y L). Las imágenes en campo brillante B, D, F y H se corresponden con las imágenes en campo oscuro A, C, E y G, respectivamente. La señal que refleja la localización del transcrito en las imágenes en campo oscuro se ve como puntos brillantes blancos de granos de plata. En las imágenes A, C, I y J se aprecia cómo la señal de la CuZnSOD es claramente más intensa en las zonas I, II y *. La señal del transcrito de la MnSOD es mayor en la zona III (E y G). En nódulos de alfalfa (K) y guisante (L), dicha señal es más abundante en las células infectadas (In) que en las no infectadas (Un).

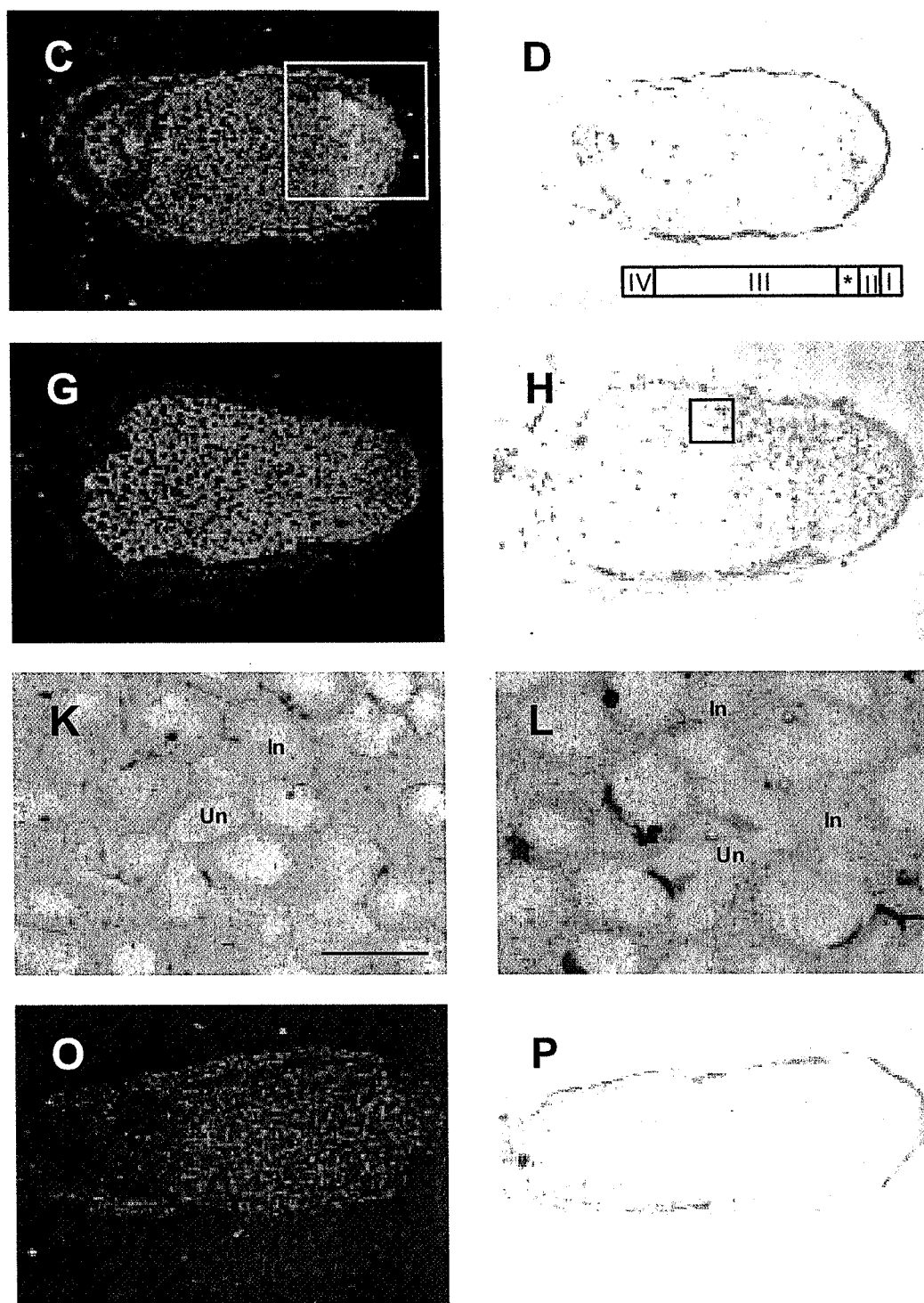


Figura 4.15 (continuación) Las imágenes I y J representan aumentos 10× de las regiones recuadradas en A y C. K y L representan aumentos 40× de las regiones recuadradas en F y H; en estas imágenes los granos de plata aparecen negros. M y N, Hibridación del transcrito antisentido de la leghemoglobina en nódulos de guisante. O y P, Nódulos de alfalfa hibridados con la sonda sentido (control) de la CuZnSODc. No se detecta señal, lo que demuestra que la señal obtenida con la sonda antisentido es específica. La estructura del nódulo se designa de acuerdo a Vasse y cols. (1990): meristemo (zona I), zona de invasión (zona II), interzona (zona *), zona fijadora de nitrógeno (zona III) y zona senescente (zona IV). Todas las imágenes representan aumentos 4× de las secciones reales, excepto I, J, K y L. Barras = 1 mm (A), 0,25 mm (I) y 0,1 mm (K).

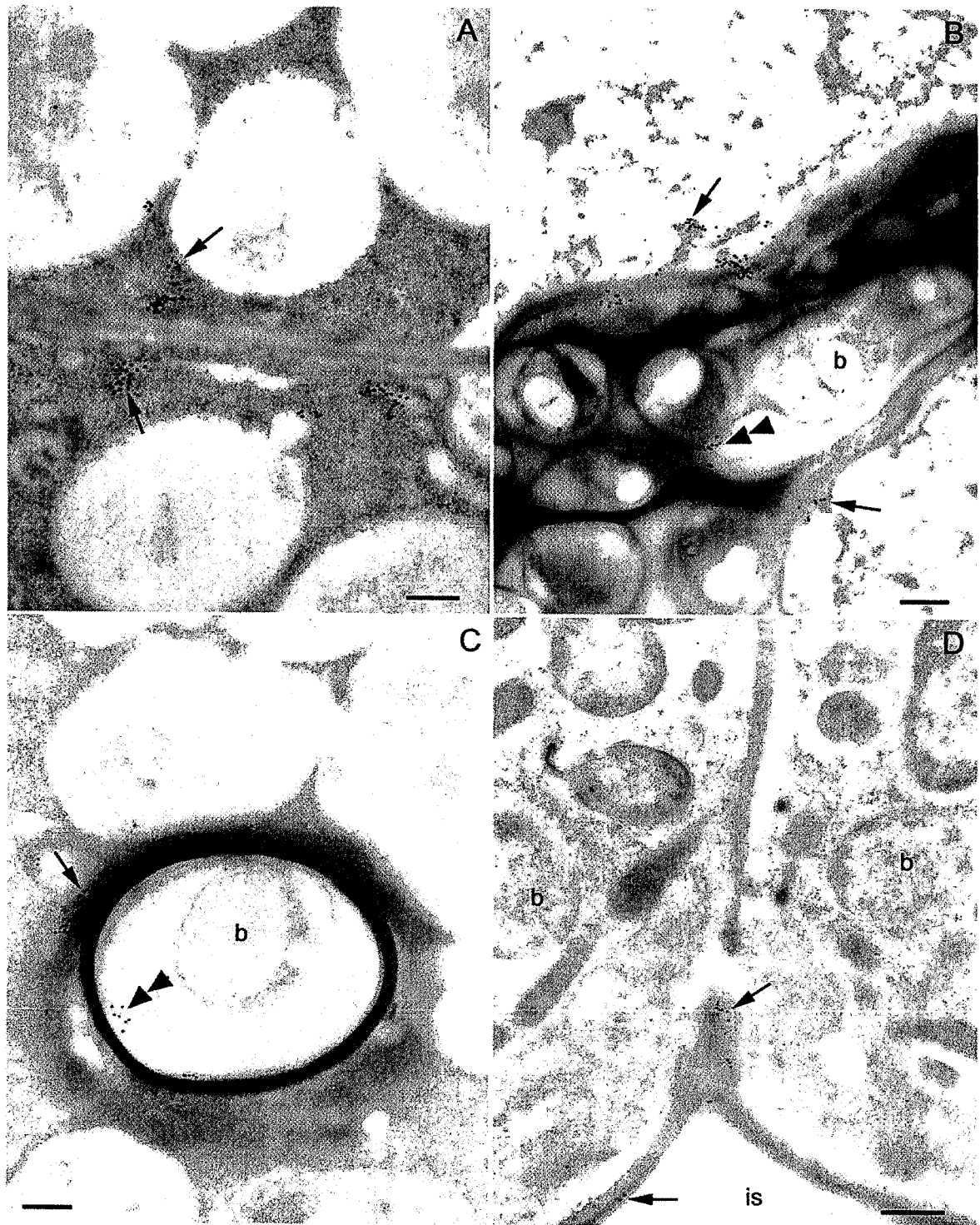


Figura 4.16 Localización de CuZnSOD en nódulos de alfalfa (A - C) y guisante (D). A, Células meristemáticas de la zona I que muestran una intensa señal en “vesículas” (flechas) asociadas a la pared celular. B y C, Secciones longitudinales y transversales, respectivamente, de cordones de infección de la zona II, que muestran una intensa señal en el citoplasma (flechas) adyacente a la pared del cordón. Se aprecia que dentro del cordón también hay señal abundante en la matriz (triángulos dobles). D, Células infectadas en la zona III. Hay señal (flechas) en las paredes celulares adyacentes a los espacios intercelulares (is). b=bacteroides. Barras=200 nm (A), 240 nm (B y C) y 500 nm (D).

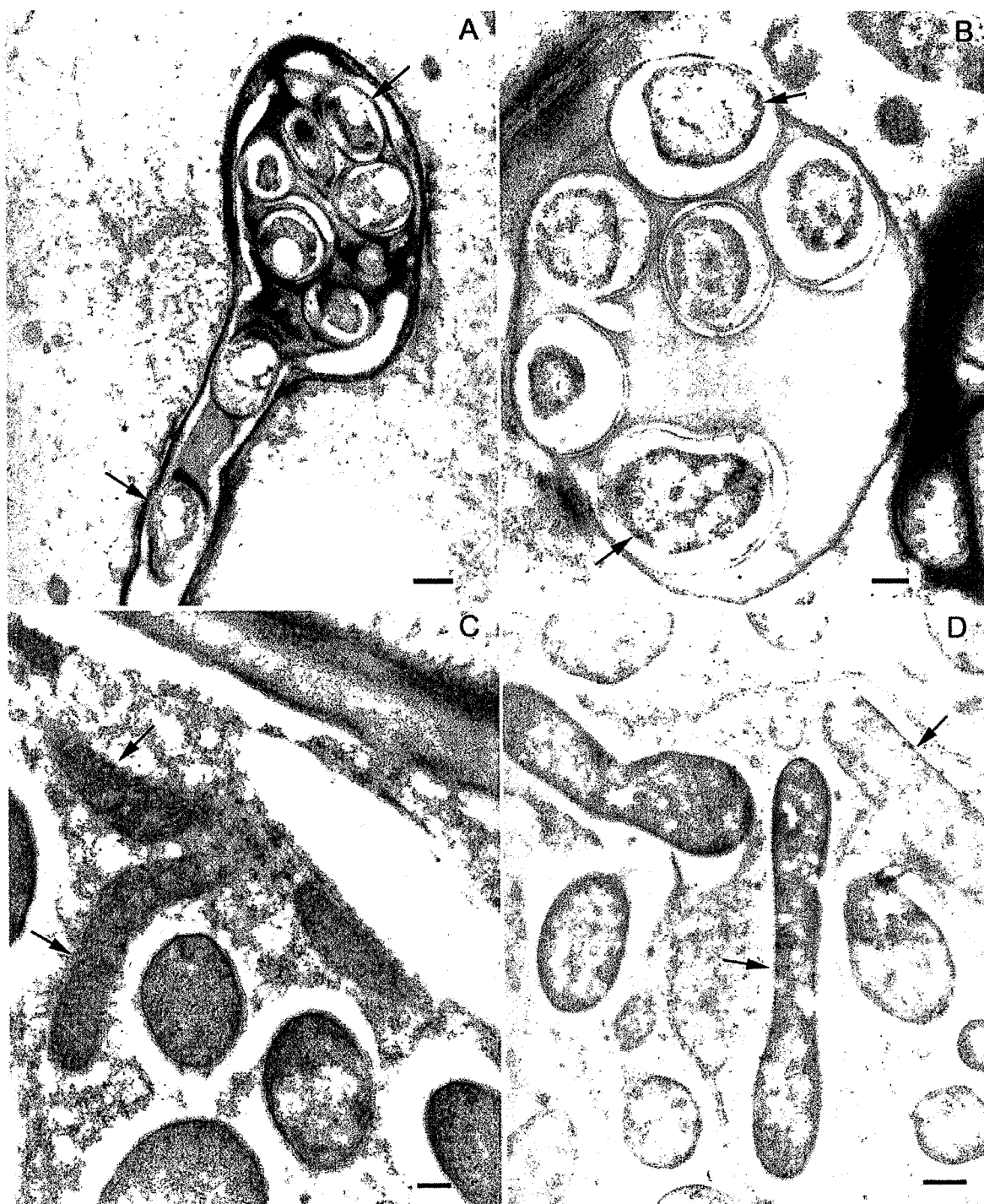


Figura 4.17 Localización de MnSOD en nódulos de alfalfa (A - C) y guisante (D). A y B, Células recientemente infectadas de la zona II con cordones y vesículas de infección, respectivamente, que contienen bacterias que expresan MnSOD (flechas). C y D, Células infectadas de la zona III que muestran señal en mitocondrias (flechas en C) y bacteroides (flechas en D). Barras=500 nm (A y D), 250 nm (B), y 160 nm.

4.10. Localización citoquímica de peróxido de hidrógeno en nódulos y estudios con inhibidores

En este trabajo, utilizando técnicas citoquímicas y microscopía electrónica, hemos demostrado la presencia de H_2O_2 en los nódulos. También hemos usado la misma técnica para elucidar el origen de dicho H_2O_2 . La técnica está basada en la oxidación del H_2O_2 a hidroperóxidos de cerio por los iones Ce^{3+} . Estos hidroperóxidos forman depósitos opacos a los electrones, que marcan la localización del H_2O_2 .

Los nódulos se separaron de las raíces, se cortaron rápidamente en pequeños trozos y, antes de llevar a cabo la perfusión con cerio, se incubaron en tampón únicamente, o bien, en el caso de los controles, en tampón con catalasa o con inhibidores enzimáticos. Como control de la preincubación se utilizaron muestras de nódulos tratados directamente con cerio. Dichas muestras mostraron una tinción de H_2O_2 similar a la de las muestras preincubadas en tampón (**Figura 4.19 A**), lo que indica que el H_2O_2 no es un artefacto formado durante la preincubación. A su vez, el tratamiento con catalasa produjo la completa desaparición de la tinción de H_2O_2 , lo que prueba que la técnica del cerio detecta específicamente H_2O_2 (**Figura 4.19 F**).

En nódulos de alfalfa y guisante, el H_2O_2 se detectó en los cordones de infección de las zonas II y III. Se localizó fundamentalmente alrededor de las bacterias, formando pequeños cúmulos dentro de la matriz y en las paredes de dichos cordones (**Figura 4.19 A, B y D**). En general, los cordones de infección de la zona III no fueron marcados tan intensamente como los de la zona II. Además de los cordones de infección, se detectó H_2O_2 en las paredes celulares y en los espacios intercelulares del córtex adyacente a las zonas I y II (**Figura 4.19 C**). Por último, también se encontró abundante H_2O_2 alrededor de los bacteroides en proceso de degradación en la zona IV (**Figura 4.19 E**). Los cordones de infección de los nódulos control que no habían sido tratados con cerio no mostraron estos precipitados.

En las muestras de nódulos tratadas con cianuro (inhibidor de las CuZnSODs y peroxidasas) o azida (inhibidor de peroxidasas) (**Figura 4.18**) no se detectó H_2O_2 en los cordones de infección, en las paredes celulares o en el apoplasto (**Figura 4.20 B**). El tratamiento con difenileniodonio (inhibidor de la NADPH oxidasa) o dietilditiocarbamato (inhibidor de las CuZnSODs) (**Figura 4.18**) causó la completa desaparición del H_2O_2 en los cordones de infección y redujo enormemente el H_2O_2 de las paredes celulares y del apoplasto (**Figura 4.20 C-E**).

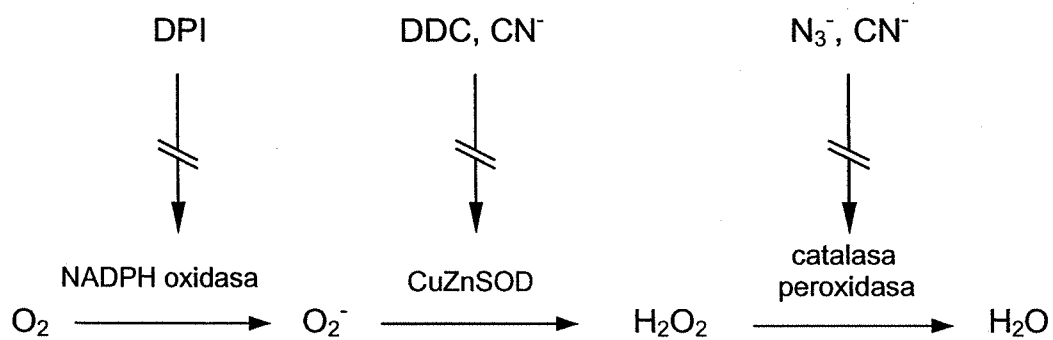


Figura 4.18 Efecto de los inhibidores difenileniodonio (DPI), dietilditiocarbamato (DDC), azida y cianuro sobre algunos enzimas asociados con la formación o destrucción de ROS.

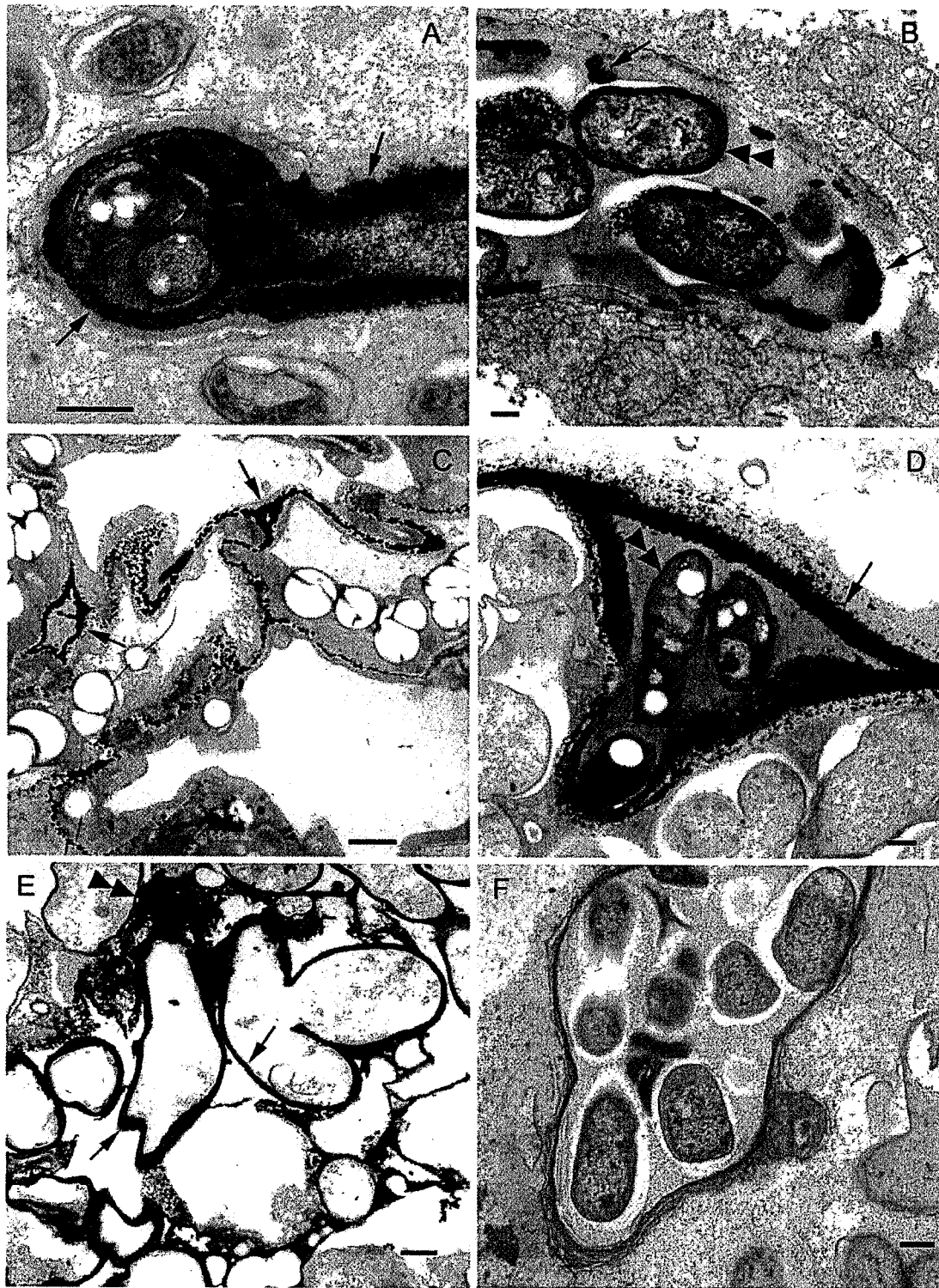


Figura 4.19 Tinción citoquímica de H_2O_2 en nódulos de alfalfa (A) y guisante (B - E). Los nódulos se perfundieron con cerio antes de procesarse y analizarse por microscopía electrónica. La presencia de H_2O_2 queda marcada por precipitados de hidroperóxidos de cerio. A - D, Localización de H_2O_2 en la matriz y las paredes de los cordones de infección de la zona II (flechas en A y B) y de la zona III (flecha en D). El H_2O_2 rodea también las bacterias dentro del cordón de infección (triángulos dobles en B y D). Asimismo, hay una gran cantidad de H_2O_2 en las paredes celulares y los espacios intercelulares del córtex adyacente a la zona II (flechas en C). E, Célula senescente en la zona IV que contiene bacteroides rodeados de H_2O_2 (flecha). También hay H_2O_2 en el citoplasma de la célula huésped que se está degradando (triángulos dobles). F, Sección del cordón de infección de la zona II de nódulos de guisante sin la adición de cerio (control negativo). Barra = 400 nm (A), 150 nm (B), 1 μ M (C) y 300 nm (D - F).

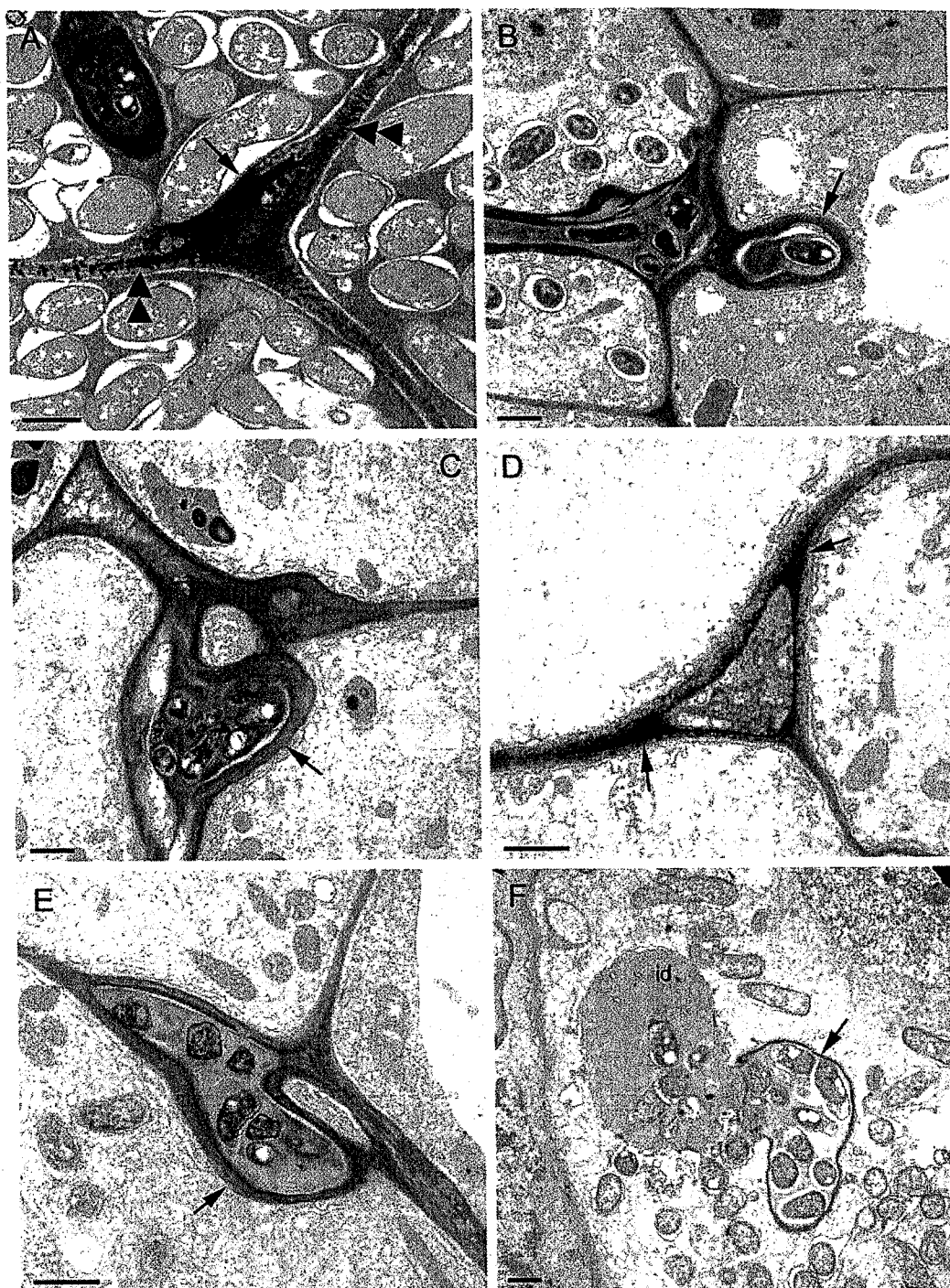


Figura 4.20 Efecto de inhibidores enzimáticos sobre la tinción citoquímica de H_2O_2 en alfalfa (A - E) y guisante (F). A, Nódulos perfundidos con cerio sin preincubar en tampón (control positivo). La presencia de H_2O_2 queda patente por precipitados de hidroperóxidos de cerio en las paredes del cordón de infección intercelular (A, flecha), así como en las paredes celulares adyacentes a dicho cordón (triángulos dobles). B - E, Los nódulos se preincubaron con 3 mM de cianuro potásico (B), 10 μ M de cloruro de difenileniodonio (C,D), 5 mM dietilditiocarbamato de sodio (E) ó 25 μ g de catalasa por ml (F). No se detectaron depósitos de hidroperóxido de cerio en los cordones de infección de aquellos nódulos preincubados con cianuro o difenileniodonio (flechas en B y C), aunque todavía se observaron depósitos (triángulos dobles) en las esquinas de algunos espacios intercelulares del córtex de dichos nódulos (D). De manera similar, no se detectaron depósitos de cerio dentro de los cordones de infección (flechas) o de las vesículas de infección (id) en nódulos preincubados con dietilditiocarbamato (E) o catalasa (F). Barras = 1 μ m.

Discusión

5. DISCUSIÓN

5.1. Biosíntesis de tioles en la leguminosa modelo *L. japonicus*

El genoma cloroplástico de la leguminosa modelo *L. japonicus* y el genoma de su simbionte, *Mesorhizobium loti*, han sido ya completamente secuenciados (Kato y cols., 2000; Kaneko y cols., 2000). Asimismo, la secuenciación del genoma nuclear de la leguminosa se completará en 2006 (S. Sato y S. Tabata, comunicación personal). Sin embargo, cuando se inició esta Tesis, no se disponía de información sobre la composición de antioxidantes en *Lotus*. Por esta razón, en la primera parte del trabajo nos propusimos analizar la biosíntesis de tioles en los distintos órganos de la planta. Determinamos el contenido de tioles y las actividades tiol sintetasa, caracterizamos los correspondientes genes, cDNAs y proteínas teóricas, y finalmente analizamos la expresión génica en las raíces, hojas y nódulos. En lo que respecta al contenido de tioles nuestra principal conclusión es que *Lotus* es esencialmente una leguminosa productora de hGSH que representa el 96% del total de tioles tripeptídicos (GSH+hGSH) en raíces y hojas. En cambio, los nódulos contienen casi dos veces más GSH que hGSH como resultado de una elevada expresión de la GSHS tanto en la fracción vegetal del nódulo como en el bacteroide (Morán y cols., 2000). Las actividades enzimáticas están en consonancia con las concentraciones de los correspondientes tioles. La distribución de GSH y hGSH en plantas de *Lotus* contrasta claramente con la de *Medicago truncatula*, una leguminosa modelo que produce exclusivamente GSH en las hojas, pero ambos tioles en raíces y nódulos (Frendo y cols., 1999).

También cabe destacar la presencia de dos poblaciones de transcritos del gen *gshs* en nódulos de *Lotus* que codifican proteínas con o sin péptido señal. Asimismo, dado el origen



común y la similitud existente entre los genes *gshs* y *hgshs*, es probable que este mismo fenómeno ocurra también con el gen *hgshs* ya sea en el nódulo o en otro órgano vegetal. Sin embargo, ambos genes están presentes como copias únicas en el genoma (Matamoros y cols., 2003). Estudios recientes realizados en *Arabidopsis* revelan la existencia de dos poblaciones de mRNAs del gen *γecs* con regiones 5'UTR de diferente tamaño, pero que incluyen en ambos casos la secuencia completa del péptido señal. La abundancia relativa de los dos tipos de transcritos está modulada durante el desarrollo de la planta. Se han detectado también varios mRNAs del gen *gshs*, de los cuales sólo el más largo posee la secuencia completa de un péptido señal; los más abundantes, sin embargo, son más cortos y carecen de la secuencia completa de dicho péptido señal. Se desconoce todavía el mecanismo por el que se regulan las diferentes actividades transcripcionales y/o la estabilidad de los distintos mRNAs. En el caso del gen *γecs* es probable que existan dos promotores parcialmente solapados que controlen la transcripción diferencial de los dos mRNAs (Wachter y cols., 2005). A la vista de nuestros resultados es posible que esté ocurriendo un fenómeno similar en el caso del gen *gshs* en nódulos de *Lotus*.

El análisis de los cDNAs de las tiol sintetasas de *Lotus* apunta una localización exclusivamente plastidial para la γ ECS y localizaciones citosólica y plastidial tanto para la GSHS como para la hGSHS. Los primeros estudios bioquímicos sobre la distribución de la actividad de los enzimas implicados en la síntesis de GSH indicaban que la GSHS y hGSHS podían localizarse tanto en los plastidios como en el citosol (Hell y Bergmann, 1988, 1990; Ruegsegger y Brunold, 1993; Rennenberg, 1997). Sin embargo, nuestro grupo demostró que en nódulos la actividad γ ECS está presente exclusivamente en los plastidios y bacteroides, y la GSHS en los plastidios, citosol y mitocondrias (Morán y cols., 2000). Experimentos recientes en brasicáceas utilizando análisis de transcritos, proteínas de fusión con genes informativos, localización inmunocitoquímica e inmunodetección de enzimas en orgánulos purificados, sugieren también una localización exclusivamente plastidial para la γ ECS y citosólica y plastidial para la GSHS (Wachter y cols., 2005).

En este trabajo hemos caracterizado los genes que codifican las tiol sintetasas de *Lotus*. El gen *γecs* contiene 15 exones interrumpidos por 14 intrones. Excepto el exón 1 (probablemente debido a diferencias en péptidos señal), todos los exones son idénticos o muy similares en tamaño a los de *Arabidopsis* (Cobbett y cols., 1998) y arroz (AJ508915), las otras dos únicas estructuras génicas de *γecs* descritas hasta ahora en plantas. Del mismo modo, los exones de la *gshs* y *hgshs* de *Lotus* son casi idénticos en tamaño y muestran una alta homología con los de la *gshs* de *Arabidopsis* (Wang y Oliver, 1996; Skipsey y cols., 1999) y *M. truncatula* (Frendo y cols., 2001). Esto sugiere que los genes *gshs* y *hgshs* están muy conservados y que se

originaron en leguminosas por duplicación. Una propuesta similar se ha realizado para los genes de *M. truncatula* (Frendo y cols., 2001). Esta hipótesis está avalada también por nuestro hallazgo de que los dos genes de *Lotus* están dispuestos en tandem y separados por sólo 8 kb, así como por el inusual “splicing” AT/AC del intrón 6 que presentan los dos genes. Este tipo de intrones, llamados U12, tiene una secuencia consenso ATATCCTTT en el sitio de “splicing” 5’ y es muy poco frecuente en eucariotas. De hecho, sólo 11 de los 19553 intrones del genoma de *Arabidopsis* pertenecen a esta familia (Burge y cols., 1998). Este “splicing” anómalo no ha sido descrito todavía en ninguna leguminosa. El hallazgo de este intrón supone que un “spliceosoma” se ha conservado durante la evolución vegetal. En el caso de *Arabidopsis*, no parece existir ninguna relación entre la presencia de este tipo de intrones y la función de los correspondientes genes.

Las regiones del promotor de los genes *γecs*, *gshs* y *hgshs* contienen elementos reguladores *cis* que pueden estar implicados en la respuesta de las plantas a la luz, hormonas o condiciones de estrés. Aunque el análisis *in silico* del promotor obviamente requiere verificación con plantas transgénicas, hay indicios que apuntan una regulación coordinada de los genes de las tiol sintetasas y subrayan el papel central del GSH en la respuesta adaptativa de las plantas a estreses ambientales (May y cols., 1998 b). Elementos homólogos a ARE o NF- κ B, asociados con la respuesta de células animales al estrés oxidativo, se han encontrado en los tres promotores, aunque con un desajuste de 1 ó 2 pb. Estos elementos se han observado también en los genes de la catalasa (Scandalios, 1997) y superóxido dismutasa (Kernodle y Scandalios, 2001), dos importantes enzimas antioxidantes de plantas.

La distribución de transcritos, actividades enzimáticas y tioles en las plantas de *Lotus* nos ha permitido poner de manifiesto la regulación diferencial de los genes de las tiol sintetasas en los órganos vegetales. El transcrito de la *γecs* es más abundante en las hojas y el de la *hgshs* en las raíces. El nivel de expresión de *hgshs* en raíces no es coherente con los correspondientes valores de actividad hGSHS o contenido de hGSH, lo que sugiere una regulación postranscripcional, o una limitación *in vivo*, de la actividad enzimática. Por lo que respecta al gen *gshs*, la expresión en hojas y raíces fue baja. Curiosamente, en hojas pudimos detectar el transcrito pero no la correspondiente actividad enzimática, lo que sugiere una regulación postranscripcional del gen *gshs* en hojas. Por el contrario, los nódulos muestran altos niveles del transcrito de *gshs*, de actividad GSHS y de GSH, lo que revela que este gen es completamente funcional y que puede desempeñar un papel crítico en la simbiosis. Estos resultados sugieren que el papel del GSH puede estar relacionado con la protección de la fijación de N₂ en la zona infectada y/o con la formación del nódulo. Estudios previos realizados por nuestro grupo con nódulos de guisante y judía, idóneos para estudios de

diseción, mostraron que la actividad γ ECS y el contenido de GSH y hGSH no se distribuyen de forma homogénea en el nódulo. El GSH es más abundante en la zona apical de los nódulos indeterminados y en la zona infectada de los determinados, mientras que el hGSH es más abundante en el córtex (Matamoros y cols., 1999). Además, se ha demostrado que el GSH está implicado en la división celular en los meristemas (Sánchez-Fernández y cols., 1997; Vernoux y cols., 2000), un proceso clave en la formación del nódulo (Mylona y cols., 1995). Recientemente, usando un inhibidor específico (butionina sulfoximina) de la síntesis de GSH y hGSH, así como raíces transgénicas que expresaban GSHS y hGSHS en orientación antisentido, se ha demostrado que la deficiencia en la síntesis de GSH y hGSH inhibe la formación de nódulos en *M. truncatula* (Frendo y cols., 2005). La inhibición no está correlacionada con el número de eventos de infección, lo que indica que en esta leguminosa un contenido bajo de GSH o hGSH no altera las primeras etapas del proceso de infección sino que reduce el número de nódulos nacientes y la expresión de nodulinas “tempranas” (*Mtenod12* y *Mtenod 40*). Es muy probable que en *Lotus* el GSH y el hGSH también sean esenciales para el adecuado desarrollo del nódulo durante la interacción simbiótica.

El análisis filogenético de la γ ECS de *Lotus* revela una elevada homología (80-90% identidad) con otras plantas, una moderada homología (56-60%) con bacterias rizobiales y otras α -proteobacterias, y una pequeña homología (18-27%) con *E. coli*, levaduras y animales. Estas observaciones sugieren al menos tres clados en la evolución de la γ ECS. Nuestros resultados apoyan, por tanto, la hipótesis de Copley y Dhillon (2002) quienes proponen que las secuencias γ ECS se distribuyen en tres grupos: el primero incluiría γ -proteobacterias, el segundo eucariotas no vegetales y el tercero plantas y α -proteobacterias. Aunque la identidad entre las secuencias pertenecientes a grupos diferentes es insignificante, existen secuencias conservadas que sugieren que las proteínas están lejanamente relacionadas. El gen *γecs* probablemente surgió en una cianobacteria y llegó a otras bacterias, a eucariotas y al menos a una arqueobacteria. Los datos de estos autores sugieren la existencia de numerosos ejemplos de transferencia génica horizontal, que incluyen una transferencia desde una α -proteobacteria a una planta, lo que justificaría la semejanza existente entre las secuencias γ ECS de estos dos tipos de organismos. La hipótesis de Copley y Dhillon contradice la de May y Leaver (1994). Estos autores propugnaban una evolución independiente de las γ ECS de diferentes organismos y una alta divergencia estructural incluso entre los enzimas de plantas superiores. La masa molecular teórica de 56 kD para la γ ECS de *Lotus* es muy similar a la de *Arabidopsis*, tabaco, guisante y judía (Hell y Bergmann 1990; May y Leaver 1994; Matamoros y cols., 1999, Jez y cols., 2004). La única γ ECS nativa caracterizada hasta ahora es la de tabaco y está descrita como un enzima que se disocia en dos subunidades por exposición a compuestos reductores (Hell y Bergmann, 1990). Las primeras medidas de actividad de la

AtECS recombinante sugerían que el enzima de *Arabidopsis* era, a diferencia del de tabaco, insensible a DTT o DTE (May y Leaver, 1994). No obstante, la reciente caracterización del enzima recombinante AtECS purificado revela que este es un enzima monomérico sensible a los reductores. El enzima experimenta un cambio conformacional inducido por el estado redox que provoca la variación de su tamaño molecular aparente en una columna de exclusión molecular (Jez y cols., 2004). La purificación y caracterización funcional de la γ ECS de *Lotus* permitirá obtener más información acerca de esta cuestión.

El análisis filogenético de la GSHS y hGSHS de *Lotus* muestra una alta homología con otras plantas (63-90% identidad), una homología significativa (37-44%) con levaduras y animales y una homología despreciable (<25%) con procariotas. Al igual que ocurría con la γ ECS, esta observación está de acuerdo con la hipótesis de Copley y Dhillon (2002) que defiende que las GSHS de bacterias y eucariotas forman dos familias muy diferenciadas. La masa molecular esperada (55,0-61,3 kD) para las GSHS y hGSHS de *Lotus* es similar a la de otras plantas (Rawlins y cols., 1995; Rennenberg, 1997) y sugiere que los enzimas nativos son homodímeros, al igual que ocurre con los de otros eucariotas (Rennenberg, 1997; Jez y Cahoon, 2004).

5.2. Biosíntesis de tioles en plantas de *Lotus* sometidas a estrés por cadmio

El Cd y otros metales pesados inducen la síntesis de (h)PCs en plantas, utilizando como sustratos GSH y hGSH (Rauser, 1995, 1999; Zenk, 1996; Cobbett, 2000 a). Por tanto, en esta segunda parte de la Tesis decidimos utilizar este modelo experimental para estudiar la regulación de los genes y enzimas implicados en la biosíntesis de tioles. Con este fin, cuantificamos mRNAs, proteínas, actividades enzimáticas y metabolitos en raíces de *Lotus* tratadas con Cd 100-200 μ M durante 3-96 h. La exposición corta (3-24 h) no tuvo efecto sobre el contenido de Cys o GSH, pero en ambos casos se produjo una ligera subida al terminar el tratamiento; por el contrario, el contenido de hGSH disminuyó inicialmente, pero se restableció transcurridas 96 h de tratamiento hasta alcanzar los niveles control. El aumento de la concentración de hGSH durante las primeras 3-6 h con 100 μ M de Cd no puede ser atribuida a una inhibición de la actividad hGSHS ya que dicha actividad permaneció constante, sino a un mayor consumo de hGSH que de GSH durante las primeras horas de exposición al metal.

Los genes *gshs* y *hgshs* de *Lotus* están estrechamente relacionados pero muestran una expresión diferencial en la planta (Matamoros y cols., 1999; Matamoros y cols., 2003) y también se comportan de manera diferente frente al Cd. La expresión del gen *hgshs* no se ve

afectada mientras que el gen *gshs* se induce marcadamente. Esta respuesta diferencial (junto con la gran acumulación de hPCs) indica que la planta responde al Cd activando rápidamente la síntesis de GSH. No obstante, puesto que el GSH y el hGSH participan en numerosos procesos fisiológicos, es lógico pensar en la existencia de una fina modulación de las actividades GSHS y hGSHS (Klapheck y cols., 1995; May y cols., 1998 b; Xiang y Oliver, 1998; Matamoros y cols., 1999). De hecho, la actividad GSHS aumentó solamente tras 96 h con Cd, mientras que el transcrito se incrementó 25 veces tan sólo 6 h de iniciarse el tratamiento, evidenciando una regulación postranscripcional del enzima. Esta conclusión está apoyada por experimentos realizados en *Arabidopsis*, en los que se muestra que el H₂O₂ no modifica los niveles de mRNA de los enzimas biosintéticos pero aumenta el contenido de GSH, lo que sugiere una regulación a distintos niveles de los enzimas implicados en su síntesis (Schäfer y cols., 1998).

No obstante, el efecto más marcado del Cd consistió en un espectacular incremento del contenido de γ EC desde las primeras horas de tratamiento. La acumulación de γ EC no se debe a una inhibición de las actividades enzimáticas que la consumen (GSHS y hGSHS), que de hecho aumentaron, sino a un incremento de la propia actividad γ ECS. El aumento de actividad γ ECS con el Cd ha sido descrito por otros autores (Hell y Bergmann, 1990; Sun y cols., 1996). En esta Tesis hemos estudiado el efecto del Cd sobre los niveles de transcrito y proteína γ ECS, así como sobre el contenido de su producto, la γ EC, en raíces de *Lotus*. El nivel de transcrito de γ ECS no resultó afectado por el tratamiento, una observación coherente con la de May y cols. (1998) en cultivos de células de *Arabidopsis*, pero en desacuerdo con los resultados de Xiang y Oliver (1998), también en *Arabidopsis*. Puesto que la ausencia de efecto sobre el transcrito de γ ECS en raíces de *Lotus* está en total contradicción con el aumento de 100 veces en el contenido de γ EC, apuntando una regulación postranscripcional del enzima, nos propusimos determinar el contenido específico de proteína γ ECS y obtener así información adicional sobre el mecanismo de regulación del enzima. Puesto que en aquel momento no existían anticuerpos frente a ninguna γ ECS de plantas, decidimos producir enzima recombinante y el correspondiente anticuerpo. Por vez primera, conseguimos clonar y expresar de forma heteróloga una γ ECS de planta. El enzima se obtuvo en forma de proteína de fusión [MBP-poli(His)-PvECS] entre la γ ECS de judía y la “proteína de unión a maltosa”, con el propósito de favorecer su solubilización en *E. coli* (Kapust y Waugh, 1999). La proteína pura fue utilizada para producir un anticuerpo policlonal monoespecífico. El análisis western-blot mostró que el anticuerpo reconocía la proteína esperada (52,4 kD) y esto fue confirmado con la observación de que tanto nuestro anticuerpo purificado por columna de afinidad como un antisuero frente a la γ ECS de *Brassica juncea* (procedente del laboratorio del Dr. Thomas Rausch, Alemania) reconocieron la misma proteína. Utilizando nuestro anticuerpo,

determinamos que el contenido de γ ECS en raíces aumenta dos veces tras el tratamiento con Cd, lo que, unido al hecho de que el Cd no afecta el nivel del correspondiente transcrito, sugiere un control de la actividad γ ECS a nivel traduccional, como se ha propuesto también para *Arabidopsis* (Xiang y Oliver, 1998; Wachter y cols., 2005). Sin embargo, el incremento de 100 veces en el contenido de γ EC indica que la actividad γ ECS está regulada principalmente a nivel postraduccional. Esta conclusión es coherente con algunos resultados que sugieren que la γ ECS de células animales se regula por fosforilación (Sun y cols., 1996).

Los efectos del Cd sobre los contenidos de tioles y PCs han sido estudiados en *Zea mays* (Rausser y cols., 1991; Rügsegger y Brunold, 1992) y *Pisum sativum* (Rügsegger y cols., 1990; Klapheck y cols., 1995), que son plantas productoras de GSH (Klapheck y cols., 1995; Matamoros y cols., 1999). En las raíces de ambas especies, el Cd provocó una disminución de GSH y un aumento de γ EC y actividad GSHS. Sin embargo, la regulación de los enzimas no se estudió a nivel molecular, por lo que es difícil comparar los resultados. Conviene destacar también que el tratamiento de *Lotus* con Cd durante 96 h provocó un aumento no sólo de la actividad γ ECS sino también del contenido de GSH y hGSH, lo que contradice la hipótesis, basada en estudios *in vitro*, de que el GSH es un inhibidor de la actividad γ ECS *in vivo* (Rügsegger y Brunold, 1992). Asimismo, nuestros resultados sobre el efecto del Cd en los mRNAs de γ ECS, GSHS y hGSHS indican que en *Lotus* no existe una respuesta coordinada, a nivel de transcritos, de los enzimas de la ruta biosintética del GSH y hGSH, contrariamente a la conclusión de Xiang y Oliver (1998) en *Arabidopsis*. Nuestros datos muestran, en cambio, que la biosíntesis de tioles está regulada a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional.

5.3. Biosíntesis de fitoquelatinas en plantas de *Lotus* sometidas a estrés por cadmio

Otro efecto importante del Cd sobre la ruta biosintética de tioles es la rápida activación de la síntesis de (h)PCs en raíces de *Lotus*. En cambio, no se observa acumulación de (h)PCs en hojas de las mismas plantas, lo que indica que las raíces son el principal lugar de desintoxicación del Cd. La presencia de (h)PCs, tras sólo 3 h de tratamiento con Cd, está en consonancia con la expresión constitutiva de la PCS y el requerimiento del metal para la activación del enzima (Grill y cols., 1989; Zenk, 1996; Cobbett y Goldsbrough, 2002; Rea y cols., 2004). Es interesante resaltar que los polipéptidos hPC₃ y PC₃ representaron, respectivamente, el 70-80% y el 94-97% de la cantidad total de hPCs y PCs sintetizadas, lo que sugiere una mayor estabilidad de la hPC₃ y PC₃ respecto a otros polipéptidos, o bien una mayor eficiencia de la actividad PCS en la síntesis de hPC₃ y PC₃.

La PCS, enzima responsable de la última etapa de la síntesis de PCs, se ha estudiado muy poco a nivel molecular. Resultados obtenidos por varios grupos (Cobbett, 2000 a) indican que la PCS es activada postraduccionalmente por interacción con ciertos metales (Cd, Pb, Cu, Zn) o metaloides (As). En *Arabidopsis* existen dos genes funcionales (*Atpcs1* y *Atpcs2*) que codifican PCS. Sin embargo, hay resultados contradictorios respecto de su mecanismo de regulación. Algunos autores han encontrado que el nivel de transcrito o de proteína AtPCS1 y AtPCS2 no es afectado por el tratamiento de las plantas con Cd, indicando que la actividad enzimática no es regulada transcripcionalmente sino postraduccionalmente por activación con los metales (Ha y cols., 1999; Cazalé y Clemens, 2001). Sin embargo, estudios más recientes indican que el transcrito del gen *Atpcs1* se incrementa con el Cd y que existe regulación transcripcional (Lee y Korban, 2002). Dado que esta información resultaba confusa, en este trabajo nos planteamos llevar a cabo un análisis molecular en profundidad de los genes *pcs* de leguminosas y estudiar su regulación en *Lotus*.

En este estudio hemos identificado tres genes *pcs* y demostrado que se encuentran agrupados en el genoma de *Lotus*. Los genes, designados *pcs1*, *pcs2* y *pcs3*, en virtud de su posición en el cromosoma, se expresaban de forma diferencial en las raíces en respuesta a Cd. La comparación de las estructuras y las secuencias de los dos genes *pcs* de *Arabidopsis* y los tres de *Lotus* apuntan a que estos últimos provienen de dos eventos de duplicación. La primera duplicación probablemente se produjo en todas las plantas superiores y originó *Ljpcs1* y otro gen, que a su vez experimentó una segunda duplicación dando lugar a *Ljpcs2* y *Ljpcs3*. Esta última duplicación probablemente ocurrió una vez que las leguminosas divergieron de otras plantas vasculares. La hipótesis de la doble duplicación también está apoyada por el análisis filogenético de las proteínas PCS deducidas y explicaría por qué existen sólo dos genes en *Arabidopsis* y tres en *Lotus* y probablemente otras leguminosas. De hecho, las ESTs disponibles en las bases de datos sugieren la existencia de tres genes *pcs* en *G. max* y *M. truncatula*.

La comparación de las secuencias PCS conocidas y el análisis de proteínas mutadas y truncadas han permitido formular la hipótesis de que los enzimas están organizados funcionalmente en un dominio conservado N-terminal, que estaría implicado en la catálisis, y un dominio variable C-terminal, implicado en la percepción del metal y en la estabilización del enzima (Cobbett y Goldsbrough, 2002; Ruotolo y cols., 2004). La posición y distribución de las Cys, especialmente en el dominio N-terminal, son importantes para la actividad PCS y la tolerancia al Cd (Cobbett y Goldsbrough, 2002; Maier y cols., 2003). Las tres proteínas de *Lotus* contienen todos los aminoácidos que son esenciales para la actividad (Maier y cols., 2003; Rea y cols., 2004). Sin embargo, la distribución de residuos de Cys en LjPCS2 y

LjPCS3 es diferente a la de otras PCS, especialmente en el dominio C-terminal, puesto que carecen de Cys en posiciones 144, 363, 366 y 471 (presente en todas o la mayoría de las plantas superiores) pero las contienen en posiciones 139, 347, 352 y 353 (presentes sólo en estas dos PCS). Además, la proteína LjPCS2 carece de un motivo de 5 aminoácidos (GRKWK) que está presente en el dominio N-terminal de los enzimas de *S. pombe*, helechos y plantas superiores. Asimismo, LjPCS2 y LjPCS3 carecen de un motivo (LHLR(R/G)Q) conservado en todas las PCS de plantas vasculares excepto en la PCS de arroz. Estos cambios pueden afectar a las propiedades bioquímicas de los enzimas. La expresión de los genes *Ljpcs1*, *Ljpcs2* y *Ljpcs3* en respuesta al Cd también es diferente. Mientras que la expresión de *Ljpcs1* no se ve afectada de modo sustancial, la expresión de *Ljpcs2* y *Ljpcs3* aumenta transcurridas 24-96 h de tratamiento.

Finalmente, en este trabajo también hemos detectado, en el genoma de *Lotus*, secuencias homólogas a una familia multigénica detectada en *Arabidopsis* y anotada como posibles PCS. No obstante, el estudio detallado de una de las secuencias de *Lotus* a la que nos hemos referido como *psl1* (*phytochelatin synthase-like 1*) ha revelado que carece de algunos residuos aminoacídicos esenciales para la actividad de las PCS clásicas. Con el fin de verificar que carece de actividad PCS, obtuvimos la correspondiente proteína recombinante poli(His)-PSL1 en *E. coli*, empleando las mismas condiciones de ensayo que en el caso de la proteína poli(His)-LjPCS1 y poli(His)-AtPCS1. El análisis por HPLC con máxima sensibilidad determinó que la proteína poli(His)-PSL1 carece de capacidad para sintetizar PCs, y concluimos que la PSL1 (y probablemente el resto de los genes de la misma familia) no son PCS genuinas, y que las correspondientes anotaciones de los genes en las bases de datos son incorrectas.

5.4. Localización de superóxidos dismutasas y de peróxido de hidrógeno en nódulos

En la parte final de la Tesis nos propusimos estudiar un segundo grupo de antioxidantes de gran importancia en los nódulos. Las SODs, una familia de enzimas ubicuos en plantas, poseen la importante característica de ser capaces de producir cantidades significativas de H_2O_2 a pH fisiológico (Fridovich, 1989). La información sobre la localización de SODs en las células y tejidos de los nódulos es escasa y está basada principalmente en ensayos de actividad SOD de orgánulos purificados (Puppo y cols., 1987; Becana y cols., 1989). En este trabajo hemos combinando estudios de inmunolocalización e inhibidores enzimáticos para examinar la posibilidad de que las dos SODs más abundantes de los nódulos sean una fuente de H_2O_2 . En

primer lugar, observamos que existe una expresión diferencial de los genes de la CuZnSODc (*sodCc*) y MnSOD mitocondrial (*sodA*). Puesto que no existía una homología significativa entre la secuencia de la sonda *sodCc* y el gen de la CuZnSODp (*sodCp*), excepto en dos pequeñas regiones, descartamos la posibilidad de que la señal de la sonda de la CuZnSODc fuese el resultado de la expresión del gen *sodCp*. La sonda de *sodCp* no produjo señal; de hecho, el nivel de transcrito del *sodCp* determinado por qRT-PCR fue un 5% del correspondiente a *sodCc* (J. Ramos and M. Becana, datos no publicados). El transcrito y la proteína de la CuZnSODc están localizados predominantemente en el ápice nodular, lo que puede ser el resultado de la activación del promotor *sodCc* en el meristemo y en la zona de invasión. Los tioles Cys y GSH, abundantes en el ápice de los nódulos indeterminados (Matamoros y cols., 1999) y/o los radicales superóxido producidos en los cordones de infección (Santos y cols., 2001), podrían activar la transcripción del gen *sodCc* (Hérouart y cols., 1993). Por el contrario; el transcrito y la proteína de la MnSOD son muy abundantes en la zona III, particularmente en las células infectadas, lo que sugiere claramente un papel protector de la MnSOD en la interacción simbiótica.

El hallazgo más interesante, sin embargo, es la colocalización de la CuZnSODc y el H₂O₂ en el citosol adyacente a las paredes celulares de la zona I, en las paredes y matrices de los cordones de infección de la zona II y en los espacios intercelulares del córtex adyacente a las zonas I y II. El H₂O₂ no se detectó en asociación con la MnSOD ni en el citosol o los peroxisomas, dos compartimentos celulares donde se genera una gran cantidad de H₂O₂. El hecho de que no detectáramos depósitos de cerio en el citosol o los peroxisomas no se debe a la dificultad de los iones cerio para penetrar en las células ya que se usaron condiciones óptimas para la tinción de H₂O₂ (Bestwick y cols., 1997; Blokhina y cols., 2001). Además, los inhibidores y la catalasa son moléculas relativamente grandes y alcanzaron sus dianas después de periodos de incubación más breves. La ausencia de H₂O₂ en el citosol o en los peroxisomas puede deberse, más probablemente, a su rápida descomposición por la APX o la catalasa, muy abundantes en los nódulos (Dalton, 1995). Esta explicación estaría de acuerdo con la hipótesis de que el cerio reacciona fundamentalmente con el exceso de H₂O₂ que no se metaboliza rápidamente (Bestwick y cols., 1997).

La rápida producción de ROS es una característica de la respuesta hipersensible que tiene lugar durante la interacción planta-patógeno (Lamb y Dixon, 1997). No está clara, sin embargo, la existencia de una genuina “explosión oxidativa” durante la interacción simbiótica (Shaw y Long, 2003 a). Hay experimentos que prueban que los factores Nod incompatibles desencadenan una respuesta defensiva en la planta, mientras que los factores Nod compatibles la suprimen (Bueno y cols., 2001; Martínez-Abarca y cols., 1998) y no promueven la secreción

de H_2O_2 por las raíces. Esto supondría que, al menos durante la interacción inicial, no hay “explosión oxidativa” (Shaw y Long, 2003 a). Otros experimentos demuestran que los rizobios pueden desencadenar una reacción hipersensible involucrada probablemente en la autorregulación del número de nódulos (Vasse y cols., 1993) y que los rizobios y los factores Nod pueden inducir la producción de ROS (Santos y cols., 2001; Ramu y cols., 2002; D’Haeze y cols., 2003). Estos resultados no son necesariamente contradictorios si se asume que la producción de ROS depende del estadio de la interacción simbiótica (Shaw y Long, 2003 a). Nosotros hemos detectado una tinción intensa de H_2O_2 en la superficie de las bacterias que se encuentran dentro de los cordones de infección; esto es consistente con una respuesta defensiva, probablemente limitada, de la planta a la infección rizobiana. Sin embargo, tampoco pueden descartarse otras explicaciones, tales como la producción metabólica de H_2O_2 por la bacteria. Al igual que otros grupos, hemos detectado grandes cantidades de H_2O_2 en la matriz y paredes celulares de los cordones de infección (Santos y cols., 2001; D’Haeze y cols., 2003). Este H_2O_2 puede estar implicado en el entrecruzamiento oxidativo de glicoproteínas ricas en Tyr e hidroxiprolina, necesarias para el crecimiento y desarrollo de los cordones de infección (Salzwedel y Dazzo, 1993; Wisniewski y cols., 2000).

Las principales ROS que se producen durante la “explosión oxidativa” desencadenada por patógenos son los radicales superóxido y el H_2O_2 (Lamb y Dixon, 1997). Para explicar este fenómeno se han propuesto principalmente dos posibles mecanismos: la producción de radicales superóxido por una NADPH oxidasa, similar a la existente en los neutrófilos y localizada en la membrana plasmática, y la generación de H_2O_2 por una peroxidasa dependiente de pH en el apoplasto y las paredes celulares (Desikan y cols., 1996; Lamb y Dixon, 1997; Grant y Loake, 2000). Habitualmente se usan inhibidores para distinguir entre los dos mecanismos e identificar la fuente enzimática de H_2O_2 (Auh y Murphy, 1995; Desikan y cols., 1996; Blokhina y cols., 2001). Aunque ninguno de los inhibidores es absolutamente específico (Desikan y cols., 1996; Barceló, 1998), proporcionan una información valiosa sobre el mecanismo de generación de H_2O_2 . El tratamiento con cianuro o azida (inhibidores de CuZnSODs y peroxidases) evitó completamente la tinción de H_2O_2 en los cordones de infección, paredes celulares y apoplasto. Del mismo modo, el DPI (inhibidor de la NADPH oxidasa de neutrófilos; Desikan y cols., 1996) y el DDC (inhibidor de la CuZnSOD; Heikkila y cols., 1976) evitaron la acumulación de H_2O_2 en los cordones de infección y redujeron enormemente el H_2O_2 en las paredes celulares y el apoplasto. Ya que el DPI no inhibe las actividades SOD o peroxidasa (Auh y Murphy, 1995) y que el cianuro no inhibe la NADPH oxidasa (Lamb y Dixon, 1997), proponemos un mecanismo secuencial de generación de H_2O_2 que implica a la NADPH oxidasa (produciendo superóxido) y a un enzima sensible al cianuro (produciendo H_2O_2 a partir del superóxido). La inhibición por DDC de la tinción de H_2O_2 en

los cordones de infección apunta a la CuZnSOD como el enzima sensible a cianuro responsable de la formación de H_2O_2 . Utilizando un anticuerpo para localizar la CuZnSOD “citoplásmica” y una tinción *in vivo* para radicales superóxido, Ogawa y cols. (1996) concluyeron que la CuZnSOD apoplástica era el enzima responsable de la generación del H_2O_2 , necesario para la lignificación en hojas e hipocótilos de espinaca. Por el contrario, Barceló (1998) atribuyó la producción de H_2O_2 en el xilema de *Zinnia elegans* a un acoplamiento de NADPH oxidasa y peroxidasas. Basándonos en los estudios de inhibición y en la colocación de CuZnSOD y el H_2O_2 en lugares críticos para la formación del nódulo, proponemos que al menos una parte del H_2O_2 , especialmente el detectado en los cordones de infección, se origina por acción de la CuZnSOD. No obstante, el DDC causó únicamente una inhibición parcial de la tinción de H_2O_2 en las paredes celulares y el apoplasto, y la azida, que inhibe débilmente a la CuZnSOD (Misra y Fridovich, 1978) pero que constituye un potente inhibidor de las peroxidasas, evitó completamente la acumulación de H_2O_2 . Estas observaciones apoyan la participación de un enzima adicional, probablemente una peroxidasa de la pared celular inhibible por cianuro y azida, en la producción del H_2O_2 apoplástico de la pared celular. Desconocemos todavía si la CuZnSOD puede proporcionar H_2O_2 a esta peroxidasa de la pared celular de un modo similar al que propusieron Ogawa y cols. (1996) en espinaca.

Además de la NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática y de la peroxidasa dependiente de pH del apoplasto y las paredes celulares existen otras dos fuentes potenciales de H_2O_2 localizadas en los espacios intercelulares del nódulo. Se ha descrito una proteína apoplástica tipo-germina que tiene actividad MnSOD (Yamahara y cols., 1999) y que está implicada en la resistencia a patógenos en cereales (Christensen y cols., 2004), por lo que probablemente puede ser la responsable de la producción de una cantidad significativa de H_2O_2 . Sin embargo, ya que la actividad MnSOD es insensible a cianuro (Yamahara y cols., 1999), este enzima probablemente no esté involucrado en la producción de una cantidad significativa de H_2O_2 en los nódulos. Por otro lado, también hay que considerar la posible contribución de la diamina oxidasa, una cuproproteína abundante en el apoplasto de los tejidos de las leguminosas (incluyendo los nódulos). Este enzima puede estar implicado en el fortalecimiento de la pared celular (Laurenzi y cols., 2001) y en la polimerización de glicoproteínas tipo extensina (Wisniewski y cols., 2000). La diamina oxidasa puede ser inhibida por el DDC, que es capaz de coordinarse al Cu (Medda y cols., 1995). Sin embargo, se desconoce si el cianuro tiene algún efecto sobre su actividad y por consiguiente no podemos descartar su implicación en la producción de H_2O_2 en los nódulos.

Una última observación novedosa de este trabajo es la acumulación de H_2O_2 en torno a los bacteroides en la zona IV de nódulos indeterminados. En esta región del nódulo, los

bacteroides han perdido su integridad estructural y se produce una gran disminución de las defensas antioxidantes, la degradación oxidativa de leghemoglobina a pigmentos verdes no funcionales y un aumento de los procesos autolíticos (Mellor, 1989; Matamoros y cols., 1999). Por tanto, el H_2O_2 encontrado en la zona IV está probablemente asociado con el estrés oxidativo resultante de la senescencia nodular. Alesandrini y cols. (2003) encontraron que el H_2O_2 se acumula en la región infectada de los nódulos senescentes de soja y propusieron que la periferia de la región infectada sufre muerte celular programada. Un proceso similar podría estar ocurriendo en la zona IV de los nódulos indeterminados.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. La leguminosa modelo *Lotus japonicus* produce mayoritariamente (96%) homoglutatión en las hojas y raíces, y glutatión (65%) en los nódulos. Estas variaciones en los contenidos de tioles de los tejidos están determinadas por una expresión diferencial de los enzimas glutatión sintetasa y homoglutatión sintetasa. La expresión del gen *glutatión sintetasa* exclusivamente en los nódulos indica que el glutatión puede desempeñar un papel específico en la simbiosis.
2. Existe una copia única del gen *glutatión sintetasa* en el genoma de *Lotus*. Sin embargo, en los nódulos se pueden detectar dos poblaciones de transcritos que codifican, respectivamente, glutatión sintetasa sin péptido señal (isoforma citosólica) o con un péptido señal en el extremo N-terminal (isoforma plastidial).
3. El cadmio induce rápidamente la biosíntesis de tioles en plantas de *Lotus*. Particularmente notables son el incremento de γ -glutamilcisteína y la activación de la síntesis de (homo)fitoquelatinas en las primeras horas de tratamiento. Puesto que el mRNA del gen *γ -glutamilcisteína sintetasa* no se ve afectado por el tratamiento con cadmio, mientras que el contenido de proteína específica aumenta dos veces y el de γ -glutamilcisteína cien veces, el enzima está regulado a nivel traduccional y principalmente postraduccional.
4. El genoma de *Lotus* contiene tres genes *pcs*, que se encuentran agrupados en el cromosoma 1 y que probablemente provienen de dos eventos de duplicación. Los análisis de secuencias de DNA y proteínas sugieren que la primera duplicación originó *Ljpcs1* y un gen que dio lugar a *Ljpcs2* y *Ljpcs3*. Esta última tuvo lugar probablemente durante la evolución, una vez que las leguminosas habían divergido de otras plantas superiores. Por otra parte, el gen

psl no codifica una auténtica fitoquelatina sintasa, a diferencia de lo postulado por los autores que anotaron inicialmente la secuencia.

5. En los nódulos indeterminados existe una expresión diferencial de los genes de la CuZnSOD citosólica y la MnSOD mitocondrial. A nivel de mRNA y proteína, la CuZnSOD está localizada predominantemente en el meristemo y en la zona de invasión, mientras que la MnSOD es muy abundante en la zona fijadora, particularmente en las células infectadas. Esto sugiere una participación de la CuZnSOD en las etapas iniciales del desarrollo nodular y un papel protector de la MnSOD en la interacción simbiótica.

6. Los estudios de co-localización de la CuZnSOD y el H₂O₂ en los nódulos, junto con los de inhibidores enzimáticos, utilizando microscopía electrónica, nos llevan a proponer que la producción del H₂O₂, al menos en los cordones de infección, es producido por la acción secuencial de una NADPH oxidasa generadora de superóxido y de la CuZnSOD citosólica. Nuestros resultados apoyan también la participación de una peroxidasa de la pared celular en la producción del H₂O₂ en el apoplasto.

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alesandrini F, Mathis R, Van de Sype G, Herouart D, Puppo A** (2003) Possible roles for a cysteine protease and hydrogen peroxide in soybean nodule development and senescence. *New Phytol* **158**: 131-138
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS** (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* **53**: 1331-1341
- Ampe F, Kiss E, Sabourdy F, Batut J** (2003) Transcriptome analysis of *Sinorhizobium meliloti* during symbiosis. *Genome Biol* **4**: R15
- Aparicico-Tejo PM, Arrese-Igor C, Becana M** (2000) Fijación de Nitrógeno. In J Azcón-Bieto, M Talón, eds, *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill Interamericana. Edicions Universitat de Barcelona, Barcelona, pp 193-213
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373-399
- Appleby CA** (1984) Leghemoglobin and rhizobium respiration. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **35**: 443-478
- Asada K, Kiso K** (1973) Initiation of aerobic oxidation of sulfite by illuminated spinach-chloroplasts. *Eur J Biochem* **33**: 253-257
- Asada K, Urano M, Takahash.M** (1973) Subcellular location of superoxide dismutase in spinach leaves and preparation and properties of crystalline spinach superoxide dismutase. *Eur J Biochem* **36**: 257-266
- Auh CK, Murphy TM** (1995) Plasma-membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O_2^- and H_2O_2 by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells. *Plant Physiol* **107**: 1241-1247

- Ayala MB, Sandmann G (1988)** Activities of Cu-containing proteins in Cd depleted pea leaves. *Physiol Plant* **72**: 801-806
- Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G (1987)** Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Crc Critical Reviews in Biochemistry* **22**: 111-180
- Bannister WH, Bannister JV, Barra D, Bond J, Bossa F (1991)** Evolutionary aspects of superoxide dismutase - the copper-zinc enzyme. *Free Rad Res Commun* **12-3**: 349-361
- Barcelo AR (1998)** The generation of H₂O₂ in the xylem of *Zinnia elegans* is mediated by an NADPH-oxidase-like enzyme. *Planta* **207**: 207-216
- Barker DG, Bianchi S, Blondon F, Dattée Y, Duc G, Essad S, Flament P, Gallusci P, Génier G, Guy P, Muel X, Tourneur J, Dénarié J, Huguet T (1990)** *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the rhizobium-legume symbiosis. *Plant Mol Biol Rep* **8**: 40-49
- Bashor CJ, Dalton DA (1999)** Effects of exogenous application and stem infusion of ascorbate on soybean (*Glycine max*) root nodules. *New Phytol* **142**: 19-26
- Beauchamp C, Fridovich I (1971)** Superoxide dismutase - improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* **44**: 276-287
- Becana M, Dalton DA, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Matamoros MA, Rubio MC (2000)** Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. *Physiol Plant* **109**: 372-381
- Becana M, Paris FJ, Sandalio LM, Delrio LA (1989)** Isoenzymes of superoxide dismutase in nodules of *Phaseolus-Vulgaris* L, *Pisum-Sativum*-L, and *Vigna unguiculata* (L) Walp. *Plant Physiol* **90**: 1286-1292
- Becker A, Pühler A (1998)** Production of exopolysaccharides. In HP Spaink, A Kondorosi, JJ Hooykaas, eds, *The Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 97-118
- Beeor-Tzahar T, Benhayyim G, Holland D, Faltin Z, Eshdat Y (1995)** A Stress-associated *Citrus* protein is a distinct plant phospholipid hydroperoxide glutathione-peroxidase. *FEBS Lett* **366**: 151-155
- Bergman B, Johansson C, Soderback E (1992)** The *Nostoc-Gunnera* symbiosis. *New Phytol* **122**: 379-400
- Berlett BS, Stadtman ER (1997)** Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* **272**: 20313-20316
- Bestwick CS, Brown IR, Bennett MHR, Mansfield JW (1997)** Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola. *Plant Cell* **9**: 209-221
- Bilinski T, Krawiec Z, Liczmanski A, Litwinska J (1985)** Is hydroxyl radical generated by the Fenton reaction *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* **130**: 533-539

- Blokhina OB, Chirkova TV, Fagerstedt KV** (2001) Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. *J Exp Bot* **52**: 1179-1190
- Bowler C, Vancamp W, Van Montagu M, Inze D** (1994) Superoxide dismutase in plants. *Crit Rev Plant Sci* **13**: 199-218
- Bowler C, Van Montagu M, Inze D** (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 83-116
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E** (2000) Responses to abiotic stresses. In BB Buchanan, W Gruissem, RL Jones, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. MD: Am Soc Plant Physiol, Rockville, pp 1158-1203
- Brewin NJ** (1998) Tissue and cell invasion by rhizobium: the structure and development of infection threads and symbiosomes. In HP Spaink, A Kondorosi, JJ Hooykaas, eds, *The Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 417-429
- Briat JF, Lobréaux S** (1997) Iron transport and storage in plants. *Trends Plant Sci* **2**: 187-193
- Bridges SM, Salin ML** (1981) Distribution of iron-containing superoxide dismutase in vascular plants. *Plant Physiol* **68**: 275-278
- Broughton BJ, Dilworth MJ** (1971) Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J* **125**: 1075-1080
- Bueno P, Soto MJ, Rodriguez-Rosales MP, Sanjuan J, Olivares J, Donaire JP** (2001) Time-course of lipoxygenase, antioxidant enzyme activities and H₂O₂ accumulation during the early stages of *rhizobium*-legume symbiosis. *New Phytol* **152**: 91-96
- Bueno P, Varela J, Gimenezgallego G, Delrio LA** (1995) Peroxisomal copper,zinc superoxide dismutase characterization of the isoenzyme from watermelon cotyledons. *Plant Physiol* **108**: 1151-1160
- Burge CB, Padgett RA, Sharp PA** (1998) Evolutionary fates and origins of U12-type introns. *Mol Cell* **2**: 773-785
- Caetano-Anolles G, Cristestes DK, Bauer WD** (1988) Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *J Bacteriol* **170**: 3164-3169
- Carlioz A, Touati D** (1986) Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli* - Is superoxide dismutase necessary for aerobic life. *EMBO J* **5**: 623-630
- Cazale AC, Clemens S** (2001) *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Lett* **507**: 215-219
- Cermola M, Fedorova E, Tate R, Riccio A, Favre R, Patriarca EJ** (2000) Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli*-*Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**: 733-741

- Chaudhary AK, Nokubo M, Reddy GR, Yeola SN, Morrow JD, Blair IA, Marnett LJ** (1994) Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science* **265**: 1580-1582
- Chen JJ, Zhou JM, Goldsbrough PB** (1997) Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiol Plant* **101**: 165-172
- Chen SX, Schopfer P** (1999) Hydroxyl radical production in physiological reactions - A novel function of peroxidase. *Eur J Biochem* **260**: 726-735
- Christensen AB, Thordal-Christensen H, Zimmermann G, Gjetting T, Lyngkjaer MF, Dudler R, Schweizer P** (2004) The germinlike protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and is an important component of quantitative resistance in wheat and barley. *Mol Plant-Microbe Interact* **17**: 109-117
- Churin Y, Schilling S, Borner T** (1999) A gene family encoding glutathione peroxidase homologues in *Hordeum vulgare* (barley). *FEBS Lett* **459**: 33-38
- Claros MG** (1995) Mitoprot, a Macintosh application for studying mitochondrial proteins. *Com App Biosci* **11**: 441-447
- Clemens S** (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**: 475-486
- Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder JI** (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J* **18**: 3325-3333
- Clemens S, Schroeder JI, Degenkolb T** (2001) *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur J Biochem* **268**: 3640-3643
- Cobbett C, Goldsbrough P** (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 159-182
- Cobbett CS** (2000 a) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* **123**: 825-832
- Cobbett CS** (2000 b) Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr Op Plant Biol* **3**: 211-216
- Cobbett CS, May MJ, Howden R, Rolls B** (1998) The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant J* **16**: 73-78
- Copley SD, Dhillon JK** (2002) Lateral gene transfer and parallel evolution in the history of glutathione biosynthesis genes. *Genome Biol* **3**: 1-16
- Cox KH, Goldberg RB** (1988) Analysis of plant gene expression. In C.H. Shaw, ed, *Plant Molecular Biology: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp 1-34

- Creissen G, Firmin J, Fryer M, Kular B, Leyland N, Reynolds H, Pastori G, Wellburn F, Baker N, Wellburn A, Mullineaux P (1999)** Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *Plant Cell* **11**: 1277-1291
- Dalton DA (1995)** Antioxidant defenses of plants and fungi. *In* S Ahmad, ed, *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. Chapman and Hall, New York, pp 298-355
- Dalton DA, Langeberg L, Treneman NC (1993)** Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root-nodules. *Physiol Plant* **87**: 365-370
- Dalton DA, Russell SA, Hanus FJ, Pascoe GA, Evans HJ (1986)** Enzymatic-reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root-nodules. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 3811-3815
- Dardel F, Bensoussan P (1988)** Dnaid - a Macintosh full screen editor featuring a built-in regular expression interpreter for the search of specific patterns in biological sequences using finite state automata. *Com App Biosci* **4**: 483-486
- Dat J, Vandenaabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F (2000)** Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* **57**: 779-795
- del Río LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gómez M, Barroso JB (2002)** Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot* **53**: 1255-1272
- del Río LA, Sevilla F, Gómez M, Yáñez J, López J (1978)** Superoxide dismutase enzyme-system for study of micronutrient interactions in plants. *Planta* **140**: 221-225
- Delaunay A, Isnard AD, Toledano MB (2000)** H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J* **19**: 5157-5166
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001)** Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 13454-13459
- Desikan R, Hancock JT, Coffey MJ, Neill SJ (1996)** Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Lett* **382**: 213-217
- Desikan R, Mackerness SAH, Hancock JT, Neill SJ (2001)** Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol* **127**: 159-172
- D'Haese W, De Rycke R, Mathis R, Goormachtig S, Pagnotta S, Verplancke C, Capoen W, Holsters M (2003)** Reactive oxygen species and ethylene play a positive role in lateral root base nodulation of a semiaquatic legume. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 11789-11794

- di Toppi LS, Gabbrielli R** (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot* **41**: 105-130
- Dietz KJ** (2003) Plant peroxiredoxins. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 93-107
- Dimitrijevic L, Puppo A, Rigaud J** (1984) Superoxide dismutase activities in *Rhizobium phaseoli* bacteria and bacteroids. *Arch Microbiol* **139**: 174-178
- Dipierro S, Borraccino G** (1991) Dehydroascorbate reductase from potato tubers. *Phytochemistry* **30**: 427-429
- Dixon DP, Laphorn A, Edwards R** (2002) Plant glutathione transferases. *Genome Biol* **3**: 3004.3001-3004.3010
- Domínguez-Solis JR, Gutiérrez-Alcala G, Romero LC, Gotor C** (2001) The cytosolic *o*-acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. *J Biol Chem* **276**: 9297-9302
- Durner J, Klessig DF** (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Op Plant Biol* **2**: 369-374
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF** (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 10328-10333
- Edwards R, Blount JW, Dixon RA** (1991) Glutathione and elicitation of the phytoalexin response in legume cell-cultures. *Planta* **184**: 403-409
- Ehrhardt DW, Atkinson EM, Long SR** (1992) Depolarization of alfalfa root hair membrane-potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* **256**: 998-1000
- Ellman GL** (1959) Tissue sulfhydryl groups. **82**: 70-77
- Escuredo PR, Minchin FR, Gogorcena Y, IturbeOrmaetxe I, Klucas RV, Becana M** (1996) Involvement of activated oxygen in nitrate-induced senescence of pea root modules. *Plant Physiol* **110**: 1187-1195
- Evans PJ, Gallesi D, Mathieu C, Hernandez NJ, de Felipe N, Halliwell B, Puppo A** (1999) Oxidative stress occurs during soybean nodule senescence. *Planta* **208**: 73-79
- Fahey R, Newton G** (1987) Determination of low-molecular-weight thiol using monobromobimane fluorescent labeling and high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* **143**: 85-96
- Ferguson DL, Burke JJ** (1994) Methionyl sulfoxide content and protein-methionine-S-oxide reductase-activity in response to water deficits or high-temperature. *Physiol Plant* **90**: 253-258
- Floyd RA, West MS, Hogsett WE, Tingey DT** (1989) Increased 8-hydroxyguanine content of chloroplast DNA from ozone-treated plants. *Plant Physiol* **91**: 644-647

- Foyer CH, LopezDelgado H, Dat JF, Scott IM (1997)** Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant* **100**: 241-254
- Foyer CH, Noctor G (2000)** Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol* **146**: 359-388
- Frahry G, Schopfer P (2001)** NADH-stimulated, cyanide-resistant superoxide production in maize coleoptiles analyzed with a tetrazolium-based assay. *Planta* **212**: 175-183
- Franssen HJ, Vijn I, Yang WC, Bisseling T (1992)** Developmental aspects of the rhizobium-legume symbiosis. *Plant Mol Biol* **19**: 89-107
- Frendo P, Gallesi D, Turnbull R, Van de Sype G, Herouart D, Puppo A (1999)** Localisation of glutathione and homogluthathione in *Medicago truncatula* is correlated to a differential expression of genes involved in their synthesis. *Plant J* **17**: 215-219
- Frendo P, Harrison J, Norman C, Jimenez MJH, Van de Sype G, Gilabert A, Puppo A (2005)** Glutathione and homogluthathione play a critical role in the nodulation process of *Medicago truncatula*. *Mol Plant-Microbe Interact* **18**: 254-259
- Frendo P, Jimenez MJH, Mathieu C, Duret L, Gallesi D, Van de Sype G, Herouart D, Puppo A (2001)** A *Medicago truncatula* homogluthathione synthetase is derived from glutathione synthetase by gene duplication. *Plant Physiol* **126**: 1706-1715
- Fridovich I (1986)** Superoxide dismutases. *Adv Enzymol* **58**: 61-97
- Galibert F, Finan TM, Long SR, Puhler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A, Boistard P, Bothe G, Boutry M, Bowser L, Buhrmester J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis RW, Dreano S, Federspiel NA, Fisher RF, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Golding B, Gouzy J, Gurjal M, Hernandez-Lucas I, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Jones T, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Kiss E, Komp C, Lalaure V, Masuy D, Palm C, Peck MC, Pohl TM, Portetelle D, Purnelle B, Ramsperger U, Surzycki R, Thebault P, Vandenbol M, Vorholter FJ, Weidner S, Wells DH, Wong K, Yeh KC, Batut J (2001)** The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**: 668-672
- Galloway JN, Schlesinger WH, Levy H, Michaels A, Schnoor JL (1995)** Nitrogen-fixation: Anthropogenic enhancement - environmental response. *Global Biogeochem Cycles* **9**: 235-252
- Gille G, Sigler K (1995)** Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol* **40**: 131-152
- Gogorcena Y, Gordon AJ, Escuredo PR, Minchin FR, Witty JF, Moran JF, Becana M (1997)** N₂ fixation, carbon metabolism, and oxidative damage in nodules of dark-stressed common bean plants. *Plant Physiol* **113**: 1193-1201
- Grant JJ, Loake GJ (2000)** Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol* **124**: 21-29

- Grill E, Loffler S, Winnacker EL, Zenk MH** (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6838-6842
- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH** (1987) Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 439-443
- Gupta R, Luan S** (2003) Redox control of protein tyrosine phosphatases and mitogen-activated protein kinases in plants. *Plant Physiol* **132**: 1149-1152
- Gutteridge JMC, Halliwell B** (1990) The measurement and mechanism of lipid-peroxidation in biological-systems. *Trends Biochem Sci* **15**: 129-135
- Ha SB, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS** (1999) Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* **11**: 1153-1163
- Hadri A, Bisseling T** (1998) Responses of the plant to Nod factors. *In* HP Spaink, A Kondorosi, JJ Hooykaas, eds, *The Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 403-416
- Hall JL** (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* **53**: 1-11
- Halliwell B, Gutteridge JMC** (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol* **186**: 1-85
- Halliwell B, Gutteridge JMC** (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 3. Oxford University Press, Oxford
- Hammond-Kosack K, Jones JDG** (2000) Responses to plant pathogens. *In* BB Buchanan, W Gruissem, RL Jones, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. MD: Am Soc Plant Physiol, Rockville, pp 1102-1156
- Handberg K, Stougaard J** (1992) *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular-genetics. *Plant J* **2**: 487-496
- Heidstra R, Geurts R, Franssen H, Spaink HP, Vankammen A, Bisseling T** (1994) Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol* **105**: 787-797
- Heikkila RE, Cabbat FS, Cohen G** (1976) *In vivo* inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate (DDC) *Adm Fed Proc* **35**: 461-461
- Hell R, Bergmann L** (1988) Glutathione synthetase in tobacco suspension cultures - Catalytic properties and localization. *Physiol Plant* **72**: 70-76

- Hell R, Bergmann L** (1990) γ -Glutamylcysteine synthetase in higher-plants - Catalytic properties and subcellular localization. *Planta* **180**: 603-612
- Henle ES, Luo YZ, Gassmann W, Linn S** (1996) Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated Fenton reactions - The deoxyguanosine family. *J Biol Chem* **271**: 21177-21186
- Herouart D, Van Montagu M, Inze D** (1993) Redox-activated expression of the cytosolic copper-zinc superoxide dismutase gene in *Nicotiana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3108-3112
- Herschbach C, Rennenberg H** (1994) Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulfate and sulfate transport in tobacco plants. *J Exp Bot* **45**: 1069-1076
- Herschbach C, van der Zalm E, Schneider A, Jouanin L, De Kok LJ, Rennenberg H** (2000) Regulation of sulfur nutrition in wild-type and transgenic poplar over-expressing γ -glutamylcysteine synthetase in the cytosol as affected by atmospheric H_2S . *Plant Physiol* **124**: 461-473
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T** (1999) Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Res* **27**: 297-300
- Hirsch AM** (1992) Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol* **122**: 211-237
- Horemans N, Foyer CH, Potters G, Asard H** (2000) Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiol Biochem* **38**: 531-540
- Howarth JR, Dominguez-Solis JR, Gutierrez-Alcala G, Wray JL, Romero LC, Gotor C** (2003) The serine acetyltransferase gene family in *Arabidopsis thaliana* and the regulation of its expression by cadmium. *Plant Mol Biol* **51**: 589-598
- Howden R, Goldsbrough PB, Andersen CR, Cobbett CS** (1995) Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol* **107**: 1059-1066
- Huang CS, Chang LS, Anderson ME, Meister A** (1993) Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat-kidney γ -glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* **268**: 19675-19680
- Hunt S, Layzell DB** (1993) Gas-exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 483-511
- Jabs T, Dietrich RA, Dangl JL** (1996) Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* **273**: 1853-1856
- James EK, Iannetta PPM, Nixon PJ, Whiston AJ, Peat L, Crawford RMM, Sprent JI, Brewin NJ** (1996) Photosystem II and oxygen regulation in *Sesbania rostrata* stem nodules. *Plant Cell Environ* **19**: 895-910

- Janicek MF, Haseltine WA, Henner WD (1985)** Malondialdehyde precursors in γ -irradiated DNA, deoxynucleotides and deoxynucleosides. *Nucleic Acids Res* **13**: 9011-9029
- Jez JM, Cahoon RE (2004)** Kinetic mechanism of glutathione synthetase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **279**: 42726-42731
- Jez JM, Cahoon RE, Chen SX (2004)** *Arabidopsis thaliana* glutamate-cysteine ligase - Functional properties, kinetic mechanism, and regulation of activity. *J Biol Chem* **279**: 33463-33470
- Jonak C, Okresz L, Bogre L, Hirt H (2002)** Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr Op Plant Biol* **5**: 415-424
- Joo JH, Bae YS, Lee JS (2001)** Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiol* **126**: 1055-1060
- Kanazawa S, Sano S, Koshiba T, Ushimaru T (2000)** Changes in antioxidative enzymes in cucumber cotyledons during natural senescence: comparison with those during dark-induced senescence. *Physiol Plant* **109**: 211-216
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Mochizuki Y, Nakayama S, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takeuchi C, Yamada M, Tabata S (2000)** Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* **7**: 331-338
- Kanematsu S, Asada K (1990)** Characteristic amino-acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. *Plant Cell Physiol* **31**: 99-112
- Kannenbergh EL, Reuhs BL, Forsberg LS, Carlson RW (1998)** Lipopolysaccharides and K-antigens: Their structures, biosynthesis and functions. In HP Spaink, A Kondorosi, JJ Hooykaas, eds, *The Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 119-154
- Kapust RB, Waugh DS (1999)** *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* **8**: 1668-1674
- Kato T, Kaneko T, Sato S, Nakamura Y, Tabata S (2000)** Complete structure of the chloroplast genome of a legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res* **7**: 323-330
- Kernodle SP, Scandalios JG (2001)** Structural organization, regulation, and expression of the chloroplastic superoxide dismutase *Sod1* gene in maize. *Arch Biochem Biophys* **391**: 137-147
- Klapheck S (1988)** Homoglutathione - Isolation, quantification and occurrence in legumes. *Physiol Plant* **74**: 727-732

- Klapheck S, Chrost B, Starke J, Zimmermann H** (1992) γ -Glutamylcysteinylserine - A new homolog of glutathione in plants of the family *Poaceae*. *Bot Acta* **105**: 174-179
- Klapheck S, Schlunz S, Bergmann L** (1995) Synthesis of phytochelatin and homo-phytochelatin in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol* **107**: 515-521
- Klapheck S, Zopes H, Levels HG, Bergmann L** (1988) Properties and localization of the homoglutathione synthetase from *Phaseolus coccineus* leaves. *Physiol Plant* **74**: 733-739
- Klessig DF, Durner J, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, Kumar D, Zhou JM, Shah J, Zhang SQ, Kachroo P, Trifa Y, Pontier D, Lam E, Silva H** (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 8849-8855
- Kocsy G, Brunner M, Rueggsegger A, Stamp P, Brunold C** (1996) Glutathione synthesis in maize genotypes with different sensitivities to chilling. *Planta* **198**: 365-370
- Kono Y, Fridovich I** (1982) Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* **257**: 5751-5754
- Kurepa J, Bueno P, Kampfenkel K, Van Montagu M, VandenBulcke M, Inze D** (1997) Effects of iron deficiency on iron superoxide dismutase expression in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol Biochem* **35**: 467-474
- Laemmli U** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lamb C, Dixon RA** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-275
- Lane BG, Dunwell JM, Ray JA, Schmitt MR, Cuming AC** (1993) Germin, a protein of early plant development, is an oxalate oxidase. *J Biol Chem* **268**: 12239-12242
- Lane TW, Morel FMM** (2000) A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 4627-4631
- Laurenzi M, Tipping AJ, Marcus SE, Knox JP, Federico R, Angelini R, McPherson MJ** (2001) Analysis of the distribution of copper amine oxidase in cell walls of legume seedlings. *Planta* **214**: 37-45
- Lee S, Korban SS** (2002) Transcriptional regulation of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase (AtPCS1) by cadmium during early stages of plant development. *Planta* **215**: 689-693
- Leegood RC** (1990) Enzymes of the Calvin cycle. In PA Lea, ed, *Methods in Plant Biochemistry*, Vol 3. Academic Press, New York, pp 15-38
- Lescot M, Dehais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouze P, Rombauts S** (2002) PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res* **30**: 325-327

- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C** (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593
- Limpens E, Franken C, Smit P, Willemsse J, Bisseling T, Geurts R** (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* **302**: 630-633
- Liu YG, Shirano Y, Fukaki H, Yanai Y, Tasaka M, Tabata S, Shibata D** (1999) Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 6535-6540
- Loomis RS, Connor DJ** (2002) Procesos del Nitrógeno. *En Ecología de Cultivos. Productividad y Manejo en Sistemas Agrarios*. Ediciones Mundi-Prisa, Madrid, pp 215-247
- Luo YZ, Henle ES, Linn S** (1996) Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated Fenton reactions - The deoxycytidine family. *J Biol Chem* **271**: 21167-21176
- Lynch DV, Thompson JE** (1984) Lipoygenase-mediated production of superoxide anion in senescing plant-tissue. *FEBS Lett* **173**: 251-254
- Macnicol PK, Bergmann L** (1984) A Role for homoglutathione in organic sulfur transport to the developing mung bean seed. *Plant Sci Lett* **36**: 219-223
- Madsen EB, Madsen LH, Radutoiu S, Olbryt M, Rakwalska M, Szczyglowski K, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J** (2003) A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **425**: 637-640
- Maier T, Yu C, Kullertz G, Clemens S** (2003) Localization and functional characterization of metal-binding sites in phytochelatin synthases. *Planta* **218**: 300-308
- Martinez-Abarca F, Herrera-Cervera JA, Bueno P, Sanjuan J, Bisseling T, Olivares J** (1998) Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti* - alfalfa symbiosis. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**: 153-155
- Matamoros MA, Dalton DA, Ramos J, Clemente MR, Rubio MC, Becana M** (2003) Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiol* **133**: 499-509
- Matamoros MA, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Rubio MC, Becana M** (1999) Glutathione and homoglutathione synthesis in legume root nodules. *Plant Physiol* **121**: 879-888
- Mauch F, Dudler R** (1993) Differential induction of distinct glutathione-S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol* **102**: 1193-1201
- Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L** (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8271-8276

- May MJ, Hammond-Kosack K, Jones JDG (1996)** Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism, and lipid peroxidation in the *Cf*-gene-dependent defense response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fluvum*. *Plant Physiol* **110**: 1367-1379
- May MJ, Leaver CJ (1993)** Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiol* **103**: 621-627
- May MJ, Leaver CJ (1994)** *Arabidopsis thaliana* γ -glutamylcysteine synthetase is structurally unrelated to mammalian, yeast, and *Escherichia coli* homologs. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10059-10063
- May MJ, Vernoux T, Sanchez-Fernandez R, Van Montagu M, Inze D (1998 a)** Evidence for posttranscriptional activation of γ -glutamylcysteine synthetase during plant stress responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12049-12054
- May MJ, Vernoux T, Leaver C, Van Montagu M, Inze D (1998 b)** Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J Exp Bot* **49**: 649-667
- Medda R, Padiglia A, Floris G (1995)** Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry* **39**: 1-9
- Meier B, Barra D, Bossa F, Calabrese L, Rotilio G (1982)** Synthesis of either Fe-superoxide or Mn-superoxide dismutase with an apparently identical protein moiety by an anaerobic bacterium dependent on the metal supplied. *J Biol Chem* **257**: 3977-3980
- Mellor RB (1989)** Bacteroids in the *rhizobium*-legume symbiosis inhabit a plant internal lytic compartment - implications for other microbial endosymbioses. *J Exp Bot* **40**: 831-839
- Meuwly P, Thibault P, Rauser WE (1993)** γ -Glutamylcysteinylglutamic acid - A new homolog of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. *FEBS Lett* **336**: 472-476
- Minchin FR (1997)** Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. *Soil Biol Biochem* **29**: 881-888
- Misra HP, Fridovich I (1978)** Inhibition of superoxide dismutases by azide. *Arch Biochem Biophys* **189**: 317-322
- Mittler R (2002)** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**: 405-410
- Mittler R, Herr EH, Orvar BL, van Camp W, Willekens H, Inze D, Ellis BE (1999)** Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 14165-14170.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004)** Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* **9**: 490-498

- Moller IM** (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 561-591
- Moran JF, Becana M, Iturbeormaetxe I, Frechilla S, Klucas RV, Aparicio-Tejo P** (1994) Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* **194**: 346-352
- Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Matamoros MA, Rubio MC, Clemente MR, Brewin NJ, Becana M** (2000) Glutathione and homoglutathione synthetases of legume nodules. Cloning, expression, and subcellular localization. *Plant Physiol* **124**: 1381-1392
- Moran JF, James EK, Rubio MC, Sarath G, Klucas RV, Becana M** (2003) Functional characterization and expression of a cytosolic iron-superoxide dismutase from cowpea root nodules. *Plant Physiol* **133**: 773-782
- Moreau S, Puppo A, Davies MJ** (1995) The Reactivity of ascorbate with different redox states of leghemoglobin. *Phytochemistry* **39**: 1281-1286
- Mulcahy RT, Bailey HH, Gipp JJ** (1995) Transfection of complementary DNAs for the heavy and light subunits of human γ -glutamylcysteine synthetase results in an elevation of intracellular glutathione and resistance to melphalan. *Cancer Res* **55**: 4771-4775
- Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J** (2002) *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* **14**: 3089-3099
- Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T** (1995) Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* **7**: 869-885
- Nakai K, Kanehisa M** (1992) A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* **14**: 897-911
- Neill S, Desikan R, Hancock J** (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Curr Op Plant Biol* **5**: 388-395
- Nikiforova V, Freitag J, Kempa S, Adamik M, Hesse H, Hoefgen R** (2003) Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: Interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant J* **33**: 633-650
- Noctor G, Arisi ACM, Jouanin L, Valadier MH, Roux Y, Foyer CH** (1997) The role of glycine in determining the rate of glutathione synthesis in poplar. Possible implications for glutathione production during stress. *Physiol Plant* **100**: 255-263
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 249-279
- Noctor G, Strohm M, Jouanin L, Kunert KJ, Foyer CH, Rennenberg H** (1996) Synthesis of glutathione in leaves of transgenic poplar overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol* **112**: 1071-1078

- Ogawa K, Kanematsu S, Asada K** (1996) Intra- and extra-cellular localization of "cytosolic" CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. *Plant Cell Physiol* **37**: 790-799
- Ogawa K, Kanematsu S, Takabe K, Asada K** (1995) Attachment of CuZn-superoxide dismutase to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PSI) in spinach chloroplasts - Detection by immunogold labeling after rapid freezing and substitution method. *Plant Cell Physiol* **36**: 565-573
- op den Camp RGL, Przybyla D, Ochsenein C, Laloi C, Kim CH, Danon A, Wagner D, Hideg E, Gobel C, Feussner I, Nater M, Apel K** (2003) Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**: 2320-2332
- Orozco-Cardenas M, Ryan CA** (1999) Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 6553-6557
- Ortiz DF, Ruscitti T, McCue KF, Ow DW** (1995) Transport of metal-binding peptides by Hmt1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J Biol Chem* **270**: 4721-4728
- Oven M, Page JE, Zenk MH, Kutchan TM** (2002) Molecular characterization of the homophytochelatase of soybean *Glycine max* - Relation to phytochelatase. *J Biol Chem* **277**: 4747-4754
- Palma JM, Lopez-Huertas E, Corpas FJ, Sandalio LM, Gomez M, del Rio LA** (1998) Peroxisomal manganese superoxide dismutase: Purification and properties of the isozyme from pea leaves. *Physiol Plant* **104**: 720-726
- Pastori GM, Distefano S, Palma JM, del Rio LA** (1996) Purification and characterization of peroxisomal and mitochondrial Mn-superoxide dismutases from watermelon cotyledons. *Biochem Soc Trans* **24**: 196S
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**: 731-734
- Phillips JP, Campbell SD, Michaud D, Charbonneau M, Hilliker AJ** (1989) Null mutation of copper-zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2761-2765
- Puntarulo S, Sanchez RA, Boveris A** (1988) Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. *Plant Physiol* **86**: 626-630
- Puppo A, Dimitrijevic L, Rigaud J** (1982) Possible involvement of nodule superoxide dismutase and catalase in leghemoglobin protection. *Planta* **156**: 374-379

- Puppo A, Dimitrijevic L, Rigaud J** (1987) O₂ consumption and superoxide dismutase content in purified mitochondria from soybean root nodules. *Plant Sci* **50**: 3-11
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Gronlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, Stougaard J** (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **425**: 585-592
- Ragland M, Theil EC** (1993) Ferritin (messenger-RNA, protein) and iron concentrations during soybean nodule development. *Plant Mol Biol* **21**: 555-560
- Ramos J, Bisseling T** (2003) Symbiotic nitrogen fixation. *In* Amâncio. S, I Stulen, eds, Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants, Vol 3. Kluwer Academic Publishers, London, pp 99-131
- Ramu SK, Peng HM, Cook DR** (2002) Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene *rip1* in *Medicago truncatula*. *Mol Plant-Microbe Interact* **15**: 522-528
- Rausser WE** (1995) Phytochelatins and related peptides - Structure, biosynthesis and function. *Plant Physiol* **109**: 1141-1149
- Rausser WE** (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants - The case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys* **31**: 19-48
- Rausser WE, Schupp R, Rennenberg H** (1991) Cysteine, γ -glutamylcysteine, and glutathione levels in maize seedlings - Distribution and translocation in normal and cadmium-exposed plants. *Plant Physiol* **97**: 128-138
- Rawlins MR, Leaver CJ, May MJ** (1995) Characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA-encoding glutathione synthetase. *FEBS Lett* **376**: 81-86
- Rea PA, Vatamaniuk OK, Rigden DJ** (2004) Weeds, worms, and more. Papain's long-lost cousin, phytochelatin synthase. *Plant Physiol* **136**: 2463-2474
- Rennenberg H** (1995) Processes involved in glutathione metabolism. *In* RM Wallsgrove, ed, Amino Acids and their Derivatives in Higher Plants. Cambridge University Press, Cambridge, pp 155-171
- Rennenberg H** (1997) Molecular approaches to glutathione biosynthesis. *In* WJ Cram, LJ DeKok, C Brunold, H Rennenberg, eds, Sulphur Metabolism in Higher Plants. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp 59-70
- Rodríguez-Barrueco C, Sevillano-García F, Subramaniam P** (1985) Fijación biológica de nitrógeno. *In* La Fijación de Nitrógeno Atmosférico. Una Biotecnología en la Producción Agraria (Centro de Edafología y Biología Aplicada, CSIC, Salamanca, Temas monográficos)

- Roth LE, Stacey G** (1989) Bacterium release into host-cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *Eur J Cell Biol* **49**: 13-23
- Rouhier N, Jacquot JP** (2002) Plant peroxiredoxins: alternative hydroperoxide scavenging enzymes. *Photosynthesis Res* **74**: 259-268
- Rubio MC, Ramos J, Webb KJ, Minchin FR, Gonzalez E, Arrese-Igor C, Becana M** (2001) Expression studies of superoxide dismutases in nodules and leaves of transgenic alfalfa reveal abundance of iron-containing isozymes, posttranslational regulation, and compensation of isozyme activities. *Mol Plant-Microbe Interact* **14**: 1178-1188
- Rüegsegger A, Brunold C** (1992) Effect of cadmium on γ -glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. *Plant Physiol* **99**: 428-433
- Rüegsegger A, Brunold C** (1993) Localization of γ -glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase activity in maize seedlings. *Plant Physiol* **101**: 561-566
- Rüegsegger A, Schmutz D, Brunold C** (1990) Regulation of glutathione synthesis by cadmium in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol* **93**: 1579-1584
- Ruotolo R, Peracchi A, Bolchi A, Infusini G, Amoresano A, Ottonello S** (2004) Domain organization of phytochelatin synthase - Functional properties of truncated enzyme species identified by limited proteolysis. *J Biol Chem* **279**: 14686-14693
- Russo T, Zambrano N, Esposito F, Ammendola R, Cimino F, Fiscella M, Jackman J, Oconnor PM, Anderson CW, Appella E** (1995) A p53-independent pathway for activation of WAF1/CIP1 expression following oxidative stress. *J Biol Chem* **270**: 29386-29391
- Saito K** (2000) Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. *Curr Op Plant Biol* **3**: 188-195
- Salt DE, Smith RD, Raskin I** (1998) Phytoremediation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 643-668
- Salzwedel JL, Dazzo FB** (1993) pSym *nod* gene influence on elicitation of peroxidase activity from white clover and pea roots by rhizobia and their cell-free supernatants. *Mol Plant-Microbe Interact* **6**: 127-134
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sánchez-Fernández R, Fricker M, Corben LB, White NS, Sheard N, Leaver CJ, Van Montagu M, Inze D, May MJ** (1997) Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 2745-2750
- Sandalio LM, del Rio LA** (1988) Intraorganellar distribution of superoxide dismutase in plant peroxisomes (glyoxysomes and leaf peroxisomes). *Plant Physiol* **88**: 1215-1218

- Santos R, Bocquet S, Puppo A, Touati D (1999)** Characterization of an atypical superoxide dismutase from *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **181**: 4509-4516
- Santos R, Herouart D, Puppo A, Touati D (2000)** Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in *rhizobium*-legume symbiosis. *Mol Microbiol* **38**: 750-759
- Santos R, Herouart D, Sigaud S, Touati D, Puppo A (2001)** Oxidative burst in Alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Mol Plant-Microbe Interact* **14**: 86-89
- Sato S, Kaneko T, Nakamura Y, Asamizu E, Kato T, Tabata S (2001)** Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. I. Sequence features and mapping of fifty-six TAC clones which cover the 5.4 Mb regions of the genome. *DNA Res* **8**: 311-318
- Sawada H, Kuykendall LD, Young JM (2003)** Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen App Microbiol* **49**: 155-179
- Scandalios JG (1997)** Molecular genetics of superoxide dismutases in plants. *In* JG Scandalios, ed, *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, pp 527-568
- Scandalios JG, Guan L, Polidoros AN (1997)** Catalases in plants: gene structure, properties, regulation and expression. *In* JG Scandalios, ed, *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidants Defences*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 343-406
- Schäfer HJ, Haag-Kerwer A, Rausch T (1998)** cDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy-metal accumulator *Brassica juncea* L.: evidence for Cd-induction of a putative mitochondrial γ -glutamylcysteine synthetase isoform. *Plant Mol Biol* **37**: 87-97
- Shapiro MB, Senapathy P (1987)** RNA splice junctions of different classes of eukaryotes - Sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* **15**: 7155-7174
- Shaw SL, Long SR (2003 a)** Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume. *Plant Physiol* **132**: 2196-2204
- Shaw SL, Long SR (2003 b)** Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant Physiol* **131**: 976-984
- Shi MM, Kugelman A, Iwamoto T, Tian L, Forman HJ (1994)** Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces γ -glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. *J Biol Chem* **269**: 26512-26517
- Skipsey M, Andrews CJ, Towson JK, Jepson I, Edwards R (1999)** Isolation of cDNA (AJ243813) and genomic clones (AJ243812) of glutathione synthetase containing plastidic targeting sequences from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **121**: 312

- Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA** (1989) Properties and functions of glutathione-reductase in plants. *Physiol Plant* **77**: 449-456
- Socolow RH** (1999) Nitrogen management and the future of food: lessons from the management of energy and carbon. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 6001-6008
- Sprent JI** (1980) Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some *Leguminosae*. *Plant Cell Environ* **3**: 35-43
- Stallings WC, Pattridge KA, Strong RK, Ludwig ML** (1984) Manganese and iron superoxide dismutases are structural homologs. *J Biol Chem* **259**: 695-699
- Steinman HM** (1982) Copper-zinc superoxide dismutase from *Caulobacter crescentus* Cb15 - a novel bacteriocuprein form of the enzyme. *J Biol Chem* **257**: 283-293
- Steinman HM, Ely B** (1990) Copper-zinc superoxide dismutase of *Caulobacter crescentus* - cloning, sequencing, and mapping of the gene and periplasmic location of the enzyme. *J Bacteriol* **172**: 2901-2910
- Stohs SJ, Bagchi D** (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad Biol Med* **18**: 321-336
- Streller S, Karpinski S, Hallgren JE, Wingsle G** (1994) Four cytosolic-type CuZn-superoxide dismutases in germinating-seeds of *Pinus sylvestris*. *Physiol Plant* **92**: 443-450
- Streller S, Wingsle G** (1994) *Pinus sylvestris* L needles contain extracellular CuZn-superoxide dismutase. *Planta* **192**: 195-201
- Strohm M, Jouanin L, Kunert KJ, Pruvost C, Polle A, Foyer CH, Rennenberg H** (1995) Regulation of glutathione synthesis in leaves of transgenic poplar (*Populus tremula* x *Populus alba*) overexpressing glutathione synthetase. *Plant J* **7**: 141-145
- Sun WM, Huang ZZ, Lu SC** (1996) Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase by protein phosphorylation. *Biochem J* **320**: 321-328
- Suthanthiran M, Anderson ME, Sharma VK, Meister A** (1990) Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human lymphocytes-T stimulated via the CD2-antigen and CD3-antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3343-3347
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) Clustal-W - Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680
- Timmers ACJ, Soupene E, Auriac MC, de Billy F, Vasse J, Boistard P, Truchet G** (2000) Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**: 1204-1213

- Trinick MJ** (1979) Structure of nitrogen-fixing nodules formed by rhizobium on roots of *Parasponia andersonii* Planch. *Can J Microbiol* **25**: 565-578
- Uchida K, Stadtman ER** (1993) Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - a possible involvement of intramolecular and intermolecular cross-linking reaction. *J Biol Chem* **268**: 6388-6393
- Uchida K, Szweda LI, Chae HZ, Stadtman ER** (1993) Immunochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in oxidized hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8742-8746
- Udvardi MK** (2001) Legume models strut their stuff. *Mol Plant-Microbe Interact* **14**: 6-9
- Udvardi MK, Day DA** (1997) Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 493-523
- Ullmann P, Gondet L, Potier S, Bach TJ** (1996) Cloning of *Arabidopsis thaliana* glutathione synthetase (GSH2) by functional complementation of a yeast *gsh2* mutant. *Eur J Biochem* **236**: 662-669
- Van Brussel AAN, Bakhuizen R, van Spronsen PC, Spaink HP, Tak T, Lugtenberg BJJ, Kijne JW** (1992) Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *rhizobium*. *Science* **257**: 70-72
- Van Camp W, Bowler C, Villarroel R, Tsang EWT, Van Montagu M, Inze D** (1990) Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9903-9907
- Van Egeraat A** (1975) Possible role of homoserine in development of *Rhizobium leguminosarum* in rhizosphere of pea seedlings. *Plant Soil* **42**: 381-386
- Van Loon A, Pesoldhurt B, Schatz G** (1986) A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 3820-3824
- Vasse J, Debilly F, Camut S, Truchet G** (1990) Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen-fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol* **172**: 4295-4306
- Vasse J, Debilly F, Truchet G** (1993) Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant J* **4**: 555-566
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA** (1999) AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and *in vitro* reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 7110-7115

- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA (2000)** Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase - Blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J Biol Chem* **275**: 31451-31459
- Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA, Reichheld JP, Muroy S, Brown S, Maughan SC, Cobbett CS, Van Montagu M, Inze D, May MJ, Sung ZR (2000)** The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell* **12**: 97-109
- Vincent JM (1970)** A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria, IBP Handbook 15, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK
- Von Heijne G, Steppuhn J, Herrmann RG (1989)** Domain-structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur J Biochem* **180**: 535-545
- Voss H, Wiemann S, Grothues D, Sensen C, Zimmermann J, Schwager C, Stegemann J, Efler H, Kupp T, Anisorg W (1999)** Automated, low-redundancy, large-scale DNA sequencing by primer walking. *Biotechniques* **15**: 714-721
- Vranova E, Atichartpongkul S, Villarreal R, Van Montagu M, Inze D, Van Camp W (2002)** Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 10870-10875
- Wachter A, Wolf S, Steininger H, Bogs J, Rausch T (2005)** Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the *Brassicaceae*. *Plant J* **41**: 15-30
- Wang CL, Oliver DJ (1996)** Cloning of the cDNA and genomic clones for glutathione synthetase from *Arabidopsis thaliana* and complementation of a *gsh2* mutant in fission yeast. *Plant Mol Biol* **31**: 1093-1104
- Wang CL, Oliver DJ (1997)** Identification of a putative flexible loop in *Arabidopsis* glutathione synthetase. *Biochem J* **322**: 241-244
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N (1998)** The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **393**: 365-369
- Whitehead LF, Day DA (1997)** The peribacteroid membrane. *Physiol Plant* **100**: 30-44
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inze D, VanCamp W (1997)** Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants. *EMBO J* **16**: 4806-4816
- Wingate VPM, Lawton MA, Lamb CJ (1988)** Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Physiol* **87**: 206-210

- Wisniewski JP, Rathbun EA, Knox JP, Brewin NJ** (2000) Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of the extracellular matrix: Implications for pea nodule initiation by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**: 413-420
- Woo EJ, Dunwell JM, Goodenough PW, Marvier AC, Pickersgill RW** (2000) Germin is a manganese containing homo-hexamer with oxalate oxidase and superoxide dismutase activities. *Nature Struct Biol* **7**: 1036-1040
- Xiang C, Bertrand D** (2000) Glutathione synthesis in *Arabidopsis*: multilevel controls coordinate responses to stress. In C Brunold, H Rennenberg, LJ De Kok, I Stulen, JC Davidian, eds, *Sulphur Nutrition and Sulphur Assimilation in Higher Plants*. Paul Haupt, Bern, pp 409-412
- Xiang CB, Oliver DJ** (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1539-1550
- Xiang CB, Werner BL, Christensen EM, Oliver DJ** (2001) The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiol* **126**: 564-574
- Yamahara T, Shiono T, Suzuki T, Tanaka K, Takio S, Sato K, Yamazaki S, Satoh T** (1999) Isolation of a germin-like protein with manganese superoxide dismutase activity from cells of a moss, *Barbula unguiculata*. *J Biol Chem* **274**: 33274-33278
- Young ND, Mudge J, Ellis THN** (2003) Legume genomes: more than peas in a pod. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 199-204
- Zenk MH** (1996) Heavy metal detoxification in higher plants - A review. *Gene* **179**: 21-30
- Zhu DH, Scandalios JG** (1993) Maize mitochondrial manganese superoxide dismutases are encoded by a differentially expressed multigene family. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 9310-9314
- Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Jouanin L, Terry N** (1999 a) Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol* **119**: 73-79
- Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Tarun AS, Weber SU, Jouanin L, Terry N** (1999 b) Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol* **121**: 1169-1177
- Zopes H, Klapheck S, Bergmann L** (1993) The function of homoglutathione and hydroxymethylglutathione for the scavenging of hydrogen-peroxide. *Plant Cell Physiol* **34**: 515-521
- Zuanazzi JAS, Clergeot PH, Quirion JC, Husson HP, Kondorosi A, Ratet P** (1998) Production of *Sinorhizobium meliloti nod* gene activator and repressor flavonoids from *Medicago sativa* roots. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**: 784-794

A la memoria de Juliana

Que no se te muera la ternura
que no se te canse la mirada
que no se te agote la paciencia
que no se te quiebre la firmeza
que no se te esconda la palabra

Carmen Sánchez

