



FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**Caracterización de los mecanismos de respuesta antioxidante
de *Medicago sativa* a metales pesados**

TESIS DOCTORAL

María Laura Flores-Cáceres

Madrid 2013

Memoria presentada para optar por el grado de Doctor en Ciencias dentro del programa de “Biología Vegetal: Aspectos Moleculares, Fisiológicos y Biotecnológicos”.

La doctoranda:

Fdo. María Laura Flores-Cáceres

En Madrid a 31 de mayo de 2013

EL DIRECTOR,

Fdo. Luis Eduardo Hernández

Dpto. Biología

Universidad Autónoma de Madrid

Este trabajo ha contado con la financiación de las siguientes instituciones y proyectos:

Fundación Ramón Areces:
Caracterización de los
Mecanismos de Resistencia
de las Plantas a Metales
Pesados.



Ministerio de Economía y Competitividad:
Prospección de bioindicadores de estrés en plantas
de uso agronómico y fitotecnologías en suelos
contaminados por metales y metaloides tóxicos
(PROBIOMET, AGL2010-15151)



**Junta de Comunidades de
Castilla-La Mancha**

Junta Comunidades Castilla-La Mancha:
Fitorremediación de Emplazamientos Afectados
por Mercurio en la Comarca de Almadén con
Plantas de Uso Agrícola (FITOALMA2, POII10-
0087-6458).



Comunidad de Madrid:
Tecnologías de evaluación y recuperación de
emplazamientos contaminados (EÍADES,
S2009/AMB-1478)



Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación
Productiva, Agencia Nacional de Promoción
Científica y Tecnológica, Fondo para la investigación
Científica y Tecnológica:
Programa de Recursos Humanos.
República Argentina.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Dios por darme la vida y esta oportunidad de poder crecer personal y profesionalmente.

A mi familia que me ha apoyado siempre en las decisiones que he tomado y ha estado siempre a mi lado a pesar de las distancias.

A mis amigos, que han sido como hermanos, por haber estado siempre en las buenas y en las malas.

A mi director y mis compañeros de laboratorio, que sin ellos la estancia en la UAM hubiera sido difícil.

Además quiero agradecer a la Fundación Ramón Areces que hizo posible la ejecución del proyecto en el que he estado participando. Ya que además gracias a ella he podido aprender técnicas muy interesantes. También quiero agradecer al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina y a la Universidad Nacional de Cuyo por la oportunidad de permitirme realizar el doctorado en el exterior. Y por último a la Junta de Castilla La-Mancha y la Universidad de Castilla-La Mancha por permitirme poder terminar mi trabajo.

RESUMEN

Las plantas están muy expuestas a distintas adversidades del ambiente. Muchos agentes externos pueden causarles efectos altamente nocivos y como ellas son un importante eslabón de la cadena trófica, estos agentes externos pueden causar luego problemas a los animales y seres humanos. Un ejemplo de ello y objeto de nuestro estudio son los metales pesados como mercurio (Hg), cadmio (Cd) o cobre (Cu), elementos que pueden ser muy tóxicos, y que se pueden acumular en el medio ambiente debido a causas antropogénicas o naturales. Frente a los otros metales, el Cu es un micronutriente esencial para las plantas, que sin embargo cuando sobrepasa cierto umbral de concentración se vuelve tóxico. Las plantas cuentan con una batería de mecanismos para poder crecer y desarrollarse en una gran diversidad de ambientes potencialmente perjudiciales. Por ello, es necesario descubrir y conocer estos mecanismos para desarrollar estrategias conducentes a tecnologías de fitorremediación.

En este trabajo nos hemos centrado en estudiar los mecanismos de respuesta antioxidantes de *Medicago sativa*, alfalfa, en presencia de estos tres metales pesados. En primer lugar, los ensayos se realizaron en un sistema hidropónico a *microescala* con distintas dosis de metal (0, 3, 10 y 30 μM) y tiempos de exposición muy cortos (3, 6 y 24 h) para determinar el umbral de toxicidad y analizar respuestas específicas y tempranas del estrés por Hg o Cd. Los mayores cambios se observaron en las raíces de plántulas donde las enzimas redox analizadas, ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR) y NADPH-oxidasa, aumentaron su actividad durante las primeras horas de exposición al Cd. Sin embargo, con los tratamientos de Hg la actividad de dichas enzimas disminuyó a medida que aumentó la severidad del tratamiento. Las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHSP17.7 y sHSP17.6) se indujeron tanto con Hg como con Cd. Además se detectaron fitoquelatinas en respuesta a la exposición de estos dos metales. También se observó una disminución de la concentración de glutatión (GSH) y su homólogo homoglutatión (hGSH) en los tratamientos más prolongados con Hg o Cd, siendo casi indetectables en el tratamiento con Hg 30 μM tras 24 h.

En el sistema de cultivo a *microescala* se estudió posteriormente el papel del etileno en las respuestas de estrés por Hg o Cd, bloqueando su percepción en plántulas pretratadas con el inhibidor 1-metilciclopropeno (1-MCP). Se observó que al crecer las plántulas con 1-MCP se produjo una atenuación de los efectos fitotóxicos de Cd y Hg, como se detectó en varios de los parámetros de estrés medidos; como sucedió con la actividad de las enzimas GR y APX, que fue mayor respecto a la detectada en plántulas expuestas únicamente al metal tóxico. Lo mismo se observó con las proteínas de choque térmico analizadas, cuya inducción fue mucho menor que en ausencia de 1-MCP. Asimismo, el etileno parece mediar en la producción de H₂O₂ extracelular, que se induce tanto por Hg como con Cd.

Por otro lado se estudió la importancia del GSH/hGSH en la respuesta de la alfalfa al estrés por metales y para ello se incorporó butionina sulfoximina (BSO), un potente inhibidor de la síntesis de GSH/hGSH. Se observó que plantas crecidas con BSO fueron mucho más sensibles a Hg o Cd, plántulas que sufrieron una fuerte inhibición del crecimiento junto con una severa disminución del contenido de GSH/hGSH y fitoquelatinas.

Se intentó realizar un estudio del proteoma de plántulas de alfalfa expuestas a Hg durante 3 y 6 h, realizándose se realizó un análisis masivo de proteínas mediante separación electroforética bidimensional DIGE (Differential In Gel Electroforesis). Aunque se obtuvo un mapa proteómico de raíces de alfalfa con buena resolución, no se pudieron detectar cambios relevantes a las primeras horas de tratamiento. Cuando se quiso aumentar la severidad de los tratamientos, subiendo la dosis de Hg y/o el tiempo de exposición con el objeto de incrementar las diferencias respecto del control, se apreciaron serios problemas de integridad de las proteínas extraídas y alteraciones en la resolución del mapa proteico bidimensional.

Para aproximarnos a unas condiciones de crecimiento más parecidas las existentes en un cultivo en suelo contaminado se procedió a utilizar un sistema de cultivo sistema semi-hidropónico a *macroescala*, sobre un sustrato inerte de perlita. En este caso se estudiaron las respuestas de plantas de alfalfa tratadas durante 7 días con Cd 0, 6 y 30 µM o Cu 0, 6, 30 y 100 µM. Los distintos parámetros de estrés analizados confirmaron

que el Cd y Cu producen estrés oxidativo en las plantas de alfalfa. Se observaron asimismo cambios en la actividad de enzimas redox como APX, GR y NADPH oxidasa en raíz; cambios más severos cuanto mayor era la concentración de metales. En cuanto a los metabolitos antioxidantes, se observó una disminución de la concentración de GSH/hGSH); y quedó patente que el Cu no indujo la síntesis de fitoquelatinas, diferente al Cd en donde se detectó acumulación de fitoquelatinas. En este sistema experimental se estudió la contribución de GSH/hGSH en la tolerancia a metales, observándose que para ambos metales la disminución del contenido celular provocó una mayor sensibilidad.

Por tanto, se pudo establecer que los distintos metales dan lugar a una *firma* de estrés característica. Los ensayos también han mostrado la importancia del metabolismo del GSH/hGSH en la tolerancia a metales, así como la participación del etileno en las respuestas tempranas. Esta información puede ser útil para seleccionar las plantas más adecuadas, pudiendo determinarse con mayor precisión cuándo están sufriendo estrés, capaces de tolerar la presencia de metales en el medio de cultivo. Esto es necesario para poder abordar futuros ensayos de fitorremediación, para lo que es necesario contar con plantas capaces de tolerar la acumulación metales pesados en sus órganos.

ABREVIATURAS

1-MCP	1-metilchiclopropeno
4-MN	4-metoxinaftol
γ -ECS	Gamma-glutamylcisteína sintetasa
APX	Ascorbato peroxidasa
BSO	Butionina sulfoximina
CAT	Catalasa
Cys	Cisteína
DCPIP	2-6 Diclorofenol indofenol
DHAR	Dehidroascorbato reductasa
DIGE	Eletoforesis diferencial de proteínas en gel
DMF	Dimetilformamida
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H ₂ DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
hGSH	Homoglutación reducido
hPCs	Homofitoquelatinas
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HSPs	Proteínas de choque térmico
IEF	Isoelectroenfoque
MDA	Malondialdehido
MDHA	Monodehidroascorbato
MES	2-(N-) morfolino etanosulfónico
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
MS	Medio nutritivo Murashige-Skoog
MTT	Bromuro de azul de tiazolil tetrazolio
N-AcCys	N-acetil-cisteína
NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato reducida
NBT	Azul de nitrotetrazolio
PCs	Fitoquelatinas
PMSF	Fluorilfenilmetilsulfonil

POX	Peroxidasas
PVPP	Polivinilpirrolidona insoluble
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel desnaturizante
SOD	Superóxido dismutasa
TBS	Tris buffer salino
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina
sHSPs	Pequeñas proteínas de choque térmico

INDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
CAPÍTULO 3. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS	29
CAPÍTULO 4. RESPUESTAS TEMPRANAS A CADMIO Y MERCURIO	43
CAPÍTULO 5. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA RESPUESTA DE ALFALFA A Cd y Hg: ensayos farmacológicos de supresión de la señalización de etileno y alteración del metabolismo de biotioles.	61
CAPÍTULO 6. INFLUENCIA DEL METABOLISMO DE BIOTIOLES EN LA TOLERANCIA A Cd y Cu	73
CAPÍTULO 7. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LA RESPUESTA TEMPRANA A Hg.....	91
CAPÍTULO 8. DISCUSIÓN	97
CAPÍTULO 9. CONCLUSIONES.....	111
CAPÍTULO 10. BIBLIOGRAFÍA	113
ANEXO. Curriculum vitae	

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS

La contaminación por metales pesados es uno de los problemas ambientales más graves que enfrenta hoy en día la humanidad. Como “metales pesados” se definen a un grupo amplio de elementos químicos que presentan densidad igual o superior a 5 g cm^{-3} , cuando están en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalinotérreos) (Emsley, 2011; Sarma, 2011). Su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0,1 % y casi siempre menor del 0,01 % (García y Dorronsoro, 2005). Sin embargo, con el término de metales pesados se pretende indicar a aquellos metales que, siendo elementos pesados, son “tóxicos” para la célula. Esta es la acepción común de los metales perjudiciales para la naturaleza ya que la toxicidad de un elemento o compuesto químico es la capacidad que tiene ese material de afectar adversamente alguna función biológica (Schützendübel y Polle, 2002; Hall, 2002). Muchos metales pesados son oligoelementos o micronutrientes necesarios en pequeñas cantidades para los organismos y sólo son tóxicos una vez pasado cierto umbral de concentración. Aquí se incluyen Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Se y Zn. Sólo un grupo pequeño de metales no tiene función biológica conocida y son altamente tóxicos, incluso a dosis bajas. Entre ellos se encuentran el As, Cd, Hg, Pb, Sb y Bi (Emsley, 2011; Salt et al., 1995; Schützendübel y Polle, 2002).

Dentro de los distintos componentes de un ecosistema, el suelo constituye el principal sumidero de metales donde pueden acumularse en concentraciones anómalas debido a factores naturales o por acción humana. La acumulación por factores naturales depende de la geodisponibilidad, aquella porción de su contenido total que puede liberarse a la superficie o cerca de la superficie (o biosfera) por procesos mecánicos, químicos o biológicos (Plumlee, 1994). Los metales pesados son muy estables en el suelo y en el proceso natural de edafización de la roca madre se concentran, aunque por lo general no llegan a rebasar los umbrales de toxicidad. Y si lo hacen, estos metales se encuentran en formas estables y por tanto poco disponibles. De los distintos tipos de rocas, las ultrabásicas, como las peridotitas, presentan altos contenidos en metales pesados (Cr, Ni, Cu y Mn). Las menores concentraciones de

metales pesados se encuentran en las rocas ígneas ácidas y en las sedimentarias (areniscas y calizas). Los porcentajes más altos de metales traza en los suelos, heredados de la roca madre, se dan para Cr, Mn y Ni, mientras que Co, Cu, Zn y Pb se presentan en menores cantidades y son mínimos los contenidos en As, Cd y Hg. Aunque la geodisponibilidad de los elementos de las rocas y su aportación al suelo es insignificante respecto a la derivada de las acciones antropogénicas. Las principales concentraciones anómalas de metales pesados en suelos provienen fundamentalmente de las menas metálicas (sulfuros, óxidos). La explotación y extracción de metales produce anualmente millones de toneladas de residuos, la mayoría con piritita y otros sulfuros, cuya oxidación libera grandes cantidades de metales pesados al ambiente, y en particular a los suelos. En estas áreas, las capas superiores de los suelos presentan concentraciones elevadas de Cu, Ni, As, Se, Cd, Fe, etc., dependiendo del tipo de mineralización explotada y beneficiada (Galán y Romero, 2008). Otra de las principales fuentes antropogénicas de metales pesados en suelos es la actividad agrícola, por el riego, el estiércol, las enmiendas calizas, el uso de fertilizantes inorgánicos y pesticidas y sobre todo los lodos residuales de depuradoras. Además, la generación eléctrica, por la combustión del carbón, es una de las principales fuentes de deposición de metales en el suelo. Las centrales térmicas que usan petróleo pueden ser fuentes de Pb, Ni y V. En cuanto a las actividades industriales, las principales industrias contaminantes son las fundiciones de hierro y acero, que emiten metales asociados a las menas de Fe y Ni. La fabricación de baterías produce cantidades considerables de Pb. Las industrias de productos químicos, fármacos, pigmentos y tintes, el curtido de pieles, etc. Producen distintos tipos de contaminantes. En general las áreas altamente industrializadas incluyen As, Cd, Cr, Hg, Fe, Ni, Pb y Zn. Además, el 10 % de los residuos domésticos están compuesto por metales (Galán y Romero, 2008).

En todas partes del mundo, pero concretamente en España, existen casos de contaminación de suelos por residuos mineros, como el sucedido tras el accidente de Aznalcóllar en la ribera del Guadiamar (Sevilla), donde los metales pesados de los lodos (Cu, Mn, Zn, Cd, Fe, Pb, Ni y Cr) contaminaron suelos y aguas, los cuales sufrieron una brusca acidez, alcanzando el pH valores inferiores a 4, que provocó que la vegetación

acuática fuera prácticamente eliminada, dañando gravemente la vegetación forestal y los ecosistemas agrícolas. Por otro lado, el área minera de Almadén (Ciudad Real) ha sido durante siglos la zona de mayor producción de Hg del mundo. El cierre de la mina provocó la necesidad de promover otras actividades económicas para la población de la zona, como la agricultura y la ganadería. Sin embargo, éstas se han visto perjudicadas por los contenidos de Hg de los suelos. Por lo que es importante evaluar los riesgos potenciales para la salud humana y el medio ambiente. Además de realizar fitotecnologías para intentar desarrollar actividades económicas y de uso de suelo para el desarrollo de la comarca. También se puede destacar la degradación de los suelos adyacentes a la Sierra minera de La Unión y la bahía de Portmán (Murcia). Asimismo, en el cinturón industrial de numerosos núcleos urbanos, como sucede en localidades de la Comunidad Autónoma de Madrid, donde diversas actividades industriales y la deposición de residuos en vertederos, muchos de ellos incontrolados durante largo tiempo, son otro ejemplo de suelos contaminados por metales tóxicos, tal y como queda reflejado en el "Inventario y Caracterización de Suelos Contaminados de la Comunidad de Madrid (1998)".

El mercurio (Hg) es uno de los metales más tóxicos y peligrosos para el medio ambiente y capaces de comprometer seriamente la salud humana. Se considera un contaminante muy potente y peligroso, con alto potencial de biomagnificación en la cadena trófica, características que llevaron a una drástica reducción de su uso y comercialización de varios países. En 2005, la Unión Europea (UE) elaboró la denominada "Estrategia comunitaria sobre el mercurio", dirigida principalmente a reducir, tanto la cantidad y la circulación de Hg en la Unión Europea y en todo el mundo, como la exposición humana a esta sustancia (Comisión Europea, 2005). Los usos más importantes del Hg se encuentran en la industria cloro-alcalina, con el uso del cátodo de Hg para el depósito electrolítico de sodio, la fabricación de pilas, lámparas fluorescentes, amalgamas para la extracción de oro y plata, y materiales para empastes dentales (Moreno, 2003). Sin embargo, los diferentes usos del Hg van disminuyendo debido a su toxicidad y están siendo reemplazados.

El cadmio (Cd) es un metal altamente perjudicial, se estima que su vida media es aproximadamente de 15 a 30 años (Henson y Chedrese, 2004; Maruthi et al., 2005). Es

de 2 a 20 veces más tóxico que otros metales y como ocurre con muchos otros, no puede ser química o biológicamente degradado ni transformado en un compuesto menos tóxico (Morrow, 1990; UNEP, 2010). Su concentración en un suelo no contaminado, según la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (EPA, 1999), debe mantenerse en niveles inferiores de 1 mg kg^{-1} . Como todos los metales pesados, el Cd puede acumularse en los organismos, transferirse de un nivel trófico al siguiente y multiplicar su concentración a lo largo de las cadenas tróficas (De Acevedo, 2003). Por lo tanto, no sólo causaría problemas en la salud, sino también importantes pérdidas económicas para aquellos países que exportan gran parte de su producción agrícola. El Cd generado por erupciones volcánicas y actividades antropogénicas es removido de la atmósfera por deposición de partículas o por precipitación, para luego ser posteriormente transportado a ríos y océanos. De igual forma, los efluentes industriales con Cd llegan a los ríos donde es absorbido por la materia particulada y acumulado en sedimentos (Salazar y Reyes, 2000). El Cd puede combinarse con otros elementos y formar compuestos (cloruros, óxidos o sulfuros) que se unen fuertemente a las partículas del suelo permaneciendo en él por muchos años. Por otro lado, la aplicación reiterada de fertilizantes fosfatados incrementa las cantidades de Cd en el suelo y puede llegar a afectar a los cultivos (Bonomelli et al., 2003).

A diferencia de los dos anteriores metales, el cobre (Cu) es un metal esencial para el normal crecimiento y desarrollo de las plantas. Es un micronutriente que participa en numerosos procesos fisiológicos y un cofactor esencial para muchas metaloproteínas. Sin embargo, también es potencialmente tóxico y los problemas surgen cuando se encuentra en exceso en las células. El Cu plantea serios problemas debido a su amplio uso industrial (manufactura de muchos productos tales como amalgamas, esmaltes y pigmentos, reactivos para curtiembre, alguicidas, prótesis médicoquirúrgicas) y agrícola, ya que algunas aplicaciones de Cu como fungicida, puede suponer exposiciones a concentraciones elevadas. El Cu es un metal de transición ampliamente usado en la industria para la manufactura de muchos productos tales como agroquímicos (especialmente fungicidas y micostáticos). La contaminación con este metal se produce mayoritariamente en la cercanía de las minas donde se extrae y procesa, y en las refinerías durante su purificación (Riedel, 2008). Los polvos de Cu que

se liberan al aire y al agua reaccionan con el oxígeno y el azufre, que muchas veces son parte de los mismos minerales desde donde se refina el metal, generando compuestos aún más hidrosolubles y diseminables. El agua superficial que se contamina de esta manera puede drenar hacia los acuíferos y aumentar el nivel de cobre en ellos (Riedel, 2008) y por consiguiente en las redes de agua potable domiciliarias (Buchanan et al., 1999). A diferencia de otros metales pesados, el cobre no es fácilmente bioacumulado y por lo tanto su toxicidad para el hombre y otros mamíferos es relativamente baja. Pero las plantas, en general, son muy sensibles a la toxicidad del Cu, ya que muestra las alteraciones metabólicas y de inhibición de crecimiento en contenidos de Cu en los tejidos sólo ligeramente superior a los niveles normales (Fernandes y Henriques, 1991). La concentración crítica de Cu en medios de cultivo (por debajo del cual se produce la deficiencia de Cu) varía desde 10^{-14} a 10^{-16} M. Las plantas suelen encontrar un suministro variable de Cu en el suelo, ya que la concentración en la solución del suelo se encuentran normalmente en un rango de 10^{-6} a 10^{-9} M (Yruela, 2005).

TOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS

Los metales y metaloides tóxicos son contaminantes extremadamente persistentes, debido a su prolongada vida media en los organismos y su retención en los suelos (Salt et al., 1995), lo que favorece su acumulación en los ecosistemas. La exposición, incluso en pequeñas dosis, puede suponer la alteración de muchos componentes y procesos celulares que conducen a fallos en las funciones vitales básicas de la planta (Schützendübel y Polle, 2002; Polle y Schützendübel, 2003). En alfalfa, Ortega-Villasante et al. (2005) observó que tanto Cd como Hg producen claramente una severa reducción de la longitud de la raíz de la plantas. El Cd alcanzó valores en torno al 30 % después de 7 d de tratamiento. Sin embargo, las plantas tratadas con Hg sufrieron una inhibición brusca (30-40 %) en las primeras 24 h de exposición. La presencia de Cu 5 μ M en la solución nutritiva causó asimismo una gran disminución de la tasa de elongación de la raíz sólo tras un día de tratamiento, llegándose prácticamente a una inhibición completa tras 3 días en *Pinus pinea* y *Pinus pinaster* (Arduini et al., 1995). La exposición de *Lemna minor* a distintas concentraciones de Cu produjo inhibición del crecimiento, según concentración y tiempo de exposición. El crecimiento se inhibió significativamente después de 96 h a 2 μ M de Cu, mientras que

después de 7 días la inhibición del crecimiento fue aún mayor (Megateli, 2013). Por otro lado, Pena et al. (2008) analizaron el efecto de diferentes metales esenciales y no esenciales sobre plantas de girasol (Cu, Pb, Zn, Al, Hg, Ni, Cr, Co, C) y encontraron que después de 4 días de exposición se produjo una significativa disminución del área foliar, donde los valores más significativos se obtuvieron con Cu^{2+} , Hg^{2+} y Ni^{2+} . Además Hg^{2+} y Ni^{2+} tuvieron también efectos adversos en el estado hídrico de las plantas. El Cd se puede acumular en cualquier parte de la planta causando retraso en el crecimiento, además de producir clorosis (Chaffei et al., 2004) y epinastia foliar (Zhao et al., 2006). También altera la estructura del cloroplasto y reduce la tasa de fotosíntesis neta, la conductancia estomática y la transpiración foliar (Souza et al., 2011). También induce la peroxidación lipídica (Groppa et al., 2001, 2003; Laspina et al., 2005; Iannone et al., 2010) y aumenta la proteólisis (Pena et al., 2008). En *Silene vulgaris* la exposición a metales pesados, especialmente a Cd 30 μM , produjo una disminución importante en la concentración de clorofila. Esto condujo a estudiar los procesos fotoquímicos midiendo la fluorescencia de la clorofila donde se observó que los parámetros para medir la eficiencia fotosintética (ϕPSII : rendimiento cuántico del fotosistema II y $q\text{P}$: decaimiento fotoquímico) disminuyeron en las plantas de *Silene* tratadas con Cd, confirmando que la exposición al Cd afecta la fotosíntesis (Sobrino-Plata et al., 2013). Además el Hg también produjo una clara disminución de la eficiencia fotosintética en *Silene vulgaris* (Sobrino-Plata et al., 2013).

Así, los efectos de los metales pesados en las plantas son diversos: a) toxicidad clara sobre el crecimiento de la planta, con enanismo e inhibición del crecimiento radicular (Hall, 2002); b) antagonismo con nutrientes minerales (Van Assche y Clijsters, 1990) alteración en la absorción de micronutrientes como Fe y Zn); c) alteraciones fisiológicas y metabólicas, como la inhibición de la fotosíntesis y respiración; y d) aparición de estrés oxidativo, con la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hall, 2002; Sharma y Dietz, 2009).

ESTRÉS OXIDATIVO

Las plantas son organismos aeróbicos obligados, que requieren oxígeno no sólo para la producción de energía mitocondrial, sino que también producen oxígeno durante la fotosíntesis. Por lo tanto, las células vegetales tienen que hacer frente a un entorno celular de hiperoxia que determina la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (De Gara et al., 2010). Se ha calculado que el 1 % del O₂ consumido por las plantas se desvía para producir ROS en diversos compartimentos subcelulares (Eltner, 1987, Del Rio et al., 1992). En las células no fotosintéticas, los principales lugares de producción de ROS son las mitocondrias. Se ha observado, por ejemplo, que en células humanas, aproximadamente un 1-5 % del oxígeno consumido por las mitocondrias se convierte en ROS (Lee y Wei, 2007). Las mitocondrias de las plantas tienen una capacidad de producción de ROS similar a la de los animales, pero además en las células fotosintéticas el flujo de electrones del cloroplasto produce aún más ROS que las mitocondrias (Foyer y Noctor, 2009) (Fig. 1). La fotorrespiración es otra vía productora de ROS en las plantas, la cual inicia y termina en el cloroplasto, e implica peroxisomas y mitocondria (Foyer et al., 2009). Por otra parte, las células vegetales enzimáticamente producen ROS en la pared celular (Bolwell et al., 2002) y probablemente también en las vacuolas, ya que en este último compartimento están presentes varias peroxidasas (POD) que requieren peróxido de hidrógeno para su actividad catalítica (Sottomayor et al., 2008) (Fig. 1). Además se ha reportado que la membrana plasmática es fuente de ROS (Garnier et al., 2006). El complejo de la NADPH-oxidasa, ahora representados por la familia NOXs, es considerada una de las más importantes fuentes de O₂^{•-} en la célula vegetal (Van Gestelen et al., 1997; Bolwell et al., 2002; Torres y Dangl, 2005; Grant et al., 2000). Las ROS generadas en tubérculos de patata y en plantas de tabaco puede que hayan sido generadas por una NADPH-oxidasa de membrana plasmática (Razem y Bernards 2003, Simon-Plas et al., 2002) (Fig. 1). Las ROS que son capaces de causar daño oxidativo incluyen el superóxido (O₂^{•-}), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el radical hidroxilo (HO[•]), radicales alcoxi (RO[•]), radicales peroxi (ROO[•]), hidroperóxido orgánico (ROOH), oxígeno singlete (¹O₂), carbonilo excitado (RO[•]), etc. (Choudhury et al., 2013). La exposición a estrés abiótico y biótico puede agravar aún más la producción de ROS (Alscher et al., 1997;

Arora, 2002). Por lo tanto, las ROS surgen en las células vegetales a través de varias rutas y la mayoría de los compartimentos celulares tiene el potencial de convertirse en una fuente de ROS.

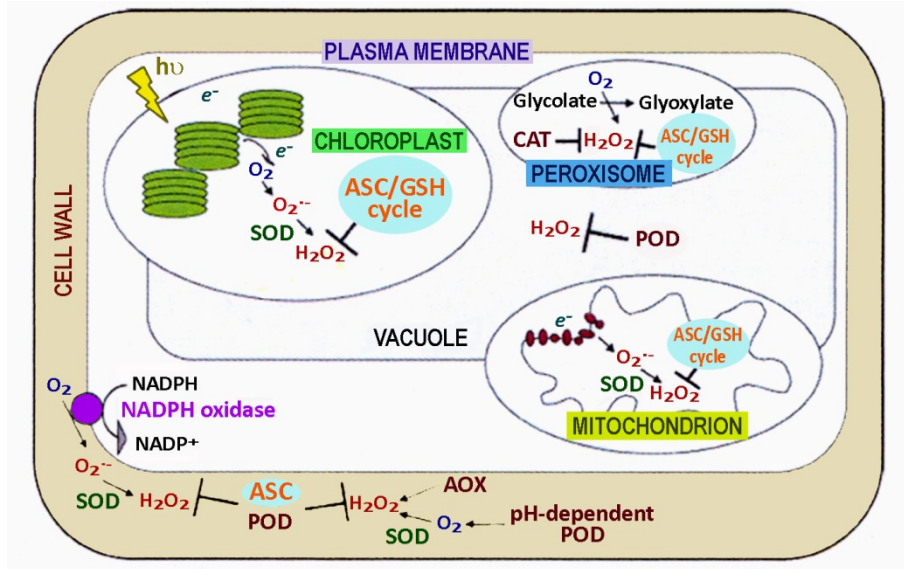


Figura 1. Principales sitios de producción y eliminación de ROS en las células de las plantas (De Gara et al., 2010). ASC, ascorbato; GSH, glutatión; APX, ascorbato peroxidasa; SOD, superóxido dismutasa; POD, peroxidasa; CAT, catalasa.

Por otra parte, metales de transición tales como el Cu catalizan la formación de radicales hidroxilo a partir de reacciones de Fenton y Haber–Weiss (Halliwell y Gutteridge, 1984). Sin embargo, el Cd y el Hg no parecen que puedan intervenir en dicho tipo de reacciones. No obstante, se sabe que son potentes inductores de estrés oxidativo (Schützendübel y Polle, 2002; Ortega-Villasante et al., 2005). La NADPH-oxidasa es, probablemente, la principal fuente de H_2O_2 bajo estrés por metales pesados, ROS que se acumula principalmente en el apoplasto después de la generación de $O_2^{\bullet -}$ (Romero-Puertas et al., 2004; Rodríguez-Serrano et al., 2009). Se observó que, en raíces de plántulas de alfalfa, se liberó H_2O_2 producido poco después de la exposición de las mismas a Cd y Hg (90 min), lo cual fue parcialmente inhibido por la adición de difenil-iodonio (DPI), un inhibidor de la NADPH-oxidasa (Ortega-Villasante et al., 2007). Otros autores observaron que células de tabaco BY-2 sufrieron una rápida acumulación de H_2O_2 después de sólo 15 min (Olmos et al., 2003), o después de 24 h (Garnier et al., 2006) de exposición a concentraciones extremas de Cd (1 a 5 mM). En plantas de guisante, la exposición a Cd generó una respuesta caracterizada por una

sobreproducción de ROS y disminución de óxido nítrico (NO) (Rodríguez-Serrano et al., 2009). Heyno et al. (2008) estudiaron la producción de ROS dependiente de Cd^{2+} a nivel de membrana plasmática y de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, donde observaron que la producción de H_2O_2 inducida por Cd se origina desde el interior de las células de las raíces, principalmente en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Por tanto, las NADPH oxidasas no son la única fuente de H_2O_2 bajo estrés con Cd, sino que las mitocondrias también pueden estar involucradas en la su generación (Heyno et al., 2008). Por otra parte, la producción de ROS intracelular aumentó constantemente en plántulas de alfalfa expuestas a Cd, con un incremento menor de H_2O_2 extracelular (Ortega-Villasante et al., 2007). Sin embargo, la exposición breve de células epidérmicas de las raíces de alfalfa a Hg 30 μM causó un estallido oxidativo, proceso que estuvo ligeramente desfasado de la generación de H_2O_2 extracelular, el cual aumentó constantemente en raíces tratadas con Hg, mientras que las ROS intracelulares se acumularon de manera transitoria (Ortega-Villasante et al., 2007). Esto sugiere que Hg y Cd disparan diferentes mecanismos de toxicidad, y que el Hg probablemente causó la liberación de grandes cantidades de ROS apoplástico que fue inhibido por la adición de DPI (Ortega-Villasante et al., 2007).

Si bien la aparición de ROS ha sido siempre considerada como un efecto negativo, antesala del proceso de degradación celular, cada vez hay más evidencias de que pueden formar parte nuclear del sistema de respuesta celular. Evidencias genéticas sugieren que las ROS también pueden actuar como moléculas de señalización en la regulación de diversas funciones de las plantas (Hammond-Kosack y Jones, 1996). El $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 , considerados como especies reactivas de oxígeno principales en plantas, pueden actuar como mensajeros secundarios regulando diferentes funciones del crecimiento y desarrollo (Foyer y Noctor, 2005; Foreman et al., 2003). Asimismo, parece necesario cierto nivel de acumulación de H_2O_2 o $\text{O}_2^{\bullet-}$ para que se disparen los mecanismos de defensa frente a diversas condiciones de estrés (Pastori y Foyer, 2002; Mithöfer et al., 2004). Es posible que componentes celulares sensibles a cambios redox posibiliten la activación de procesos de transducción de señales, dando lugar en último término a cambios en la transcripción genética (Foyer y Noctor, 2005). El incremento de H_2O_2 producido por Hg y Cd, atribuido primariamente a un efecto de los metales

sobre la NADPH-oxidasa, la cual está involucrada en la generación de H_2O_2 , se cree que inicia una cascada de señalización para las respuestas a estrés (Maksymiec y Krupa, 2006b). Hay evidencia de la interferencia de Cu, Pb, Zn y Cd con cascadas de señalización de MAP quinasas. Los niveles de ácido jasmónico, ácido salicílico y etileno aumentan después de la exposición a los metales pesados (Cánovas et al., 2004; Metwally et al., 2003; Maksymiec et al., 2005). Estas hormonas de las plantas juegan un doble papel en la tolerancia a metales pesados, ya que tienen efectos beneficiosos como la neutralización de la toxicidad de Mn y Cd por la activación de antioxidantes (Metwally et al., 2003; Shi y Zhu, 2008); y efectos negativos, tales como el aumento de producción de H_2O_2 (Zawoznik et al., 2007). Varios datos indican que las cascadas de MAPK están implicados en señalización activada por diferentes metales, con el fin de traducir la información en una respuesta biológica (Eckardt, 2009; Sinha et al., 2011). Jonak et al. (2004) mostraron la activación diferencial de las vías de MAPK en células de las raíces de alfalfa bajo estrés por Cd y Cu. En este sentido, los últimos avances logrados en la comprensión de la señalización de las ROS en plantas abundan en la hipótesis de que las ROS son efectivamente moléculas de señalización importantes en diversos procesos de las plantas (Choudhury et al., 2013).

MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Como se ha mostrado anteriormente, una de las principales consecuencias de la acumulación de metales pesados es la producción de ROS, que además de causar daños importantes también pueden funcionar como moléculas de señalización (Manara, 2012). En particular, el H_2O_2 podría actuar como una molécula de señalización en respuesta a metales pesados y otros factores de estrés (Dat et al., 2000). En *A. thaliana* los niveles de H_2O_2 aumentaron en respuesta al tratamiento con Cu y Cd (Maksymiec y Krupa, 2006b), tras la exposición Hg en tomate (Cho y Park, 2000) y en respuesta a la toxicidad de Mn en la cebada (Cho y Park, 2000). Este aumento en la acumulación de H_2O_2 cambia el estado redox de la célula e induce la producción de antioxidantes y la activación de los mecanismos antioxidantes (Manara, 2012), con el fin de que no puedan alcanzar niveles incompatibles con el normal funcionamiento de las células.

Las células vegetales poseen un complejo mecanismo antioxidante para controlar el nivel redox celular, entre los que cabe destacar el ciclo ascorbato-GSH o de Halliwell-Asada. Este sistema antioxidante cuenta con enzimas redox, siendo la ascorbato peroxidasa (APX) la más abundante, que requiere ascorbato para reducir el H_2O_2 a H_2O . El monodehidroascorbato (MDHA) puede ser reducido a ascorbato de nuevo por la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), que requiere NADH, o bien puede descomponerse en ascorbato y dehidroascorbato (DHA). A continuación, la dehidroascorbato reductasa (DHAR) regenera el ascorbato a partir de DHA utilizando GSH como reductor. El ciclo se completa con la reducción del GSSG a GSH mediante la actividad glutatión reductasa (GR) utilizando NADPH. La concentración de APX citosólica puede ser muy elevada, hasta un 0,9 % de la proteína soluble en ciertas células. Además existen isoformas en las mitocondrias, peroxisomas y plastidios.

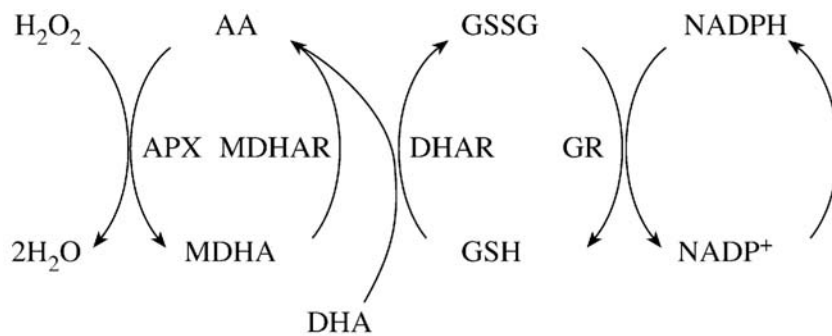


Figura 2. Ciclo ascorbato (AA)-glutatión (GSH) para eliminación de ROS descrita en varios compartimentos subcelulares. Ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), deshidroascorbato reductasa (DHAR), glutatión reductasa (GR) (May et al., 1998).

Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran el ascorbato (AA) y el glutatión (GSH), que son los principales tampones redox celulares. El anión ascorbato es la forma predominante a pH fisiológico. Su capacidad antioxidante le permite reaccionar directamente con las ROS oxidándose sucesivamente a MDHA y DHA (Fig. 2). El ascorbato se regenera a través del ciclo AA-GSH. Además, el AA es cofactor de las dioxigenasas, participa en la regulación del ciclo celular y en la organogénesis (De Potters et al., 2002; Smirnoff y Wheeler, 2000).

Como sucede con los restos tiólicos de múltiples moléculas orgánicas, el GSH (tripéptido γ -glutamil-cisteinil-glicina, γ -Glu-Cys-Gly) puede someterse a numerosas

reacciones redox. Las formas oxidadas dan lugar a la formación de enlaces disulfuros, ya sea con otro residuo de cisteína de otra molécula de GSH para producir glutatión disulfuro (GSSG), o con un tiol diferente para formar “disulfuros mixtos” (p. ej. de una cisteína presente en una proteína), así como formas más oxidadas en donde el grupo tiol se convierte en ácidos sulfénico, sulfínico o sulfónico (Foyer y Noctor, 2005; Noctor et al., 2011). Las especies reactivas de oxígeno, tales como el radical superóxido o el hidroxilo, son compuestos capaces de oxidar el GSH. El GSH es un metabolito antioxidante, muy nucleofílico, con alta capacidad de unirse a distintas sustancias a las que cede electrones. Por ello, el GSH está implicado en la defensa celular contra la acción tóxica de diferentes xenobióticos, oxidoradicales y cationes metálicos (Riccillo et al., 2000; Wu et al., 2004; Chen et al., 2010). En concreto, parte de estas reacciones están catalizadas por enzimas GSH S-transferasas. Estas enzimas están codificadas por una súper familia génica que se sobreexpresan en condiciones de estrés. Múltiples estudios indican un papel de las GSH S-transferasas en la detoxificación de compuestos tóxicos celulares, como sucede bajo estrés por Cd (Semane et al., 2010).

El GSH es el tiol no proteico más abundante en muchos organismos, incluyendo las plantas. Se encuentra en concentraciones milimolares (0,5-10 mM) en células de plantas (Noctor et al., 2012). El GSH se sintetiza a partir de tres aminoácidos en dos pasos dependientes de ATP, entre el γ -carboxilo del glutamato y la cisteína por la γ -glutamylcisteína sintetasa (γ -ECS) (Noctor et al., 2011). Posteriormente se adiciona el resto de glicina, catalizada por la glutatión sintetasa (GS) (May et al., 1998) (Fig. 3). La γ -ECS se encuentra restringida a plástidos, mientras que la GS se puede encontrar tanto en cloroplastos como en el citosol (Noctor et al., 2011). Los factores más importantes que afectan la tasa de síntesis de GSH son la disponibilidad de azufre y la actividad γ -ECS (Jozefczak et al., 2012) (Fig. 3). En leguminosas está presente también el homoglutatión (hGSH; γ -Glu-Cys- β Ala), tripéptido homólogo a GSH en el que una alanina (β Ala) sustituye a la Gly (Naya et al., 2007). El hGSH es sintetizado por la γ -ECS y una homoglutatión sintetasa específica (hGS) (Clemente et al., 2012), pudiendo sustituir parcial o completamente la función del GSH (Frendo et al., 2001; Matamoros et al., 2003). Actualmente, hay evidencias inequívocas de que GSH/hGSH es un metabolito multifuncional en plantas, que es importante en la homeostasis redox y en

procesos de transducción de señales, así como en las reacciones de defensa ante estreses de tipo biótico y abiótico (Noctor et al., 2011).

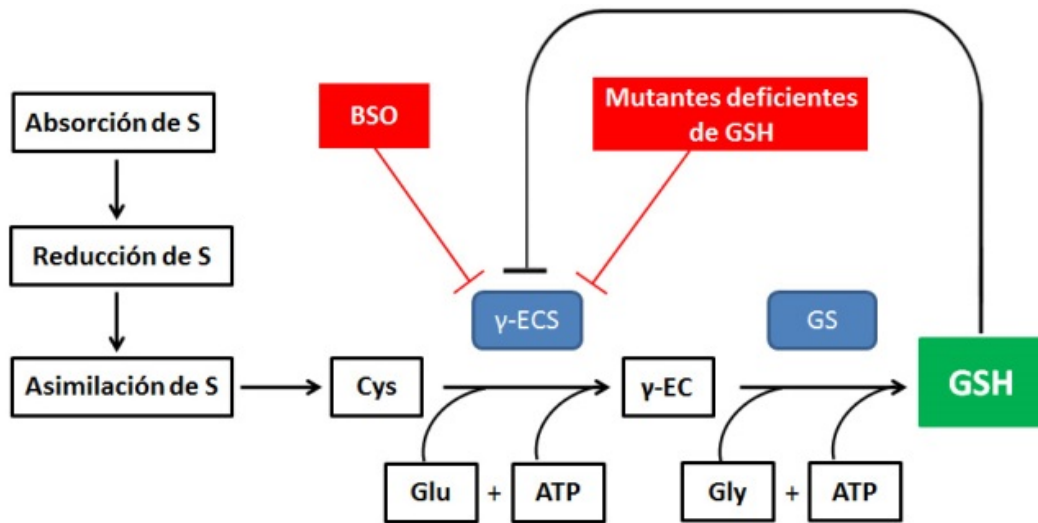


Figura 3. Descripción de la biosíntesis de GSH, la acción de butionina sulfoximina (BSO) y de los mutantes deficientes de GSH provocan una disminución severa de la concentración celular de GSH. La línea negra simboliza la inhibición de retroalimentación (*feedback*) cuando se tienen niveles adecuados de GSH (Jozefczak et al., 2012).

Con el fin de enfrentarse a diferentes tipos de metales, las plantas poseen estrategias de defensa en las que el GSH juega un papel central como agente quelante, como antioxidante y como componente en la señalización, por lo que el GSH interviene en la homeostasis, en la defensa antioxidante y en la transducción de señales bajo estrés por metales (Jozefczak et al., 2012). Una herramienta que ha demostrado ser muy útil en el análisis funcional de glutatión en las plantas es la butionina sulfoximina (BSO), un inhibidor específico que se une al sitio activo de la γ -ECS (Griffith y Meister, 1979) (Fig. 3). Se puede utilizar en estudios centrados específicamente en la función de síntesis de glutatión y en la concentración en las plantas (por ejemplo, Cobbett et al., 1998; Kocsy et al., 2000; Meyer et al., 2007; Reichheld et al., 2007). Un estudio realizado en *Silene cucubalus* expuesta a Cu demostró un incremento de la peroxidación lipídica y una relación más oxidada de GSSG/GSH después del tratamiento con Cu (20 μ M). La disminución de GSH por el pre-tratamiento con BSO aumentó significativamente el daño oxidativo por Cu (de Vo et al., 1992). Recientemente, Wójcik y Tukiendorf (2011) expusieron *Arabidopsis thaliana* a Cd, con o sin adición de BSO, para investigar la adaptación de GSH al estrés por Cd (50 y 100 μ M). Este experimento mostró que el

tratamiento con BSO aumentó la sensibilidad a Cd y tanto el contenido de GSH como la acumulación de fitoquelatinas fueron reducidos en más del 96 %. Por otro lado, en la bibliografía se han descrito mutaciones alélicas de la γ -ECS en *Arabidopsis thaliana* que son deficientes de GSH, y en los que se ha demostrado alta sensibilidad a factores ambientales adversos. Como por ejemplo, el *cad2-1* (*cadmium-sensitive 2-1*) es sensible a metales pesados (Cobbett et al., 1998), el *rml1* (*root-meristemless 1*) presenta severas alteraciones en el desarrollo (Vernoux et al., 2000), el *rax1-1* (*regulator APX2 1-1*) es sensible a alta luminosidad (Ball et al., 2004) y el *pad2-1* (*phytoalexin-deficient 2-1*) es sensible a patógenos (Parisy et al., 2007). Sobrino-Plata et al. (2013) estudiaron el efecto del Hg y el Cd en *A. thaliana* y en algunos de estos mutantes. La exposición al Cd causó acumulación de PCs sólo en el ecotipo silvestre aunque el *rax1-1* acumuló GSH. Además se detectaron altas concentraciones de Cys en *cad2-1* y el *pad2-1* debido a la baja afinidad de Cys por la proteína mutada (Xiang et al., 2001). El mutante *pad2-1* fue el más afectado, particularmente por la exposición al Hg. Sin embargo, el *rax1-1* fue capaz de responder a la exposición a Hg acumulando GSH y PCs (a pesar de contar con un 40 % menos de GSH respecto al ecotipo silvestre) al igual que el ecotipo silvestre para aminorar los efectos tóxicos del Hg (Carrasco-Gil et al., 2011). En ambos casos, se observó la sobreexpresión de la γ -ECS, por lo que esta enzima puede ser un factor clave en la tolerancia a metales (Sobrino-Plata et al., 2013).

Por otro lado, el GSH/hGSH se mantiene en un estado predominantemente reducido por la GR, la cual tiene alta afinidad por el GSSG (Kataya y Reumann, 2010; Noctor et al., 2011). El daño celular severo observado en las raíces de plantas de *A. thaliana* expuestas a Cd 5 μ M se reflejó por un equilibrio redox celular altamente oxidado en este tejido (Cuypers et al., 2011), donde se observó una alta relación GSSG/GSH bajo estrés por Cd. Esto se puede explicar por los múltiples procesos en los que está implicado el GSH durante el estrés por Cd (Cuypers et al., 2011). Además, el GSH está implicado en la protección contra los metales pesados como precursor en la síntesis de fitoquelatinas (PCs) (Cobbett y Goldsbrough, 2002), las cuales son quelantes de Cd, por lo que existe una conexión directa entre el metabolismo del GSH y la desintoxicación de Cd (Semane et al., 2007).

CONTROL DE LA CONCENTRACION CATION METALICO LIBRE

Dentro de la célula, los iones de metales pesados que no sean necesarios metabólicamente pueden alcanzar concentraciones tóxicas, y por ello las células de plantas han desarrollado varios mecanismos para almacenar el exceso de metales y así evitar su participación en reacciones tóxicas no deseadas. Si la concentración del metal tóxico supera cierto umbral en el interior de las células, se activa un proceso metabólico que contribuye a la producción de compuestos quelantes. Péptidos específicos, tales como PCs y metalotioneinas (MTS) se utilizan para quelar metales en el citosol y para secuestrarlos en determinados compartimentos subcelulares (Rauser, 1999; Clemens, 2001; Hall, 2002; Cobbett Y Goldsbrough, 2002). Un gran número de moléculas de pequeño peso molecular también están involucradas en la quelación del metal en el interior de las células, incluyendo ácidos orgánicos, y aminoácidos (Rauser, 1999). Como se mencionó anteriormente, el GSH juega un importante papel en la detoxificación de metales, ya que es el precursor de PCs (Cobbett Y Goldsbrough, 2002). Las PCs son polipéptidos de estructura $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, donde $n=2-11$, que existen en diversas variantes estructurales, donde el aminoácido C-terminal es sustituido por βAla , Ser o Glu (Cobbett y Goldsbrough, 2002). Si la Gly es sustituida por una βAla , se denominan homofitoquelatinas (hPCs) y hasta ahora sólo se han detectado en las leguminosas, ya que se sintetizan a partir de hGSH (Grill et al., 1986; Carrasco-Gil et al., 2011). La enzima fitoquelatina sintasa (PCS) cataliza la condensación de la fracción $\gamma\text{-Glu-Cys}$ del GSH con el residuo de Glu de un segundo GSH, liberando Gly y aumentando la longitud de la molécula de PC (Vatamaniuk et al., 2004; Clemens, 2006) (Fig. 4).

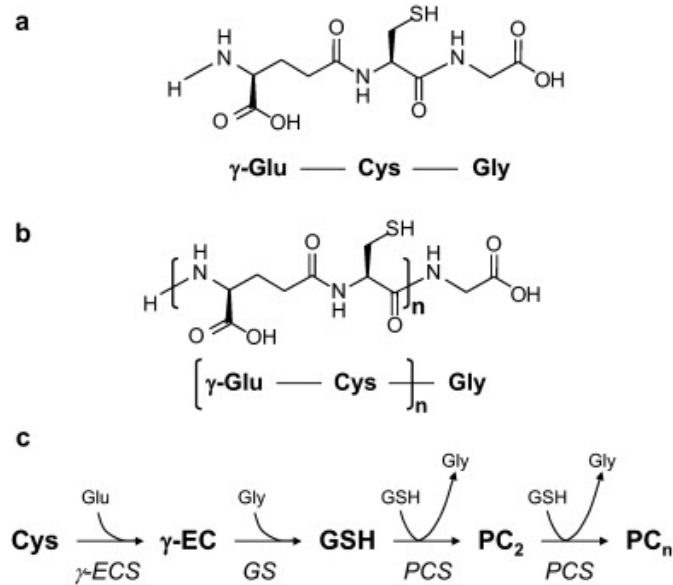


Figura 4. **a.** Estructura química del glutatión (GSH), **b.** estructura química de fitoquelatina ($n = 2-6$) y **c.** vía de síntesis de fitoquelatinas canónicas de Glu Cys, Gly y a través de $\gamma\text{-Glu-Cys}$ ($\gamma\text{-EC}$) y GSH. Las enzimas implicadas son $\gamma\text{-EC}$ sintetasa ($\gamma\text{-ECS}$), glutatión sintetasa (GS), y la fitoquelatina sintasa (PCS) (Wesenberg et al. 2011).

La enzima PCS se expresa constitutivamente, pero requiere una activación post-traducciona por el metal, y el Cd parece ser uno de los activadores más eficaces (Cobbett y Goldsbrough, 2002; Verbruggen et al., 2009). Debido a la presencia de grupos tiólicos de Cys, las PCs quelan Cd y otros metales, por ejemplo Hg, y forman complejos de varios pesos moleculares de aproximadamente 2.500-3.600 Da, protegiendo el citosol de iones de Cd^{2+} u otros metales, como el Hg, secuestrándolos finalmente en la vacuola (Cobbett, 2000; Schat et al., 2002; Clemens, 2006; Ernst et al., 2008; Carrasco-Gil et al., 2011). Las técnicas modernas, incluyendo espectroscopía de absorción de rayos X (XAS), cromatografía líquida de alto rendimiento acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS), ayudan a revelar que los iones de Cd están generalmente ligados a fitoquelatinas en planta (Yang y Chu, 2011). La quelación del metal a través de las PCs es una estrategia de defensa importante en la homeostasis como se ha demostrado en mutantes de *A. thaliana* deficientes de PCs, los cuales son extremadamente sensibles a los metales como Cd, Hg y As (Hall, 2002; Howden et al., 1995). Se ha reportado que la alfalfa, la cual es capaz de sintetizar GSH y hGSH, produce varios tipos de PCs y hPCs en presencia de metales tóxicos, incluyendo Hg (Sobrino-Plata et al., 2009). Carrasco-Gil et al. (2011) identificaron al menos diez

complejos de Hg-PCs en alfalfa. Las fitoquelatinas se asocian generalmente con la desintoxicación de metales no esenciales. Sin embargo, no sólo los metales tóxicos, sino también los iones esenciales, como el Zn pueden estar ligados a PCs, lo que sugiere que las PCs tienen la función de regular las concentraciones de metal libre en la célula (Hirata et al., 2005; Clemens, 2006). Generalmente se observa una disminución transitoria en el contenido de GSH/hGSH bajo estrés por metales pesados, que se ha considerado ligado al drenaje para la síntesis de PCs, lo que podría resultar en una menor homeostasis redox celular, y probablemente pueda alterar otros procesos metabólicos mediados por GSH/hGSH (Saito, 2004). Mutantes *cad1-3* de *A. thaliana*, deficientes de PCs, sufrieron un aumento notable y rápido en la concentración de GSH después de los tratamientos a corto plazo con Cd y Hg, que no se utilizó finalmente para sintetizar PCs. Por lo tanto, esto implica que la vía de síntesis de GSH puede estar inducida por metales pesados, y podría ser la etapa limitante en la tolerancia al metal (Carrasco-Gil et al., 2011). Los complejos formados por fitoquelatina y metal se transportan principalmente a la vacuola, donde se almacenan de forma segura, aunque no se puede descartar que una porción del metal podría ser secretada al xilema, permitiendo la translocación del metal a los brotes (Saathoff et al., 2011). Otros autores también proponen que las PCs unidas al metal son transportadas a la vacuola (Sharma y Dietz, 2006) como un paso final de detoxificación y podrían trabajar en conjunto con otros compuestos, como aminoácidos, para combatir el estrés oxidativo inducido por metales pesados (Park et al., 2012). La vacuola es el principal compartimento de almacenamiento para iones metálicos, que en las plantas representa hasta el 90% del volumen de la célula (Vögeli-Lange y Wagner 1990). La familia de transportadores ABC puede transportar xenobióticos y metales pesados en la vacuola, y las dos subfamilias (MRP y PDR) son particularmente activas en el secuestro de metales pesados quelados (Manara, 2012). En respuesta al Cd, se forman complejos PC-Cd que son transportados a la vacuola por antiporters Cd/H⁺ y al tonoplasto por transportadores ABC dependientes de ATP (Salt y Wagner 1993; Salt y Rauser, 1995). En las vacuolas se incorpora S²⁺ y se forman complejos de alto peso molecular (HMW) que son la principal forma de almacenamiento del Cd (Manara, 2012). También los P_{1B}-ATPasas (HMAs) están involucrados en el flujo de salida de iones metálicos desde el citoplasma al tonoplasto (tales como AtHMA3) y se cree que

contribuyen a la homeostasis de Cd y Zn mediante el secuestro en la vacuola (Krämer et al., 2007). Otros transportadores son los CDF (también llamado MTP en plantas) están involucrados en el transporte de iones metálicos desde el citoplasma a la vacuola (Krämer et al., 2007), y al apoplasto y retículo endoplásmico (Peiter et al., 2007). Los MTPs transportan los cationes metálicos divalentes tales como Zn, Cd, Co, Fe, Ni, y Mn (Montanini et al. 2007). Una de las principales familias involucradas en la absorción de metales es la familia de transportadores ZIP, identificados en muchas especies de plantas e implicados en la translocación de cationes divalentes través de las membranas como Fe o Zn (Manara, 2012). Küpper y Kochian (2010) estudiaron la expresión de genes de tres transportadores (ZNT1, ZNT5: familia ZIP y MTP1: familia CDF) principalmente de Zn, en hojas de *T. caerulea* como principal órgano de almacenamiento en plantas hiperacumuladoras. La presencia de Cd indujo cambios importantes en la expresión de estos genes como parte de la aclimatación a la toxicidad de Cd (Küpper y Kochian, 2010). Además las similitudes químicas del Cd y Zn provocan la afinidad del Cd en sitios designados para el Zn, por lo que se cree que ZNT1, ZNT5 y MTP1 transportarían o por lo menos se unirían al Cd (Küpper y Kochian, 2010).

CHAPERONAS MOLECULARES

La pérdida de función de las proteínas es una consecuencia inevitable de una amplia gama de condiciones ambientales adversas, incluyendo la toxicidad por metales pesados (Hossain y Komatsu, 2012; Joseph et al., 2012). Pena et al. (2008) comprobaron que los sistemas proteolíticos se alteraron drásticamente en las hojas de girasol en respuesta al estrés por metal. Las chaperonas moleculares se consideran proteínas de estrés y muchas de ellas se identificaron originalmente como proteínas de choque térmico (HSPs). Según los conocimientos actuales, las HSPs facilitan el repliegamiento de proteínas y estabilizan los polipéptidos y las membranas (Joseph et al., 2012) y también son responsables de la estabilización de proteínas (Wang et al., 2004). Las HSPs también se expresan en algunas células ya sea constitutivamente o bajo el control del ciclo celular o el desarrollo, dando idea de la importancia que tienen para mantener un correcto funcionamiento celular (Joseph et al., 2012). Se clasifican por su peso molecular, tamaño, estructura, función, y se dividen en varias familias:

HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 (o chaperoninas), 17 a 30 kDa pequeñas HSPs (sHSPs) y ubiquitina (8.5 kDa) (Waters et al., 1996).

Una respuesta general de las plantas a niveles elevados de metales pesados parece ser el aumento de la síntesis de diversas proteínas de choque térmico (HSP) (Barque et al., 1996; Hall, 2002). La HSP70 tiene funciones esenciales en la prevención de la agregación y ayuda al replegado de proteínas en condiciones de estrés (Wang et al., 2003). Hay pruebas considerables de que la producción de ROS induce la expresión de proteínas de choque térmico y otras chaperonas, proporcionando protección contra el estrés oxidativo (Timperio et al., 2008). Además, varios genes relacionados con la desintoxicación celular y la reparación han demostrado ser inducidos por el tratamiento con Cd, especialmente quitinasas y proteínas de choque térmico (HSPs), considerado como una segunda línea de defensa contra el estrés por metal (Metwally et al., 2003; Békésiová et al., 2008; Rodríguez-Serrano et al., 2009). La inducción de HSPs por la toxicidad del Cd se ha observado en distintas especies de plantas (Sanità di Toppi y Gabbrielli, 1999; Rodríguez-Serrano et al., 2009) y puede ser regulada por la sobreproducción de H₂O₂ ya que los factores de transcripción implicados pueden actuar como sensores de H₂O₂ (Mittler y Mittler, 2006; Rodríguez-Serrano et al., 2009).

Tabla 1. Localización de HSPs en plantas y sus funciones específicas (Joseph et al., 2012).

Denominación	Compartimento celular	Función
HSP100	Citosol, mitocondria	Disgregación y desdoblamiento.
HSP90	Citosol, mitocondria, retículo endoplasmático, cloroplasto	Facilitar maduración de moléculas señal, tampones genéticos.
HSP70	Citosol, mitocondria, retículo endoplasmático, cloroplasto	Prevenir agregación, ayudar al replegamiento, translocación de proteínas, transducción de señales, activación transcripcional.
HSP60 (chaperoninas)	Citosol, mitocondria, cloroplasto	Plegamiento y ayudar al replegamiento.
sHSP	Citosol, mitocondria, retículo endoplasmático, cloroplasto	Prevenir agregación y estabilizar proteínas no nativas.
Ubiquitinas	Citosol, mitocondria, retículo endoplasmático, cloroplasto	Inmunidad, control de crecimiento y tolerancia al estrés.

SEÑALIZACIÓN CELULAR

Se cree que la acumulación de H₂O₂ producido por la NADPH-oxidasas de la membrana plasmática, induce la formación de peróxidos de lípidos (es decir, radicales de ácidos grasos o FA-OO; Neil et al., 2002). Este proceso oxidativo, junto con la actividad de varias clases de lipoxigenasas (LOX), generan oxilipinas, que son precursores del jasmonato (JA; Turner et al., 2002; Foreman et al., 2003). Varios experimentos a corto plazo han demostrado que los metales pesados pueden inducir la sobreexpresión de varios genes que codifican LOXs. La exposición a concentraciones micromolares de Cd y de Cu durante 24 h causó la sobreexpresión de LOXs en *A. thaliana* (Remanes et al., 2010). Resultados similares fueron observados por Maksymiec et al. (2005) en *A. thaliana* tratadas con exceso de Cd o Cu, donde las plántulas acumularon JA después de tan sólo 6-7 h de exposición. Además, Rakwal et al. (1996) demostraron que el Cu indujo un aumento rápido del contenido JA en hojas de *Oryza sativa*.

El etileno también podría ser parte del proceso de señalización desencadenada por la exposición de las plantas a los metales pesados (Sanità di Toppi y Gabbrielli, 1999). La primera evidencia provino de los estudios de Sandmann y Böger (1980), que demostraron que el Cu indujo la síntesis de etileno que condujo a la senescencia celular. Es factible que la inhibición del crecimiento observado en las plantas dicotiledóneas tratadas con Cu pueda ser mediada por etileno (Maksymiec y Krupa, 2006). El Cu estimula la producción de etileno, probablemente a través de un aumento de la actividad enzimática de la ACC sintasa en plantas de *A. thaliana* (Arteca y Arteca, 2007). Del mismo modo, las plantas de guisante expuestas a Cd 50 µM durante 14 días acumularon una notable cantidad de etileno en las hojas (Rodríguez-Serrano et al., 2009), lo que sería parte del proceso de señalización implicado en las respuestas de defensa a metales pesados (Guo y Ecker, 2004). Un análisis transcriptómico de plantas de *Medicago sativa* tratadas con Hg apoya la idea de que el etileno podría ser parte de las moléculas de señalización inducidas por metales pesados, ya que se encontró que los factores de transcripción que responden al etileno (como ERF1) son regulados hasta después de sólo 3 horas de tratamiento (Montero-Palmero et al., 2013). El etileno actúa por la activación de la cascada de MAPKs (proteínas quinasa activadas por mitógenos (Guo y Ecker, 2004), proceso de transducción de señales que también

se activa por Cd y Cu (Yeh et al., 2003; Jonak et al., 2004), sugiriendo que los procesos de señalización mediados por etileno podrían ser inducidos en las células de las plantas expuestas a metales pesados (Hernández et al., 2012). Asimismo, podrían haber interacciones entre diferentes fitohormonas, como se ha encontrado que existe una estrecha relación entre JA, etileno y otras fitohormonas para mediar en la expresión de genes como el citocromo P450 bajo varios estreses bióticos y abióticos (Narusaka et al., 2004). Por otro lado, Metwally et al. (2003) observaron que la toxicidad del Cd puede ser aliviada por el ácido salicílico, que es un conocido factor de señalización que a menudo bloquea la vía del JA (Gupta et al., 2000). Se han encontrado algunos paralelismos en las respuestas de las plantas expuestas a metales pesados y al JA, por ejemplo, en el patrón de expresión génica, Xiang y Oliver (1998) encontraron respuestas comunes entre las plantas tratadas con Cd o Cu y JA en el perfil de transcripción de genes implicados en el metabolismo del GSH. Experimentos a corto plazo con metales pesados indicaron que se activan varios procesos de señalización, en el que H_2O_2 , el JA y el etileno juegan un papel central (Hernández et al., 2012).

El etileno es una fitohormona gaseosa que está involucrada en varias fases del crecimiento de las plantas implicada en numerosas funciones fisiológicas (Abeles et al., 1992) y su síntesis ocurre continuamente a velocidades bajas en condiciones normales (Loka y Oosterhuis, 2013). Sin embargo, la producción de etileno aumenta significativamente bajo condiciones de estrés biótico o abiótico (Morgan y Drew, 1997; Narayana et al., 1991). En la síntesis de etileno, en plantas superiores, intervienen tres enzimas: S-adenosil-1-metionina (SAM) sintetasa, que cataliza la conversión de metionina a SAM (Giovanelli et al., 1980), la ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) sintasa, intermediaria en la hidrólisis de SAM a ACC y 5'-metiltioadenosin (Yang y Hoffman, 1984; Kende, 1989) y la ACC oxidasa que cataliza la conversión de ACC a etileno, dióxido de carbono y cianida (John, 1991). Por lo que el etileno sintetizado en respuesta a estrés ambiental podría agravar los síntomas de estrés o dar lugar a respuestas que mejoren la supervivencia de las plantas en condiciones adversas.

Existen productos comerciales que inhiben la acción del etileno, actuando como bloqueadores de los receptores de etileno. Uno de ellos es el 1-metilciclopropeno (1-MCP), el cual tiene aplicaciones prácticas en la agricultura comercial, ya que se utiliza

para extender la vida poscosecha y la calidad de productos vegetales, aunque además se utiliza en programas de investigación para estudiar las respuestas fisiológicas de las plantas al etileno (Blankenship y Dole, 2003). El 1-MCP es un gas a temperatura ambiente y presión atmosférica, que actúa uniéndose a receptores de etileno (Sisler y Serek, 1997). Esto produciría la insensibilidad de la planta a esta hormona ya que la afinidad del 1-MCP a los receptores de etileno es casi 10-veces superior a la del propio etileno (Blankenship y Dole, 2003). Además se ha observado que previene los efectos del etileno sobre la madurez y senescencia de los frutos (Sisler and Serek, 1997). Asimismo, el 1-MCP disminuye la producción de etileno en frutos climatéricos, la respiración y la degradación de la clorofila (Blankenship y Dole, 2003; Dong et al., 2001; Jeong et al., 2002; Jiang et al., 1999). El 1-MCP tiene un modo de acción no tóxico para humanos y para el medio ambiente, siendo activo a concentraciones muy bajas (Luo et al., 2007). Se ha observado que el 1-MCP es eficaz en superar los efectos del etileno en una gama de frutas y verduras perecedoras (Watkins, 2006). Diversos ensayos en fruta almacenada han mostrado que el tratamiento con 1-MCP disminuye la generación de ROS durante el almacenaje, posiblemente aumentando la actividad de enzimas antioxidantes como SOD, CAT o POX (Chiriboga, 2012; Lui et al., 2013; Yuan et al., 2010).

FITORREMEDIACIÓN

Uno de los aspectos importantes de estudiar y conocer a fondo los mecanismos de defensa y resistencia de las plantas a los metales pesados es el de poder diseñar estrategias de fitorremediación. La fitorremediación (del griego antiguo φυτό (fito), que significa "planta", y *remedium* en latín, que significa "restablecer el equilibrio") esto significa utilizar plantas para extraer, retener o transformar los contaminantes (Chaney et al., 1997; Iskandar y Adriano, 1997). Históricamente, la fitorremediación ha sido considerada como un proceso natural, identificado por primera vez y probado desde hace más de 300 años (Lasat, 2000). Las especies que se utilizan en esta técnica son eficaces en la acumulación de cantidades crecientes de metales pesados tóxicos (Ghosh y Singh, 2005; Brunet et al., 2008). Estas plantas son conocidas como hiperacumuladoras, ya que acumulan metales pesados en concentraciones más altas (≥ 100 veces) que las no hiperacumuladoras creciendo en las mismas condiciones y sin

mostrar ningún síntoma visible en sus tejidos (Barceló y Poschenrieder, 2003). Nagaraju y Karimulla (2002) describieron que algunas especies, como la *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae), *Dodonaea viscosa* (Sapindaceae) y *Cassia auriculata* (Fabaceae), tenían potencial para la remediación de suelos contaminados con diferentes tipos de elementos traza y principales. La fitorremediación se puede clasificar en diferentes aplicaciones, tales como rizofiltración, fitoestabilización, fitovolatilización, fitodegradación (Long et al., 2002), y fitoextracción (Jadia y Fulekar, 2009) (Fig. 5). La fitoestabilización es un enfoque sencillo, de bajo costo y poco invasivo con el ambiente, para estabilizar o reducir la biodisponibilidad de los contaminantes utilizando las plantas (Ahmadpour et al., 2012) (Fig. 5). En efecto, estos enfoques utilizan las raíces de plantas para restringir la movilidad y la biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo (Jadia y Fulekar, 2009). Este método es aplicable cuando no es posible una acción inmediata para descontaminar las zonas contaminadas (por ejemplo, si una empresa responsable sólo existe durante un corto período de tiempo, o en un área que no es de alta preocupación) (Garbisu y Alkorta, 2001). En este enfoque, las características químicas y biológicas de los suelos contaminados se modifican mediante el aumento del contenido de materia orgánica, la capacidad de intercambio catiónico (CEC), el nivel de nutrientes, y las actividad biológica (Alvarenga et al., 2008). Se estima que la fitoestabilización es una técnica adecuada para remediar Cd, Cu, As, Zn y Cr, sobre todo cuando se encuentran en áreas contaminadas amplias y en altas concentraciones, donde sería necesario recurrir a múltiples ciclos de cultivo para su extracción (Alvarenga et al., 2009).

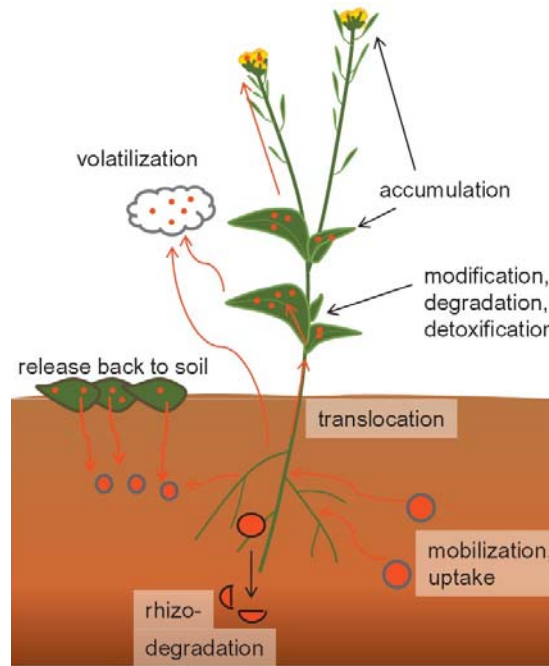


Figura 5. Vista general las interacciones planta-contaminantes y los posibles destinos de los contaminantes (representados como círculos) (Dhankher et al., 2012).

La fitorremediación es una estrategia de bajo costo y efectiva para limpiar suelos contaminados sin necesidad de herramientas de alto costo y de recursos humanos expertos (Environmental Protection Agency, 2000; Ghosh y Singh, 2005). Como la tecnología verde, es aplicable para los diferentes tipos de contaminantes orgánicos e inorgánicos y proporciona beneficios estéticos para el medio ambiente mediante el uso de árboles y la creación de zonas verdes (Ghosh y Singh, 2005; Lewis, 2006). Otra ventaja es que el proceso se realiza *in situ*, sin generar un enorme volumen de residuos que haya que tratar posteriormente (Cunningham et al., 1995). El uso de plantas posibilita la recuperación de terrenos que en su momento quedaron abandonados, y que dado el alto coste para descontaminarlos no pueden ser limpiados por otras técnicas. Sin embargo sus resultados se obtienen a medio y largo plazo, ya que se necesitan varios ciclos de cultivo. Esta tecnología verde es adecuada para grandes áreas en las que otros enfoques sería costoso e ineficaz (Vidali, 2001; Prasad y Freitas, 2003). Además, los residuos pueden ser reutilizados con un daño mínimo al medio ambiente (Schnoor, 2002). La expansión de los contaminantes en el aire y el agua se reduce mediante la prevención de la erosión y la lixiviación del suelo que puedan resultar de la actividad del viento y agua (Pivetz, 2001; Ghosh y Singh, 2005). Otra

ventaja importante del empleo de plantas para recuperar suelos contaminados, es que las mismas permiten la regeneración de la fertilidad de los suelos afectados, mejorando su actividad biológica, gracias a la interacción con la microfauna de la rizosfera. Las leguminosas, como la alfalfa permiten, a través de relaciones simbióticas con bacterias fijadoras de N_2 (*Rhizobium*) y hongos micorrizicos, mejorar la fertilidad de suelos degradados (Göhre y Paszowski, 2006).

La alfalfa, *Medicago sativa*, es una planta perenne de 10-80 cm, herbácea, endémica de Asia Menor y la cuenca mediterránea (*Medicago sativa* subsp. *sativa*) y del norte de Eurasia (*M. sativa* subsp. *falcata*). Es una especie que tolera el calor y es bastante resistente a la sequía. Puede soportar bajas temperaturas (subsp. *falcata*) y tolera la salinidad pero no el encharcamiento. Es cultivada mundialmente y en la Península Ibérica existen importantes superficies cultivadas en el valle del Ebro y en el valle del Duero. Se establece en regadío como cultivo monófito, y en secano sola o mezclada con una gramínea (avena, cebada, etc.). En la Península, las mayores superficies de regadío se siembra con alfalfa de ecotipo Aragón. Este ecotipo (*Medicago sativa* subsp. *sativa* var. *Aragon*) es una población natural de alfalfa erecta adaptada por selección natural al medio climático y edáfico del Valle medio del Ebro. Es una planta leguminosa que ha sido ampliamente cultivada desde tiempos antiguos como un alimento para el ganado y cobertura de cultivos por su capacidad de producir forraje de alto rendimiento y de alta calidad. Es una planta leguminosa que tiene la capacidad para asimilar atmósfera de nitrógeno (N_2), gracias a la asociación con simbióticas fijadoras de N_2 bacterias (es decir, *Sinorhizobium meliloti*). Por lo tanto, estas plantas son normalmente capaces de obtener sus propios requerimientos de nitrógeno, y son capaces de crecer en suelos pobres (Garau et al., 2005). De hecho, estas plantas se utilizan para mejorar la fertilidad del suelo, y disminuir las requerimientos de fertilización (Zahran, 1999). Además, la mayor disponibilidad de nitrógeno del suelo puede estimular la actividad microbiana, factores importantes para la descontaminación de suelos (D'Orazio et al., 2013). Singh et al. (2009) estudiaron el potencial de la alfalfa en la absorción de Cd, observando que luego de 21 días de tratamiento la alfalfa absorbió un 80-85 % del Cd de la solución hidropónica. Por lo que

M. sativa puede ser un candidato adecuado para la fitorremediación, la cual posee una biomasa menor pero acumula gran concentración de metal.

CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El Hg, el Cd y el Cu producen estrés oxidativo en las plantas de alfalfa (*Medicago sativa*), aunque tienen propiedades químicas diferentes. Es previsible que la exposición a estos distintos metales pesados dé lugar a una firma de estrés característica para cada uno de ellos; estudio que se realizará en alfalfa, planta con capacidad fitorremediadora. El contenido de GSH, y por ende de los biotioles asociados es importante en la tolerancia a dichos metales, siendo asimismo parte de los mecanismos de respuesta mediados por etileno. Todo ello depende también del estado fenológico de las plantas, así como del sistema de cultivo, que pueden modificar el modo en que éstas respondan y se aclimaten a la exposición a metales pesados.

En base a los antecedentes anteriormente descritos, nos planteamos analizar los parámetros de estrés y caracterizar los mecanismos de respuesta de la alfalfa (*Medicago sativa*) a Hg, Cd y Cu y en diferentes condiciones de cultivo.

1. Caracterización de la respuesta temprana antioxidante de alfalfa (*Medicago sativa*) a distintas concentraciones y tiempos de exposición a Cd y Hg, en un sistema hidropónico a *microescala*. Se analizará esta respuesta de la alfalfa desde diversas aproximaciones metabólicas, bioquímicas y proteómicas.
2. Analizar la interferencia de la señal de etileno y la modificación del metabolismo del GSH, en plantas expuestas a Hg y Cd en el sistema a *microescala*. Para ello se empleará una aproximación farmacológica utilizando 1-metilciclopropeno (1-MCP), inhibidor de la señal de etileno, y butionina sulfoximina (BSO), capaz de bloquear la síntesis de GSH/hGSH.
3. Validar los parámetros de estrés inducidos por metales en un sistema a *macroescala* semi-hidropónico sobre sustrato inerte, en plantas de alfalfa crecidas en condiciones de cultivo más próximas a una situación ambiental real.

CAPÍTULO 3. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

CAPÍTULO 3. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL

Para todos los experimentos se utilizó la misma especie de alfalfa *Medicago sativa* var. Aragón (Semillas Mur, Zaragoza, España). Las semillas fueron esterilizadas agitando durante 5 minutos en una disolución de hipoclorito sódico al 5%. Seguidamente se lavaron 5 veces con agua destilada estéril y conservaron a 4 °C durante 24 horas. Para la germinación, las semillas se colocaron en placas de Petri cuadradas estériles, que contenían agarosa 1,5 % (p/v), las cuales se mantuvieron a 28 °C en completa oscuridad por 24 horas (Fig. 6).



Figura 6. Semillas de alfalfa en placa de Petri cuadrada con agarosa (1,5%).

2. DISEÑO EXPERIMENTAL SISTEMAS DE CULTIVO

Se utilizaron en los experimentos desarrollados dos sistemas para el cultivo de la alfalfa: hidropónico a microescala y semi-hidropónico a macroescala.

Experimentos en el sistema de cultivo a microescala: Una vez seleccionadas las plántulas más homogéneas entre sí, se traspasaron al microsistema hidropónico de cultivo denominado “portas de Fåhraeus” (Heidstra et al., 1994). Este consiste en unos soportes denominados “sándwich” que constan de un portaobjeto y un cubreobjeto unidos con silicona, con un espacio suficiente entre ellos para poder colocar las raíces de las plántulas (ver Fig. 7).

Varios sándwiches con plántulas de alfalfa (6 plantas por sándwich y 6 sándwiches por contenedor) se colocaron en cubetas Schieferdecker de tinción horizontal (Ortega Villasante et al., 2005) con 150 ml de medio de cultivo Murashige-Skoog (MS, Duchefa Biochemie, Holanda) ajustando el pH a 6,0.

Las plántulas se mantuvieron por 24 horas en un fitotrón para su aclimatación (fotoperiodo de 16 h de luz, a 25 °C/18 °C). Transcurrido este tiempo, se añadió al medio MS los metales correspondientes (HgCl_2 y CdCl_2) a distintas concentraciones (3, 10 y 30 μM), dejándose varias cubetas sin tratamiento de metales como controles. Los tratamientos de concentración de metales, se analizaron en 3 tiempos de exposición: 3, 6 y 24 h.

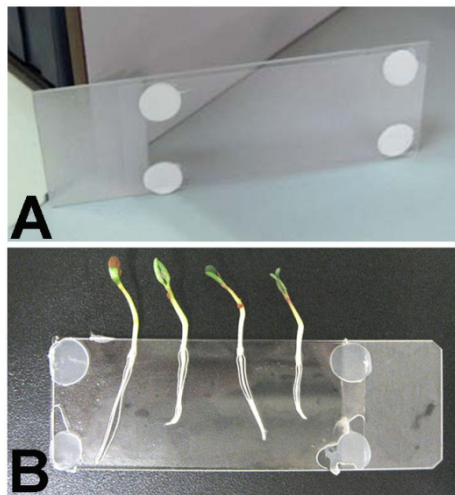


Figura 7. Soporte sándwich. **A:** Sandwich: portaobjeto y cubreobjeto sellados con silicona. **B:** Sandwich alojando plántulas de alfalfa.

En los ensayos funcionales; de interferencia de señalización de etileno y contribución del GSH, se utilizaron dosis de 30 μM de CdCl_2 y 3 μM de HgCl_2 . Para el ensayo de interferencia de la señalización de etileno se utilizó 10 μM de 1-MCP (1-metilciclopropeno; AgroFresh Inc., Philadelphia, PA, USA). Se trataron algunas cubetas sólo con 1-MCP, otras sólo con Hg o Cd y otras conjuntamente el metal con el fármaco. Además se dejaron algunas cubetas sin tratar como plantas control.

El fármaco que se utilizó para alterar el metabolismo del GSH fue la butionina sulfoximina (BSO; Sigma, USA), inhibidor de la gamma-glutamilcisteína sintetasa (γ -

ECS), primer paso en la síntesis de GSH/hGSH) a una concentración final de 1 mM en la cubeta. Se trataron algunas cubetas sólo con Hg o Cd y otras conjuntamente el metal y el BSO. Se dejaron cubetas sin tratar para utilizarlas como controles.

Experimentos en el sistema de cultivo semi-hidropónico: Para este sistema, las semillas se mantuvieron en las placas Petri durante 48 horas para que alcanzaran un tamaño apropiado para asegurar su supervivencia en el sistema de cultivo. Las plántulas más homogéneas se colocaron en el sistema semi-hidropónico, que consta de unas bandejas con perlita, como medio de soporte, y una disolución nutritiva, Hoagland modificada, a pH 6,2 cuya composición se describe en la Tabla 1 (Sobrino-Plata et al., 2009).

Luego de 18 días de crecimiento en periodos de luz:oscuridad 18:6, se realizaron los tratamientos con distintas concentraciones de metales durante 7 días.

Tabla 1. Composición disolución nutritiva de alfalfa en sistema semi-hidropónico de pH 6,2.

Macronutrientes		Micronutrientes	
KH ₂ PO ₄	1,0 mM	FeEDDHA	45,0 µM
MgSO ₄	0,5 mM	MnSO ₄	18,0 µM
NaCl	0,4 mM	CuSO ₄	6,0 µM
Ca (NO ₃) ₂	2,0 mM	ZnSO ₄	3,0 µM
KNO ₃	1,5 mM	H ₃ BO ₃	23,5 µM
Mg (NO ₃) ₂	1,0 mM	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	2,0 µM



Figura 8. Sistema semi-hidropónico: plántulas de alfalfa en bandeja con perlita y disolución nutritiva.

En la cosecha, las plantas se sumergieron en 10 mM Na_2EDTA a fin de eliminar los restos de metal que pudieran quedar adheridos a la superficie, y posteriormente con agua. Se procedió a anotar la longitud y peso de raíces y parte aérea como parámetros biométricos de estrés, tras lo cual sumergieron en nitrógeno líquido y se conservaron las muestras a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis.

El tratamiento con metales consistió en crecer las plantas con diversas dosis de cadmio y cobre. En un primer lugar se emplearon tres niveles de Cu (6, 30 y 100 μM CuSO_4) y dos de Cd (6 y 30 μM CdCl_2), preparándose para ello disoluciones stock concentradas (30 mM) de cada metal. Se utilizó una bandeja para cada tratamiento (ver Fig. 8), además de contar con una bandeja sin tratar para utilizarla como plantas control.

En un segundo experimento se estudió la modificación del metabolismo del GSH, de modo que plantas tratadas con CdCl_2 y CuSO_4 30 μM se y se preincubaron con 1 mM de BSO, para inhibir la síntesis de GSH y hGSH, en la solución nutritiva. Se utilizó una bandeja para cada tratamiento, por lo que una bandeja con plantas se dejó sin tratar para tener plantas control, otra con BSO y las restantes con metal (ya sea Cd o Cu) y metal más BSO.

3. PARÁMETROS DE ESTRÉS

Parámetros biométricos: Para cuantificar la inhibición de crecimiento, fue necesario comparar todos y cada uno de los tratamientos a su respectivo control mediante la

siguiente expresión, donde C son las plantas control y M las del correspondiente tratamiento:

$$\% \text{ relativo de inhibición} = 1 - \frac{\text{Media } M}{\text{Media } C} \times 100$$

En cuanto a las plantas cultivadas en cubetas de *microescala* se realizó la medición de la plántula entera (mínimo de 10 plántulas por tratamiento). En los ensayos a *macroescala* del sistema semi-hidropónico, se midieron en las longitudes de 10 plantas de alfalfa al azar. Posteriormente se procedió a pesar la parte aérea y la raíz de forma separada y aplicar la fórmula descrita.

Concentración de metales en material vegetal: Para cuantificar el contenido de Cd, Hg en las plántulas crecidas en el sistema a *microescala* se trabajó con las plántulas enteras, sin separar parte aérea de raíz. Sin embargo para realizar esta determinación en las plantas cultivadas en semi-hidroponía, se cuantificó por separado parte aérea y raíz. Tras recolectar las plantas, se realizó un lavado con 10 mM Na₂EDTA y otro en agua desionizada y se colocaron en estufa durante 72 horas a 60 °C para su secado, excepto las plántulas con Hg las cuales se secaron a temperatura ambiente para evitar la volatilización del metal.

Las plántulas del sistema de *microescala* se secaron directamente en el vial de vidrio para su digestión ácida; mientras que las plantas crecidas en semi-hidroponía se molieron en un mortero para homogeneizar las muestras.

Al material vegetal seco se le añadió 2 ml de una mezcla oxidante ácida (HNO₃: H₂O₂: H₂O; 0,6:0,4:1 v:v). La digestión se realizó en autoclave (120 °C; 1,5 atm; 30 min). Una vez enfriados los viales a temperatura ambiente, se filtró el digerido a través de un filtro de PVDF y se diluyó con agua desionizada (calidad Mili-Ro, Millipore) a 5 ml.

El contenido de Cd, Hg y Cu se determinó por espectrometría de masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS Elan 6000 Perkin-Elmer, EE.UU., equipado con autosampler AS91), equipo disponible en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI, UAM).

Peroxidación de lípidos: Un método indirecto que se utiliza para medir el estrés oxidativo celular es la determinación de malondialdehído (MDA), un subproducto de la degradación de ácidos grasos insaturados. Para su determinación se utilizó el método basado en Buege y Aust (1978), en el que se hace reaccionar la muestra con el reactivo TCA-TBA-HCl (TCA 15 % (p/v), TBA 0,37 % (p/v) y HCl 0,25 M), midiéndose luego la absorbancia a 535 nm.

La cuantificación de la acumulación del subproducto malondialdehído (MDA), se realizó de acuerdo con Ortega-Villasante et al. (2005). Se pesaron 0,1 gramos de tejido congelado (parte aérea o raíz) y se añadió 1 ml del reactivo MDA (15 % p/v ácido tricloroacético; 0,37 % p/v ácido 2-tiobarbitúrico y 0,25 M HCl). Se incubó a 90 °C durante 30 minutos y se centrifuga a 10.000 xg durante 10 minutos. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 535 y 600 nm, y se calculó la concentración de MDA aplicándose la siguiente fórmula:

$$\frac{nmolMDA}{gPF} = \left[\frac{(A_{535} - A_{600})}{(1,56 * 10^5)} \right] * \left(\frac{10^6 nmolesMDA}{1ml} \right) * \left(\frac{1ml}{0,1gPF} \right)$$

Cuantificación de clorofilas: Se utilizó 0,05 g de material vegetal congelado; se transfirieron a un mortero y se añadió 10 ml de acetona 80 %. Se homogeneizó y se filtró con un filtro de pliegues de papel para eliminar material en suspensión. Posteriormente se midió la absorbancia de dichos extractos a $\lambda_1 = 663$ nm y $\lambda_2 = 645$ nm. Cuando se realiza la extracción de clorofilas con una disolución de acetona al 80 %, la clorofila a (Cla) y clorofila b (Clb) tienen un pico de máxima absorbancia en el rango del rojo, cuyas longitudes de onda son 663 y 645 nm, respectivamente. A partir de estas dos medidas se realizaron los cálculos utilizando la ecuación experimental desarrollada por Arnon (Porra, 2002):

$$Cla = \text{Clorofila } a \left(\frac{\mu g}{gMF} \right) = \left[(12,7 * A_{663}) - (2,60 * A_{645}) \right] * \frac{10 mL \text{ acetona}}{0,05 gMF}$$

$$Clb = \text{Clorofila } b \left(\frac{\mu g}{gMF} \right) = \left[(12,7 * A_{645}) - (2,60 * A_{663}) \right] * \frac{10 mL \text{ acetona}}{0,05 gMF}$$

$$\text{Clorofilas } T = Cla + Clb$$

Determinación de H₂O₂ extracelular: Para esta determinación se utilizó material fresco obtenido de plántulas crecidas en el sistema microescala, tratadas con Hg o Cd (3, 10 y 30 μ M) durante 3, 6 y 24 horas y se diseñó un experimento basado en Garnier et al. (2006) y Shaw y Long (2003), para detectar el H₂O₂ extracelular en segmentos de raíz. Se cortaron segmentos de raíz de 1 cm, y se equilibraron en medio MS con MES 2 mM a pH 6,0 en oscuridad durante 1 hora. Posteriormente se colocaron individualmente en una placa microtiter 96. Cada pocillo contenía 5 μ l de Amplex red (disolución madre de 50 mM; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) y 195 μ l de medio MS tamponado con MES 2 mM a pH 6,0. El Amplex Red en presencia de peroxidasa se oxida a resorfurina, fluoróforo que al excitarse a 560 nm emite fluorescencia a 590 nm. La fluorescencia se cuantificó en un lector de placas (Sinergy HT, Biotek, EE.UU.) utilizando un juego de filtros (λ_{exc} = 542 nm y λ_{em} = 590 nm). Las mediciones se realizaron cada cinco minutos durante 60 minutos.

4. ACTIVIDAD DE ENZIMAS REDOX

Extracción de proteínas: A partir del material congelado, se llevó a cabo la extracción de proteínas para realizar con ellas distintas determinaciones. Como primer paso se preparó la mezcla extractora a partir del tampón de extracción conservado a -80 °C, cuya composición se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición del tampón de extracción de proteínas.

Reactivo	Concentración (mM)
MOPS	30
EDTA-Na	5
DTT	10
Ácido ascórbico	1
PVP soluble	0,6% (p/v)

Se homogeneizaron 0,5 g de material congelado en 1mL de mezcla extractora preparada en el momento [(14 ml de TE, 10 μ l de PMSF 200 mM, 1 ml de *cocktail* inhibidor de proteasas (cat. P2714, Sigma, USA; preparado en 10 ml de H₂O Mili-RO)]. En el caso de partes aéreas y para los extractos de raíz se utilizó 0,5 ml. Tras su

centrifugación a 14.000 xg durante 15 min a 4 °C, el sobrenadante se conservó a -80 °C en varias alícuotas de único uso.

La concentración de proteínas de los extractos fue determinada por el método Bradford (reactivo Bio-Rad Protein Assay), siguiendo instrucciones del fabricante. La medida de la absorbancia, a 595 nm, se realizó en un lector de placas (Synergy HT Biotek, Winooski, VT, USA). Para confirmar la cantidad de proteínas de cada muestra se separaron las proteínas de los extractos mediante electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 % y posterior tinción con azul de Coomassie (Laemmli, 1970).

Tinción de actividad glutatión reductasa (GR): a actividad de GR se determinó mediante una electroforesis en condiciones no desnaturizantes en gel de poliacrilamida al 12 %, siguiendo el protocolo descrito por Sobrino-Plata et al. (2009). La cantidad de proteína para la carga del gel fue de 15 µg y 5 µg de parte aérea y raíz respectivamente. La presencia de GR fue detectada siguiendo el procedimiento de Kaplan (1968) con pequeñas modificaciones: los geles fueron incubados en solución de tinción para GR (Tris-HCl 250 mM pH 7,5 suplementado 0,2 mg/ml de bromuro de azul de tiazolil tetrazolio (MTT); 0,2 mg/ml; 2,6-diclorofenol indofenol 0,2 mg/ml, NADPH 0,5 mM y 3,5 mM de glutatión oxidado; GSSG). Las bandas correspondientes a la actividad diaforasa fueron identificadas incubando un segundo gel en la solución de tinción sin GSSG.

Actividad ascorbato peroxidasa (APX): Para determinar la actividad de APX se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % en condiciones no desnaturizantes, siguiendo el protocolo descrito por Jiménez et al. (1998). Se utilizaron concentraciones totales de proteínas de 15 µg para parte aérea y 5 µg de raíz. Los geles se incubaron con ascorbato sódico 4 mM y H₂O₂ 2 mM en tampón fosfato sódico 50 mM a pH 7,0 durante 20 min. La presencia de APX fue detectada con una disolución de azul de nitrotetrazolio (NBT) 0,5 mM y TEMED 10 mM en tampón fosfato sódico 50 mM a pH 7,8.

Determinación de actividad peroxidasas (POX): El patrón de isoformas de POX presentes en los extractos de alfalfa fue obtenido por isoelectroenfoque (IEF) en

condiciones no desnaturizantes en gel de poliacrilamida al 6,5 %, preparadas con anfolitos cubriendo el rango de pH entre 3,0 y 10,0. La composición de los tampones y soluciones y condiciones de electroforesis utilizadas, fueron descritas por Ros-Barceló et al. (2002). La concentración total de carga de proteínas en el gel fue de 15 µg y 5 µg de parte aérea y raíz respectivamente. La actividad POX fue revelada incubando los geles en una solución compuesta por 4-metoxi-naftol (4-mn, 100 mM) y H₂O₂ (10 mM) en tampón de acetato de sodio 50 mM a pH 5,0.

Determinación de actividad NADPH oxidasa: Se realizaron geles PAGE no desnaturizantes de poliacrilamida al 12 %, donde se separaron 10 µg de proteína tanto de raíz como de parte aérea. El gel se reveló con el proceso descrito por Sagi y Fluhr (2001) con algunas modificaciones. Para el revelado de las bandas de NADPH, los geles se incubaron en una disolución 0,2 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂; 0,5 mg/ml de NBT; 0,5 mM y 0,2 mM de NADPH en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,4). Se mantuvieron en agitación durante toda la noche, a temperatura ambiente y en oscuridad.

Determinación de SOD: Para la detección de SOD se realizó el procedimiento descrito por Beauchamp y Fridovich (1971). Se utilizaron geles separadores con gradiente de poliacrilamida (12-17 %) y después de la electroforesis no desnaturizante se detectó la actividad enzimática incubando los geles en el tampón de revelado (descrito en la Tabla 3). Se generaron radicales O₂•⁻ *in situ* por la reacción de fotooxidación de la riboflavina.

Tabla 3. Composición tampón de revelado de SOD.

Reactivo	Concentración
Tampón Fosfato Potásico pH 7,8	
Na ₂ EDTA pH 8,0	0,5 M
Riboflavina	0,1 mM
NBT	0,12 mM*

*Es una tinción negativa, por tanto se verán bandas acromáticas sobre un fondo violáceo

5. INMUMODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN-BLOT

Mediante ensayo de Western-blot se detectaron GR, APX y tres proteínas de choque térmico (HSPs): sHSP17.6, sHSP17.7 y HSP70. Luego de separar las proteínas por electroforesis en gel desnaturizante (Laemmli, 1970), los geles fueron incubados en tampón de transferencia (Tris-HCl 48 mM, glicina 39 mM, SDS 1,3 mM y metanol 20 % a pH 8,3) durante 1 hora, y transferidos a una membrana de nitrocelulosa (BioTrace NT, Pall Corporation), usando el sistema de transferencia semi-seca de BioRad (Trans Blot SD Semy Dry Electrophoretic Transfer Cell) siguiendo los procedimientos y las condiciones establecidas por el fabricante. La membrana fue bloqueada con leche en polvo al 5% en TBS (Tris-HCl 200 mM a pH 7,5, NaCl 5 M), e incubada durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente, descritos en la Tabla 4.

Se realizó una segunda incubación de una hora con el anticuerpo secundario de cabra contra IgG de conejo conjugado con peroxidasa (GeneScript A00098, EE.UU.), a una titulación 1:2000 en TBS y leche desnatada en polvo 5 %. Para la detección de bandas se utilizaron reactivos quioluminiscentes (Lumisensor Chemiluminiscent HRP Substrate Kit, GeneScript, EE.UU.) y se reveló en un equipo ChemiDoc™ XRS (#170-8265) de Bio-Rad. La intensidad de las bandas fue calculada utilizando el software ImageLab™, siguiendo en todos los casos las instrucciones del fabricante.

Tabla 4. Condiciones de inmunoreactividad.

Anticuerpo primario	Carga (µg)		Titulación
	Hoja	Raíz	
α-GR	10	5	1:5000
α-APX	10	5	1:2000
α-HSP 17.6	10	10	1:1000
α-HSP 17.7	10	10	1:1000
α-HSP 70	10	10	1:3000

6. ANÁLISIS DE BIOTIOLES POR HPLC

La determinación de tioles no-proteicos o biotioles en las plántulas de alfalfa se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El primer paso es realizar la extracción de tioles. Para ello se homogeneizó 0,1 g de tejido congelado intacto con 300 μ L de HCl 0,1 N. Además se agregó a la muestra 15 μ L de N-acetilcisteína (N-AcCys) 5 mM como patrón interno. El homogeneizado se centrifugó dos veces a 14.000 xg durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un vial de vidrio boro-sílice para inyección, empleando el auto-inyector del equipo cromatográfico (inyección de 100 μ L de extracto ácido) en una columna Mediterránea SEA18 (5 μ m, 250 x 4,6 mm; Teknokroma, España) y se eluyó con un gradiente de disolvente A [98:2 agua desionizada MiliQ: acetonitrilo (v/v), además de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,01%] y disolvente B (2:98 agua desionizada MiliQ: acetonitrilo (v/v) más TFA 0,01%). El programa de gradiente, para B% de disolvente, fue: 2 min, 0%; 25 min, 25%; 26 min, 50%; 30 min, 50%; 35 minutos, 0%, 45 min, 0%. La cromatografía se realizó en un sistema cromatográfico líquido de alta resolución (HPLC Agilent 1200, Santa Clara, CA, EE.UU.). La detección de los tioles no-proteicos se realizó por derivatización post-columna con el reactivo de Ellman [1,8 mM DTNB (ácido 5,5-ditio-bis (2 nitrobenzoico) en tampón fosfato potásico 300 mM suplementado con EDTA 15 mM a pH 7,0]. La reacción se llevó a cabo en un reactor de 1,8 ml termostático a 37 °C (Rauser, 1991). El compuesto derivado, 5-mercapto-2-nitrobenzoato, tiene un máximo de absorbancia a 412 nm que se midió con un detector de array de fotodiodos (Ortega-Villasante et al., 2005). La cuantificación de los tioles presentes en la muestra se realizó integrando el área de pico en base al área de pico del patrón interno de N-AcCys.

7. ANÁLISIS DE IMÁGENES

El análisis densitométrico de las bandas de los geles y membranas se realizó con un software de análisis de imágenes ImageLab™ Software (BioRad, USA) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. En las figuras se muestran sólo los geles representativos de cada experimento, obtenidos a partir de tres ensayos independientes. Y sólo se destacan las diferencias más relevantes entre los

tratamientos. Se consideraron relevantes aquellos cambios donde el valor relativo normalizado respecto del control varió un $\pm 30\%$.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de todas las pruebas se realizó con el programa SPSS para Windows (versión 19.0, SPSS Inc., Chicago, USA) empleando el test de Duncan. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación típica, y fue considerado significativo el valor con $p < 0,05$.

9. PROTEÓMICA

Material vegetal y tratamientos: Las plántulas de *Medicago sativa* se trataron con Hg 10 y 30 μM durante 3 y 6 horas en el sistema de microescala y se separó la raíz para su posterior procesamiento.

Extracción y cuantificación de proteínas: En la extracción de proteínas se empleó un procedimiento basado en la utilización de fenol (adaptado de Wang et al., 2003). Para mejorar la calidad de los extractos de proteínas obtenidas y eliminar los contaminantes se usó el 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare). La cuantificación de las proteínas se realizó con el kit RC DC™ Protein Assay (BioRad 500-0121), basado en el método de Lowry, siguiendo instrucciones del fabricante. Las muestras se almacenaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

Marcaje de las muestras “Diferential gel electrophoresis”: El primer paso consistió en elaborar un diseño experimental en el que teniendo en cuenta el máximo de cantidad de proteínas a utilizar (150 μg por experimento). Para preparar el estándar interno de carga se tomaron 25 μg de cada muestra y se mezclaron en un mismo tubo, seguidamente se dividió en partes iguales entre todos los experimentos. Luego se reconstituyeron los CyDyes con dimetilformamida anhidra, según las instrucciones del fabricante. Posteriormente se ajustó el pH de las muestras a 8,5.

Electroforesis bidimensional: Se realizó un isoelectroenfoque (IEF) en la primera dimensión. Para ello, las muestras marcadas con CyDyes (150 μg de proteínas en total) se cargaron por “cup loading” en tiras de IPG (Immobiline DryStrip, GE Healthcare) de

poliacrilamida de 18 cm de longitud rehidratas, con un gradiente inmovilizado de pH 4,0 a 7,0. Las proteínas se enfocaron en una Unidad de IPGPhor (GE Healthcare), empleando el programa de voltajes mostrado en la Fig. 9.

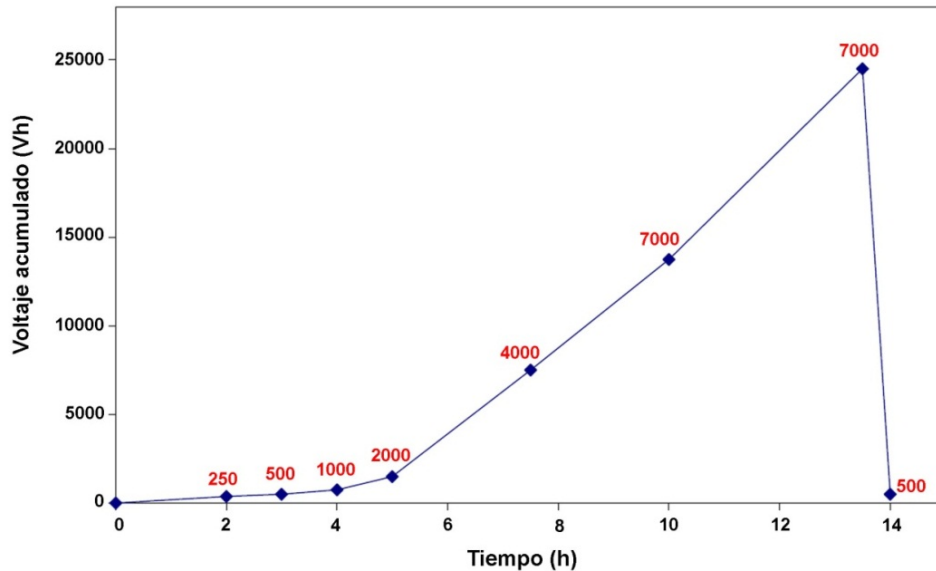


Figura 9. Protocolo de IEF utilizado para la correcta focalización de las proteínas del extracto vegetal, donde se muestra el voltaje acumulado durante la electroforesis. Los números en color rojo indican el voltaje correspondiente a cada paso del protocolo.

Luego del IEF se procedió a la separación en la segunda dimensión. Así, las tiras con las proteínas enfocadas fueron equilibradas en un primer paso con tampón de equilibrado (GE Healthcare Handbooks) al que se añadió ditiotretitol 1,5 %; y en un segundo paso con tampón de equilibrado que contenía iodoacetamida 2,5 %. Tras el proceso de equilibrado las tiras se colocaron sobre un gel de poliacrilamida 12 % de separación con SDS 0,1 % y fueron fijadas con un gel de agarosa 0,5 % de baja electroendosmosis. Para la electroforesis en el sistema Ettan DaltSix (GE Healthcare) se realizó un primer paso con un voltaje de 1 V/gel durante 30 min y posteriormente a 10 V durante 12 h.

Imágenes y análisis de datos: La tecnología DIGE utiliza uno de los fluorocromos, el Cy2 como marcador de una muestra estándar. La utilización de una muestra estándar, permitió extrapolar los resultados comparativos de gel a gel, reduciendo las diferencias debidas a las variaciones por las condiciones experimentales. Las comparaciones entre geles, se llevó a cabo con el Software DeCyder 6.5 gracias a su módulo BVA del Servicio

de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid, donde se realizó la captura de imágenes con un equipo Typhoon (GE Healthcare). Este equipo detectó automáticamente cada una de las manchas correspondientes a las proteínas resueltas, y realizó los análisis comparativos, ofreciendo una medida ajustada de los cambios diferenciales en la abundancia de proteína.

Tinción convencional de geles: Luego del análisis de las imágenes se procedió a la tinción con nitrato de plata siguiendo un procedimiento compatible con espectrometría de masas (MALDI). En primer lugar los geles fueron fijados en una solución de metanol 50 %, ácido acético glacial 12 % y formaldehído 0,05 %. Tras varios lavados con etanol 35 %, y luego con agua destilada, se procedió a sensibilizar los geles durante 2 min en una disolución de tiosulfato de sodio 100 mM. Antes de añadir la disolución de nitrato de plata 0,2 % y formaldehído 0,076 %, se realizaron varios lavados con agua destilada para eliminar los restos de tiosulfato. Se incubó durante 20 min a temperatura ambiente para eliminar el exceso de AgNO_3 con varios nuevos lavados de agua destilada, y los geles se revelaron con una solución de carbonato de sodio 6 %, formaldehído 0,05 % y tiosulfato de sodio 0,004%. Para detener el revelado de los geles se retiró la disolución de revelado y se añadió una solución de ácido acético glacial al 1 %. Los geles se conservaron en esta solución a 4 °C hasta su uso.

Identificación de proteínas por espectrometría de masas: Según los datos obtenidos con el análisis de las imágenes, los spots de interés fueron picados y almacenados en agua MiliQ para su posterior análisis. Éste se realizó en la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid mediante huella peptídica y fragmentación de péptidos mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF).

CAPÍTULO 4. RESPUESTAS TEMPRANAS A CADMIO Y MERCURIO

CAPÍTULO 4. RESPUESTAS TEMPRANAS A CADMIO Y MERCURIO

Muchos de los componentes y procesos celulares pueden verse comprometidos cuando las plantas están expuestas a niveles moderados de Cd y Hg, siendo la inducción de estrés oxidativo, uno de los efectos tóxicos característicos. Se trataron plántulas de alfalfa durante 3, 6 y 24 h de exposición a distintas concentraciones de Cd o Hg para establecer la firma de estrés oxidativo, característica para cada metal tóxico (Sobrino-Plata et al., 2009), y así evaluar el efecto tóxico de los metales a tiempos cortos y analizar las respuestas fisiológicas en un sistema hidropónico microescala.

La caracterización de las respuestas tempranas de estrés puede permitir la identificación de los mecanismos celulares implicados en la tolerancia de las plantas a metales tóxicos. Esta información posibilitará identificar índices fisiológicos de estrés específicos para cada contaminante. Como parámetro inicial de toxicidad se determinó el crecimiento de las plántulas expuestas a los metales; en particular, el crecimiento de la raíz muy sensible a metales tóxicos (Ortega-Villasante et al., 2005). Además de analizar la actividad de algunas enzimas redox y la producción de peróxido de hidrógeno extracelular, como mecanismos de defensa de las plántulas a la exposición de los metales (Rellán et al., 2006; Sobrino-Plata et al., 2009; Ortega-Villasante et al., 2007).

Por otra parte, se conoce que las pequeñas proteínas de choque térmico sHSP17.6 y sHSP17.7 y la sHSP70 responden en plantas no sólo a los golpes de calor, sino también a diferentes tipos de estrés abiótico (Wang et al., 2003; Timperio et al., 2008). Asimismo, en un análisis transcriptómico de la respuesta temprana a Hg realizado en nuestro laboratorio se ha podido detectar la sobreexpresión de los genes que codifican varias sHSPs, particularmente a las primeras horas de tratamiento (Montero-Palmero et al., 2013). Por estas razones, se analizó la expresión de estas chaperonas mediante inmunodetección en raíces de las plántulas de alfalfa crecidas en el sistema a microescala.

Otra respuesta esperada en plantas luego de la exposición a metales pesados es la alteración en el metabolismo de los biotioles (Sobrino-Plata et al., 2009; Carrasco-Gil et

al., 2011). Tanto la síntesis de fitoquelatinas, como el balance GSH/GSSG juegan un importante rol en la detoxificación de metales (Cobbett y Goldsbrough, 2002; Noctor et al., 2011).

1. ÍNDICES DE ESTRÉS Y TOXICIDAD

Parámetros biométricos

El crecimiento de las plántulas de alfalfa se inhibió por su exposición al Cd y al Hg, como puede observarse en la Fig. 6, viéndose reflejado por una disminución en el tamaño de las plántulas, en relación a las control. En general, se observó un mayor efecto tóxico en los tratamientos con Hg, siendo mayor la inhibición del crecimiento a medida que aumentó la concentración y el tiempo de exposición al metal.



Figura 6. Fotografía de las plántulas de alfalfa sometidas a los distintos tratamientos.

Se apreció una drástica inhibición en la elongación de las raíces de alfalfa sobre todo a las 24 h de tratamiento con Hg 30 μ M, que alcanzó una inhibición de casi el 40% (Fig. 7). En cambio, la exposición a Cd provocó una inhibición máxima de crecimiento que no superó el 15 % (Fig. 7). No se apreció un efecto tóxico claro tras 3 h de tratamiento, salvo en la dosis más alta de Hg (30 μ M).

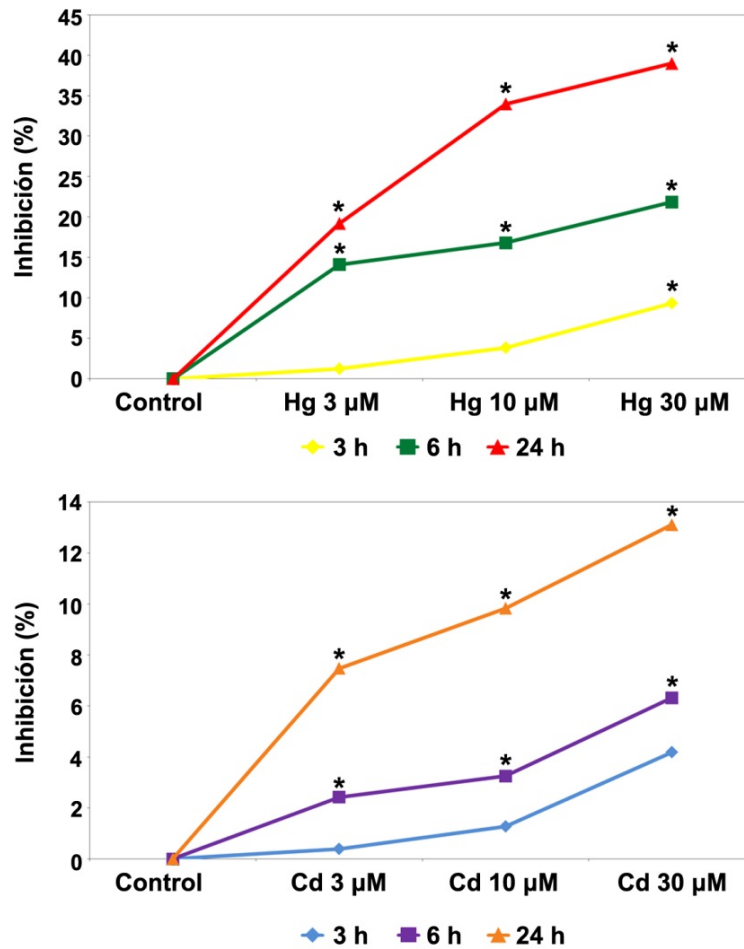


Figura 7. Inhibición del crecimiento (%) en plántulas de alfalfa tratadas con Cd o Hg (0, 3, 10 y 30 µM) a distintos tiempos. Los asteriscos indican que los valores medios significativamente diferentes respecto al control ($p < 0,05$). Las barras de error estándar son más pequeñas que los símbolos utilizados.

En cuanto a los síntomas visuales, el mayor efecto se observó sobre el crecimiento de la raíz, ya que tanto hipocotilo y cotiledones alcanzaron un tamaño similar al de las plántulas control, no observándose efectos sobre la apertura de los cotiledones. En dosis superiores a Hg 3 µM y tras exposiciones de más de 6 h se apreció que las raíces están ennegrecidas, siendo más finas y blandas que las de las plántulas control o tratadas con Cd. El ennegrecimiento no fue tan significativo con Cd, aunque sí se observó en a las 24 h de exposición en plántulas tratadas con Cd 30 µM. Estos efectos podrían reflejar un efecto negativo en la elongación de las células radiculares en las condiciones de mayor toxicidad.

Concentración de metales

Existen diferencias en la acumulación de cada metal en las plántulas (ver Fig. 8). El Hg se acumuló rápidamente durante las primeras horas de exposición a 3 y 6 h. A las 24 h se observó que la acumulación de Cd fue mucho menor que la de Hg, detectándose una concentración de ligeramente superior a 30 nmol/gPF de Cd, frente a los aproximadamente 200 nmol/gPF de Hg (Fig. 8).

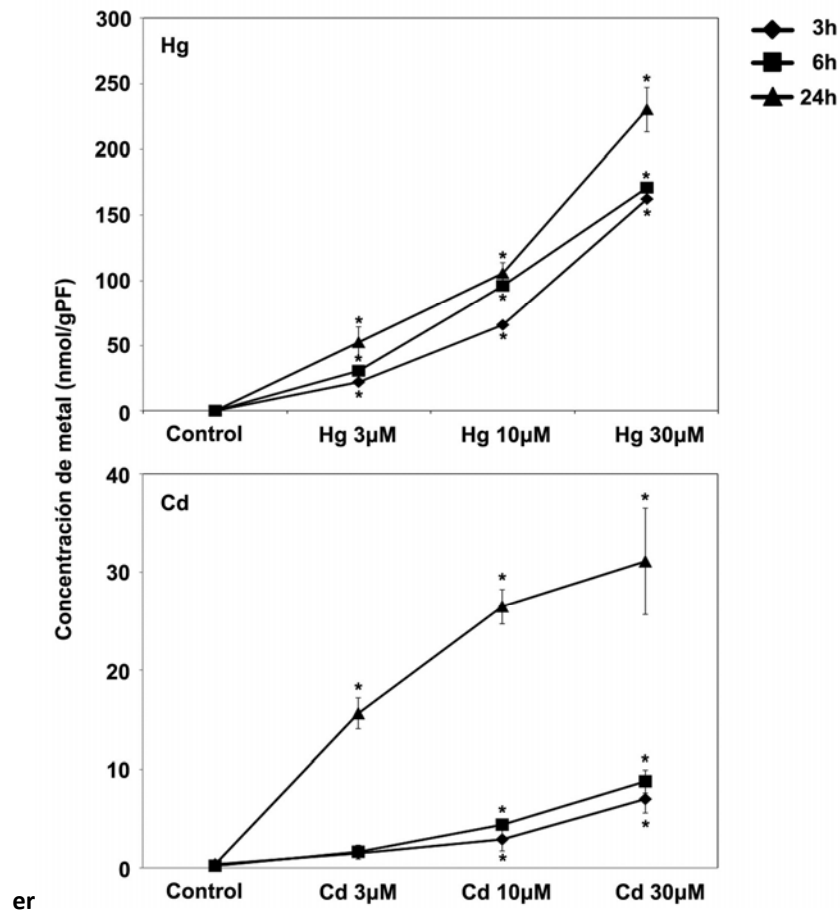


Figura 8. Concentración de metales (nmol/gPF) en plántulas de alfalfa por peso fresco (PF), tratadas con Cd o Hg (3, 10 y 30 µM) durante 3, 6 y 24 h. Los asteriscos indican que los valores medios son significativamente diferentes al control ($p < 0,05$). Las barras de error estándar son más pequeñas que los símbolos utilizados.

2. ESTRÉS OXIDATIVO

Producción de H₂O₂ extracelular

En presencia de metales, como el Cd y Hg, las células de las plantas son capaces de acumular H₂O₂ extracelular (Ortega-Villasante et al., 2007), siendo posible cuantificar

su producción mediante la fluorescencia del Amplex Red. Para ello se emplearon segmentos apicales de raíces de plántulas de alfalfa (0,5-1,0 cm) que fueron tratadas con Cd o Hg a distintos tiempos.

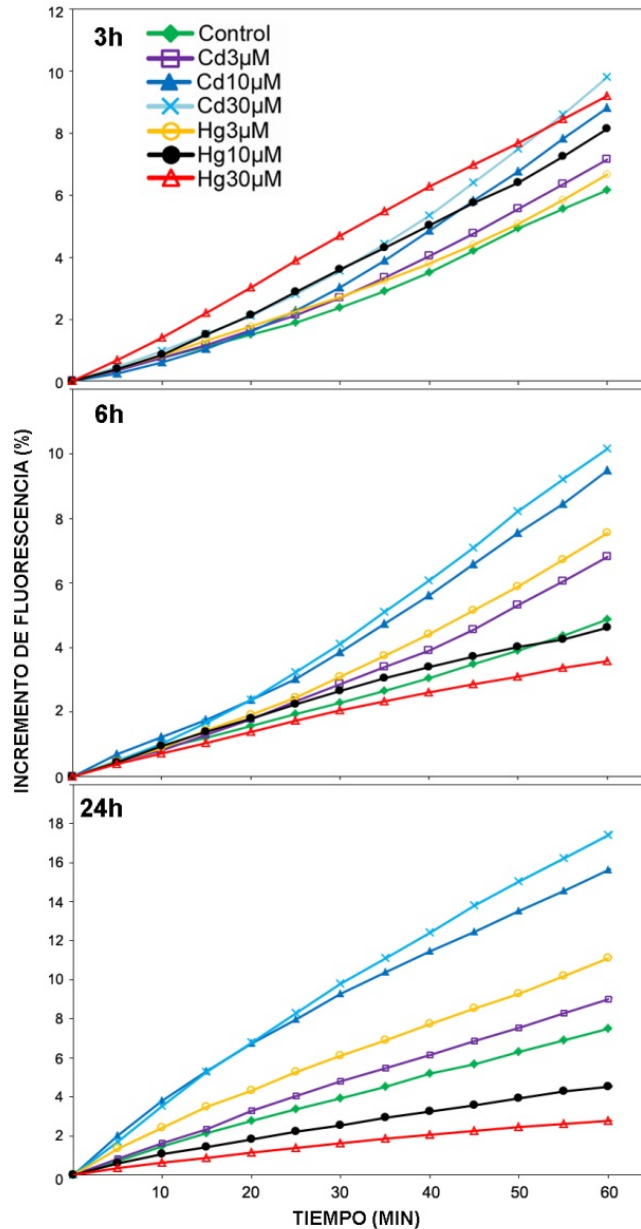


Figura 9. Producción relativa de H_2O_2 extracelular, medido por fluorescencia del Amplex Red, en plántulas de alfalfa tratadas con Cd o Hg (0, 3, 10 y 30 μM) durante 3, 6 y 24 h. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Con la exposición de 3 h a Cd y Hg se observó un aumento de la fluorescencia respecto a las plántulas control (Fig. 9). Siendo el tratamiento de Hg 30 μM el que produjo mayor nivel de fluorescencia. La generación de H_2O_2 siguió aumentando en plántulas expuestas a Cd durante 6 h. Sin embargo, con Hg ocurrió lo contrario: hubo una

disminución de la fluorescencia respecto a las plántulas control, especialmente con Hg 30 μM . A las 24 h se apreció que la fluorescencia incluso disminuyó a valores por debajo de las plántulas control. En cambio, la fluorescencia aumentó progresivamente en las plántulas expuestas a Cd.

Enzimas redox en cotiledones

Como puede observarse en la Fig. 10, la actividad de APX en cotiledones aumentó en las plántulas expuestas durante 3 h a Cd o Hg 3 y 10 μM (Fig. 10, línea b). En cambio, a partir de las 6 h de exposición la actividad de APX fue similar para los distintos tratamientos, efecto que se acentuó a las 24 h (Fig. 10, líneas g y l). Por tanto; parece producirse una activación temprana y transitoria de APX en presencia de Cd o Hg. En cuanto a la cantidad de proteína APX, determinada por inmunodetección, no se apreciaron cambios reseñables en ningún tratamiento (Fig. 10, líneas c, h y m). En cuanto a la actividad de GR, se observó una activación a las 3 h de tratamiento, con Cd 10 y 30 μM y Hg 3 μM (Fig. 10, línea c), efecto que se atenuó a medida que se prolongaron las horas de exposición a los metales. En concreto se apreció una disminución importante de la actividad de GR en las dosis más altas de Cd y Hg (30 μM ; Fig. 10, línea n). En cuanto a la proteína GR, no se detectaron cambios significativos en su contenido bajo ningún tratamiento (Fig. 10, líneas e, j y o).

Además del análisis de las enzimas antioxidantes del ciclo ascorbato-GSH se estudió la actividad de peroxidasas (POXs), tras separación electroforética mediante isoelectroenfoque (rango pH 7,0 a 10,0), y NADPH-oxidasa de membrana plasmática tras electroforesis no-desnaturalizante en gel de poliacrilamida (Fig. 11). Si bien se pudieron detectar distintas bandas de actividad enzimática, correspondientes a distintas isoformas de POX y NADPH-oxidasa, no se apreciaron cambios reproducibles en la actividad de ninguna de las dos actividades enzimáticas como consecuencia de los tratamientos con Cd o Hg a los distintos tiempos de exposición.

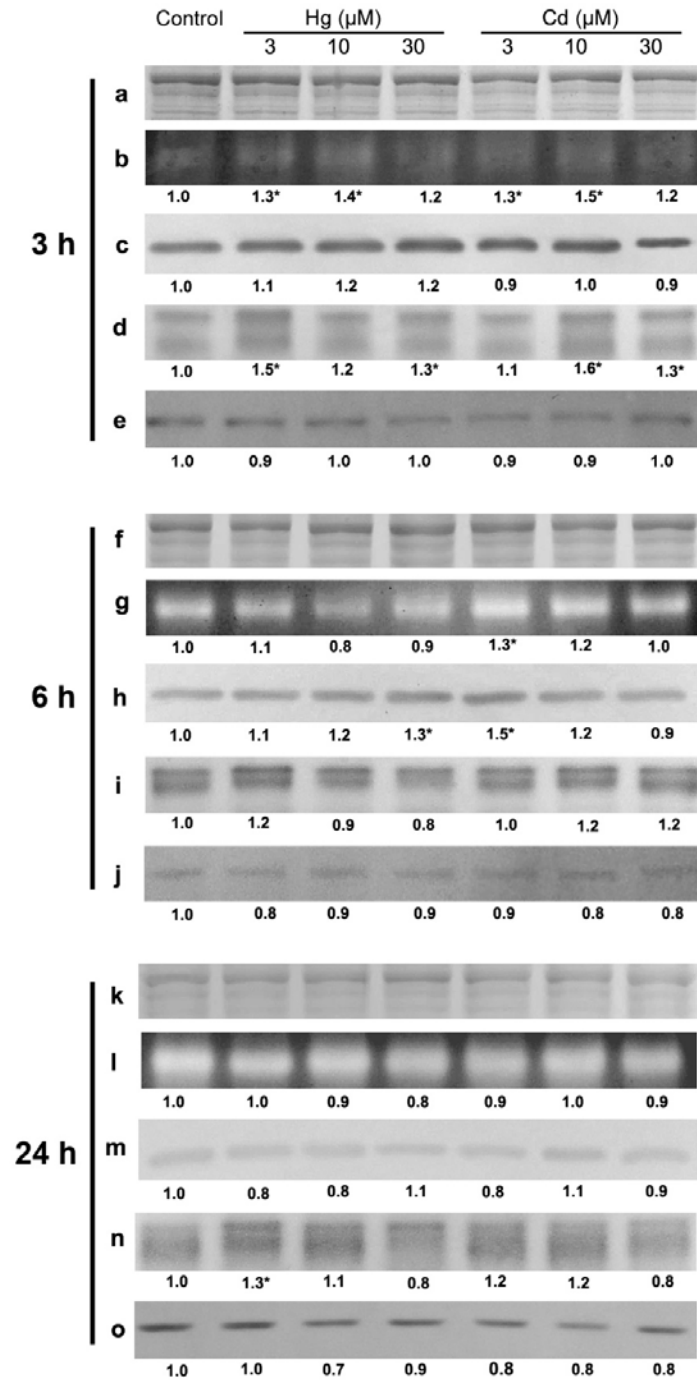


Figura 10. Actividad de ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR) *in gel* de cotiledones de plántulas tratadas con Cd o Hg (0, 3, 10 y 30 μM) durante 3, 6 y 24 h. **a, f, k**, tinción azul de Coomassie para demostrar igualdad en la carga de todas las muestras. **b, g, y l**, actividad de APX. **c, h, m**, inmunodetección de APX por Western-blotting. **d, i, n**, actividad de GR. **e, j, o**, inmunodetección de GR por Western-blotting. Los números indican el cambio relativo de intensidad de las bandas, los asteriscos marcan los cambios superiores a $\pm 30\%$.

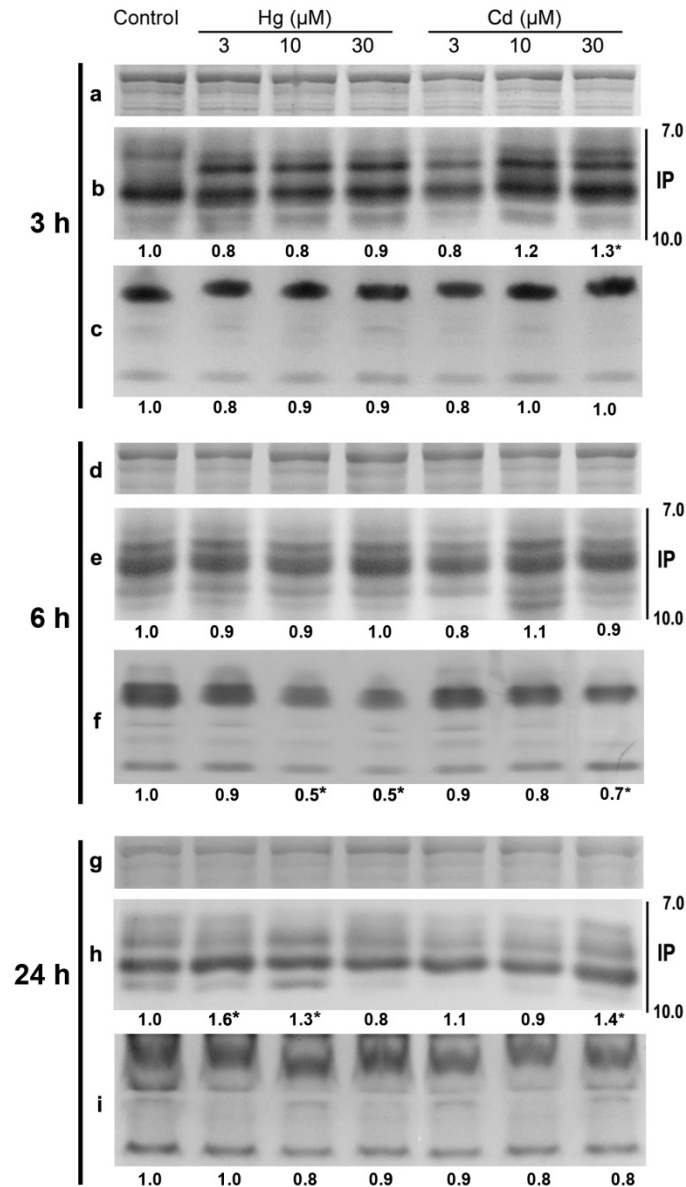


Figura 11. Actividad de peroxidasas (POX) y NADPH-oxidasa *in gel* de cotiledones de plántulas de alfalfa tratadas con Hg o Cd (0, 3, 10 y 30 μM). **a, f, k**, tinción azul de Coomassie para demostrar igualdad en la carga de todas las muestras. **b, e, h**, actividad de POX. **c, f, i**, actividad de NADPH-oxidasa. Los números indican el cambio relativo de intensidad de las bandas, los asteriscos marcan los cambios superiores a $\pm 30\%$.

Enzimas redox en raíces

En las raíces de las plántulas, el comportamiento de las enzimas redox fue diferente al observado en los cotiledones, previsiblemente por ser el órgano que estaba en mayor contacto con los metales aplicados en la disolución nutritiva. La actividad APX se vio afectada negativamente por el tratamiento con Hg, observándose una disminución progresiva de la actividad a mayores dosis de Hg y a medida que aumentan las horas

de exposición al mismo. Ya a las 3 h se detectó una inhibición severa de la actividad de APX con Hg 30 μ M (Fig. 12, línea b), que siguió disminuyendo a las 6 y 24 h de exposición (Fig. 12, líneas g y l). Además, esta inhibición se observó también en Hg 10 μ M a las 6 y 24 h (Fig. 12, líneas d y f). En cuanto a los tratamientos con Cd, sólo se observó un pequeño aumento de actividad respecto al control a las primeras horas de tratamiento y luego se mantuvo a niveles similares a las plantas control (Fig. 12, líneas b, d y f). El tratamiento con Hg también causó una severa inhibición de la actividad de GR en todas las dosis probadas y tiempos de exposición, si bien de un modo mucho más acusado que para la actividad de APX (Fig. 12, líneas d, i y n). A las 3 h de exposición a Hg 30 μ M se detectó la completa inhibición de la actividad de GR, siendo también completa a las 6 h de tratamiento con Hg 10 μ M. A las 24 h sólo las plantas crecidas con Hg 3 μ M tuvieron una mínima actividad GR (la décima parte de la detectada en plántulas control; Fig. 12 línea n). La exposición al Cd provocó en cambio un aumento de la actividad de GR, siendo mayor a las dosis más altas y tiempos de exposición más prolongados (Fig. 12, líneas d, i y n). La máxima actividad se detectó a las 6 h de exposición con Cd 10 y 30 μ M (Fig. 12, líneas i y n). Estos cambios en los niveles de actividad se produjeron mayoritariamente sin ningún tipo de alteración detectable en los niveles de proteína GR (Fig. 12, líneas e, j y o). Sin embargo, cabe destacar, que en los tratamientos de Hg 10 y 30 μ M se observó un aumento significativo en la cantidad de GR sobre todo más intenso a las 24 h de tratamiento (Fig. 12, líneas i y n).

Al igual que lo observado con la actividad de APX y GR de raíces, la actividad de POXs disminuyó más acusadamente en plántulas tratadas con Hg que en las crecidas con Cd (Fig. 13, líneas b, e y h). Además, este efecto negativo se detectó principalmente en la dosis más alta, en la que se apreció cambios en el patrón de bandas. De igual forma, se correspondió una relación de mayor efecto a mayor concentración del metal y mayores tiempos de exposición. A las 3 h de tratamiento con Hg se apreció una disminución de la actividad de POXs, que se mantuvo a las 6 y 24 h (Fig. 13, líneas b, e y h). En la Fig 13 (línea h) se puede observar que la actividad de POXs disminuyó fuertemente tras 24 h de tratamiento con Hg 30 μ M. Los tratamientos con Cd no

produjeron cambios significativos en la actividad de POX, si bien se apreció un ligero aumento tras 6 h de exposición a Cd 10 y 30 μM (Fig. 13, línea e).

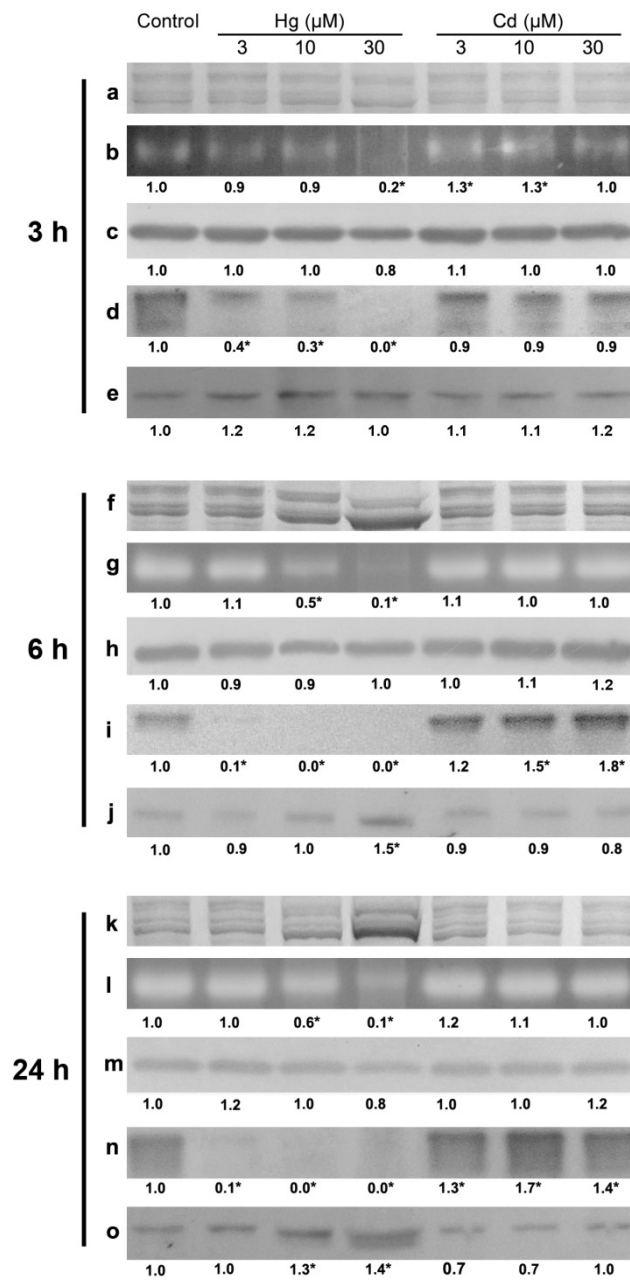


Figura 12. Actividad de ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR) *in gel* de raíces de plántulas de alfalfa tratadas con Cd o Hg (0, 3, 10 y 30 μM) durante 3, 6 y 24 h. **a, f, k**, tinción azul de Coomassie para mostrar igualdad en la carga de todas las muestras. **b, g, l**, actividad de APX. **c, h, m**, inmunodetección de APX. **d, i, n**, actividad de GR. **e, j, o**, inmunodetección de GR. Los números indican el cambio relativo de intensidad de las bandas, los asteriscos marcan los cambios superiores a $\pm 30\%$.

La actividad NADPH-oxidasa aumentó notablemente en las plántulas tratadas con Cd 30 μM después de sólo 3 horas (Fig. 13, línea c). Esta activación se mantuvo después

de 6 h, y disminuyó ligeramente tras 24 h de exposición a Cd (Fig. 13, línea i). Por otro lado, los tratamientos con Hg causaron una disminución severa de la actividad de NADPH-oxidasa, observándose cambios en la movilidad de las diferentes isoformas, que fue tanto más acusado cuanto mayor la dosis y el tiempo de exposición a Hg (Fig. 13, líneas c y f). En concreto, se apreció la completa inhibición de la actividad de NADPH-oxidasa en plántulas expuestas a Hg 30 μ M durante 24 h (Fig. 13, línea i).

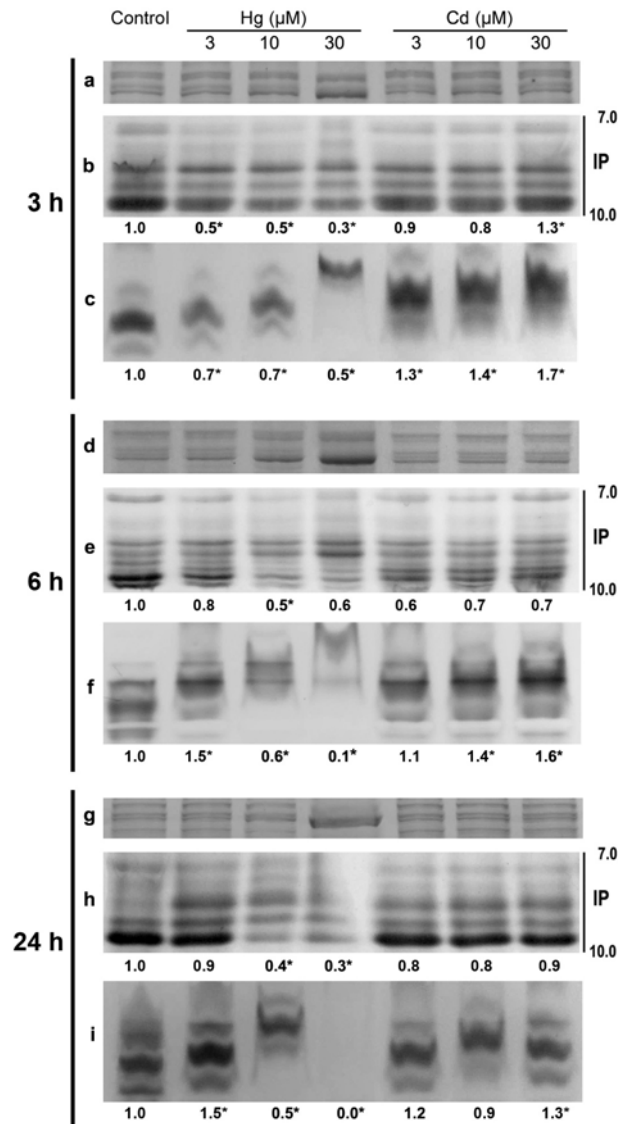


Figura 13. Actividad de peroxidasas (POX) y NADPH-oxidasa (NADPH) *in gel* de raíces de plántulas de alfalfa tratadas con Cd o Hg (0, 3, 10 y 30 μ M). **a, f, k**, tinción azul de Coomassie para demostrar igualdad en la carga de todas las muestras. **b, e, h**, actividad de POX. **c, f, i**, actividad de NADPH. Los números indican el cambio relativo de intensidad de las bandas, los asteriscos marcan los cambios superiores a \pm 30%.

3. MECANISMOS DE TOLERANCIA

Inmunodetección de proteínas de choque térmico (HSPs)

En la Fig. 14 se puede observar las tres proteínas de choque térmico que fueron analizadas en las raíces de las plántulas de alfalfa tratadas con Cd y Hg: dos proteínas de bajo peso molecular, sHSP17.6 Clase I y sHSP17.7 Clase II; inducibles fuertemente por choque térmico, y una proteína HSP70, de expresión más constante. La exposición de las plántulas de alfalfa produjo cambios apreciables en la acumulación de las proteínas sHSP17.6 y sHSP17.7. En cambio, la HSP70 no mostró cambios aparentes en su expresión respecto a las plántulas no tratadas a los diferentes tiempos en los que se recolectaron las plántulas de alfalfa (Fig. 14, líneas b, f y j).

Con sólo 3 h de exposición a Hg, especialmente en las dosis de 10 y 30 μM , se observó una sobreexpresión acusada de la sHSP17.6 y sHSP17.7, con todas las dosis utilizadas (Fig. 14, líneas c y d). A partir de 6 h también se indujeron ambas proteínas en plántulas tratadas con Hg 3 μM , mientras que la expresión de la sHSP17.7 disminuyó paulatinamente en las expuestas a 30 μM . Así, con Hg 30 μM el contenido de sHSP17.7 no tuvo un aumento significativo respecto a las plántulas control, tanto a las 6 como a las 24 h de exposición al metal (Fig. 14, líneas g y k). Cuando se sometieron a estrés por Cd sólo se apreció un aumento en la cantidad de sHSP17.6 a las 3 h (Fig. 14, línea d), mientras que a las 6 h de tratamiento con Cd la cantidad de sHSP17.6 y sHSP17.7 aumentó en paralelo a la mayor dosis del metal (Fig. 14, líneas g y h). A las 24 h se atenuó el nivel de expresión de la sHSP17.7 (Fig. 14, línea k), si bien aumentó con el tratamiento de Cd 30 μM . Por el contrario, el nivel de expresión de la sHSP17.6 fue muy superior al mostrado por la sHSP17.7 (prácticamente triplicándose para la misma dosis; Fig. 14, líneas k y l). Esto es, posiblemente la sobreexpresión de sHSP17.6 fue más tardía que la de sHSP17.7, mostrando una fuerte expresión particularmente en los tratamientos con las dosis más altas de Cd.

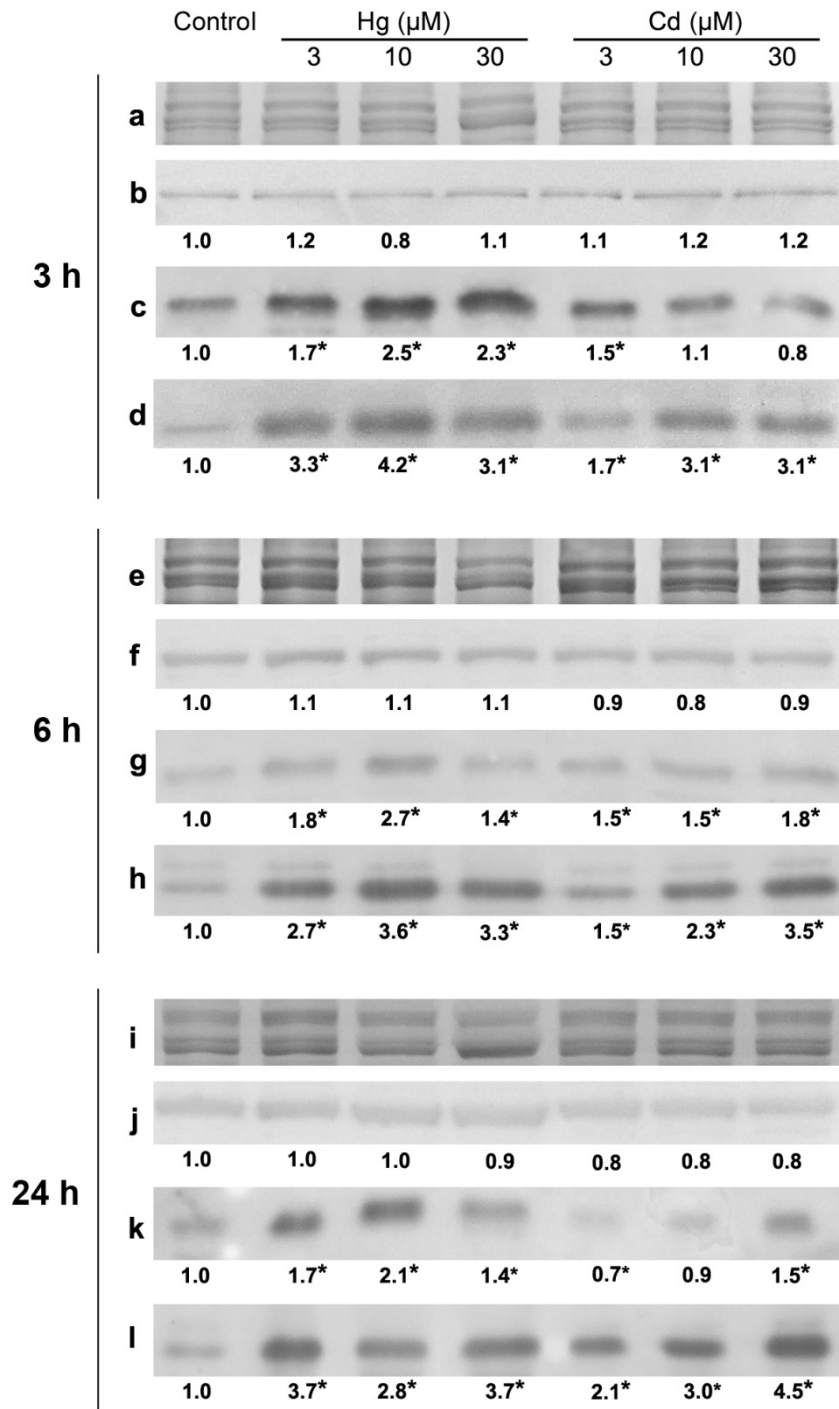


Figura 14. Detección inmunoquímica de varias clases de HSPs por Western-Blot en las raíces de las plántulas de alfalfa expuestas a Cd o Hg (0, 3, 10 y 30 μM) durante 3, 6 y 24 h. **a**, tinción azul de Coomassie para mostrar igual carga de proteínas. **b, f, j** HSP70. **c, g, k** sHSP17, 7. **d, h, l** sHSP17, 6. Los números indican el cambio relativo de intensidad de las bandas, los asteriscos marcan los cambios superiores a ± 30%.

Análisis de biotioles

Fueron identificados varios biotioles en los cotiledones de las plántulas de alfalfa expuestas a Cd o Hg: cisteína (Cys), glutatión (GSH) y homoglutatión (hGSH), no apreciándose cambios significativos en sus concentraciones (Tabla 5), si bien las concentraciones fueron superiores a las mostradas en raíces (Tabla 6).

Tabla 5. Concentración de biotioles (nmol/g peso fresco) en cotiledones de plántulas de alfalfa tratadas con Cd o Hg (0, 3, 10 y 30 μM) durante 3, 6 y 24h. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos ni tiempos de toma de muestra con $p < 0,05$.

	Dosis (μM)	BIOTIOLES				
		Cys	GSH	hGSH	PCs	
CADMIO	3h	Control	85,8 ^a \pm 0,1	46,5 ^a \pm 1,7	95,0 ^a \pm 0,4	n.d.
		Cd 3 μM	96,4 ^a \pm 14,1	40,3 ^a \pm 8,7	118,8 ^a \pm 20,9	n.d.
		Cd 10 μM	117,3 ^a \pm 13,3	51,5 ^a \pm 11,6	156,9 ^a \pm 15,8	n.d.
		Cd 30 μM	103,4 ^a \pm 8,8	56,9 ^a \pm 9,0	140,1 ^a \pm 11,5	n.d.
	6h	Control	108,9 ^a \pm 5,4	48,2 ^a \pm 5,2	171,9 ^a \pm 4,6	n.d.
		Cd 3 μM	105,7 ^a \pm 5,0	38,1 ^a \pm 2,8	166,3 ^a \pm 10,3	n.d.
		Cd 10 μM	105,6 ^a \pm 8,8	42,4 ^a \pm 3,7	174,9 ^a \pm 10,9	n.d.
		Cd 30 μM	120,6 ^a \pm 9,9	38,7 ^a \pm 1,1	151,4 ^a \pm 1,5	n.d.
	24h	Control	85,7 ^a \pm 5,0	48,2 ^a \pm 5,2	171,9 ^a \pm 4,6	n.d.
		Cd 3 μM	86,2 ^a \pm 1,1	38,1 ^a \pm 2,8	166,3 ^a \pm 10,3	n.d.
		Cd 10 μM	97,7 ^{ab} \pm 2,9	42,4 ^{ab} \pm 3,7	174,9 ^a \pm 10,9	n.d.
		Cd 30 μM	102,8 ^b \pm 1,2	38,7 ^a \pm 1,1 ^a	151,4 ^a \pm 1,5	n.d.
MERCURIO	3h	Control	132,7 ^a \pm 2,0	84,7 ^a \pm 0,5	160,6 ^a \pm 0,5	n.d.
		Hg 3 μM	109,8 ^a \pm 17,2	53,9 ^a \pm 9,6	178,6 ^a \pm 4,5	n.d.
		Hg 10 μM	111,9 ^a \pm 12,4	58,4 ^a \pm 0,2	141,5 ^a \pm 4,4	n.d.
		Hg 30 μM	99,7 ^a \pm 3,9	47,7 ^a \pm 4,1	158,1 ^a \pm 8,0	n.d.
	6h	Control	108,9 ^a \pm 5,4	48,2 ^a \pm 5,2	171,9 ^a \pm 4,6	n.d.
		Hg 3 μM	114,1 ^a \pm 5,0	52,6 ^a \pm 7,3	158,1 ^a \pm 5,7	n.d.
		Hg 10 μM	117,7 ^a \pm 11,5	67,8 ^a \pm 5,0	175,2 ^a \pm 19,5	n.d.
		Hg 30 μM	110,8 ^a \pm 14,8	59,7 ^a \pm 4,8	165,9 ^a \pm 4,6	n.d.
	24h	Control	140,2 ^a \pm 25,4	37,0 ^a \pm 10,6	116,2 ^a \pm 1,6	n.d.
		Hg 3 μM	120,4 ^a \pm 4,9	32,1 ^a \pm 2,3	121,9 ^a \pm 17,2	n.d.
		Hg 10 μM	115,0 ^a \pm 12,0	34,5 ^a \pm 3,3	131,1 ^a \pm 11,8	n.d.
		Hg 30 μM	126,2 ^a \pm 6,7	34,1 ^a \pm 5,1	122,5 ^a \pm 14,6	n.d.

n.d.: no detectado

Por otra parte, sí se observó cambios significativos en raíces debidos a los tratamientos con metales, siendo lo más característico la acumulación de fitoquelatinas (PCs) en plántulas tratadas con Cd y Hg. Se apreció asimismo una ligera disminución en los

niveles de GSH y hGSH, fundamentalmente en las dosis más altas de Cd y Hg a los distintos tiempos de exposición. Significativamente, el tratamiento de Hg 30 μ M provocó una disminución extrema en el contenido de biotioles sobre todo en los tiempos más prolongados (24 h), siendo casi indetectables Cys, GSH, hGSH ni PCs, (Tabla 6, Fig. 15).

Tabla 6. Concentración de tioles (nmol/g peso fresco) en raíces de plántulas de alfalfa tratadas con Cd o Hg (0, 3, 10 y 30 μ M) durante 3, 6 y 24h. Diferentes letras en superíndices denotan diferencias significativas entre los tratamientos con $p < 0,05$.

	Dosis (μ M)	BIOTIOLES				
		Cys	GSH	hGSH	PCs	
CADMIO	3h	Control	70,4 ^a \pm 8,3	48,0 ^a \pm 3,4	60,1 ^a \pm 4,1	nd
		Cd 3 μ M	40,6 ^a \pm 4,9	35,2 ^b \pm 1,5	36,9 ^a \pm 6,9	nd
		Cd 10 μ M	50,8 ^a \pm 0,3	35,5 ^b \pm 1,6	42,8 ^a \pm 2,2	nd
		Cd 30 μ M	56,8 ^a \pm 4,0	32,5 ^b \pm 0,9	41,5 ^a \pm 3,8	nd
	6h	Control	76,2 ^a \pm 1,9	43,2 ^a \pm 2,2	70,4 ^a \pm 2,6	nd
		Cd 3 μ M	65,9 ^b \pm 2,1	33,7 ^b \pm 1,3	52,3 ^b \pm 1,2	nd
		Cd 10 μ M	70,7 ^{ab} \pm 2,8	32,5 ^b \pm 0,1	48,1 ^b \pm 1,6	nd
		Cd 30 μ M	77,8 ^a \pm 1,0	35,0 ^b \pm 0,5	43,2 ^b \pm 3,9	nd
	24h	Control	46,4 ^a \pm 0,3	49,2 ^a \pm 0,9	88,1 ^a \pm 0,6	nd
		Cd 3 μ M	33,2 ^b \pm 0,5	33,0 ^b \pm 0,8	46,1 ^b \pm 0,7	< 10
		Cd 10 μ M	42,8 ^{ac} \pm 1,0	35,6 ^b \pm 1,6	59,5 ^c \pm 0,8	44,9 \pm 3,6
		Cd 30 μ M	41,7 ^c \pm 1,4	48,0 ^a \pm 1,6	58,0 ^c \pm 3,2	74,7 \pm 6,5
MERCURIO	3h	Control	71,1 ^a \pm 8,2	32,0 ^a \pm 3,7	62,6 ^a \pm 1,3	n.d.
		Hg 3 μ M	62,4 ^a \pm 7,9	28,3 ^a \pm 7,7	41,1 ^a \pm 6,9	n.d.
		Hg 10 μ M	74,2 ^a \pm 4,2	20,6 ^a \pm 1,7	38,0 ^b \pm 2,4	n.d.
		Hg 30 μ M	70,1 ^a \pm 24,5	34,5 ^a \pm 28,1	94,2 ^a \pm 81,3	n.d.
	6h	Control	76,2 ^a \pm 1,9	43,2 ^a \pm 2,2	70,4 ^a \pm 2,6	n.d.
		Hg 3 μ M	74,5 ^a \pm 2,7	25,0 ^b \pm 2,6	48,7 ^{ab} \pm 2,2	n.d.
		Hg 10 μ M	59,9 ^a \pm 10,8	24,0 ^b \pm 1,1	36,1 ^a \pm 7,6	n.d.
		Hg 30 μ M	54,3 ^a \pm 10,8	22,1 ^b \pm 1,4	< 10	n.d.
	24h	Control	50,2 ^a \pm 3,6	41,3 ^a \pm 5,4	80,4 ^a \pm 4,8	n.d.
		Hg 3 μ M	43,9 ^{ab} \pm 5,6	26,6 ^{ab} \pm 1,9	54,4 ^b \pm 5,6	84,4 \pm 6,2
		Hg 10 μ M	27,9 ^c \pm 3,2	23,5 ^b \pm 3,9	33,0 ^b \pm 6,6	37,1 \pm 1,0
		Hg 30 μ M	< 10	< 10	< 10	< 10

n.d.: no detectado

En la Fig. 15 se presentan los perfiles de los biotioles detectados en las raíces de las plántulas de alfalfa a las 24 h de tratamiento. Se puede observar la disminución de GSH y hGSH que se produjo conforme aumentó la concentración de metal y la aparición de fitoquelatinas en los tratamientos de Hg y Cd.

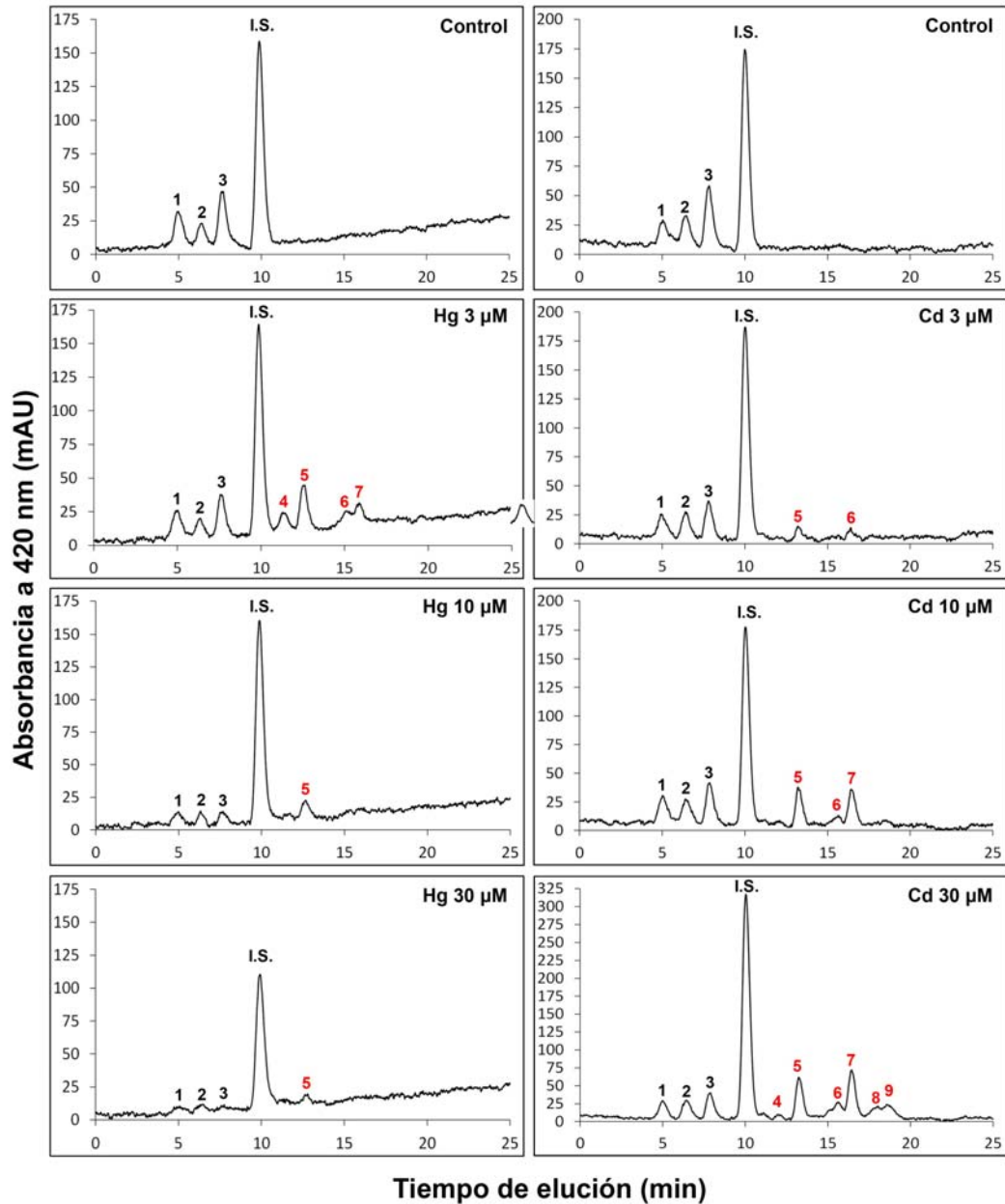


Figura 15. Perfiles de biotoles en raíces de plántulas de *M. sativa* tratadas durante 3, 6 y 24 h con Hg (0, 3, 10 y 30 μM) o Cd (0, 3, 10 y 30 μM). Los picos se identificaron mediante la elución de estándares comerciales disponibles. La concentración se calculó mediante la integración del estándar interno (I.S.), N-acetil-cisteína (N-AcCys). 1: Cys, 2: GSH, 3: hGSH; 4: PC2, 5: hPC2, 6: PC3, 7: hPC3, 8: PC4, 9: hPC4.

CAPITULO 5. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA RESPUESTA DE ALFALFA A Cd y Hg

CAPITULO 5. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA RESPUESTA DE ALFALFA A Cd Y Hg: SUPRESIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DE ETILENO Y ALTERACIÓN DEL METABOLISMO DE BIOTIOLES.

Experimentos desarrollados en nuestro laboratorio para establecer el perfil transcriptómico de la respuesta temprana a Hg en plántulas de alfalfa crecidas en el sistema hidropónico de microescala, permitieron identificar al etileno como una fitohormona que media en la percepción de estrés (Montero-Palmero et al., 2013). El etileno puede modular la respuesta antioxidante, por lo que se realizaron ensayos en los que se bloqueó la señalización de etileno utilizando el inhibidor 1-metilciclopropeno (1-MCP). Plántulas de alfalfa fueron preincubadas con 1-MCP 10 μ M y expuestas a Cd y Hg, para confirmar que plantas insensibles a etileno tienen una respuesta atenuada a diferentes metales tóxicos.

En los ensayos descritos en el anterior capítulo de esta memoria, se puede apreciar que la enzima GR y la concentración de biotioles (GSH, hGSH y fitoquelatinas) se alteraban por el tratamiento con metales. Los biotioles juegan un papel clave en la tolerancia a metales desde el punto de vista de sus propiedades antioxidantes (May et al., 1998; Jozefczak et al., 2012). Para comprobar el papel que juegan los biotioles en la tolerancia a metales, se procedió a reducir el contenido de GSH/hGSH utilizando butionina sulfoximina (BSO), potente inhibidor de la enzima γ -glutamyl-cisteína-sintetasa (γ -ECS), primer paso de la síntesis de estos biotioles (Griffith y Meister, 1979). El tratamiento de plantas de alfalfa con BSO 1 mM causa una disminución del contenido de GSH/hGSH, asociado a un nivel moderado de estrés oxidativo (Ortega-Villasante et al., 2005). Por tanto, es previsible que la presencia de niveles moderados de Cd y Hg provoque cambios relevantes en el estado redox celular cuando se tiene disminuida la capacidad antioxidante en plantas con concentraciones bajas de GSH/hGSH.

Los experimentos descritos en el capítulo anterior permitieron establecer los umbrales de toxicidad a Cd y Hg, y así determinar una concentración en la que se observaran cambios significativos por el tratamiento con metales. Para limitar daños celulares extremos y evitar la observación de síntomas de envenenamiento se optó por utilizar

una dosis de Cd 30 μM , mientras que la concentración de Hg se redujo a 3 μM . Se estudiaron diversos parámetros de estrés a 6 y 24 h de tratamiento, con el objeto de analizar la interferencia de la señal de etileno y la modificación del metabolismo del GSH en la respuesta de la alfalfa a los metales pesados.

1. SUPRESIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DE ETILENO

Análisis de parámetros biométricos

La exposición de plántulas de alfalfa a Cd y Hg produjo inhibición del crecimiento de las mismas tanto a 6 como a 24 h de tratamiento respecto a las plántulas no tratadas. Se observó un efecto más tóxico del Hg (22%) respecto al Cd (12%) (Fig. 16).

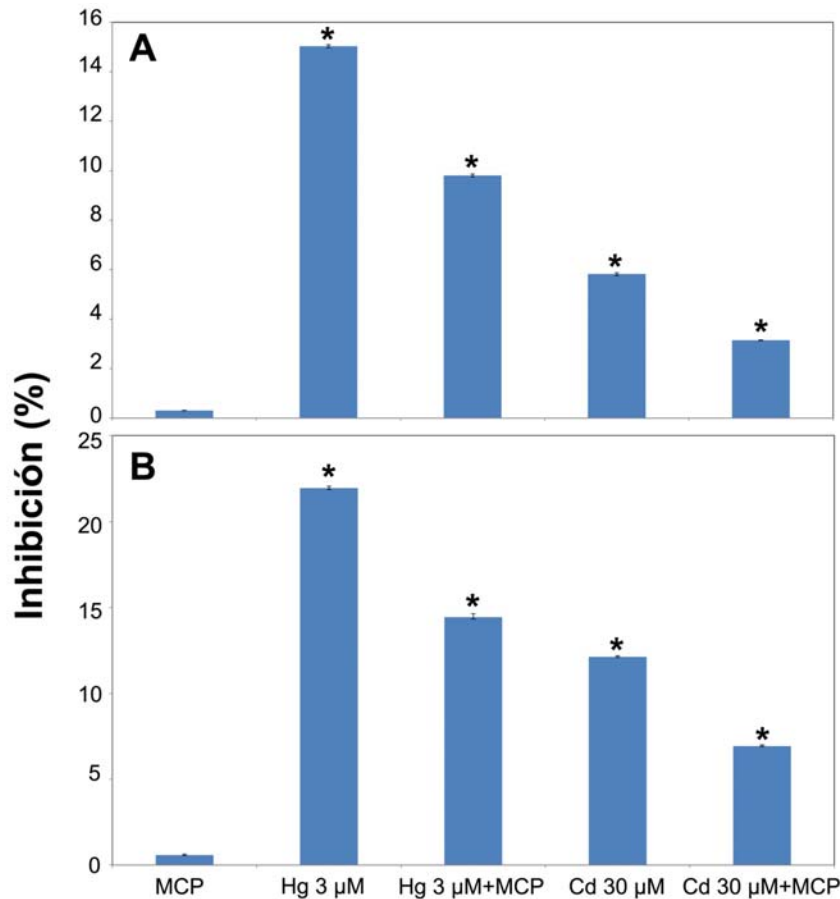


Figura 16. Porcentaje de medias de inhibición de crecimiento en plántulas de *M. sativa* tratadas durante 6h (A) y 24h (B) con Hg (3 µM), Cd (30 µM) o MCP (10 µM). Los asteriscos indican que los valores medios son significativamente diferentes entre los tratamientos y el control.

En los tratamientos conjuntos de metal y 1-MCP se advirtió que la inhibición del crecimiento fue menor que en los tratamientos sin 1-MCP, si bien los valores de crecimiento no alcanzaron el de plántulas control. La exposición de las plántulas a Hg supuso un nivel de inhibición mayor que el observado en plántulas tratadas con Cd, a pesar de haberse utilizado una dosis 10 veces menor. Por otra parte, comparado con el efecto beneficioso que tuvo el pretratamiento con 1-MCP en presencia de Hg, el

bloqueo de la señalización de etileno fue menos efectivo en plántulas tratadas con Cd (Fig. 16).

Análisis de biotioles

En la Tabla 7 se presenta la concentración de biotioles en las plántulas con la señalización de etileno bloqueada. El tratamiento con 1-MCP produjo una disminución en la concentración de hGSH en la raíz de plántulas de alfalfa tanto a las 6 como 24 h de tratamiento. En cambio, cuando se combinó dicho tratamiento con la exposición a Cd 30 μ M o Hg 3 μ M se apreció un efecto positivo, con un ligero aumento de su concentración respecto a las plántulas que sólo fueron tratadas con los metales, efecto que se apreció mejor tras 24 h de tratamiento (Tabla 7). También se observó que el 1-MCP produjo un aumento en la concentración tanto de Cys y hGSH, aunque sin llegar a los niveles de las plántulas control.

Por otra parte, la exposición a Cd o Hg dio lugar a la acumulación de fitoquelatinas, siendo el Cd el metal que indujo una mayor síntesis sobre todo tras 24 h de tratamiento (Fig. 17). Se observó asimismo una menor concentración de fitoquelatinas en plántulas pretratadas con 1-MCP cuando se expusieron a Cd o Hg.

Tabla 7. Concentración de biotioles (nmol/g peso fresco) en raíces de plántulas de *M. sativa* tratadas durante 6 y 24 h con Hg (3 μ M), Cd (30 μ M) o 1-MCP (10 μ M). Diferentes superíndices denotan diferencias significativas entre los tratamientos con $p < 0,05$.

	Tratamiento	Cys	GSH	hGSH	PCs
6 h	Control	36,9 ^a \pm 1,6	35,7 ^a \pm 2,3	100,3 ^a \pm 5,1	n.d.
	1-MCP 10 μ M	31,7 ^a \pm 3,2	33,8 ^a \pm 1,8	63,7 ^{bc} \pm 1,6	n.d.
	Hg 3 μ M	25,1 ^b \pm 1,4	n.d.	31,2 ^b \pm 0,2	20,7 ^a \pm 0,6
	Hg 3 μ M+MCP	37,9 ^c \pm 0,9	13,6 ^b \pm 2,2	39,4 ^b \pm 1,0	13,8 ^b \pm 0,6
	Cd 30 μ M	24,0 ^b \pm 0,4	21,8 ^b \pm 1,3	41,5 ^b \pm 0,0	48,4 ^c \pm 0,8
	Cd 30 μ M+MCP	31,5 ^a \pm 0,6	20,7 ^b \pm 0,7	52,9 ^b \pm 0,0	n.d.
24 h	Control	37,3 ^{ab} \pm 1,9	41,2 ^a \pm 1,6	101,9 ^a \pm 2,8	n.d.
	1-MCP 10 μ M	43,8 ^a \pm 2,3	40,0 ^{ab} \pm 2,1	85,3 ^b \pm 1,6	n.d.
	Hg 3 μ M	27,5 ^c \pm 0,9	24,2 ^d \pm 0,2	53,4 ^c \pm 0,4 ^c	77,4 ^a \pm 3,1
	Hg 3 μ M+MCP	35,1 ^{bc} \pm 0,6	33,7 ^{cb} \pm 0,3	72,2 ^d \pm 0,6	53,6 ^b \pm 5,5
	Cd 30 μ M	27,8 ^c \pm 1,1	30,3 ^{cd} \pm 0,2	44,5 ^{ce} \pm 2,1	138,7 ^c \pm 7,0
	Cd 30 μ M+MCP	35,9 ^b \pm 2,4	36,8 ^{abc} \pm 0,4	64,1 ^f \pm 1,1	88,1 ^a \pm 0,9

n.d.: no detectado

Tal y como se observa en la Fig. 17, en las plántulas tratadas exclusivamente con Hg y Cd se acumularon hasta cinco tipos diferentes de fitoquelatinas: PC2, hPC2, PC3, hPC3, PC4 y hPC4; siendo ligeramente superior su concentración en el tratamiento de Cd 30 μM . En presencia de 1-MCP, se apreció una disminución significativa de la concentración de estos biotioles, y se detectó una menor área de pico de las distintas PCs en plántulas insensibles a etileno.

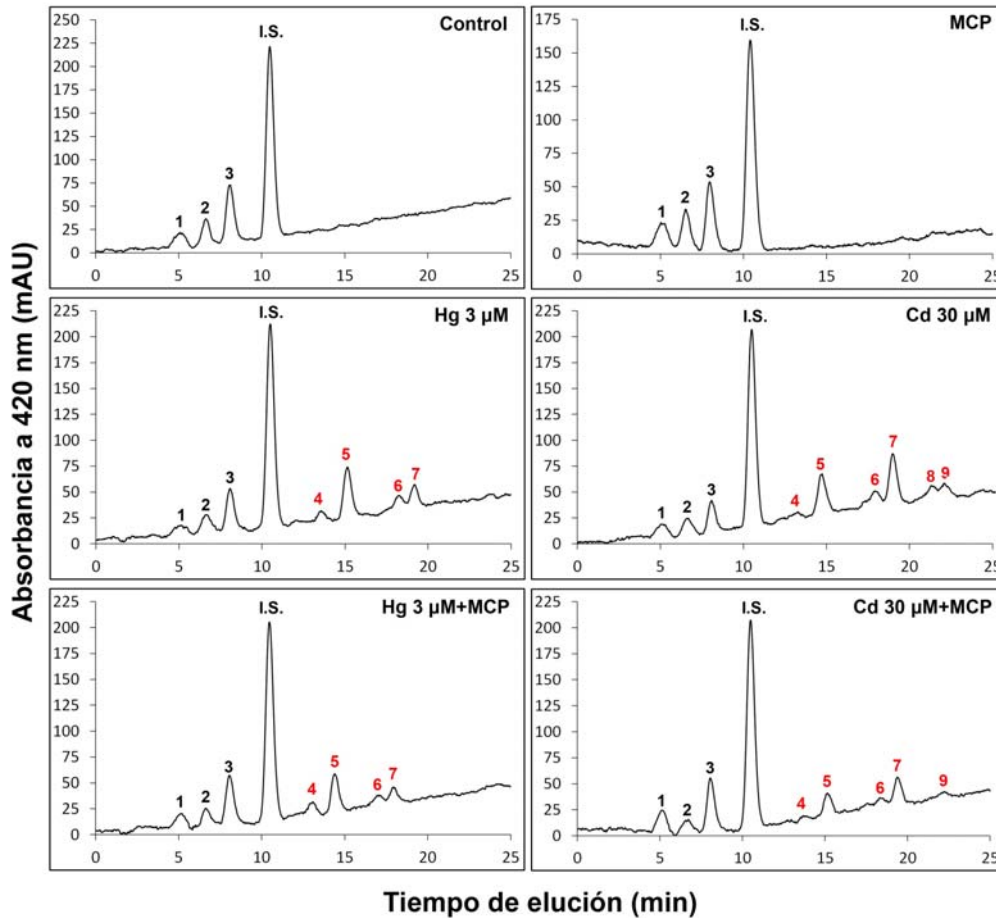


Figura 17. Perfiles de biotioles en raíces de plántulas de *M. sativa* tratadas durante 6 y 24h con Hg (3 μM), Cd (30 μM) o MCP (10 μM). Los picos se identificaron mediante la elución de estándares comerciales disponibles. La concentración se calculó mediante la integración del estándar interno (I.S.) N-acetil-cisteína (N-AcCys) 1: Cys, 2: GSH, 3: hGSH, 4: PC2, 5: hPC2, 6: PC3, 7: hPC3, 8: PC4, 9: hPC4.

Producción relativa de H_2O_2 extracelular

En la Fig. 18 puede observarse que la fluorescencia del Amplex Red aumentó en plántulas expuestas a Cd y Hg respecto a las plántulas control, lo que demuestra un aumento en la producción de H_2O_2 extracelular. Con el tratamiento de 1-MCP la producción de H_2O_2 fue menor que la producida sólo en presencia del correspondiente

metal. Este efecto fue más claro tras 24 h de tratamiento, donde los niveles de fluorescencia de las plántulas preincubadas con 1-MCP fueron similares a los de plántulas control.

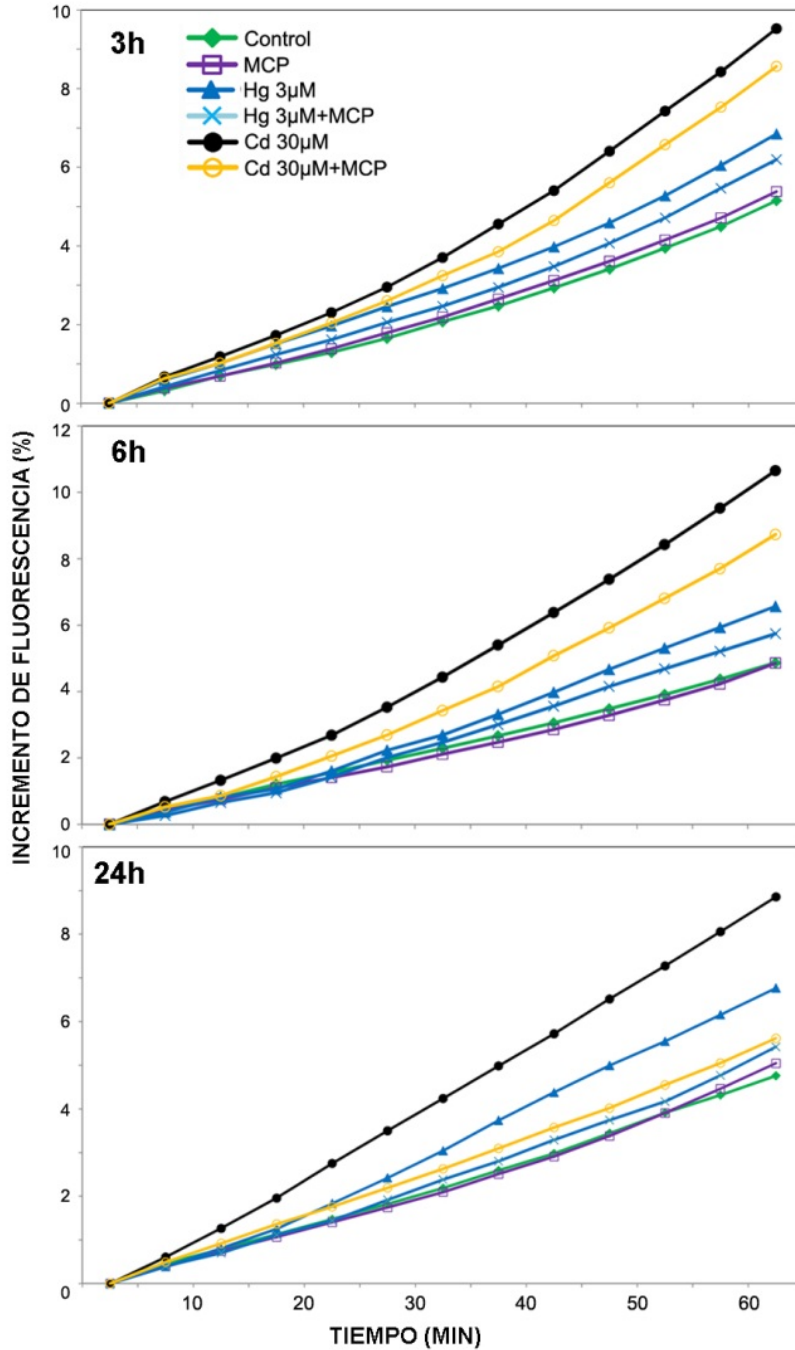


Figura 18. Producción relativa de H₂O₂ extracelular medido por fluorescencia del Amplex red de plántulas de alfalfa tratadas con Hg (3µM), Cd (30µM) o MCP (10µM) durante 3, 6 y 24 h. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Inmunodetección de Proteínas de choque térmico (HSPs)

Como ya habíamos observado en experimentos anteriores analizando las raíces de las plántulas de alfalfa, la exposición de las mismas a Hg y Cd provocó una sobreexpresión temprana de las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (Fig. 19, líneas c y d). Por el contrario, la HSP70 no se vio afectada por los tratamientos con metales ni con 1-MCP. El tratamiento exclusivo con 1-MCP tampoco provocó cambio alguno en la señal de sHSP17.7 y sHSP17.6.

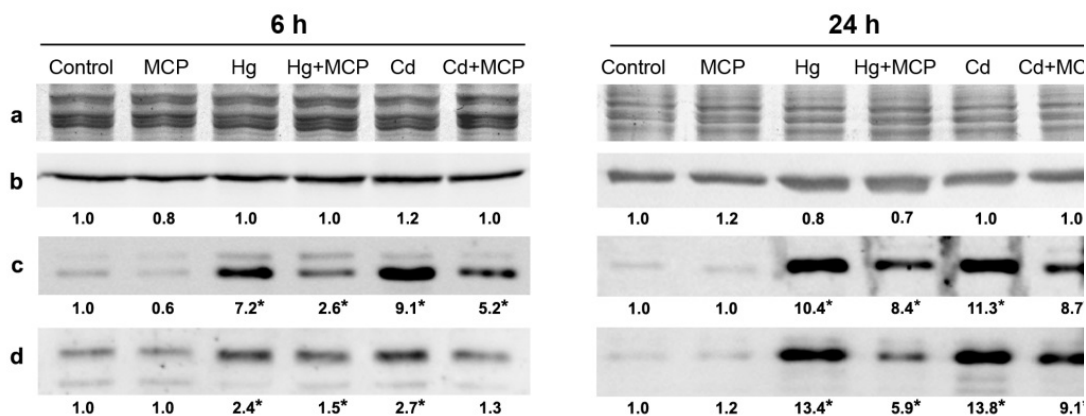


Figura 19. Detección inmunológica de varias clases de HSPs por Western-Blot en las raíces de las plántulas de alfalfa expuestas a Cd, Hg o 1-MCP (10 μ M). **a**, Tinción azul de Coomassie para mostrar igualdad de carga de proteínas. **b**, HSP70. **c**, sHSP17.7. **d**, sHSP17.6. Los números indican el cambio relativo de intensidad de las bandas, los asteriscos marcan los cambios superiores a \pm 30%.

Sin embargo, se observaron diferencias muy apreciables en los tratamientos donde las plántulas de alfalfa se expusieron a metal y 1-MCP conjuntamente. Con ambos tratamientos (Hg+MCP y Cd+MCP) se observó una disminución en la expresión de las sHSPs respecto a los tratamientos que sólo contenían Hg o Cd. Además, se puede señalar que el tratamiento de 1-MCP fue particularmente efectivo cuando se expusieron las plántulas a Hg 3 μ M, ya que la disminución relativa de la expresión de las sHSPs fue mayor que en plántulas sometidas a Cd 30 μ M.

Actividad de enzimas redox

En la Fig. 20 (línea b) se puede observar que la actividad de GR disminuyó significativamente a las 6 h por el tratamiento de Hg 3 μ M. Sin embargo, el tratamiento de Hg+MCP previno dicha disminución de la actividad enzimática,

manteniéndose a niveles similares al control. Los tratamientos de 6 y 24 h con Cd 30 μM produjeron un aumento en la actividad de GR, y en presencia de 1-MCP se observó un valor semejante a las plantas sin tratar. A las 24 h de tratamiento con Hg 3 μM se produjo una casi completa inhibición de la actividad de GR, mientras que el pretatamiento con 1-MCP permitió mantener unos niveles de actividad de GR detectables, aunque menores que el correspondiente control.

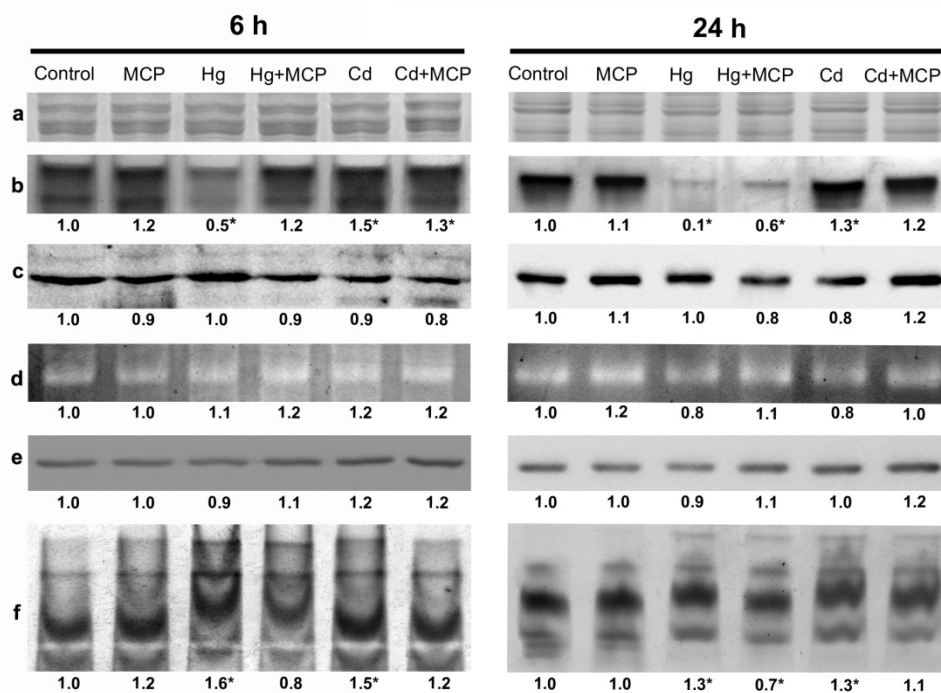


Figura 20. Actividad de ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR) y NADPH-oxidasa en gel, de raíces de plántulas tratadas con Hg (3 μM), Cd (30 μM) o MCP (10 μM) durante 6 y 24 h. **a**, Tinción azul de Coomassie para demostrar igualdad en la carga de todas las muestras. **b**, Actividad GR en gel. **c**, inmunodetección de GR mediante Western-blotting. **d**, actividad de APX. **e**, inmunodetección de APX por Western-blotting. **f**, Actividad de NADPH-oxidasa. Los números indican el cambio relativo de intensidad de las bandas, los asteriscos marcan los cambios superiores a $\pm 30\%$.

La actividad de APX mostró una tendencia similar a la observada para la actividad de GR, si bien con cambios mucho más moderados. Los cambios en la actividad de GR y APX ocurrieron sin cambios significativos en el contenido de las mismas (Fig. 20, líneas c y e). Finalmente se determinó también la actividad de NADPH-oxidasa en gel, que podría intervenir en la generación de H_2O_2 extracelular. En presencia de Hg+MCP se detectó menor actividad de esta enzima respecto al tratamiento de Hg 3 μM . Y lo mismo se observó en el tratamiento de Cd+MCP.

2. MODIFICACIÓN DEL METABOLISMO DE BIOTIOLES

Análisis de parámetros biométricos

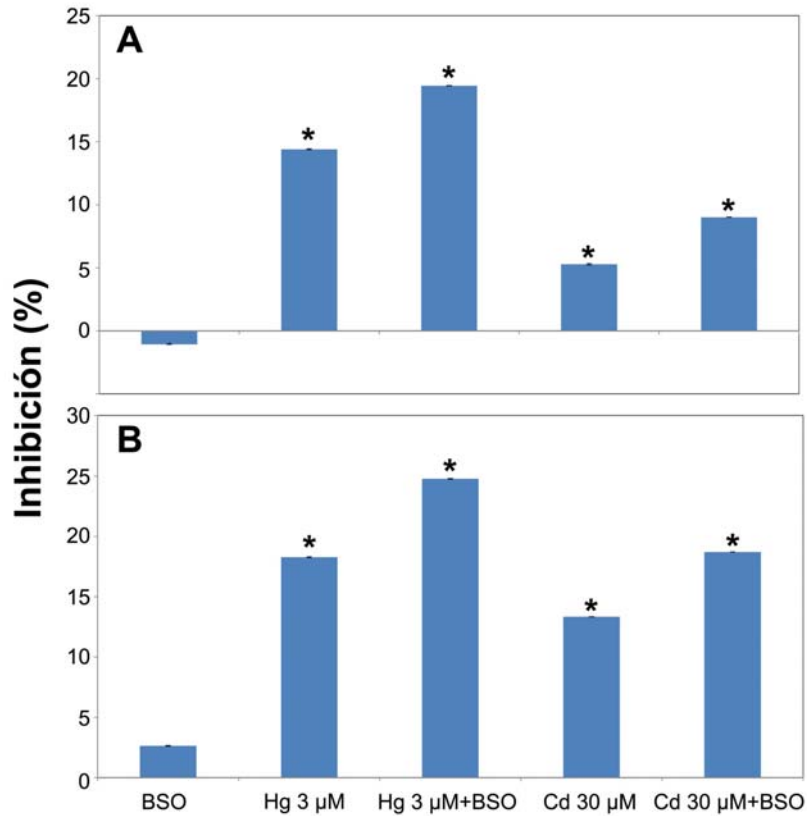


Figura 21. Inhibición del crecimiento en plántulas de *M. sativa* tratadas durante 6 h (A) y 24 h (B) con Hg 3 µM, Cd 30 µM y/o BSO 1 mM. Los asteriscos indican que los valores medios son significativamente diferentes entre los tratamientos y el control, con $p < 0,05$.

El tratamiento exclusivo de BSO 1mM no produjo cambios en el desarrollo de las plántulas de alfalfa a las 6 y 24 h de incubación; que alcanzaron valores de crecimiento similares al control. En cambio, la exposición de las plántulas de alfalfa al tratamiento conjunto de Hg 3 µM y BSO 1 mM produjo mayor inhibición de crecimiento comparado con las plántulas tratadas sólo con Hg. De igual forma, el tratamiento de Cd+BSO supuso un mayor grado de inhibición del crecimiento respecto a la inhibición determinada en plántulas tratadas únicamente con Cd. Se pudo apreciar que el tratamiento con BSO fue más efectivo en el tratamiento con Hg comparado con el de Cd para 6 y 24 h de exposición.

Análisis de biotioles

Al igual que en los experimentos precedentes, se identificó Cys, GSH y hGSH en cotiledones y raíces de las plántulas de alfalfa. La incubación con el inhibidor de la γ -ECS, primer paso de la síntesis de GSH/hGSH, supuso una drástica disminución de la concentración de estos biotioles, en particular de hGSH (Tabla 8) tanto en raíces como en cotiledones. Estos cambios en el metabolismo de GSH/hGSH también se reflejaron en un aumento significativo de la concentración de Cys, uno de los sustratos de la síntesis de γ -EC (γ -Glu-Cys), particularmente significativa en plantas expuestas a Cd. Asimismo, como de la disminución de la concentración de GSH/hGSH en las raíces bajo la acción del BSO, la concentración de PCs también disminuyó, llegando a no ser detectadas en el tratamiento de Hg+BSO.

Tabla 8. Concentración de biotioles (nmol/g peso fresco) en raíz y parte aérea de plántulas de *M. sativa* tratadas durante 24h con Hg (3 μ M), Cd (30 μ M) o BSO (1 mM). Diferentes superíndices denotan diferencias significativas entre los tratamientos con $p < 0,05$.

	Dosis	Cys	GSH	hGSH	PCs
Parte aérea	Control	121,9 ^{ab} \pm 4,2	34,0 ^a \pm 1,3	146,8 ^a \pm 2,3	n.d.
	BSO	151,0 ^c \pm 5,6	20,8 ^b \pm 1,9	48,8 ^b \pm 4,5	n.d.
	Hg 3 μ M	115,1 ^{ab} \pm 1,3	32,9 ^a \pm 2,5	122,5 ^c \pm 1,5	n.d.
	Hg 3 μ M+BSO	134,0 ^{bc} \pm 1,7	17,6 ^b \pm 1,6	55,3 ^{bd} \pm 6,9	n.d.
	Cd 30 μ M	106,1 ^a \pm 2,8	33,8 ^a \pm 2,8	132,9 ^{ac} \pm 1,3	n.d.
	Cd 30 μ M+BSO	143,6 ^c \pm 1,9	29,6 ^{ab} \pm 3,7	71,5 ^d \pm 3,9	n.d.
Raíz	Control	33,2 ^a \pm 3,0	39,3 ^a \pm 3,2	111,6 ^a \pm 1,1	n.d.
	BSO	43,7 ^a \pm 7,6	13,0 ^b \pm 3,4	15,8 ^c \pm 0,6	n.d.
	Hg 3 μ M	33,8 ^a \pm 4,0	25,3 ^{ab} \pm 7,9	59,1 ^b \pm 4,0	45,7 ^a \pm 6,2
	Hg 3 μ M+BSO	32,2 ^a \pm 3,0	15,2 ^b \pm 0,6	20,2 ^c \pm 0,2	n.d.
	Cd 30 μ M	29,2 ^a \pm 2,8	28,2 ^{ab} \pm 4,8	40,6 ^b \pm 2,2	83,6 ^b \pm 5,2
	Cd 30 μ M+BSO	75,8 ^b \pm 8,7	16,4 ^b \pm 5,6	24,2 ^c \pm 5,1	15,6 ^c \pm 2,3

n.d.: no detectado

La Fig. 22 muestra los perfiles de los biotioles detectados en raíces, donde se puede observar la drástica disminución del área de los picos correspondientes a GSH/hGSH que provocó los tratamientos con BSO 1 mM. En la parte aérea también se observó un aumento significativo de Cys en el tratamiento con BSO respecto a las plántulas sin tratar (Tabla 8). Al igual que en la raíz, la presencia de metales produjo un ligero aumento en la concentración de Cys respecto a las plantas tratadas exclusivamente

con BSO. Conviene resaltar que no se pudo detectar PCs en los cotiledones de plántulas expuestas a Hg o Cd, en contraposición a lo observado en raíces.

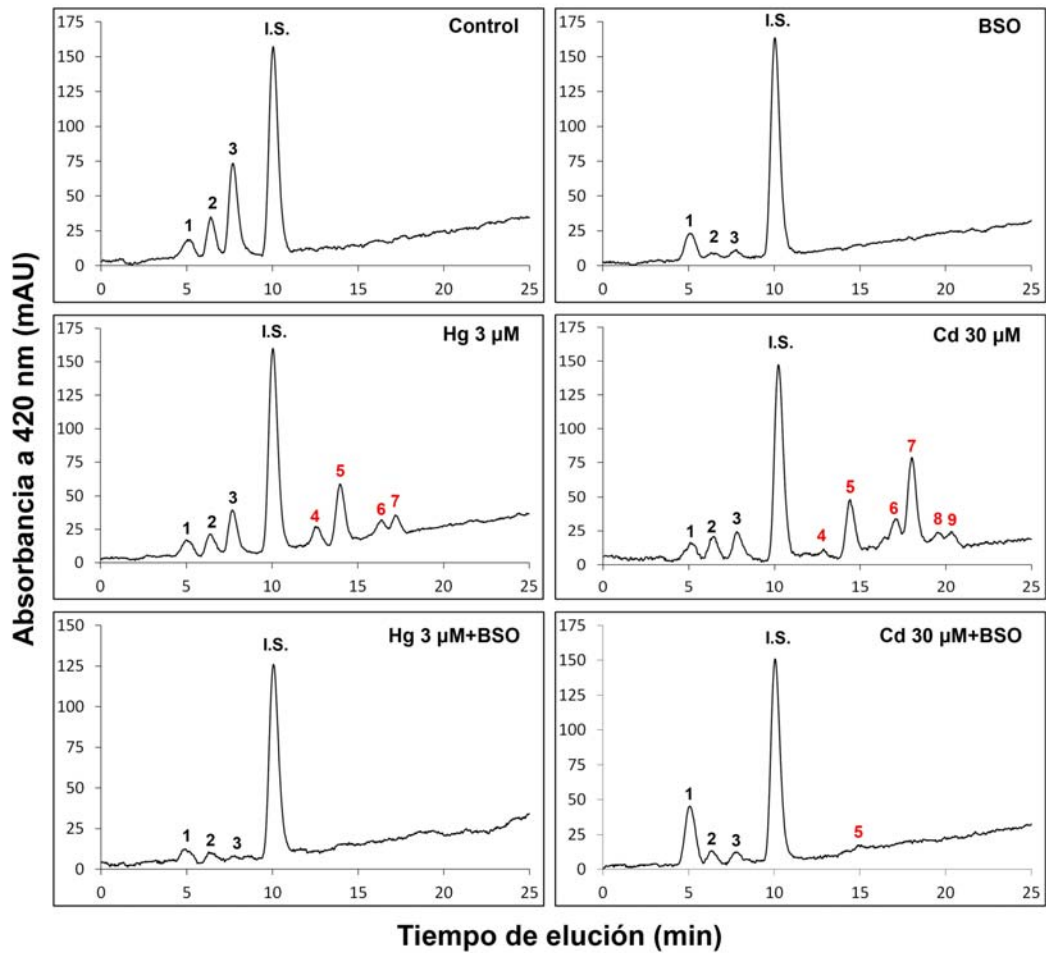


Figura 22. Perfiles de biotios en raíces de plántulas de *M. sativa* tratadas durante 6 y 24 h con Hg (3 μM), Cd (30 μM) o BSO (1 mM). Los picos se identificaron mediante la elución de estándares comerciales disponibles. La concentración se calculó mediante la integración del estándar interno, (I.S.), N-acetil-cisteína (N-AcCys). 1: Cys, 2: GSH, 3: hGSH, 4: PC2, 5: hPC2, 6: PC3, 7: hPC3, 8: PC4, 9: hPC4.

CAPÍTULO 6. INFLUENCIA DEL METABOLISMO DE BIOTIOLES EN LA TOLERANCIA A Cd y Cu.

CAPÍTULO 6. INFLUENCIA DEL METABOLISMO DE BIOTIOLES EN LA TOLERANCIA A Cd y Cu

Antecedentes

El objetivo de este estudio fue evaluar varios parámetros fisiológicos relacionados con el estrés oxidativo, que es una característica de las plantas expuestas al Cd, un metal tóxico, y el Cu, un metal esencial, necesario para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas (Vangronsveld y Clijsters, 1994; Yruela, 2005). Como se ha puesto de manifiesto en los experimentos desarrollados a microescala, el GSH/hGSH determina parte de la capacidad de tolerancia a metales pesados, dado su papel como metabolito antioxidante como por ser precursor de PCs (Jozefczak et al., 2012). Para ello, se utilizará el inhibidor de la síntesis de γ -ECS, primer paso de la producción de biotioles, que es capaz de provocar síntomas de estrés oxidativo en plántulas de alfalfa crecidas en el sistema de microescala (Ortega-Villasante et al., 2007).

Se desarrollaron experimentos con plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) de 3 semanas de edad, crecidas en un sistema de cultivo semi-hidropónico, donde el patrón de desarrollo de las plantas se asemeja más al de plantas cultivadas en suelo (Sobrino-Plata et al., 2009). En una primera etapa fue preciso determinar los umbrales de toxicidad en las plantas estudiadas, que fueron tratadas inicialmente con Cd (0, 6 y 30 μ M) o Cu (0, 6, 30 y 100 μ M) durante 7 días. En una segunda etapa, se seleccionó la concentración de 30 μ M de Cu o Cd, en las que se apreciaron síntomas moderados de estrés, y parte de las plantas fueron preincubadas con BSO 1 mM para modificar el pool de GSH/hGSH, y así analizar las consecuencias de limitar el nivel de GSH/hGSH en las respuestas antioxidantes de estas plantas. Así, se analizaron parámetros biométricos, la peroxidación de lípidos y el contenido de clorofila; medidas que completaron los ensayos para determinar la actividad de enzimas redox como APX o GR, se identificó la respuesta de proteínas de choque térmico (sHSPs) y la concentración de biotioles.

1. ENSAYOS DE IDENTIFICACIÓN DE UMBRALES DE TOXICIDAD

Indicadores de estrés

Puede observarse en la Fig. 23, que el crecimiento de las plantas de alfalfa disminuyó en las dosis más altas de Cu (30 y 100 μM), mientras que las tratadas con Cd se inhibió incluso en la concentración de 6 μM . La misma tendencia se apreció cuando se determinó el peso fresco de hoja y raíz, que disminuyeron fundamentalmente en las dosis más altas de metal, por encima de 30 μM , tanto de Cu como de Cd. Se pudo observar que el nivel de inhibición en el peso de raíz y hoja de plantas tratadas con Cd 100 μM fue similar al de plantas expuestas a Cd 30 μM .

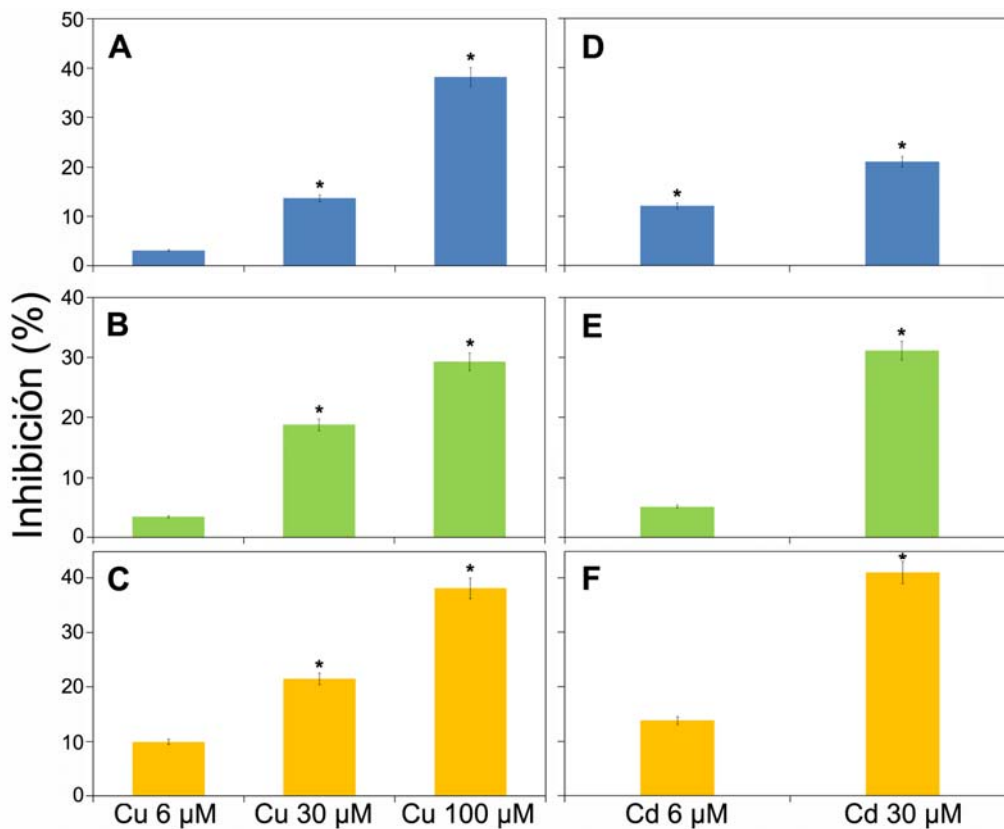


Figura 23. Porcentaje de inhibición de crecimiento (A), peso fresco de parte aérea (B) y peso fresco de raíz (C) de plantas de *M. sativa* tratadas durante 7 días con Cu (0, 6, 30 y 100 μM) o Cd (0, 6 y 30 μM). Los asteriscos indican que los valores medios significativamente diferentes entre los tratamientos y el control con $p < 0,05$.

En cuanto a la concentración de metales en los órganos de las plantas de alfalfa, se observaron diferencias significativas en la concentración de Cu y Cd (Fig. 24), si bien ambos metales se acumularon preferentemente en las raíces. El Cu se acumuló,

generalmente, a unos niveles superiores a los encontrados para el Cd, no sufriendo una saturación incluso en la dosis de 100 μM , que fue aproximadamente tres veces mayor de la encontrada con 30 μM Cu.

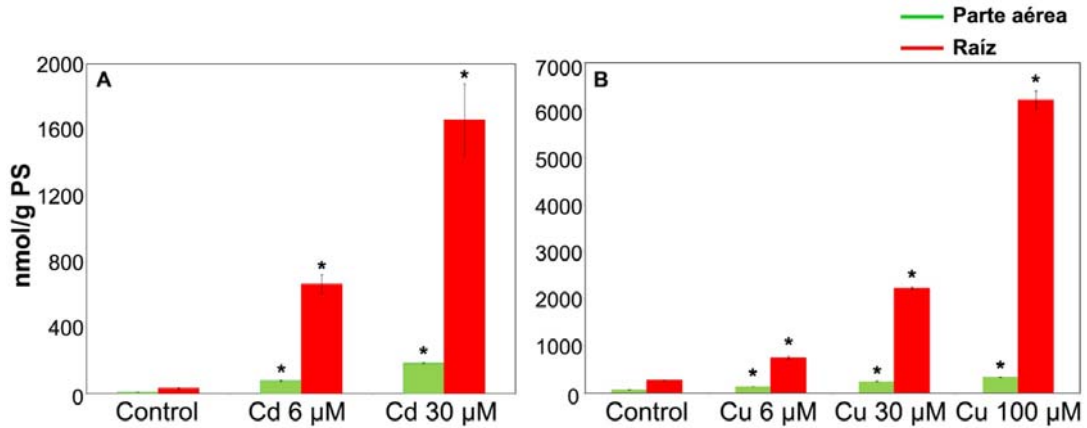


Figura 24. Concentración de metales (nmol/g peso seco) en parte aérea y raíz de alfalfa, tratadas con Cu (0, 6, 30 y 100 μM) o Cd (0, 6 y 30 μM) durante 7 días. Los asteriscos indican que los valores medios son significativamente diferentes entre los tratamientos y el control con un $p < 0,05$.

En lo referente a la peroxidación de lípidos, se observó un aumento significativo en la concentración de MDA de la parte aérea, mayor a medida que las concentraciones de Cd y Cu aumentaron en el medio de cultivo (Fig. 25). Las raíces sufrieron menor peroxidación lipídica que los brotes como consecuencia de los tratamientos con Cu y Cd, observándose un nivel moderado de peroxidación incluso en las raíces de plantas control (Fig. 26). Esto hizo que las diferencias relativas fueran menores que la observada en parte aérea.

Por otra parte, otro índice que mostró el estrés inducido por metales fue la concentración de clorofilas, que disminuyó drásticamente en las plantas tratadas con Cu 100 μM , plantas en las que la concentración disminuyó casi un 50 % respecto al control (Tabla 9). El tratamiento con Cd 30 μM también produjo una disminución significativa del contenido de clorofilas respecto al control, aunque en menor medida que en las plantas tratadas con Cu (Tabla 9).

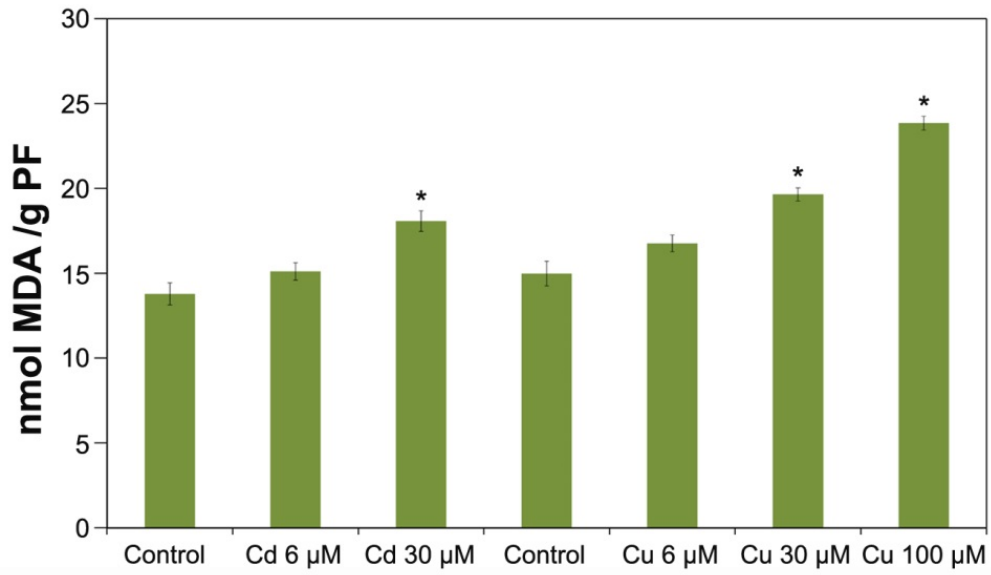


Figura 25. Acumulación de MDA en brotes de *Medicago sativa* tratadas con Cu (0, 6, 30 y 100 μM) y Cd (0, 6 y 30 μM) durante 7 d. Los asteriscos indican que los valores medios son significativamente diferentes entre los tratamientos y el control ($p < 0,05$).

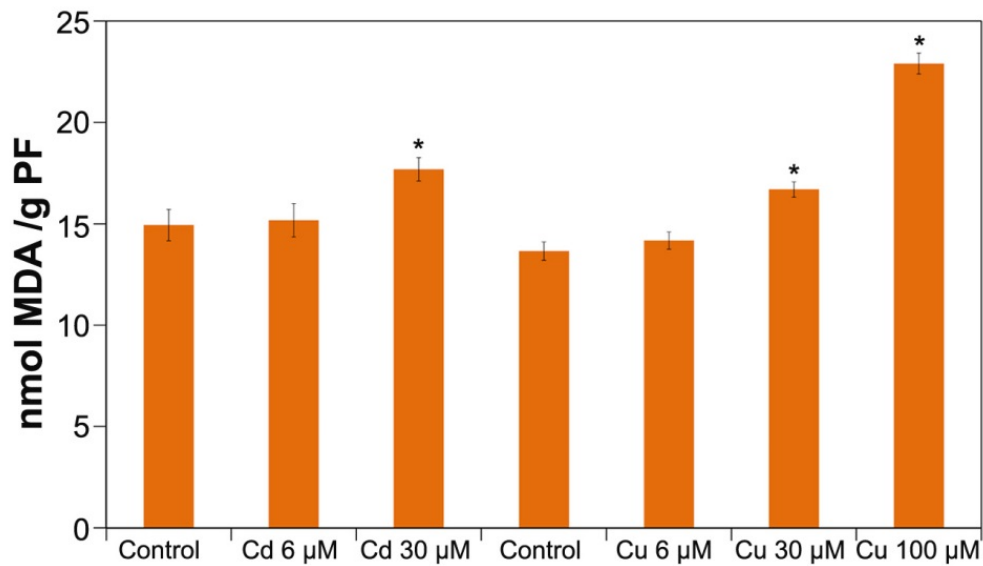


Figura 26. Acumulación de MDA en raíces de *Medicago sativa* tratadas con Cu (0, 6, 30 y 100 μM) y Cd (0, 6 y 30 μM) durante 7 d. Los asteriscos indican que los valores medios son significativamente diferentes entre los tratamientos y el control ($p < 0,05$).

Tabla 9. Concentración de clorofilas totales ($\mu\text{g/g}$ PF) de plantas de alfalfa tratadas con Cu (0, 6, 30 y 100 μM) y Cd (0, 6 y 30 μM) durante 7 d. Diferentes superíndices denotan diferencias significativas entre los tratamientos con $p < 0,05$. PF: peso fresco.

Tratamiento	Concentración ($\mu\text{g/g}$ PF)
Control	4,06 ^{a±} 0,51
Cu 6 μM	3,28 ^{ab±} 0,1
Cu 30 μM	2,80 ^{bc±} 0,41
Cu 100 μM	2,23 ^{c±} 0,14
Control	3,83 ^{a±} 0,54
Cd 6 μM	2,97 ^{ab±} 0,50
Cd 30 μM	2,74 ^{b±} 0,70

Enzimas redox sensibles a metales

Se testó la actividad de enzimas redox sensibles a metales, como GR o APX, como hemos podido comprobar en capítulos previos, y en consonancia con otros resultados previos (Ortega-Villasante et al., 2007). Se apreció una ligera inducción de la actividad de GR de parte aérea en la dosis más baja de Cu (6 μM) y en la más alta de Cd (30 μM ; Fig. 27). Algo similar se notó en la actividad de APX, con un ligero aumento en las hojas de plantas expuestas a Cu 6 μM . Por otra parte, la actividad de NADPH-oxidasa no sufrió cambios, enzima que responde a varios metales y puede estar implicada en la producción de ROS fundamentalmente en el apoplasto (Fig. 27).

La actividad de GR aumentó en la raíz de plantas expuestas a Cd 6 y 30 μM . Por el contrario, el tratamiento con Cu no supuso cambios significativos excepto una ligera disminución con Cu 100 μM (Fig. 28). No se apreciaron cambios en la cantidad de enzima GR detectada mediante inmunodetección en los tratamientos de Cd, mientras que cuando se expusieron a Cu sí que hubo un aumento relevante en la cantidad de GR en plantas crecidas con Cu 30 y 100 μM . La actividad de APX tuvo un ligero aumento con los tratamientos de Cd y Cu 30 μM . No se apreciaron cambios en el nivel de enzima APX entre los distintos tratamientos. En cuanto a la actividad de la NADPH-oxidasa, no se observaron diferencias significativas en las raíces de las plantas expuestas a Cd. En cambio, en las plantas tratadas con Cu se observó un aumento en la actividad de esta enzima, que disminuyó bruscamente cuando se expusieron a Cu 100 μM .

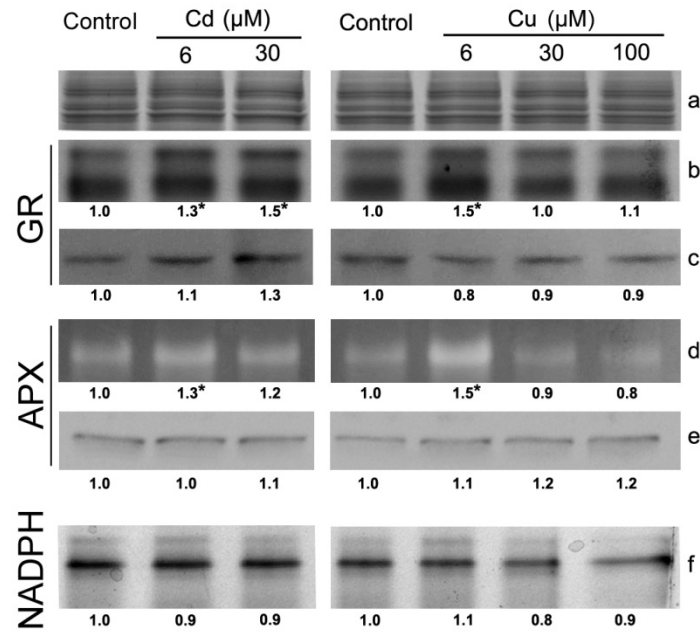


Figura 27. Enzimas redox de hojas de alfalfa tratadas con Cu (0, 6, 30, 100 μM) o Cd (0, 6, 30 μM) durante 7 días. **a**, tinción de azul de Coomassie igualar carga de proteína; **b**, actividad de GR; **c**, Inmunodetección de GR; **d**, actividad de APX. **e**, inmunodetección de APX. **f**, actividad NADPH-oxidasa. Los números indican el cambio relativo de intensidad de las bandas, los asteriscos marcan los cambios superiores a ± 30%.

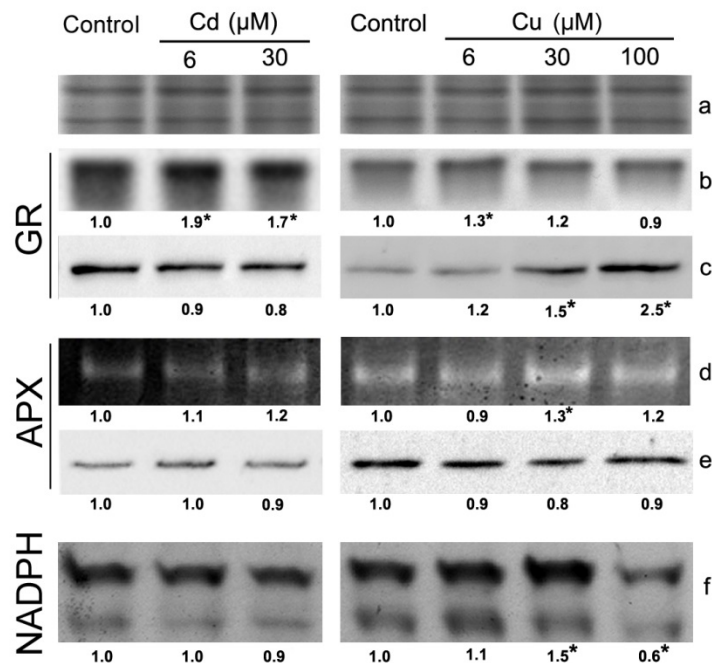


Figura 28. Enzimas redox de raíces de alfalfa tratadas con Cu (6, 30, 100 μM) o Cd (6, 30 μM) durante 7 días. **a**, tinción de azul de Coomassie igualar carga de proteína; **b**, actividad de GR; **c**, Inmunodetección de GR; **d**, actividad de APX; **e**, inmunodetección de APX; **f**, actividad NADPH-oxidasa. Los números indican el cambio relativo de intensidad de las bandas, los asteriscos marcan los cambios superiores a ± 30%.

Inmunodetección de proteínas de choque térmico (HSPs)

Dado que el tratamiento con metales a tiempos cortos supuso cambios en los niveles de varias proteínas de choque térmico (HSPs), se procedió a su estudio en las plantas cultivadas en el sistema semi-hidropónico expuestas a Cd y Cu. Tal como se muestra en la Fig. 29, no se apreciaron cambios consistentes entre tratamientos. Sólo fue posible detectar disminuciones relevantes en la proteína sHSP Clase I de bajo peso molecular (sHSP17.7) cuando se trataron las plantas con Cd 30 μM ; cambios que se detectaron tanto en raíz como en hoja (Fig. 29, líneas c, g).

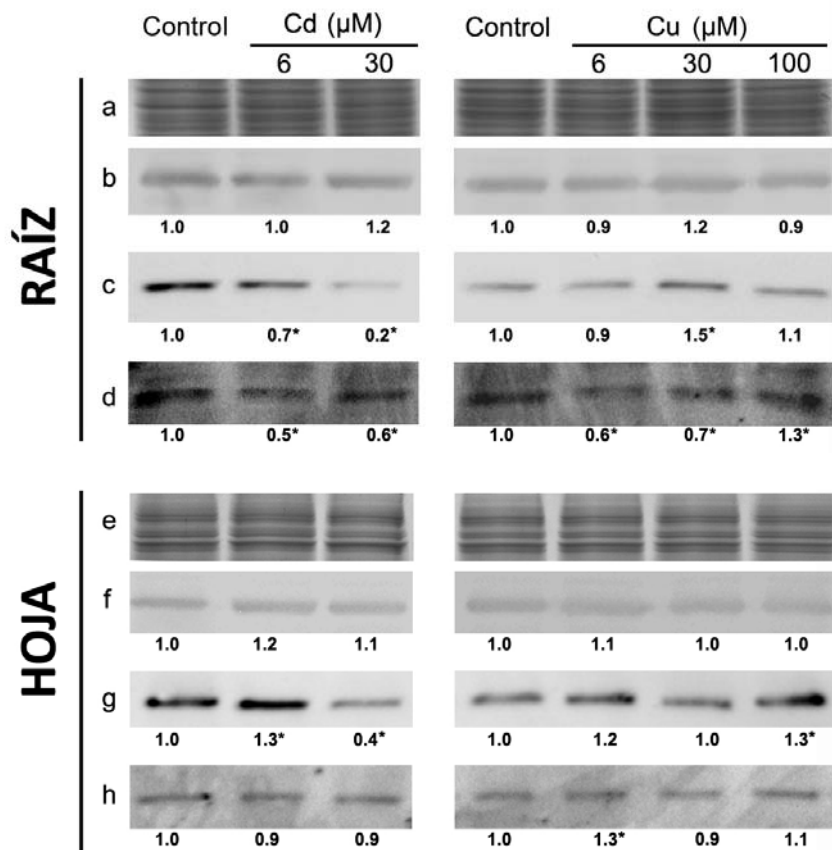


Figura 29. Inmunodetección de varias clases de HSPs por Western-blot en raíz y brotes de plantas de alfalfa tratadas con Cu (0, 6, 30 y 100 μM) o Cd (6 y 30 μM) durante 7. **a, e**, tinción de azul de Coomassie para igualar cargas de proteína; **b, f**, HSP70; **c, g**, sHSP17.7; **d, h**, sHSP 17.6. Los números indican el cambio relativo de intensidad de las bandas, los asteriscos marcan los cambios superiores a $\pm 30\%$.

Análisis de biotioles

El contenido de biotioles detectados en las plantas de alfalfa tratadas con Cu disminuyó a medida que aumentó la dosis del metal, tanto en parte aérea como en raíz, alcanzando valores cercanos al 50 % del control en la dosis de 100 μM (Tabla 10). Por el contrario, en el tratamiento con Cd no se observaron cambios significativos en la concentración de GSH/hGSH. En cuanto a la acumulación de fitoquelatinas, es necesario resaltar que no se detectaron bajo ninguna dosis de Cu ni en brotes ni en raíz. En cambio, sí que se detectaron al exponerse las plantas a Cd. En parte aérea sólo se pudieron cuantificar en el tratamiento de Cd 30 μM , mientras que en raíz se pudieron medir incluso en la dosis de Cd 6 μM (Tabla 10). En la Fig. 30 se muestra los perfiles de elución de biotioles de muestras de raíz. Como puede apreciarse, el tratamiento con Cd 30 μM supuso la acumulación de fitoquelatinas derivadas tanto de GSH como de hGSH, conocidas éstas últimas como homofitoquelatinas (hPCs). La identificación de estos péptidos se realizó comparando su elución con la de patrones, pudiéndose detectar hasta PC4 ((γ -Glu-Cys)₄-Gly) y hPC4 ((γ -Glu-Cys)₄-Ala).

Tabla 10. Concentración de biotioles (nmol/g peso fresco) en parte aérea y raíz de plantas de *M. sativa* tratadas con Cu (0, 6, 30 y 100 μM) o Cd (0, 6 y 30 μM) durante 7 d en cultivo semi-hidropónico. Superíndices diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

	Dosis	Cys	GSH	hGSH	PCs	
Cu	Parte aérea	Control	<5	47,4 ^a ± 0,9	301,5 ^a ± 21,7	n.d.
		Cu 6 μM	<5	45,5 ^a ± 1,2	273,9 ^{ab} ± 15,1	n.d.
		Cu 30 μM	<5	35,3 ^b ± 0,8	238,2 ^b ± 14,0	n.d.
		Cu 100 μM	<5	22,9 ^c ± 3,1	176,2 ^c ± 8,1	n.d.
	Raíz	Control	25,6 ^a ± 0,9	41,4 ^a ± 2,1	124,6 ^a ± 5,1	n.d.
		Cu 6 μM	24,3 ^a ± 0,3	39,9 ^a ± 2,2	109,2 ^{ab} ± 2,8	n.d.
		Cu 30 μM	23,5 ^a ± 0,9	35,4 ^a ± 0,5	100,8 ^b ± 2,4	n.d.
		Cu 100 μM	19,3 ^b ± 0,5	23,7 ^b ± 2,6	74,0 ^c ± 5,1	n.d.
Cd	Parte aérea	Control	< 5	39,8 ^a ± 1,6	264,2 ^a ± 6,7	n.d.
		Cd 6 μM	< 5	44,7 ^{ab} ± 1,3	294,0 ^{ab} ± 3,7	n.d.
		Cd 30 μM	< 5	48,3 ^b ± 0,8	318,2 ^b ± 6,7	62,3 ± 11,3
	Raíz	Control	< 5	39,2 ^a ± 3,0	116,8 ^a ± 5,9	n.d.
		Cd 6 μM	< 5	42,0 ^a ± 2,2	101,1 ^a ± 7,8	98,9 ± 21,5
		Cd 30 μM	< 5	41,5 ^a ± 1,0	98,3 ^a ± 3,0	182,0 ± 25,7

n.d.: no detectado

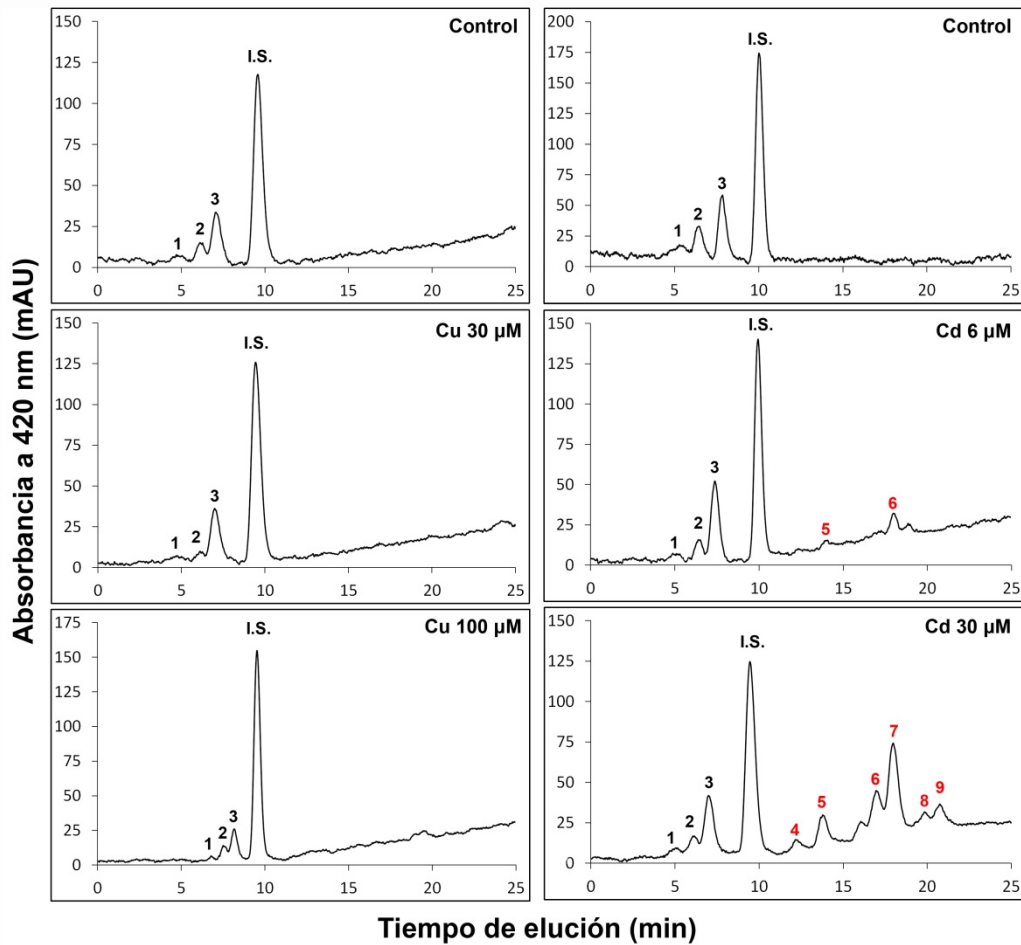


Figura 30. Perfiles de biotioles en raíces de plantas de *M. sativa* tratadas durante 7 días con Cu (0, 6 30 y 100 µM) o Cd (0, 6 y 30 µM). Los picos se identificaron mediante la elución de estándares comerciales disponibles. La concentración se calculó mediante la integración del estándar interno (I.S.), N-acetil-cisteína (N-AcCys). 1: Cys, 2: GSH, 3: hGSH, 4: PC2, 5: hPC2, 6: PC3, 7: hPC3, 8: PC4, 9: hPC4.

2. MODIFICACIÓN DEL METABOLISMO DE BIOTIOLES

Índices de estrés

La longitud total de las plantas de alfalfa se vio afectada por los tratamientos de Cd y Cu, observándose asimismo que el porcentaje de inhibición fue más acusado al añadir BSO 1 mM al medio de cultivo (Fig. 31). Esto ocurrió tanto para Cu, donde se observa aproximadamente un 26 % de inhibición, como para Cd donde se produjo una inhibición algo mayor (38 %). De igual forma, el peso fresco de brotes y raíces de las plantas de alfalfa se vio afectado por el tratamiento con Cd y Cu, el cual disminuyó con el tratamiento de metales, efecto que se acentuó cuando las plantas de alfalfa se incubaron también con BSO 1 mM (Fig. 31).

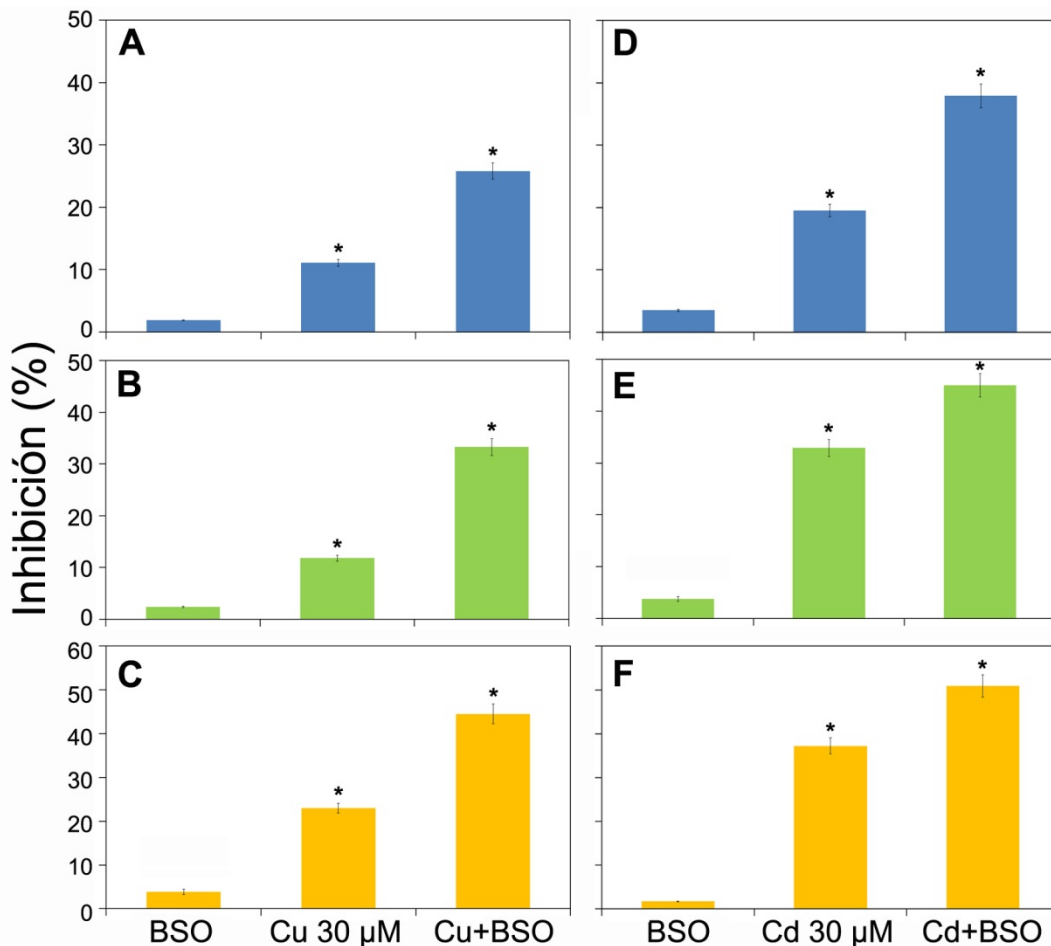


Figura 31. Porcentaje de inhibición de crecimiento, de peso fresco en parte aérea (A) y en raíz (B) de plantas de *M. sativa* tratadas con Cd 30 µM, Cu 30 µM o BSO 1mM durante 7 d en un sistema de cultivo semi-hidropónico. Los asteriscos indican diferencias significativas con el control ($p < 0,05$).

En cuanto a la peroxidación lipídica, se pudo observar que se produjo un aumento en la acumulación de MDA en las plantas de alfalfa tratadas con Cd o BSO (Fig. 32). El tratamiento combinado de BSO 1 mM y Cd 30 μ M dio lugar a acumulación de MDA significativamente superior a la alcanzada con los tratamientos por separado de dichas sustancias. La inducción de estrés oxidativo siguió un patrón similar en parte aérea y raíces (Fig. 32 A, B).

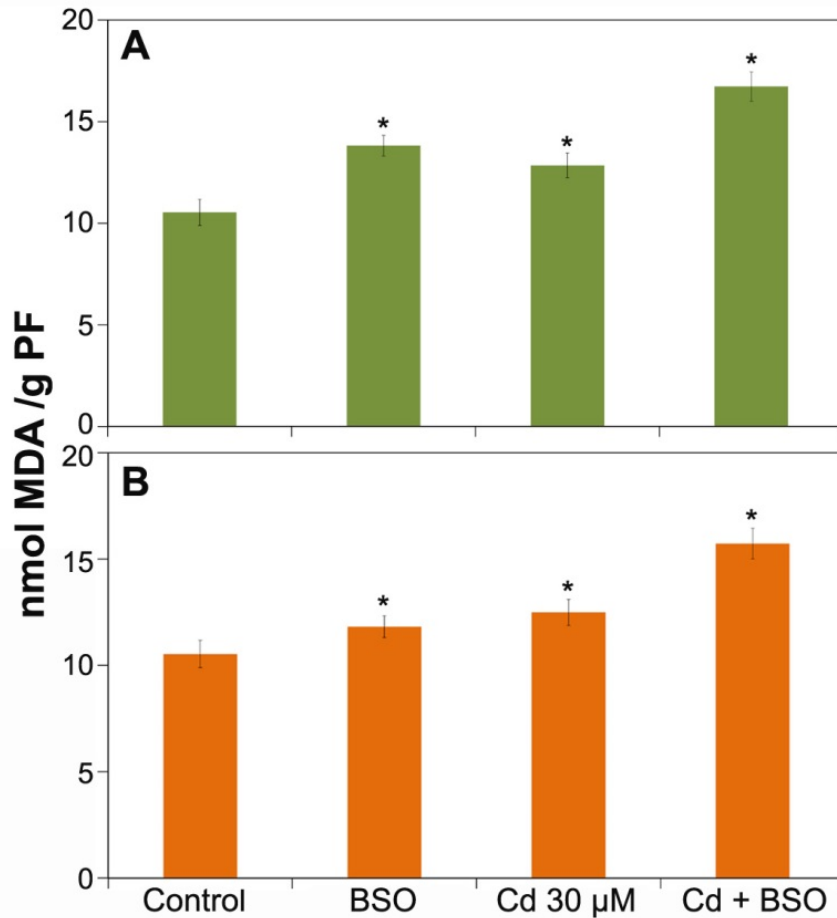


Figura 32. Peroxidación lipídica (nmol MDA/g PF) en brotes (A) y raíces (B) de *M. sativa* tratadas con Cd 30 μ M o BSO 1 mM durante 7 d. Los asteriscos señalan diferencias significativas con el control ($p < 0,05$).

Algo parecido se apreció en plantas tratadas con Cu o BSO, de modo que la peroxidación lipídica en brotes y raíces aumentó bajo los tratamientos con BSO 1 mM y Cu 30 μ M (Fig. 33). Este índice de estrés oxidativo que aumentó significativamente en el tratamiento combinado, alcanzando valores similares a los obtenidos tras la exposición de las plantas de alfalfa a Cd y BSO.

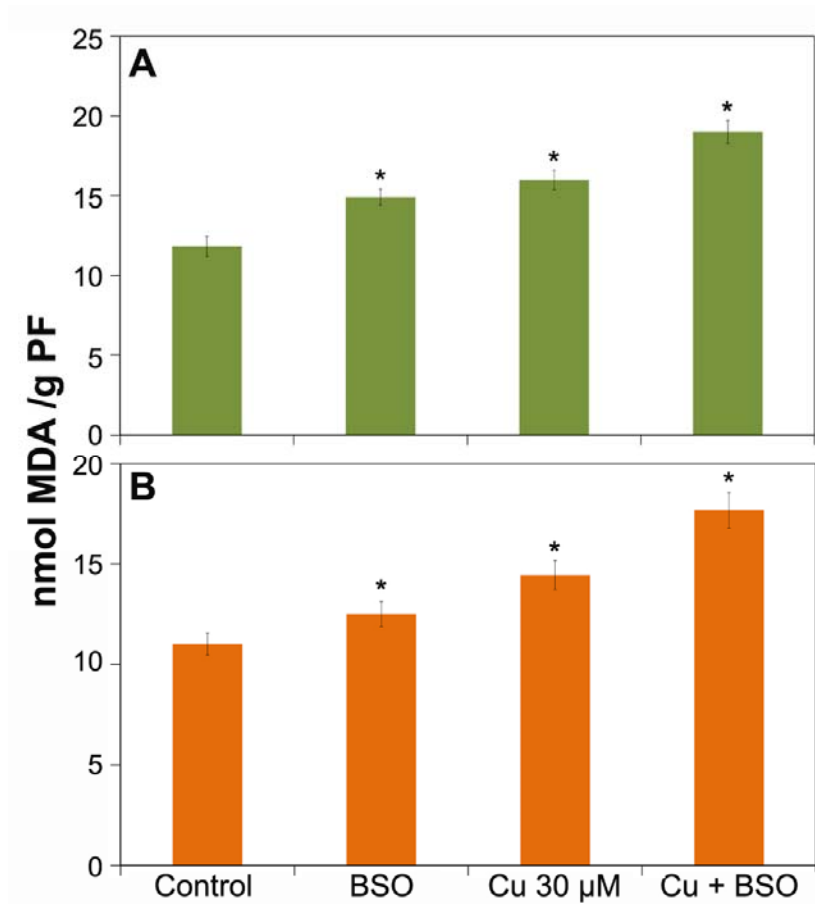


Figura 33. Peroxidación lipídica (nmol MDA/gPF) en brotes y raíces de *Medicago sativa* tratadas con Cu (30 µM) o BSO (1 mM) durante 7 días. Los asteriscos señalan diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

La concentración de clorofilas también fue afectada por los tratamientos con metales y BSO, observándose en la Tabla 12 que hubo una disminución significativa de su contenido en los tratamientos por separado de las sustancias perniciosas. Dicho efecto se acentuó cuando las plantas crecieron en medios de cultivo suplementados con Cu o Cd 30 µM y BSO 1 mM, donde los valores obtenidos fueron cercanos a la mitad de la concentración medida en el control.

Tabla 12. Concentración de clorofilas totales ($\mu\text{g/g}$ peso fresco) en plantas de alfalfa tratadas con Cu $30\mu\text{M}$, Cd $30\mu\text{M}$ o BSO 1 mM durante 7 d. Diferentes superíndices denotan diferencias significativas entre los tratamientos con $p < 0,05$.

Tratamiento	Concentración clorofila ($\mu\text{g/g}$ PF)
Control	$3,30^a \pm 0,05$
BSO 1 mM	$2,72^b \pm 0,17$
Cu $30\mu\text{M}$	$2,30^b \pm 0,21$
Cu $30\mu\text{M}$ +BSO 1mM	$1,74^c \pm 0,20$
Control	$2,82^a \pm 0,16$
BSO 1 mM	$2,15^b \pm 0,15$
Cd $30\mu\text{M}$	$2,10^b \pm 0,06$
Cd $30\mu\text{M}$ +BSO 1mM	$1,77^c \pm 0,06$

Actividad de enzimas redox

El BSO fue capaz de producir un cierto nivel de respuesta antioxidante, dado que la actividad de APX de hoja aumentó sobre los valores del control, incremento que también se detectó en las plantas tratadas con Cu $30\mu\text{M}$ y BSO 1 mM (Fig. 34, línea d). En raíz, en cambio, la actividad de APX disminuyó cuando se incubaron con el tratamiento conjunto de Cu $30\mu\text{M}$ y BSO, mostrando un patrón de respuesta diferenciado entre ambos órganos (Fig. 34, línea d). No se observaron alteraciones apreciables en la actividad de GR ni en la inmunodetección de GR y APX, tanto en brotes como raíces, excepto en el tratamiento de Cu $30\mu\text{M}$ que se observó un aumento en el contenido de GR (Fig. 34, línea c).

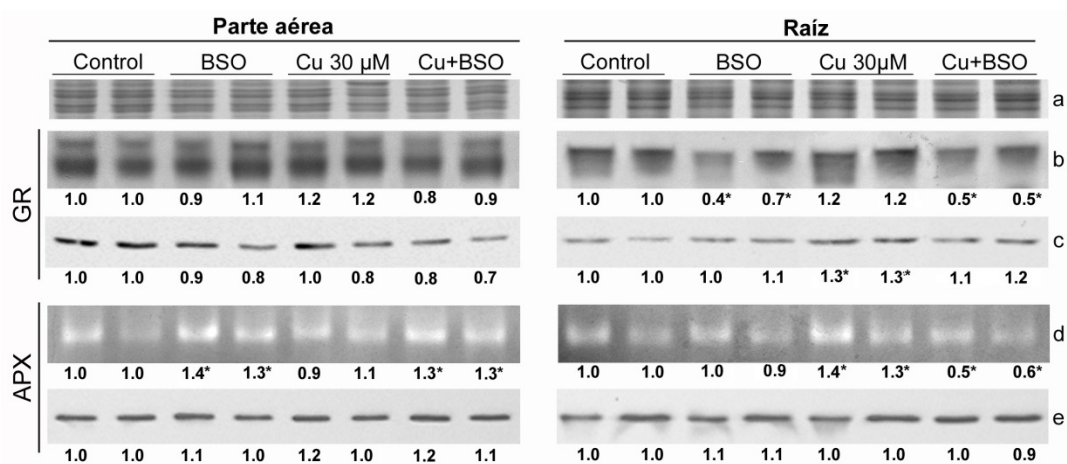


Figura 34. Caracterización de GR y APX en brotes y raíces de alfalfa tratadas con Cu $30\mu\text{M}$ o BSO 1 mM durante 7 d. **a**, tinción de azul de Coomassie para mostrar igualdad de carga de proteína; **b**, actividad de GR; **c**, inmunodetección de GR; **d**, actividad APX; **e**, inmunodetección de APX. Los números indican el cambio relativo de intensidad de las bandas, los asteriscos marcan los cambios superiores a $\pm 30\%$. Se muestran dos réplicas por muestra.

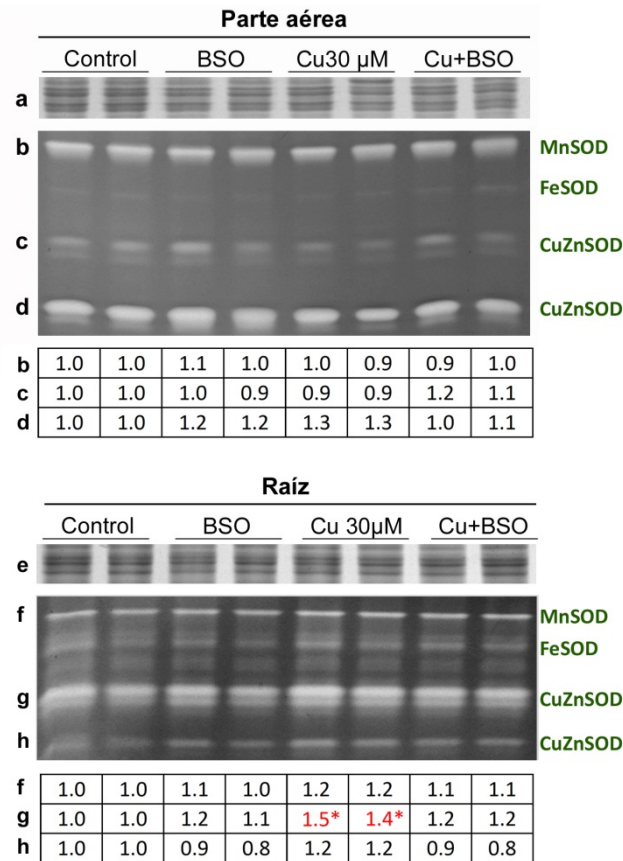


Figura 35. Actividad de SOD en brotes y raíces de alfalfa tratadas con Cu 30 μ M o BSO 1 mM durante 7 d. **a**, tinción de azul de Coomassie para mostrar igualdad de carga de proteína; **b, f**, isoforma de MnSOD; **c, g**, isoforma de CuZnSOD; **d, h**, isoforma de CuZnSOD. Los números indican el cambio relativo de intensidad de las bandas, los asteriscos marcan los cambios superiores a \pm 30%. Se muestran dos réplicas por muestra.

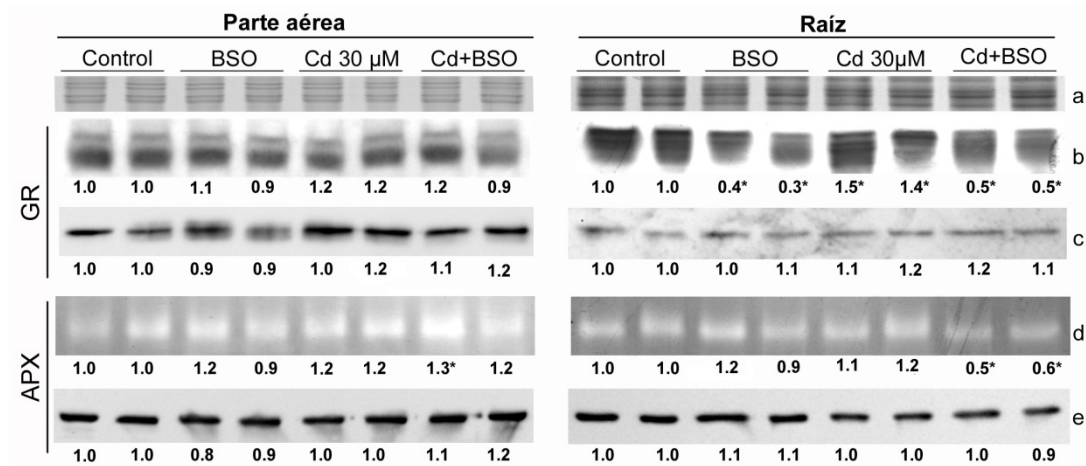


Figura 36. Caracterización de GR y APX en brotes y raíces de alfalfa tratadas con Cd 30 μ M o BSO 1 mM durante 7 d. **a**, tinción de azul de Coomassie para mostrar igualdad de carga de proteína; **b**, actividad de GR; **c**, inmunodetección de GR; **d**, actividad APX; **e**, inmunodetección de APX. Los números indican el cambio relativo de intensidad de las bandas, los asteriscos marcan los cambios superiores a \pm 30%. Se muestran dos réplicas por muestra.

Como puede apreciarse en la Fig. 35, no hubo cambios reseñables en la intensidad de las bandas correspondientes a las distintas isoformas de la enzima SOD, salvo un ligero aumento en la raíz de plantas tratadas con Cu 30 μ M (Fig. 35). En cuanto a la exposición a Cd, las plantas mostraron una disminución importante de la actividad de GR en raíz cuando crecieron en presencia de BSO 1 mM, a pesar de que la exposición a Cd 30 μ M causó un aumento de actividad (Fig. 36). Al igual que en el experimento con Cu, la actividad de APX aumentó con BSO en hoja, mientras que disminuyó en raíz.

Análisis de biotioles

La incubación de las plantas de alfalfa con BSO 1 mM supuso una importante disminución de la concentración de GSH y hGSH en las raíces y brotes de las plantas (Tabla 13). El tratamiento de Cu 30 μ M produjo por su parte una disminución en la concentración de GSH y hGSH, tanto en brotes como en raíces. Además, al añadir BSO al tratamiento con el metal, dicha disminución fue más acusada, excepto para el contenido de Cys que pareció aumentar en ambos órganos con dicho tratamiento. Al igual que se observó en los ensayos previos de distintas dosis de Cu, no se pudieron detectar PCs.

Por otra parte, no se observaron cambios significativos en el contenido de GSH y hGSH en las plantas tratadas con Cd 30 μ M aunque sí se observó su severa disminución al preincubarlas con BSO, mostrando por tanto un patrón de respuesta diferente al Cu. Resulta interesante que al añadir BSO el contenido de Cys fue superior que el medido en plantas control, y que esta tendencia se mantuvo en las sometidas al tratamiento combinado Cd 30 μ M y BSO 1 mM. En este caso, se produjo una fuerte caída de la concentración de GSH y hGSH en presencia de Cd.

Tabla 13. Concentración de biotioles (nmol/g peso fresco) en raíz y parte aérea de plantas de *M. sativa* tratadas durante 7 d con Cu 30 μ M, Cd 30 μ M o BSO 1 mM. Diferentes superíndices denotan diferencias significativas entre los tratamientos con $p < 0,05$.

		Dosis	Cys	GSH	hGSH	PCs
Cu	Parte aérea	Control	21,6 ^a \pm 2,2	46,0 ^a \pm 3,5	303,1 ^a \pm 5,3	n.d.
		BSO	35,8 ^b \pm 1,7	< 5	35,6 ^b \pm 3,1	n.d.
		Cu 30 μ M	17,2 ^a \pm 1,2	29,0 ^b \pm 2,0	271,7 ^c \pm 10,4	n.d.
		Cu 30 μ M+BSO	37,0 ^b \pm 1,8	18,4 ^c \pm 1,9	36,1 ^b \pm 3,4	n.d.
	Raíz	Control	27,4 ^a \pm 1,7	39,6 ^a \pm 2,2	104,9 ^a \pm 2,2	n.d.
		BSO	37,1 ^b \pm 1,4	< 5	< 5	n.d.
		Cu 30 μ M	26,3 ^a \pm 1,7	34,2 ^b \pm 2,8	89,8 ^c \pm 3,1	n.d.
		Cu 30 μ M+BSO	37,3 ^b \pm 2,0	22,7 ^c \pm 1,3	20,2 ^b \pm 3,6	n.d.
Cd	Parte aérea	Control	22,2 ^a \pm 0,3	41,7 ^{ab} \pm 1,6	270,9 ^a \pm 20,2	n.d.
		BSO	33,9 ^{ab} \pm 5,1	< 5	26,2 ^b \pm 2,9	n.d.
		Cd 30 μ M	18,8 ^a \pm 3,2	51,7 ^b \pm 6,1	317,4 ^c \pm 9,8	46,6 \pm 0,8
		Cd 30 μ M+BSO	35,7 ^b \pm 4,4	27,4 ^a \pm 3,3	28,1 ^b \pm 8,4	n.d.
	Raíz	Control	23,3 ^a \pm 0,8	40,0 ^a \pm 2,4	100,6 ^a \pm 9,3	n.d.
		BSO	36,7 ^{ab} \pm 7,3	< 5	< 5	n.d.
		Cd 30 μ M	26,8 ^a \pm 0,7	38,7 ^a \pm 0,9	87,5 ^a \pm 4,3	161,1 \pm 12,7
		Cd 30 μ M+BSO	58,2 ^b \pm 8,3	13,9 ^b \pm 0,7	20,0 ^b \pm 5,6	13,7 \pm 1,1

n.d.: no detectado

Sólo se pudieron detectar fitoquelatinas como consecuencia de la exposición de la plantas de alfalfa a Cd, siguiendo el patrón detectado en el ensayo con distintas concentraciones de metales. Como puede apreciarse en la Tabla 13, la dosis de Cd 30 μ M permitió la acumulación de PCs en hoja y raíz (aproximadamente 4 veces superior en raíz). La preincubación con BSO 1 mM supuso una drástica disminución en la concentración de PCs (25% de lo observado sin BSO); que no pudieron ser detectadas en parte aérea. Como se muestra en la Fig. 37, hubo cambios importantes en el perfil de biotioles eluidos de la cromatografía HPLC cuando se trataron las plantas con BSO. Así, sólo pudo detectarse una mínima cantidad de hPC2; mientras que en ausencia de BSO se pudo detectar una gran variedad de PCs, derivadas tanto de GSH como de hGSH, fundamentalmente de un grado de condensación de tres γ -Glu-Cys (PC3 y hPC3).

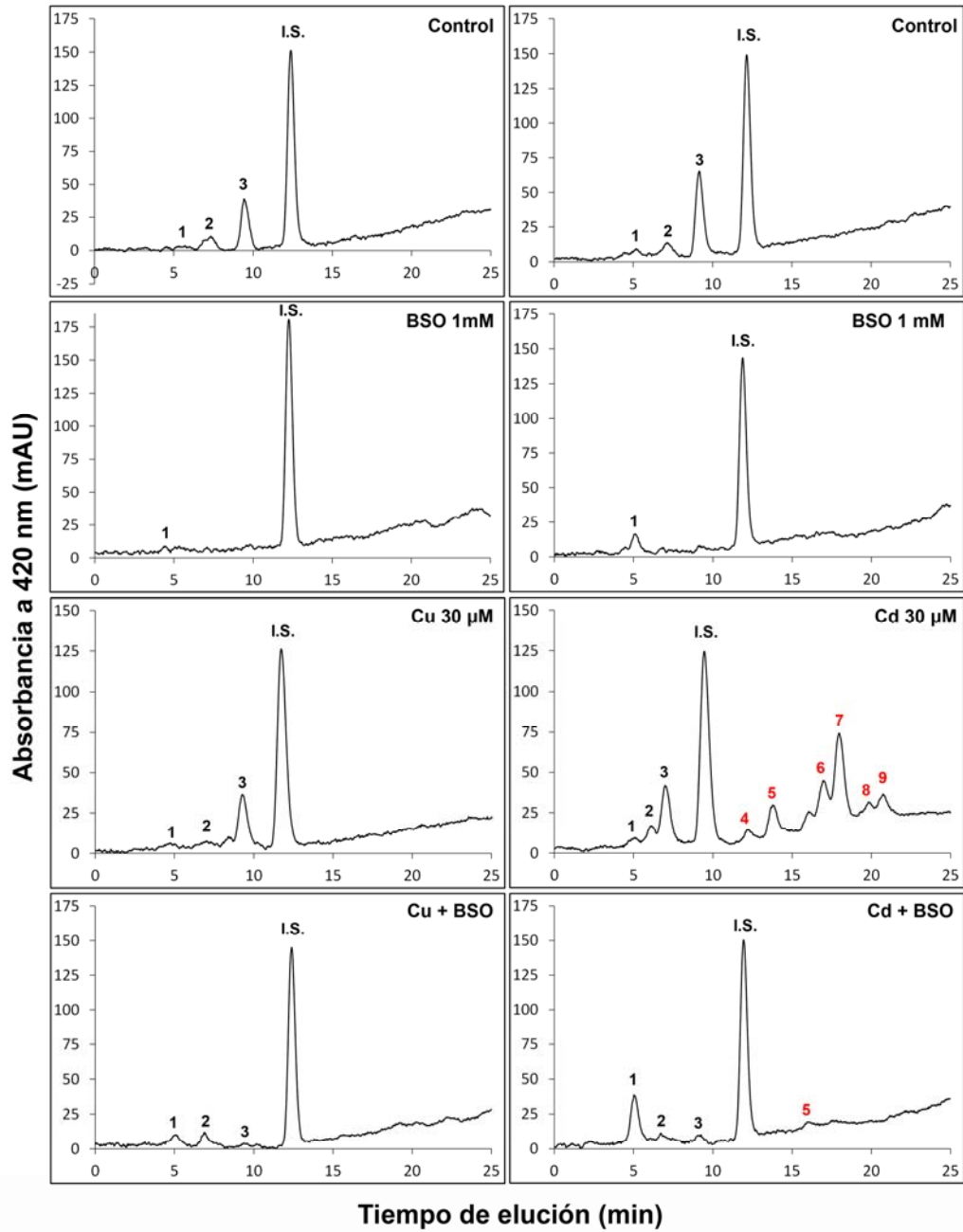


Figura 37. Perfiles de biotioles en raíces de plantas de *M. sativa* tratadas durante 7 d con Cu 30 μ M, Cd 30 μ M o BSO 1 mM. Los distintos biotioles se identificaron mediante la elución de estándares comerciales disponibles. La concentración se calculó mediante la integración del estándar interno (I.S.) N-acetil-cisteína. 1: Cys, 2: GSH, 3: hGSH, 4: PC2, 5: hPC2, 6: PC3, 7: hPC3, 8: PC4, 9: hPC4.

CAPÍTULO 7. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LA RESPUESTA TEMPRANA A Hg

CAPÍTULO 7. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LA RESPUESTA TEMPRANA A Hg.

Antecedentes

En los últimos años se ha llevado a cabo un intenso esfuerzo para caracterizar los mecanismos de resistencia de las plantas a metales pesados, habiéndose realizado buena parte de los trabajos con plantas hiperacumuladoras, como algunos ecotipos de *Thlaspi caerulescens* o *Arabidopsis halleri*, o bien en plantas tolerantes o metalíferas como *Silene vulgaris* (Krämer, 2005; Meharg, 2005).

En la bibliografía aparece una gran variedad de experimentos para estudiar el estrés oxidativo como respuesta a metales pesados, en los que se han empleado diferentes especies vegetales, dosis de metales y tiempos de exposición, como queda de manifiesto en una revisión de Shützendübel y Polle (2002). No obstante, en la mayoría de los casos, las respuestas de la planta pudieron detectarse cuando los tratamientos fueron lo suficientemente prolongados como para causar un daño celular substancial, reflejando por tanto alteraciones generales del metabolismo.

Además, buena parte del abordaje experimental está basado en una investigación focalizada a la descripción de unos parámetros fisiológicos concretos. No obstante, con el desarrollo de nuevas técnicas de análisis molecular se ha tratado de identificar cambios en el perfil de expresión génica (cDNA-AFLPs, microarrays, etc.), en el patrón de acumulación de proteínas (proteómica), o la caracterización de cambios en la composición de metabolitos (metabolómica) (Assunção et al., 2003). Mediante el empleo de técnicas de separación electroforética bidimensionales y posterior identificación por espectrometría se han identificado algunas proteínas: degradación de rubisco, inducción de proteínas relacionadas con interacción con patógenos (PR5), enzimas del metabolismo del azufre y de la ruta de glicólisis.

La técnica más utilizada para el análisis masivo de proteínas es la separación electroforética bidimensional DIGE (Differential In Gel Electroforesis), de un extracto de proteínas en gel de poliacrilamida. Esta técnica, desarrollada por O'Farrel en 1975, se basa en la separación de proteínas combinando la separación en la primera dimensión por isoelectroenfoque (IEF) según su punto isoeléctrico (pI), seguido de una

segunda dimensión por SDS-PAGE, donde se separan por su peso molecular. Para un análisis cuantitativo de las diferencias en el patrón de proteínas entre muestras que se separan en un único gel bidimensional, se utiliza la técnica DIGE, con sondas fluorescentes.

ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LA RESPUESTA TEMPRANA A Hg.

Como puede observarse en la Fig. 38 el software de análisis de geles 2-D (Typhoon, GE-Healthcare) obtuvo las imágenes de los geles para cada fluorocromo utilizado (Cy3, Cy5 o Cy2), que fueron luego superpuestos en un única imagen donde se podrían detectar los cambios en el patrón de proteínas, constituyendo un “gel maestro” compuesto.

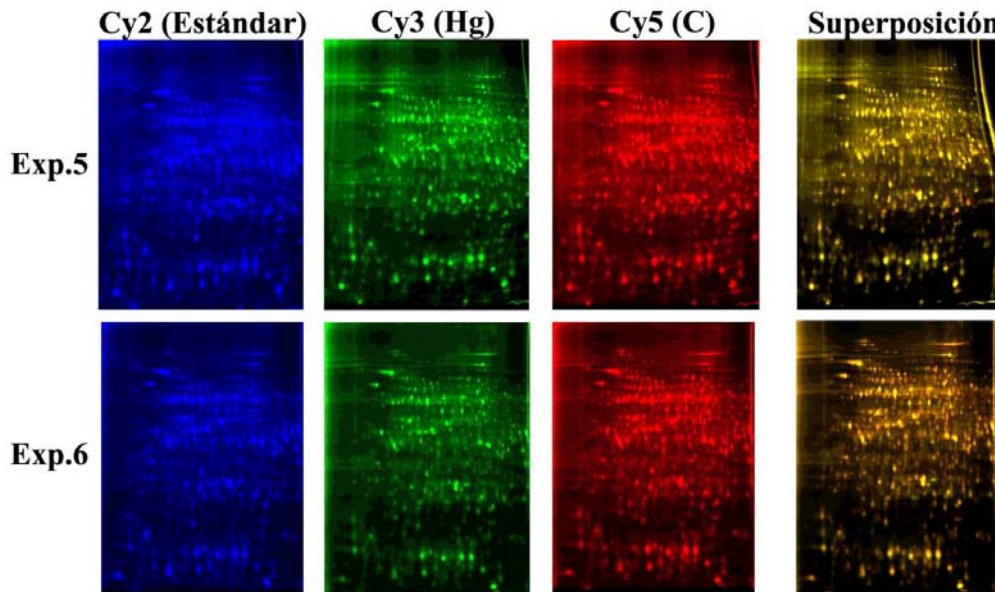


Figura 38. Ejemplo de separaciones en geles 2-D de proteínas de dos experimentos independientes (de seis realizados), en los que se realiza el marcaje cruzado de plántulas control y tratadas con Hg, con tres fluoróforos (pseudo colores para mostrar el diferente pico de emisión). La lectura independiente de la fluorescencia de cada marcaje era comparada en un gel de superposición, donde se cuantificaban las diferencias de señal entre cada muestra separadas en el mismo gel analítico. Puede observarse la gran cantidad de manchas proteicas separadas con buena resolución, pero en las que se encontraron diferencias mínimas entre el control y las plántulas tratadas con Hg 30 μ M durante 3 h.

En la Fig. 39 se exponen las imágenes de los geles obtenidos con el mapa proteómico de alfalfa para cada tratamiento utilizado, con los que mediante el análisis de imágenes, se pudieron observar pequeños cambios en el patrón de proteínas de los distintos tratamientos de Hg 10 y 30 μ M durante 3 y 6 h. El tratamiento de 3 h con Hg 30 μ M provocó pocos cambios en el patrón de proteínas (Fig. 39 A). Se identificaron cuatro proteínas mediante espectrometría de masas, de las que cuales las únicas que podrían estas relacionadas con estrés fue una proteína con alta homología a lipooxigenasa (LOX) y otra homóloga a una proteína de choque térmico de alto peso

molecular (HSP101). El perfil de ambas proteínas se muestra en la Fig. 39 C, donde se puede apreciar cambios sutiles.

Para intentar detectar más cambios, se analizaron las proteínas de plántulas tratadas durante 6 h con HgCl_2 10 y 30 μM . Como consecuencia de dichos tratamientos pudo detectarse un mayor número de proteínas diferencialmente expresadas (Fig. 39 B y 39 D). No obstante, el tratamiento con Hg provocó alteraciones importantes en la definición y resolución de las proteínas. Esto fue patente en las plántulas tratadas con Hg 30 μM , apreciándose bandeo horizontal y vertical, señal de proteínas pobremente solubilizadas, posiblemente debido a la interferencia de sustancias (sales, metabolitos secundarios) y/o degradación de proteínas, y a la propia unión de Hg (Fig. 39 D). Estos datos indican que el extracto de proteínas obtenido de dichas plantas era de baja calidad. Dado que los tratamientos con Hg durante 6 h afectaron en gran medida la integridad de las proteínas no pudo obtenerse datos válidos para identificar las proteínas diferencialmente expresadas mediante su análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

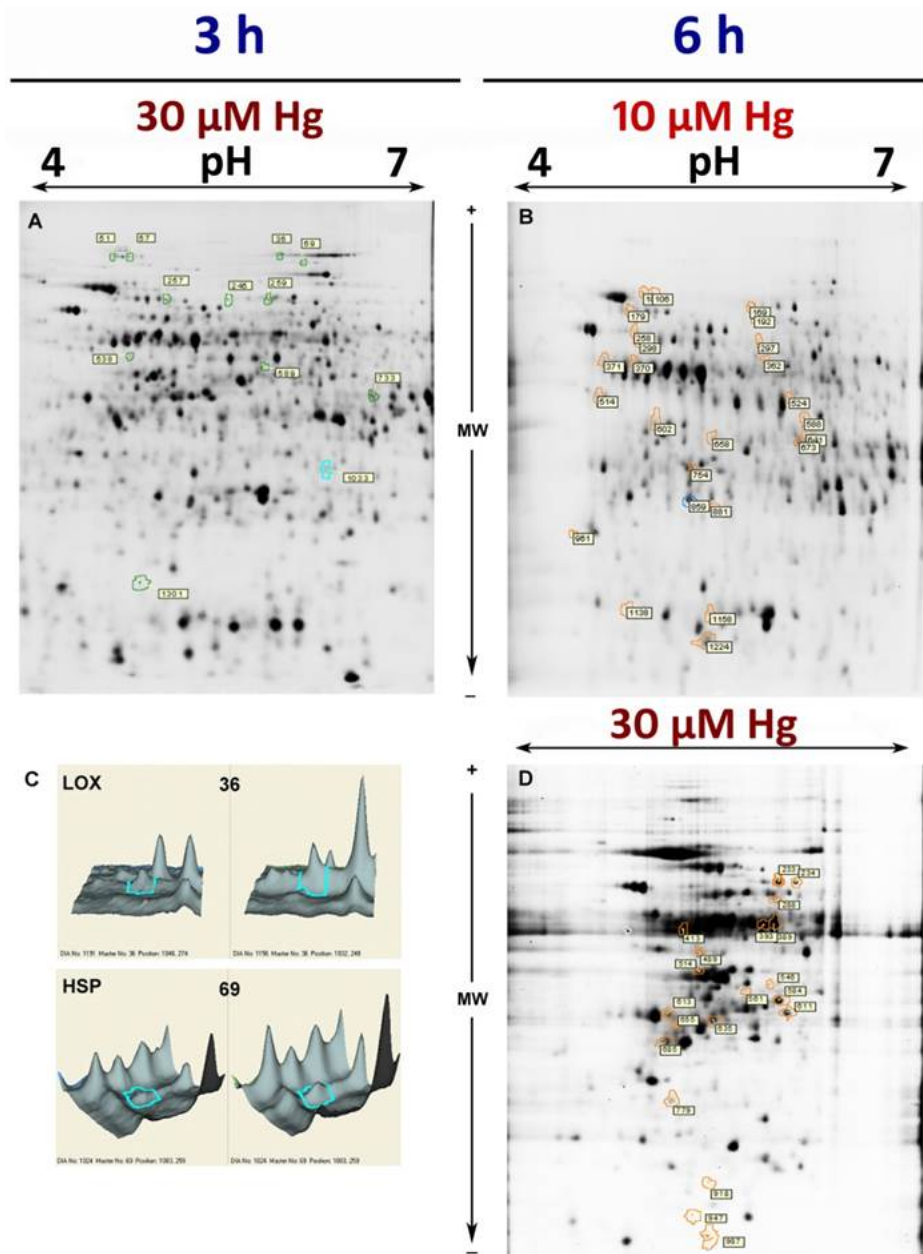


Figura 39. Mapa proteómico bidimensional de *Medicago sativa*. **A:** Gel maestro tratamiento Hg 30 μM 3 h, indicando las proteínas de interés. **B:** Gel maestro tratamiento Hg 10 μM 6 h, indicando las proteínas de interés. **C:** Perfiles tridimensionales de dos proteínas identificadas por espectrometría de masas. **D:** Gel maestro tratamiento Hg 30 μM 6 h, indicando las proteínas de interés.

CAPÍTULO 8. DISCUSIÓN

CAPÍTULO 8. DISCUSIÓN

RESPUESTAS TEMPRANAS A CADMIO Y MERCURIO

Un parámetro muy sensible del estrés por metales es la inhibición del crecimiento (Ortega-Villasante et al., 2005), tal y como ha sido observado en múltiples especies vegetales como maíz (Lagriffoul et al., 1998; Rellán-Álvarez et al., 2006), guisante (Dixit et al., 2001) o tomate (Cho y Park, 2000). En nuestro trabajo, este parámetro reveló valores elevados a tiempos cortos de exposición a los metales tóxicos, como observaron otros autores en plántulas de *Pinus sylvestris* expuestas a Cd 50 μM (Schützendübel et al., 2001) y alfalfa expuesta a Cd y Hg 30 μM (Ortega-Villasante et al., 2005). La inhibición del crecimiento fue más severa a medida que aumentaba la dosis de metales y el tiempo de exposición de las plántulas a los mismos. Sin embargo, la inhibición del crecimiento fue más acusada con Hg, lo que sugiere mayor toxicidad que el Cd, al igual que lo observado por Ortega-Villasante et al. (2007) en *Medicago sativa*. En nuestro trabajo también se observó un incremento en la actividad de POXs en presencia de Hg y Cd. Las POXs están implicadas en distintos procesos fisiológicos como la lignificación y suberización de la pared celular, reforzamiento de la pared por entrecruzamiento de proteínas, deposición de polifenoles, oxidación de compuesto fenólicos y producción de radicales tóxicos (Pozo, 1999). La alteración de la actividad de POX bajo estrés metal ha sido ampliamente reportado, en diferentes plantas, las dosis de metal y tiempo de exposición (Cho y Park, 2000; Dixit et al., 2001; Schützendübel y Polle, 2002; Zhou et al., 2008; Sobrino-Plata et al., 2009). Se ha propuesto que, bajo condiciones de estrés, la actividad de las isoformas básicas de POXs aumenta, las paredes de las células se vuelven más rígidas y, como consecuencia, la expansión de células se detiene (Ros-Barceló et al., 2002). La inducción de POXs se correlacionó con la inhibición de crecimiento de las raíces en plantas de cebada expuesta a Cd (Tamás et al., 2007). Por lo que la exposición de metales tóxicos como el Hg o Cd provocaría la inducción de isoformas básicas de POXs y la rigidez de la pared celular, y con ello la disminución del crecimiento. Sin embargo, en nuestro trabajo la exposición prolongada a Hg produjo una disminución de la actividad POX en raíz. Por lo que se cree que a partir de las 6 h de tratamiento con Hg la toxicidad del metal

empieza a hacer muy acusada y es factible que las células se envenenen rápidamente y no sean metabólicamente funcionales (Ortega-Villasante et al., 2007).

La actividad de APX en cotiledones aumentó en presencia de Hg y Cd durante las primeras horas de exposición. Es posible que esta activación pueda deberse a una modificación post-traducciona ya que no se detectaron cambios de la cantidad de APX citosólica mediante inmunodetección por Western-blot. Sin embargo, en raíces, a partir de las 3 h de exposición a Hg, la actividad APX disminuyó, en concordancia con un trabajo realizado con plantas de maíz que revelaba una disminución crítica de la actividad APX cuando las plantas estuvieron expuestas a Hg 30 μM (Rellán-Álvarez et al., 2006). Por otra parte, se observó que la actividad GR también fue afectada diferencialmente en las plántulas de alfalfa a Hg o Cd. En los cotiledones y raíces la GR fue activada moderadamente con Cd, en concordancia con los resultados obtenidos en alfalfa por Zhou et al. (2008) y plantas de guisante tratadas con Cd (Romero-Puertas et al., 2006). Por un lado, el tratamiento con Cd produjo un aumento progresivo de la actividad GR en las raíces, como también observaron Yannarelli et al. (2007) en raíces de plantas de trigo tratadas con Cd 100 μM por una a dos semanas. Sin embargo, en los tratamientos con Hg, al igual que ocurrió con las otras enzimas analizadas (APX y POX), a partir de las 6 h de exposición comenzó a observarse una disminución significativa de la actividad de GR, siendo totalmente inhibida con Hg 10 y 30 μM . Estos cambios no produjeron modificaciones en el contenido de proteína GR, excepto a las 24 h con Hg 10 y 30 μM en donde se registró un aumento en el contenido de GR. Esto podría explicarse por el aumento de la expresión del genes GR1 y GR2 en presencia de Hg 30 μM , reportado por Ortega-Villasante et al. (2007); quizás siguiendo un mecanismo compensatorio para ajustar el balance celular de GSH/GSSG o hGSH/hGSSGh. Cabe destacar también la diferente relación dosis/tiempo entre las enzimas estudiadas. Se observa que la actividad GR es mucho más sensible al tratamiento con metales y responde más rápidamente que las peroxidasas, incluyendo APX. Además la raíz es la parte de las plántulas de alfalfa que se ve más afectada y donde se observa más claramente la influencia de los metales tóxicos. Esto es previsible ya que la raíz es el primer órgano que se expone en contacto con los metales y donde se acumula la mayor proporción de Hg y Cd absorbido, metales que son poco

transportados a los cotiledones. Además el Hg se acumula en mucha mayor proporción que el Cd, hecho también observado por Ortega-Villasante et al. (2007) en plántulas de alfalfa. El aumento de las enzimas antioxidantes en las primeras horas de exposición a Hg o Cd podría sugerir que la presencia de los metales incrementó la capacidad antioxidante de las células para la eliminación del exceso de H₂O₂ (Morita et al., 1999). Sin embargo es probable que debido a la alta toxicidad del Hg, las plántulas lleguen rápidamente al mencionado “intervalo caracterizado por muerte celular” (Ortega-Villasante et al., 2007).

Por otro lado, varios estudios recientes han demostrado que la presencia de metales pesados aumenta la síntesis de proteínas de choque térmico (HSPs) en plantas (Dubey, 2011; Zhen et al., 2007; Zhao et al., 2011). En nuestro trabajo se observó la sobreexpresión de la sHSP17.6 (Clase I) y sHSP17.7 (Clase II) en raíces de alfalfa desde las primeras horas de exposición a Hg y Cd (Fig. 14). Es factible que las sHSP puedan ser necesarias para prevenir el plegamiento aberrante de proteínas bajo estrés por metales tóxicos, como se sugiere en plantas de girasol tratadas con Cd (Rampino et al., 2010). En plantas de *A. thaliana* expuestas a Cd se observó la sobreexpresión de genes implicados en el plegamiento de proteínas (Suzuki et al., 2001), lo que demuestra que la toxicidad del Cd es en parte debida a la inducción de procesos de desnaturalización de proteínas, probablemente por modificaciones oxidativas (Romero-Puertas et al., 2002). Haq et al. (2013) estudiaron en *Chenopodium album* la expresión del gen y la acumulación de sHSP26.13 por exposición a Cd. La ausencia de correlación entre los niveles de transcripción y proteína en presencia de Cd indicó que bajo estrés por metal, hay una regulación post-transcripcional en la producción de sHSP26.13 implicada en proteger a las plantas del estrés por metal. Todos estos resultados indican que determinadas clases de chaperonas podrían ser activadas por estrés debido a diferentes metales, como Hg o Cd. Además Rodríguez-Serrano et al. (2009) observaron en plantas de guisante que la exposición a Cd provocó la inducción del gen HSP71.2, y que esta inducción está regulada por la sobreproducción de H₂O₂. En concreto, se cree que los factores de transcripción que participan en la regulación de las HSPs podrían actuar como sensores de H₂O₂ (Miller y Mittler, 2006; Rodríguez-Serrano et al., 2009).

El tratamiento con metales induce estrés oxidativo y la consiguiente acumulación de H_2O_2 (Ortega-Villasante et al., 2007, Olmos et al., 2003; Garnier et al., 2006; Heyno et al., 2008). Se sabe que las moléculas de H_2O_2 pueden actuar como moléculas señal iniciando una cascada de señalización a respuestas de estrés (Maksymiec y Krupa, 2006), y que el estallido oxidativo (Ortega-Villasante et al., 2007), el aumento de actividad de NADPH-oxidasa y la producción de H_2O_2 está conectado a la percepción de etileno (Montero-Palmero et al., 2013). Se ha observado que la presencia de esta fitohormona lleva a un incremento de la rigidez de la pared celular, resultando en menor elasticidad, necesaria para la elongación y crecimiento celular (Schopfer, 1996). En nuestro trabajo, durante las primeras horas de exposición a Hg o Cd se observó un aumento progresivo de producción de H_2O_2 extracelular, determinado por la oxidación del fluoróforo Amplex Red. Esta producción continuó en aumento con la exposición de las plántulas al Cd, sin embargo comenzó a caer drásticamente a partir de las 6 h de exposición a Hg. Esto se apoya con los resultados de actividad enzimática obtenidos en las raíces de alfalfa donde la actividad NADPH-oxidasa aumentó durante las primeras horas de exposición a Hg y Cd, pero se inhibió en los tratamientos más prolongados con Hg. No así con los tratamientos de Cd donde se detectó un aumento de la actividad de esta enzima. El aumento de H_2O_2 producido por los tratamientos con Hg y Cd podría atribuirse a un efecto primario de estos metales en la NADPH-oxidasa, que se sabe que está implicada en la generación de H_2O_2 (Olmos et al., 2003; Garnier et al., 2006). Sin embargo, Heyno et al. (2008) determinaron que las NADPH-oxidasas no son la única fuente de H_2O_2 en plantas tratadas con Cd, ya que las mitocondrias también pueden estar involucradas en la generación de H_2O_2 . Además, Ortega-Villasante et al. (2007) observaron que el DPI (cloruro difenileneiodonio) inhibidor de la NADPH-oxidasa no bloqueó la producción de H_2O_2 en las raíces de alfalfa expuestas a Cd, mientras que sí redujo significativamente la producción de H_2O_2 inducida por Hg. Por lo tanto, no se puede descartar otros procesos metabólicos que den lugar a ROS en presencia de Hg o Cd, y que cada metal podría ejercer diferentes efectos tóxicos en las plantas.

Por otra parte, se observó la acumulación de fitoquelatinas en las raíces de las plántulas de alfalfa tratadas con Cd o Hg. En los tratamientos de Cd, esta acumulación

fue progresiva con el aumento de dosis y tiempo de exposición al metal. Sin embargo, a con 24 h de exposición a Hg, la acumulación de fitoquelatinas disminuyó hasta ser prácticamente indetectable con Hg 30 μ M (Fig. 15; Tabla 2). La importancia de la síntesis de PCs en la tolerancia a Hg fue demostrada por Carrasco-Gil et al. (2011), quienes observaron la capacidad de las PCs para formar complejos muy estables con Hg en distintas especies vegetales. En estos experimentos fue posible detectar los complejos incluso en extractos extremadamente ácidos, dando idea de la enorme estabilidad de los enlaces entre restos tiólicos y el Hg (Carrasco-Gil et al., 2011). De hecho, sólo se pudo cuantificar correctamente la concentración de PCs libres en *Brassica chinensis* tras un tratamiento químico severo con NaBH₄ alcalino (Chen et al., 2009). Esto da idea de la dificultad que entraña medir PCs libres en extractos vegetales en plantas tratadas con Hg; sobre todo cuando se tratan de plántulas que tienen aún mecanismos de detoxificación y compartimentalización poco establecidos como sucede en las de alfalfa estudiadas en el sistema a *microescala* utilizado.

Un resultado interesante del análisis de biotioles fue la disminución del contenido de hGSH a medida que aumentó la dosis y tiempo de exposición a Hg o Cd. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ortega-Villasante et al. (2005), y con los reportados para tabaco (Vögeli-Lange y Wagner, 1996), *A. thaliana* (Xiang y Oliver, 1998) y pino (Schützendu-bel et al., 2001), en los que después de tratamientos a corto plazo con Cd se apreciaron cambios transitorios en el nivel de GSH/hGSH, posiblemente debidos a su drenaje por la necesidad de sintetizar PCs (Cobbett y Golsdbrough, 2002). Se estima que uno de los pasos limitantes en la tolerancia a metales mediada por PCs depende de la capacidad de sintetizar suficiente GSH/hGSH, como ha sido demostrado en plantas transgénicas que sobreexpresan γ -ECS, donde la sobreexpresión de esta enzima produjo mayor tolerancia al Cd debido a la mayor producción de GSH/hGSH y producción de PCs (Zhu et al., 1999).

IMPLICACIÓN DEL ETILENO EN LA RESPUESTA TEMPRANA DE PLANTULAS DE ALFALFA A Cd Y Hg

Análisis transcriptómicos de *Medicago sativa* realizados en nuestro laboratorio han postulado la participación del etileno en la respuesta temprana de la alfalfa al estrés

por Hg (Montero-Palmero et al., 2013). El etileno se sintetiza en plantas sometidas a diversos tipos de estrés biótico y abiótico y es responsable de la inducción de la senescencia celular (Wang et al., 2002). En particular, las plantas que acumulan metales pesados, tales como Cd o Cu, producen etileno a una tasa mayor que las control (Arteca y Arteca, 2007; Rodríguez-Serrano et al., 2009). Por ello, para analizar la participación del etileno en la respuesta a la toxicidad por Cd o Hg, utilizamos el 1-metilciclopropeno (1-MCP), un inhibidor de la acción del etileno. En primer lugar, se observó que al incorporar 1-MCP a los tratamientos de Hg o Cd, las plántulas expuestas a los mismos tuvieron menor tasa de inhibición de crecimiento que las expuestas sólo a Hg o Cd (Fig. 16). Se observaron comportamientos similares en *A. thaliana* tratadas con Al debido a la utilización de inhibidores de síntesis de etileno (Co^{2+}), el aminoetoxivinilglicina (AVG) y un bloqueador de señalización de etileno (Ag^+) que evitaron la inhibición de crecimiento radicular inducido por el Al (Sun et al., 2010). Por otro lado, las raíces de alfalfa y *A. thaliana* tratadas con Hg y 1-MCP crecieron más que cuando fueron expuestas a niveles moderados de Hg (Montero-Palmero et al., 2013). Además, en nuestros estudios la adición del 1-MCP mitigó la acumulación de H_2O_2 en las raíces de alfalfa, una de las principales especies reactivas de oxígeno producidas bajo estrés por Hg o Cd (Ortega-Villasante et al., 2007; Olmos et al., 2003; Garnier et al., 2006). También se observó una disminución de la actividad NADPH-oxidasa en las raíces de las plántulas insensibles etileno. La actividad de APX no cambió significativamente en los tratamientos sin embargo, estas plántulas se observó actividad GR aún en presencia de Hg, que es un potente inhibidor; mientras que en presencia de Cd no se observaron cambios significativos respecto a las plántulas sin tratar. Los cambios detectados se produjeron sin modificaciones significativas en el contenido de GR y APX determinado por inmunodetección por Western-blot. Se cree que la actividad de estas enzimas está mediada por el etileno, ya que en las plantas insensibles Se cree que las plantas insensibles a etileno pueden mantener la integridad de sus mecanismos de defensa a pesar de la exposición a Hg y Cd que produce etileno e induce el proceso de senescencia (Wang et al., 2004), como se ha observado en distintos estudios de postcosecha donde los frutos que ya han comenzado el proceso de senescencia recuperan la actividad de enzimas antioxidantes (Chiriboga, 2012; Liu et al., 2013; Yuan et al., 2010).

Otra respuesta que se atenuó al incorporar 1-MCP a los tratamientos con metales fue la inducción de sHSP17.7 y sHSP17.6. Las sHSPs están implicadas en la respuesta temprana a metales, como se ha discutido en el apartado anterior de esta discusión. Sanita di Toppi y Gabrielli (1999) han propuesto que la presencia de metales genera etileno y distintos autores han planteado que las HSPs se inducen por algunas fitohormonas, como el etileno (Wang., 2004; Kotak et al., 2007; Divi et al., 2010; Larkindale y Huang, 2004; Larkindale et al., 2005). Suzuki et al. (2005) y Kagale et al. (2010) estudiaron factores de transcripción vinculados a la señalización de etileno, entre los que identificaron varios factores de choque térmico (HSF), responsables en último término de la sobre-expresión de sHSPs. Por tanto, esto apoyaría nuestros resultados en las plántulas insensibles a etileno, donde la inducción de sHSPs es mucho menor que las no tratadas con el inhibidor 1-MCP.

Se detectó menor concentración de PCs en las raíces de las plántulas insensibles a etileno (Tabla 7, Fig. 17). Además, la concentración de los otros tres biotioles detectados (Cys, GSH y hGSH) fue mayor respecto a las plántulas expuestas a Hg o Cd sin 1-MCP. En plantas mutantes *ein2* de *A.thaliana* insensibles a etileno, se observó que la mutación de este gen las hacía más sensibles al Pb, debido a dos mecanismos diferentes, uno dependiente de GSH y otro independiente de GSH pero dependiente de AtPDR12, un transportador ABC que contribuye a la resistencia Pb (II) en *Arabidopsis*, y funciona como una bomba para excluir Pb (II) y/o Pb (II) que del citoplasma (Lee et al., 2005; Cao et al., 2009). Además Meyer (2008) postula que un modelo para la transmisión de señales redox inducidas por estrés, donde las glutaredoxinas (Grxs) son el “sensor” intermediario entre las ROS y la biosíntesis de GSH.

Los resultados obtenidos con las plántulas insensibles a etileno y lo descrito en la bibliografía refuerza la hipótesis de que el etileno podría estar involucrado en la regulación de la actividad de NADPH-oxidasa y la producción de H₂O₂ (Montero-Palmero et al., 2013; Mersmann et al., 2010). De algún modo las ROS son responsables, en parte, de activar la ruta de biosíntesis de GSH/hGSH como metabolito necesario de las plantas como antioxidante y precursor de PCs (Jozefczak et al., 2012). Por lo que si las plántulas no perciben el etileno, no activarían la NADPH-oxidasa y por

ende se produciría menor cantidad de H₂O₂. Es posible que la disminución del estallido oxidativo, asociada al bloqueo de la señal de etileno, limite la amplitud de la respuesta del metabolismo de asimilación de azufre y, por tanto, haya una menor tasa de síntesis de biotioles.

CONTRIBUCIÓN DEL METABOLISMO DE GSH/hGSH EN LA TOLERANCIA A Cd y Hg

Como es bien sabido el GSH, juega un papel fundamental en las defensas de las plántulas, interviniendo en la homeostasis, en la defensa antioxidante y en la transducción de señales bajo estrés por metales (Jozefczak et al., 2012). En análisis funcionales de GSH en las plantas, una de las herramientas que se utiliza es la butionina sulfoximina (BSO), un inhibidor específico de la síntesis de GSH (Griffith y Meister, 1979) ya que se pueden realizar estudios centrados en su síntesis y su concentración en las plantas (por ejemplo, Cobbett et al., 1998; Kocsy et al., 2000; Meyer et al., 2007; Reichheld et al., 2007). En nuestro trabajo, se observó una mayor inhibición de crecimiento en los tratamientos conjuntos de metal y BSO respecto a los que sólo tenían Hg o Cd, tanto a las 6 como a las 24 h de exposición. Estos resultados se apoyan con lo descrito de que el BSO produce estrés oxidativo (Sobrino-Plata et al., 2009; Ortega-Villasante et al., 2005) y que la disminución de GSH/hGSH por BSO podría causar una mayor sensibilidad al estrés, que afecta el crecimiento de las plantas (Sobrino-Plata et al., 2009).

Por otro lado, se observó una disminución notable del contenido de GSH y hGSH en cotiledones y raíces expuestos a BSO, confirmando así el efecto inhibidor del BSO en la síntesis de GSH/hGSH. Además la adición de BSO a los tratamientos de Hg o Cd provocó una disminución drástica del contenido de PCs. Esto se apoya con lo observado por Xiang et al. (2001) que evaluaron la fitotoxicidad de Cd en líneas transgénicas de *Arabidopsis* con la supresión de la expresión de γ -ECS, y demostraron que las plantas con reducido contenido de GSH fueron más sensibles a este metal pesado. Del mismo modo, plantas de *Brassica napus* que sobreexpresaban la γ -ECS eran más resistentes a Hg, lo que sugiere que la γ -ECS podría ser una enzima clave en el proceso (Li et al., 2006). Además se ha descrito que la exposición de diferentes cultivos celulares o plantas a BSO produjo mayor sensibilidad a Cd con una inhibición

correspondiente de la biosíntesis de PCs y esto podía ser revertido por la adición de GSH al medio (Zenk, 1996; Rauser, 1995, 1999; Cobbet et al., 2000). Por lo que nuestros resultados pondrían en evidencia la importancia del GSH/hGSH en la tolerancia a metales, principalmente como precursor de PCs. Además se detectó mayor contenido de Cys en las plántulas expuestas a BSO, siendo este contenido aún mayor en el tratamiento de Cd+BSO. Este resultado se apoyaría con los obtenidos por Rodríguez-Serrano et al. (2009) donde el azufre se acumuló 3 veces en plantas expuestas a Cd respecto a las plantas sin tratar, lo que sugiere que bajo condiciones de estrés por metales se produce la inducción del metabolismo de asimilación de este macronutriente (Nocito et al., 2006). Además la inducción del metabolismo del azufre por Cd se ha descrito anteriormente y consiste en una regulación coordinada transcripcional de los genes para la captación de sulfato y su asimilación, así como la biosíntesis de glutatión y fitoquelatinas (Howarth et al., 2003; Nocito et al., 2006). Además la inducción de la fitoquelatinas es una de las principales estrategias de desintoxicación contra el Cd, por ser quelantes de iones Cd y la prevención de su toxicidad (Howarth et al., 2003; Nocito et al., 2006). Por lo que se cree que el metabolismo del S podría ser inducido en respuesta al estrés por Cd y ser mayor aún al inhibirse la producción de GSH/hGSH por el BSO.

INFLUENCIA DEL METABOLISMO DE BIOTIOLES EN LA TOLERANCIA A Cd y Cu.

La exposición de las plantas de alfalfa a Cd y Cu durante 7 días produjo efectos nocivos sobre su crecimiento. La inhibición del crecimiento se manifestó en el tratamiento de Cu 30 y 100 μM , una vez que el umbral beneficioso para este micronutriente fuera sobrepasado. Las dos dosis de Cd fueron perjudiciales para las plantas, produciendo inhibición de crecimiento (Fig. 23, D). Estos resultados se pueden con los descritos para ensayos similares en plantas tratadas con Cd y Hg en un sistema de cultivo semi-hidropónico (Sobrino-Plata et al., 2009). La inhibición del crecimiento en respuesta a los metales pesados constituye un síntoma característico del estrés oxidativo inducido por éstos y se ha detectado en múltiples especies vegetales como guisante (Dixit et al., 2001) o tomate (Cho y Park 2000), quizás por la interacción que puede producir el metal en la raíz, causando peroxidación lipídica y la potencial pérdida de la integridad de las membranas celulares (Hernández y Cooke, 1997). Estos trabajos también

apoyan los resultados obtenidos en nuestro estudio donde se observó aumento de peroxidación lipídica en las plantas expuestas a las dosis más altas de Cd (30 μM) y Cu (30 y 100 μM). También se observó una disminución de la concentración de clorofila a mayores dosis de Cd y Cu. Estos resultados concuerdan con los obtenidos anteriormente en plantas de alfalfa en condiciones similares frente a Cd o Hg (Sobrino-Plata et al., 2009). Otros trabajos con tratamientos prolongados de Cd detectaron una fuerte clorosis ligada a un estallido oxidativo (Paradiso et al., 2008; Arora et al., 2002). Además se detectó un ligero aumento de actividad de NADPH-oxidasa en las raíces de las plantas tratadas con Cu, aunque no se observó modificación significativa en las tratadas con Cd. Sin embargo, se cree que esta activación de la NADPH-oxidasa es transitoria, ya que los análisis sólo se realizaron con plantas expuestas durante 7 días a metales no habiéndose analizado a tiempos más cortos. En este sentido, los ensayos realizados en el sistema a microescala mostraron un aumento de la actividad de NADPH-oxidasa en las primeras horas, que podría ser reflejo de esos cambios tempranos de respuesta y aclimatación a la exposición a metales tóxicos (Ortega-Villasante et al., 2007). Se observó además que con Cu 100 μM la actividad NADPH-oxidasa disminuyó, posiblemente por la elevada toxicidad del tratamiento. Por lo que estos resultados apoyarían la hipótesis de que el Cd y el Cu producirían estrés oxidativo en las plantas de alfalfa por la inducción de ROS y la consiguiente disminución de crecimiento. La actividad de las enzimas antioxidantes analizadas, GR y APX, se vio afectada por los tratamientos de Cd y Cu. El efecto más significativo se vio en las raíces de plántulas expuestas a Cd. En los tratamientos con Cu no se observaron grandes cambios en la actividad de GR. La activación de esta enzima podría explicarse por modificaciones post-traduccionales ya que no se observaron cambios en el contenido de las enzimas. Excepto para Cu que se observó un aumento en el contenido de GR con Cu 30 y 100 μM . La APX se vio ligeramente inducida por los tratamientos de Cd y Cu sobre todo en las raíces de las plantas de alfalfa. Estos resultados concuerdan con lo observado en plantas de alfalfa expuestas a Cd 30 μM (Sobrino-Plata et al., 2009) y en plantas de trigo expuestas a Cd 100 μM (Yannarelli et al., 2007). Por otro lado, tampoco se detectaron alteraciones significativas en la inducción de HSPs en presencia con Cd y Cu. Con las dosis más pequeñas de metal se observó un ligero aumento de sHSP17.7 y sHSP17.6. Como se ha documentado, estos metales son

potentes inductores de estrés oxidativo (Dixit et al., 2001; Cho y Park 2000; Hernández y Cooke, 1997) y la planta podría actuar en presencia de Cd o Cu activando sus defensas antioxidantes para hacer frente al estrés por dichos metales pesados. Sin embargo con estos resultados se puede observar que Cd y Cu han producido efectos moderados de estrés en las plantas en comparación con cultivos hidropónicos puros. Además teniendo en cuenta el estado fenológico, las plantas en sistema semi-hidropónico son más maduras que las utilizadas en el cultivo hidropónico puro por lo que también sus mecanismos de respuesta a estrés estarían más desarrollados. De todos modos no se realizó un estudio de aclimatación a los metales, sino que sólo se expusieron durante 7 días. Esto concuerda con lo observado en trabajos anteriores (Vázquez y Carpena-Ruiz, 2005; Sobrino-Plata et al. 2009) donde los efectos tóxicos de metales fueron menores en sistemas semi-hidropónico que en sistemas de cultivo hidropónicos puros.

Anteriormente en otro trabajo se estudió el efecto del Hg en plantas cultivadas en sistema semi-hidropónico (Sobrino-Plata et al., 2009). Por lo que se decidió incorporar el Cu a los nuevos estudios con la hipótesis de que este micronutriente, en dosis elevadas podría inducir comportamientos similares al Hg, ya que es un potente agente redox debido a la generación de ROS por reacciones tipo Fenton y Haber-Weiss (Halliwell y Gutteridge, 1984). Sin embargo, una de las diferencias fundamentales encontradas fue que la presencia del Cu no indujo la producción de PCs en las plantas, mientras que se conoce que el Hg induce la síntesis y acumulación de PCs (Sobrino-Plata et al., 2011; Carrasco-Gil et al., 2011). Se cree que la tolerancia al Cu no depende de la síntesis de PCs y esto se apoya con los resultados de algunos autores que observaron que no se indujeron PCs en *Arabidopsis* expuestas a Cu entre 5 a 50 μM (Wójcik et al., 2009). O como se evidenció por un mutante de *Arabidopsis* deficiente de PCs y sensible a Cd (*cad1-3*) que no muestra incremento significativo de sensibilidad al Cu (Lee y Kang, 2005). Además, que en plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobrepresan PCS1 (*AtPCS1*) y son tolerantes a Cd no eran tolerantes a estrés por Cu, apoyando así la hipótesis de que las PCs no están involucradas en el mecanismo de tolerancia (Lee y Kang, 2005). Sin embargo, como era de esperar, se observó que las plantas tratadas con Cd acumularon PCs en sus raíces. Estos datos son

similares a los obtenidos por Sobrino-Plata et al. (2009) donde también se observó el aumento progresivo de PCs a medida que aumentaba la dosis de Cd en plantas de alfalfa. En presencia de Cu y Cd se observó una disminución progresiva de GSH y hGSH a medida que aumentaba la dosis de metales, como también se observó en el trabajo de Cuypers et al. (2011), y se cree que esta puede deberse a su utilización como sustrato en la reducción en la síntesis de ascorbato, además que el GSH podría también consumirse y degradarse con el fin de proteger las membranas celulares de la peroxidación de lípidos (Markovska et al., 2009) y ser utilizado en el caso del Cd para la síntesis de PCs (Josefckac et al., 2012).

Con los resultados anteriores pudimos observar que el tratamiento de Cu 100 μ M era bastante nocivo para las plantas de alfalfa. Por lo que para estudiar el papel del GSH/hGSH en la tolerancia a metales, se trabajó sólo con las dosis de Cu o Cd 30 μ M. Se observó que al añadir BSO 1 mM a los tratamientos con metales, la inhibición de crecimiento fue mayor comparada con los tratamientos de sólo metal. La peroxidación de lípidos también aumentó significativamente cuando se incorporó BSO a los tratamientos de Cu o Cd. Además la concentración de clorofilas se vio negativamente influenciada por la acción conjunta de metal y BSO. Además se observó que la actividad de las enzimas antioxidantes, GR y APX, disminuyó como consecuencia de la incorporación del BSO. Parece que la disminución del GSH/hGSH por el BSO provocaría una situación mucho mayor de estrés y las plantas no serían capaces de tolerarlo. Esto podría confirmar la importancia del GSH/hGSH en la defensa antioxidante de las plantas en presencia a metales tóxicos (Jozefczak et al., 2012).

Por otro lado, se analizó la actividad de las distintas isoformas de SOD, entre las que se encuentran una isoforma citosólica y otra plastidial que contienen cofactores de Zn y Cu. Se observó un ligero aumento en presencia de Cu 30 μ M, aunque la presencia de BSO no produjo cambios significativos respecto a las plantas control. La idea era estudiar los posibles cambios que la presencia de Cu pudiera tener sobre la actividad de las enzimas que necesitan este metal. Sin embargo como también concluye Cuypers et al. (2011), la incorporación de Cu no afectó significativamente la actividad SOD como tampoco lo hizo la disminución de GSH/hGSH.

El tratamiento con BSO también influyó negativamente en la acumulación de PCs en el tratamiento con Cd y sólo se pudo detectar una mínima cantidad de hPC2. En el tratamiento con Cu, la incorporación de BSO provocó una disminución significativa de los niveles de GSH y hGSH. Sin embargo, se observó un aumento en el contenido de Cys, mucho mayor en el tratamiento de Cd+BSO. Por lo que se cree que al inhibir la síntesis de GSH/hGSH se podría inducir el metabolismo de asimilación del S (Howarth et al., 2003; Nocito et al., 2006; Rodríguez-Serrano et al., 2009) para contrarrestar la deficiencia de biotioles antioxidantes, y hacer frente al estrés por estos metales tóxicos, posiblemente a través de un mecanismo que regula la homeostasis redox celular.

ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LA RESPUESTA TEMPRANA A Hg

Para identificar cambios fisiológicos masivos que se produjeran durante la respuesta temprana de las plántulas de alfalfa expuestas a Hg, se procedió a analizar su proteoma empleando técnicas de separación electroforética bidimensional. Para cuantificar los cambios en la expresión de las proteínas se realizó un análisis de perfiles de expresión de proteínas basado en el marcaje por fluorescencia DIGE que permite analizar múltiples muestras y visualizarlas sobre un único gel 2-D. La aparición o desaparición de manchas informa sobre la expresión diferencial de las proteínas y la intensidad de las manchas permite conocer los niveles de expresión. Por lo que se logró poner a punto un procedimiento para realizar un estudio proteómico de la respuesta de plántulas de alfalfa a Hg a tiempos cortos. Sin embargo, se observaron cambios mínimos en el patrón electroforético de proteínas de raíz de plántulas tratadas con Hg 10 y 30 μ M durante 3 y 6 h. En el tratamiento de 3 h se resolvieron correctamente un número elevado de proteínas (2000-3000) manchas, similar al obtenido por algunos autores utilizando esta misma tecnología (Almeida et al., 2012; Colditz y Braun, 2010). Lamentablemente, el análisis estadístico no permitió identificar un número elevado de proteínas diferencialmente expresadas, incluso en los tratamientos de Hg 30 μ M, en los que se pudo apreciar la aparición de numerosos síntomas de estrés oxidativo (Figura 39 A). De las cuatro proteínas que pudieron identificarse mediante MALDI-TOF, dos se identificaron como homólogas a una LOX y una HSP (Figura 39 C). Las LOXs son enzimas oxigenasas de ácidos grasos

poliinsaturados, codificadas por una amplia familia de genes en plantas y animales (Feussner y Wasternack, 2002). La vía LOX se puede activar en diferentes condiciones de estrés abiótico, como también por las interacciones con agentes patógenos (Blée, 2002). Por otro lado, se pudieron encontrar varios informes que demuestran el aumento en la expresión de HSPs en plantas en respuesta al estrés por metales pesados (Tseng et al., 1993; Neumann et al., 1995; Wollgiehn y Neumann, 1999; Sanita di Toppi y Gabbrielli, 1999; Rodríguez-Serrano et al., 2009; Montero-Palmero et al., 2013). Las HSPs actúan como chaperonas moleculares en el plegamiento de las proteínas además de jugar un papel en la protección y reparación de las proteínas en condiciones de estrés (Joseph et al., 2012). Para intentar visualizar mayores cambios en el patrón de proteínas, se expusieron las plántulas durante 6 h a Hg 10 y 30 μM . En este caso, se pudieron detectar un gran número de manchas proteicas con un patrón de expresión diferencial, pero tras múltiples pruebas no se pudo identificar las proteínas afectadas. Además, se observó que la resolución de los geles estaba seriamente comprometida, por lo que se podía estar causando por daños severos o crónicos en las células, al tiempo que se afectó la movilidad electroforética posiblemente por la interacción directa del Hg con las proteínas, dado que es un agente desnaturalizante de proteínas bien conocido que reacciona a través de restos sulfhidrilo (Steele y Opella, 1997); todo ello redundaría en producir numerosos artefactos que nos impediría identificar los cambios específicos a metal que estábamos buscando. Estos daños producidos por el Hg pueden confirmarse con la toxicidad observada por Ortega-Villasante et al. (2007) en las mismas condiciones de crecimiento de plántulas de alfalfa expuestas a Hg durante 6 y 24 h. Asimismo, Montero-Palmero et al. (2013) observaron una degradación importante y progresiva del RNA a partir de las 6 h de exposición a concentraciones moderadas de Hg (10 μM), lo que da idea de los estrechos márgenes en los que hay realizar las pruebas analíticas en plantas tratadas con Hg para detectar cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares específicos de la aclimatación a este metal pesado.

CAPÍTULO 9. CONCLUSIONES

CAPÍTULO 9. CONCLUSIONES

- 1.** Puede inferirse que sobrepasado un cierto umbral de concentración de metales, el metabolismo de las plántulas de alfalfa se ve comprometido y es incapaz de adaptarse a la acumulación de elementos tóxicos. Además, algunos de los síntomas son característicos de muerte celular. Sin embargo, en condiciones de estrés moderado se detectaron algunas respuestas específicas a Hg o Cd, lo que ayudará a comprender las diferentes respuestas homeostáticas a elementos tóxicos.
- 2.** El etileno parece jugar un papel relevante en el proceso de respuesta de estrés por Hg o Cd, pudiendo intervenir en la modulación de la respuesta antioxidante y en la aclimatación al estrés inducido por metales. .
- 3.** El GSH/hGSH es fundamental para hacer frente al estrés por Hg, Cd o Cu. La disminución en el contenido de GSH/hGSH provocó menor tolerancia de las plantas a estos metales pesados.
- 4.** Diferentes sistemas de cultivo y diferentes estados de desarrollo de las plantas producen diferencias en el nivel de respuesta al estrés por Hg, Cd o Cu. Plantas en un estado fenológico de mayor madurez parecen disponer de mecanismos de defensa más desarrollados.

CAPÍTULO 10. BIBLIOGRAFIA

CAPÍTULO 10. BIBLIOGRAFÍA

- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit Jr ME. 1992. *Ethylene in plant biology*. Academic press.
- Ahmadpour P, Ahmadpour F, Mahmud T, Abdu A, Soleimani M, Tayefeh FH. 2012. Phytoremediation of heavy metals: A green technology. *African Journal of Biotechnology* 11, 14036-14043.
- Almeida AM, Parreira JR, Santos R, Duque AS, Francisco R, Tomé DF, Ricardo CP, Coelho AV, Fevereiro P. 2012. A proteomics study of the induction of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* using 2DE and MALDI-TOF/TOF. *Physiologia Plantarum* 146, 236-249.
- Alscher RG, Donahue, J. L. and Cramer, C. L. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationship in green cells 100, 224–233.
- Alvarenga P, Gonçalves A, Fernandes R, De Varennes A, Vallini G, Duarte E, Cunha-Queda A. 2008. Evaluation of composts and liming materials in the phytostabilization of a mine soil using perennial ryegrass. *Science of the Total Environment* 406, 43-56.
- Alvarenga P, Gonçalves A, Fernandes R, De Varennes A, Vallini G, Duarte E, Cunha-Queda A. 2009. Organic residues as immobilizing agents in aided phytostabilization:(I) Effects on soil chemical characteristics. *Chemosphere* 74, 1292-1300.
- Arduini I, Godbold DL, Onnis A. 1995. Influence of copper on root growth and morphology of *Pinus pinea* L. and *Pinus pinaster* Ait. seedlings. *Tree physiology* 15, 411-415.
- Arora, A, Sairam RK, Srivastava GC. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science-Bangalore* 82, 1221–1235.
- Arteca RN y Arteca JM. 2007. Heavy-metal-induced ethylene production in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant physiology* 164, 1480-1488.
- Assunção A, Schat H, Aarts M. 2003. *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* 159, 351-360.
- Ball L, Accotto G, Bechtold U, Creissen G, Funck D, Jimenez A, Kular B, Leyland N, Mejia-Carranza J, Reynolds H. 2004. Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 16, 2448-2462.
- Barceló J, Poschenrieder C. 2003. Phytoremediation: principles and perspectives. *Contributions to Science* 2, 333-344.
- Barque JP, Abahamid A, Chacun H, Bonaly J. 1996. Different Heat-Shock Proteins Are Constitutively Overexpressed in Cadmium and Pentachlorophenol Adapted *Euglena gracilis* Cells. *Biochemical and biophysical research communications* 223, 7-11.
- Beauchamp C y Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44, 276-87.

- Békésiová B, Hraška S, Libantová J, Moravcikova J, Matusšiková I. 2008. Heavy-metal stress induced accumulation of chitinase isoforms in plants. *Mol Biol Rep* 35:579–588
- Blankenship SM y Dole JM. 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest biology and technology* 28, 1-25.
- Blée E. 2002. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in plant science* 7, 315-322.
- Bonomelli C, Bonilla C, Valenzuela A. 2003. Efecto de la fertilización fosforada sobre el contenido de cadmio en cuatro suelos de Chile. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38, 1179-1186.
- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL y Minibayeva F. 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany* 53, 1367-1376.
- Brunet J, Repellin A, Varrault G, Terryn N, Zuily-Fodil Y. 2008. Lead accumulation in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.): a novel plant for phytoremediation systems? *Comptes rendus biologies* 331, 859-864.
- Buchanan SD, Diseker RA 3rd, Sinks T, Olson DR, Daniel J y Flodman T. 1999. Copper in drinking water, Nebraska, 1994. *Int J Occup Environ Health*, 5: 256-261.
- Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 52, 302-310.
- Cánovas D, Vooijs R, Schat H, de Lorenzo V. 2004. The role of thiol species in the hypertolerance of *Aspergillus sp.* P37 to arsenic. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 51234-51240.
- Cao S, Chen Z, Liu G, Jiang L, Yuan H, Ren G, Bian X, Jian H, Ma X. 2009. The *Arabidopsis Ethylene-Insensitive 2* gene is required for lead resistance. *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 308-312.
- Carrasco-Gil S, Álvarez-Fernández A, Sobrino-Plata J, Millán R, Carpena-Ruiz RO, Leduc DL, Andrews JC, Abadía J, Hernández LE. 2011. Complexation of Hg with phytochelatin is important for plant Hg tolerance. *Plant, Cell & Environment* 34, 778-791.
- Chaffei C, K. Pageau A, Suzuki H, Gouia M, Ghorbel H, y Masclaux-Daubresse C. 2004. Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. *Plant Cell Physiol* 45, 1681–1693.
- Chaney RL, Malik M, Li YM, Brown SL, Brewer EP, Angle JS, Baker AJ. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current opinion in biotechnology* 8, 279-284.
- Chen L, Yang L, Wang Q. 2009. *In vivo* phytochelatin and Hg–phytochelatin complexes in Hg-stressed *Brassica chinensis* L. *Metallomics* 1, 101-106.
- Chen F, Wang F, Wu F, Mao W, Zhang G, Zhou M. 2010. Modulation of exogenous glutathione in antioxidant defense system against Cd stress in the two barley genotypes differing in Cd tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 663-672.

- Chiriboga MA, Bordonaba JG, Schotsmans WC, Larrigaudière C y Recasens I. 2012. Antioxidant Potential Of 'Conference' Pears During Cold Storage And Shelf Life In Response To 1-Methylcyclopropene. *LWT-Food Science and Technology*.
- Cho UH, y Park JO. 2000. Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Science* 156, 1-9.
- Choudhury S, Panda P, Sahoo L, y Panda SK. 2013. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant signaling & behavior* 8, e23681.
- Clemente MR, Bustos-Sanmamed P, Loscos J, James EK, Pérez-Rontomé C, Navascués J, Gay M, Becana M. 2012. Thiol synthetases of legumes: immunogold localization and differential gene regulation by phytohormones. *Journal of experimental botany* 63, 3923-3934.
- Clemens S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212, 475-486.
- Clemens S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707-1719.
- Cobbett CS. 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology* 123, 825-832.
- Cobbett C y Goldsbrough P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual review of plant biology* 53, 159-182.
- 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. *The Plant Journal* 16, 73-78.
- Colditz F y Braun H. 2010. *Medicago truncatula* proteomics. *Journal of proteomics* 73, 1974-1985.
- Comisión Europea 2005. Community Strategy concerning Mercury. Summaries of EU Legislation. (http://europa.eu/legislation_summaries/internal_market/single_market_for_goods/chemical_products/l28155_en.htm)
- Cunningham SD, Berti WR, Huang JWW. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol.* 13, 393-397
- Cuyppers A, Karen S, Jos R, Kelly O, Els K, Tony R, Nele H, Nathalie V, Suzy VS, Frank VB. 2011. The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of Plant Physiology* 168, 309-316.
- Dhankher O P, Pilon-Smits EA, Meagher RB, Doty S. 2012. Biotechnological approaches for phytoremediation. *Plant Biotechnology and Agriculture*, A. Altman, & PM Hasegawa 309-328.
- Dat JF, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D y Van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57, 779-795.
- De Acevedo F. 2003. Toxicología do Mercúrio. RiMa. Sao Paulo, Brasil. p. 292.

- De Gara L, Locato V, Dipierro S, de Pinto MC. 2010. Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. *Respiratory physiology & neurobiology* 173, S13-S19.
- de Vos CHR, Vonk MJ, Vooijs R, Schat H. 1992. Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus* *Plant Physiology* 98, 853–858.
- del Río LA, Sandalio LM, Palma J, Bueno P, y Corpas FJ. 1992. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radical Biology and Medicine* 13, 557-580.
- Divi UK, Rahman T, Krishna P. 2010. Brassinosteroid-mediated stress tolerance in Arabidopsis shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC plant biology* 10, 151.
- Dixit V, Pandey V, Shyam R. 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany* 52, 1101-1109.
- D'Orazio V, Ghanem A, Senesi N. 2013. Phytoremediation of Pyrene Contaminated Soils by Different Plant Species. *CLEAN—Soil, Air, Water*.
- Dong L, Zhou HW, Sonogo L, Lers A, Lurie S. 2001. Ripening of 'Red Rosa' plums: effect of ethylene and 1-methylcyclopropene. *Australian Journal of Plant Physiology* 28, 1039–1045
- Dubey RS. 2011. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. in *Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants*, S. D. Gupta, Ed., pp. 177–203, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA.
- Eckardt NA. 2009. Negative regulation of stress-activated MAPK signaling in Arabidopsis. . 21.
- Elstner EF. 1987. Metabolism of activated oxygen species. *The biochemistry of plants: A comprehensive treatise*, 11.
- Emsley J. 2011. Nature's building blocks: an AZ guide to the elements. In: Anonymous, ed. OUP Oxford.
- Environmental Protection Agency (EPA) United States. 1999. Biosolids Generation, Use, and Disposal in the United States. Municipal and Industrial Solid Waste Division Office of Solid Waste. EPA 530-R-99-009. 74p.
- Environmental protection agency. 2000. Brownfields Technology Primer: Selecting and Using Phytoremediation for Site. Cleanup. www.brownfieldstsc.org/pdfs/phytoremprimer.pdf.
- Ernst WHO, Krauss G-J, Verkleij JAC, Wesenberg D. 2008. Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. *Plant, Cell and Environment* 31, 123-143.
- Fernandes JC y Henriques FS. 1991. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *The Botanical Review* 57, 246-273.

- Feussner I y Wasternack C. 2002. The lipoxygenase pathway. *Annual review of plant biology* 53, 275-297.
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Panagiota M, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG, Davies JM y Dolan L. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH-oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422, 442-446.
- Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, y Noctor G. 2009. Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Ann review of plant biology* 60, 455-484.
- Foyer, CH y Noctor G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell Online* 17, 1866-1875.
- Foyer CH, y Noctor G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & redox signaling* 11, 861-905.
- Frendo P, Jiménez MJH, Mathieu C, Duret L, Gallesi D, Van de Sype G, Hérouart D, Puppo A. 2001. A *Medicago truncatula* homogluthathione synthetase is derived from glutathione synthetase by gene duplication. *Plant Physiology* 126, 1706-1715.
- Galán Huertos E, Romero Baena A. 2008. Contaminación de suelos por metales pesados. *Macla* 10, 48-60.
- Garau G, Reeve WG, Brau L, Deiana P, Yates RJ, James D, Tiwari R, O'Hara GW, Howieson JG. 2005. The symbiotic requirements of different *Medicago* spp. suggest the evolution of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* with hosts differentially adapted to soil pH. *Plant and Soil* 276, 263-277.
- Garbisu C, Alkorta I. 2001. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource technology* 77, 229-236.
- García I, Dorronsoro C, Tecnología de suelos Universidad de Granada, Departamento de Edafología y Química Agrícola. 2005. Contaminación por metales pesados. *Tecnología de Suelos. Departamento de Edafología y Qca Agrícola. Universidad de Granada, Granada.*
- Garnier L, Simon-Plas F, Thuleau P, Agnel J, Blein J, Ranjeva R, Montillet J. 2006. Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant, Cell & Environment* 29, 1956-1969.
- Ghosh M y Singh S. 2005. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Applied Ecology and Environmental Res* 3, 1-18.
- Giovanelli J, Mudd SH, Datko AH (1980) Sulfur amino acids in plants. In: Mifflin BJ (ed) *The biochemistry of plants: a comprehensive treatise*, vol 5. Academic Press, New York, pp 453-505
- Göhre V, Paszkowski U. 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223, 1115-1122.
- Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A, Mansfield J. 2000. The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J.* 23, 441-450.

- Griffith, O.W., y Meister, A. 1979. Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). 254, 7558-7560.
- Grill RN, Winnacker EL, Zenk MH. 1986. Synthesis of seven different homologous phytochelatins in metal exposed *Schizosaccharomices pombe* cells FEBS Lett, 197,115–119
- Groppa MD, Benavides MP, Tomaro ML. 2003. Polyamine metabolism in sun-flower and wheatleaf discs under cadmium or copper stress. *Plant Science* 164, 293–299.
- Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP. 2001. Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Science* 161, 481–488.
- Guo H y Ecker JR. 2004. The ethylene signaling pathway: new insights. *Current opinion in plant biology*, 7, 40.
- Gupta V, Willits MG, Glazebrook J. 2000. *Arabidopsis thaliana* EDS4 contributes to salicylic acid (SA)-dependent expression of defense responses: evidence for inhibition of JA signaling by SA. *Mol. Plant-microbe interactions* 13, 503-511.
- Hall J. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of experimental botany* 53, 1-11.
- Halliwell B y Gutteridge J. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* 219, 1.
- Hammond-Kosack KE y Jones JD. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8, 1773.
- Haq NU, Raza S, Luthe DS, Heckathorn SA, Shakeel SN. 2013. A dual role for the chloroplast small heat shock protein of *Chenopodium album* including protection from both heat and metal stress. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1-11.
- Heidstra R, Geurts R, Franseen H, Spaink HP, Van Kammen A, Bisseling T. 1994. Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiology* 105, 787-797.
- Hernández LE y Cooke DT. 1997. Modification of the root plasma membrane lipid composition of cadmium-treated *Pisum sativum*. *J. of exp. Botany* 48, 1375-1381.
- Hernández LE, Ortega-Villasante C, Montero-Palmero MB, Escobar C, Carpena RO. 2012. Heavy Metal Perception in a Microscale Environment: A Model System Using High Doses of Pollutants. *Metal Toxicity in Plants: Perception, Signaling and Remediation*, 23-39.
- Heyno E, Klose C, Krieger-Liszkay A. 2008. Origin of cadmium-induced reactive oxygen species production: mitochondrial electron transfer versus plasma membrane NADPH oxidase. *New Phytologist* 179, 687-699.
- Henson MC, Chedrese PJ. 2004. Endocrine Disruption by Cadmium, a Common Environmental Toxicant with Paradoxical Effects on Reproduction. *Exp. Biol. Med.* 229, 383-392.

- Hirata K, Tsuji N, Miyamoto K. 2005. Biosynthetic regulation of phytochelatins, heavy metal-binding peptides. *Journal of bioscience and bioengineering* 100, 593-599.
- Hossain Z, Komatsu S. 2012. Contribution of proteomic studies towards understanding plant heavy metal stress response. *Frontiers in plant science* 3.
- 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 Molecular Biology* 51, 589-598.
- Howden R, Andersen CR, Goldsbrough PB, Cobbett CS. 1995. Cadmium-Sensitive, cad1 Mutants of *Arabidopsis thaliana* Are Phytochelatin Deficient. *Plant Physiology* 107, 1059-1066.
- Iannone MF, Rosales EP, Groppa MD, Benavides MP. 2010. Reactive oxygen species formation and cell death in catalase-deficient tobacco leaf disks exposed to cadmium. *Protoplasma* 245, 15–27
- Iskandar IK, Adriano DC, Iskander I. 1997. Remediation of soils contaminated with metals-a review of current practices in the USA. , 1-26.
- Jadia CD, Fulekar M. 2009. Phytoremediation of heavy metals: Recent techniques. *African journal of biotechnology* 8, 6.
- Jeong J, Huber, DJ, Sargent, SA. 2002. Influence of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and cell-wall matrix polysaccharides of avocado (*Persea americana*) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 25, 241-256.
- Jiang Y, Joyce DC, Macnish AJ. 1999. Responses of banana fruit to treatment with 1-methylcyclopropene. *Plant Growth Reg.* 28, 77–82
- Jimenez A, Hernandez JA, Pastori G, del Rio LA, Sevilla F. 1998. Role of the ascorbateglutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Journal of Plant Physiology*, 118, 1327-1335.
- Jonak C, Nakagami H, Hirt H. 2004. Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiology* 136, 3276–3283.
- Joseph B, Georde J, Jeevitha MV. 2012. Impact of heavy metals and Hsp Response. *International Journal of Biosciences* 2, 51-64
- Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A. 2012. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *International journal of molecular sciences* 13, 3145-3175.
- John P. 1991. How plant molecular biologists revealed a surprising relationship between two enzymes, which took an enzyme out of a membrane where it was not located, and put it into the soluble phase where it could be studied. *Plant Molecular Biology Reporter* 9, 192-194.
- Kagale S, Links MG, Rozwadowski K. 2010. Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 152, 1109–1134

- Kaplan J.C. & Beutler E. (1968) Electrophoretic study of glutathione reductase in human erythrocytes and leukocytes. *Nature* 217, 256.
- Kataya AR y Reumann S. 2010. *Arabidopsis* glutathione reductase 1 is dually targeted to peroxisomes and the cytosol. *Plant signaling & behavior* 5, 171-175.
- Kende H. 1989. Enzymes of ethylene biosynthesis. *Plant physiology* 91, 1-4.
- Kocsy G, von Ballmoos S, Suter M, Rueggsegger A, Galli U, Szalai G, Galiba G, Brunold C. 2000. Inhibition of glutathione synthesis reduces chilling tolerance in maize. *Planta* 211, 528–536.
- Kotak S, Larkindale J, Lee U, von Koskull-Döring P, Vierling E, Scharf K D. 2007. Complexity of the heat stress response in plants. *Current opinion in plant biology* 10, 310-316.
- Krämer U. 2005. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion Biotechnology* 16, 133-141.
- Krämer U, Talke IN, Hanikenne M. 2007 Transition metal transport. *FEBS Lett* 581, 2263–2272
- Krieger-Liszky A. 2005. Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 56, 337–346.
- Küpper H y Kochian LV. 2010. Transcriptional regulation of metal transport genes and mineral nutrition during acclimatization to cadmium and zinc in the Cd/Zn hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens* (Ganges population). *New Phytologist* 185, 114-129.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lagriffoul A, Mocquot B, Mench M, Vangronsveld J. 1998. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L). *Plant and Soil* 200, 241-250.
- Larkindale J y Huang B. 2004. Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *J Plant Physiol* 161, 405–413.
- Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E. 2005. Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol* 138, 882–897.
- Lasat MM. 2002. Phytoextraction of toxic metals. *Journal of environmental quality* 31, 109-120.
- Lasat M. 2000. Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *Journal of Hazardous Substance Research* 2, 1-25.
- Laspina NV, Groppa MD, Tomaro, ML, Benavides MP. 2005. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Science* 169, 323–330.
- Lee HC y Wei YH. 2007. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Experimental biology and medicine* 232, 592-606.

- Lee S, Kang BS. 2005. Phytochelatin is not a primary factor in determining copper tolerance. *Journal of Plant Biology* 48, 32-38.
- Lewis AC. 2006. *Assessment and comparison of two phytoremediation systems treating slow-moving groundwater plumes of TCE* (Doctoral dissertation, Ohio University).
- Li Y, Dankher OP, Carreira L, Smith AP, Meagher RB. 2006. The shoot-specific expression of γ -glutamylcysteine synthetase directs the long-distance transport of thiol-peptides to roots conferring tolerance to mercury and arsenic. *Plant Physiol.* 141, 288-298
- Liu R, Lai, T, Xu, Y y Tian, S. 2013. Changes in physiology and quality of *Laiyang* pear in long time storage. *Scientia Horticulturae* 150, 31-36.
- Loka DA, Oosterhuis DM. 2013. Effect of 1-MCP on Gas Exchange and Carbohydrate Concentrations of the Cotton Flower and Subtending Leaf under Water-Deficit Stress. *American Journal of Plant Sciences* 4, 142-152.
- Long X, Yang X, Ni W. 2002. Current situation and prospect on the remediation of soils contaminated by heavy metals. *Chinese Journal of Applied Ecology* 6, 027.
- Luo Z, Xu X, Cai Z, Yan B. 2007. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP) on lignification of postharvest bamboo shoot. *Food Chemistry* 105, 521-527.
- Maksymiec W y Krupa Z. 2006. The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Exp. Bot.* 57, 187-194
- Maksymiec W, Wianowska D, Dawidowicz A., Radkiewicz S, Mardarowicz M y Krupa Z. 2005. The level of jasmonic acid in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus coccineus* plants under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology* 162, 1338-1346.
- Manara A. 2012. Plant Responses to Heavy Metal Toxicity. *Plants and Heavy Metals*, 27-53.
- Markovska YK, Gorinova NI, Nedkovska MP, Miteva KM. 2009. Cadmium-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Brassica juncea* plants. *Biologia Plantarum* 53, 151-154.
- Maruthi BBS, Dile SV, Han FX, Monts DL, Su Y. 2005. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). *Env. Exp. Bot.* 54, 131-141.
- Matamoros MA, Clemente MR, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Ramos J, Moran JF, Stiller J, Gresshoff PM, Becana M. 2003. Molecular analysis of the pathway for the synthesis of thiol tripeptides in the model legume *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 1039-1046.
- May MJ, Vernoux T, Leaver C, Van Montagu M, Inzé D. 1998. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of experimental botany* 49, 649-667.
- Megateli S, Dosnon-Olette R, Trotel-Aziz P, Geffard A, Semsari S y Couderchet M. 2013. Simultaneous effects of two fungicides (copper and dimethomorph) on their phytoremediation using *Lemna minor*. *Ecotoxicology* 1-10.

- Meharg AA. 2005. Mechanisms of plant resistance to metal and metalloid ions and potential biotechnological applications. *Plant Soil* 274, 163-174.
- Mendoza-Cozatl DG, Moreno-Sanchez R. 2006. Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants. *Journal of theoretical biology* 238, 919-936.
- Mersmann S, Bourdais G, Rietz S, Robatzek S. 2010. Ethylene signaling regulates accumulation of the FLS2 receptor and is required for the oxidative burst contributing to plant immunity. *Plant Physiology* 154, 391-400.
- Meyer AJ. 2008. The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *Journal of plant physiology* 165, 1390-1403.
- Meyer AJ, Brach T, Marty L, Kreye S, Rouhier N, Jacquot JP, Hell, R. 2007. Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *The Plant Journal* 52, 973-986.
- Metwally A, Finkemeier I, Georgi M y Dietz KJ. 2003. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiology* 132, 272-281.
- Mithöfer A, Schulze B, Boland W. 2004. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS letters* 566, 1-5.
- Miller G y Mittler R. 2006. Could heat shock transcription factor function as hydrogen peroxide sensor in plants? *Ann Bot* 98, 279-288
- Montanini B, Blaudez D, Jeandroz S, Sanders D, Chalot M. 2007. Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC genomics* 8, 107.
- Montero-Palmero MB, Escobar C, Hernández LE. 2013 Ethylene participates in the early responses of alfalfa seedlings to mercury, *New Phytologist*. (En revisión).
- Moreno D. 2003. Toxicología Ambiental. McGrawHill. Madrid.
- Morgan PW y Drew MC. 1997. Ethylene and plant responses to stress. *Physiologia Plantarum* 100, 620-630.
- Morita S, Kaminaka H, Masumura T, Tanaka K. 1999. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress, the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signalling. *Plant and Cell Physiology* 40, 417-422
- Morrow H. 1990. Cadmium (Cd), *Metals Handbook*, 10th Edition, Volume 2, ASM. International, Metals Park, Ohio.
- Muller M, Prosperi J, Santoni S, Ronfort J. 2003. Inferences from mitochondrial DNA patterns on the domestication history of alfalfa (*Medicago sativa*). *Molecular ecology* 12, 2187-2199.
- Nagaraju A, Karimulla S. 2002. Accumulation of elements in plants and soils in and around Nellore mica belt, Andhra Pradesh, India-a biogeochemical study. *Environmental Geology* 41, 852-860.
- Navarro-Aviñó J, Aguilar A, López-Moya J. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas* 16, 10-25.

- Narayana I, Lalonde S, Saini HS. 1991. Water-stress-induced ethylene production in wheat. *Plant Physiology* 96: 406–410
- Narusaka M, Seki M, Umezawa T, Ishida J, Nakajima M, Enju A, Shinozaki K. 2004. Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis*: analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray. *Plant molecular biology* 55, 327-342.
- Naya L, Ladrera R, Ramos J, González EM, Arrese-Igor C, Minchin FR y Becana M. 2007. The response of carbon metabolism and antioxidant defenses of alfalfa nodules to drought stress and to the subsequent recovery of plants. *Plant Physiology* 144, 1104-1114.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurs RD, Hancock JT. 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *J Exp Bot* 53, 1237–1247
- Neumann D, Nieden UZ, Lichtenberger O, Leopold I. 1995. How does *Armeria maritima* tolerate high heavy metal concentrations? *J. of Plant Physiology* 146, 704–717.
- Nocito FF, Lancilli C, Crema B, Fourcroy P, Davidian J, Sacchi GA. 2006. Heavy metal stress and sulfate uptake in maize roots. *Plant Physiology* 141, 1138-1148.
- Noctor G, Queval G, Mhamdi A, Chaouch, S., & Foyer, C. H. 2011. Glutathione. The *Arabidopsis* Book/American Society of Plant Biologists, 9.
- Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marque-Garcia B, Queval G, Foyer CH. 2012. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment* 35, 454-484.
- O'Farrell PH. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of biological chemistry* 250, 4007-4021.
- Olmos E, Martínez-Solano JR, Piqueras A, Hellín E. 2003. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *Journal of experimental botany* 54, 291-301.
- Ortega-Villasante C, Hernández LE, Rellán-Álvarez R, Del Campo FF, Carpena-Ruiz RO. 2007. Rapid alteration of cellular redox homeostasis upon exposure to cadmium and mercury in alfalfa seedlings. *New Phytologist* 176, 96-107.
- Ortega-Villasante C, Rellán-Álvarez R, Del Campo FF, Carpena-Ruiz RO, Hernández LE. 2005. Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *Journal of experimental botany* 56, 2239-2251.
- Paradiso A, Berardino R, de Pinto MC, di Toppi LS, Storelli MM, Tommasi F, De Gara, L. 2008. Increase in ascorbate–glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants. *Plant and cell physiology* 49, 362-374.
- Parisy V, Poinssot B, Owsianowski L, Buchala A, Glazebrook J, Mauch F. 2007. Identification of PAD2 as a γ -glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 49, 159-172.
- Park J, Song W, Ko D, Eom Y, Hansen TH, Schiller M, Lee TG, Martinoia E, Lee Y. 2012. The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury. *The Plant Journal* 69, 278-288.

- Pastori GM y Foyer CH. 2002. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiology* 129, 460-468.
- Peiter E, Montanini B, Gobert A, Pedas P, Husted S, Maathuis FJ, Sanders D. 2007. A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 8532-8537.
- Pena LB, Zawoznik MS, Tomaro ML, Gallego SM. 2008. Heavy metals effects on proteolytic system in sunflower leaves. *Chemosphere* 72, 741-746.
- Pivetz BE. 2001. Ground water issue: phytoremediation of contaminated soil and ground water at hazardous waste sites. National Risk Management Research Lab.
- Plumlee G. 1994. Environmental geology models of mineral deposits. *SEG Newsletter* 16, 5-6.
- Polle A, Schützendübel A. 2003. Heavy metal signalling in plants: linking cellular and organismic responses. *Topics in Current Genetics* 4, 187-215.
- Porra RJ. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research* 73, 149-156.
- Potters G, De Gara L, Asard H, Horemans N. 2002. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 537-548.
- Pozo M. 1999. *Inducción de enzimas hidrolíticas en raíces de tomate (Lycopersicon esculentum) como respuesta a la formación de MA y su implicación en el control biológico de Phythoptora parasítica.*
- Prasad MN y de Oliveira Freitas HM. 2003. Metal hyperaccumulation in plants: Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* 6, 285-321.
- Rakwal R, Hasegawa, M, Kodama O. 1996. A methyltransferase for synthesis of the flavanone phytoalexin sakuranetin in rice leaves. *Biochemical and biophysical research communications* 222, 732-735.
- Rampino P, Mita G, Assab E, De Pascali M, Giangrande E, Treglia AS, Perrotta C. 2010. Two sunflower 17.6 HSP genes, arranged in tandem and highly homologous, are induced differently by various elicitors. *Plant Biology* 12, 13-22.
- Rauser WE. 1991. Cadmium-binding peptides from plants. *Methods in Enzymology* 205, 319-333.
- Rauser WE. 1995. Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiology* 109, 1141.
- Rauser WE. 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell biochemistry and biophysics* 31, 19-48.
- Razem FA y Bernards MA. 2003. Reactive oxygen species production in association with suberization: evidence for an NADPH-dependent oxidase. *Journal of experimental botany* 54, 935-941.

- Rellán-Álvarez R, Ortega-Villasante C, Álvarez-Fernández A, Campo FFd, Hernández LE. 2006. Stress responses of *Zea mays* to cadmium and mercury. *Plant and Soil* 279, 41-50.
- Reichheld JP, Khafif M, Riondet C, Droux M, Bonnard G, Meyer Y. 2007. Inactivation of thioredoxin reductases reveals a complex interplay between thioredoxin and glutathione pathways in *Arabidopsis* development. *The Plant Cell Online* 19, 1851-1865.
- Remans T, Opdenakker K, Smeets K, Mathijsen D, Vangronsveld J, Cuypers A. 2010. Metal-specific and NADPH oxidase dependent changes in lipoxygenase and NADPH oxidase gene expression in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium or excess copper. *Functional Plant Biology* 37, 532-544.
- Riccillo PM, Muglia CI, de Bruijn FJ, Roe AJ, Booth IR, Aguilar OM. 2000. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *Journal of bacteriology* 182, 1748-1753.
- Riedel G. 2008. Encyclopaedia of Ecology. *Ecotoxicology: Copper, Elsevier*, 778-783.
- Rocío V, Del Águila P. Determinación de cobre y zinc en suelos acondicionados con lodos residuales a diferentes tiempos. Laboratorio de Edafología y Ambiente. Facultad de Ciencias UAEM.
- Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Pazmiño DM, Testillano PS, Risueño MC, Luis A, Sandalio LM. 2009. Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiology* 150, 229-243.
- Romero-Puertas MC, Palma JM, Gomez M, Del Rio, LA, Sandalio LM. 2002. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell & Environment*, 25, 677-686.
- Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, Gómez MD, Del Rio LA, y Sandalio LM. 2004. Cadmium-induced subcellular accumulation of $O_2^{\cdot -}$ and H_2O_2 in pea leaves. *Plant, Cell & Environment* 27, 1122-1134.
- Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Sandalio LM, Leterrier M, Rodríguez-Serrano M, del Río LA, Palma JM, 2006. Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isoenzyme. *New Phytologist* 170, 43-52.
- Ros-Barceló A, Pomar F, Ferrer MA, Martínez P, Ballesta MC, Pedreño MA, 2002. *In situ* characterization of a NO-sensitive peroxidase in the lignifying xylem of *Zinnia elegans*. *Physiol. Planta*. 114, 33-40.
- Saathoff AJ, Sarath G, Chow EK, Dien BS, Tobias CM. 2011. Downregulation of cinnamyl-alcohol dehydrogenase in switchgrass by RNA silencing results in enhanced glucose release after cellulase treatment. *PLoS One* 6, e16416.
- Saito K. 2004. Sulfur assimilatory metabolism: the long and smelling road. *Plant Physiol* 136, 2443-2450
- Salazar R y Reyes R. 2000. Efectos tóxicos y mecanismos de tolerancia al cadmio en los seres vivos. Universidad, Ciencia y Tecnología. 13: 17-22.

- Salt DE, Prince RC, Pickering IJ, Raskin I. 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiology* 109, 1427-1433.
- Salt DE y Rauser WE. 1995. MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiology* 107, 1293-1301.
- Salt DE y Wagner GJ. 1993. Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$ antiport activity. *J Biol Chem* 268, 12297-12302
- Sagi M, Fluhr R. 2001. Superoxide production by plant homologues of the gp91^{phox} NADPH-oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology* 126: 1281-1290.
- Sandmann G y Böger P. 1980. Copper deficiency and toxicity in *Scenedesmus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 98, 53-59.
- Sanita di Toppi LS y Gabbrielli R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 41, 105–130
- Sarma H. 2011. Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. *J of Environmental Science and Technology* 4, 118-138.
- Schat H, Llugany M, Vooijs R, Hartley-Whitaker J, Bleeker PM. 2002. The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *Journal of Experimental Botany* 53, 2381-2392.
- Schnoor JL. 2002. Phytoremediation. In: Anonymous, ed. GWRTAC.
- Schopfer P. 1996. Hydrogen peroxide-mediated cell-wall stiffening in vitro in maize coleoptiles. *Planta* 199, 43-49.
- Schützendübel A, y Polle A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of experimental botany* 53, 1351-1365.
- Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold DL, Polle A. 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, H_2O_2 content and differentiation in pine (*Pinus sylvestris*) roots. *Plant Physiology* 127, 887–892.
- Semane B, Cuypers, A., Smeets, K., Van Belleghem, F., Horemans, N., Schat, H., & Vangronsveld, J. 2007. Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiologia Plantarum* 129, 519-528.
- Semane B, Dupae J, Cuypers A, Noben JP, Tuomainen M, Tervahauta A y Vangronsveld J. 2010. Leaf proteome responses of *Arabidopsis thaliana* exposed to mild cadmium stress. *Journal of plant physiology* 167, 247-254.
- Shakeel S, Haq NU, Heckathorn SA, Hamilton EW, Luthe DS. 2011. Ecotypic variation in chloroplast small heat-shock proteins and related thermotolerance in *Chenopodium album*. *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 898-908.
- Sisler EC y Serek ME. 1997. Inhibitors of ethylene response in plants at the receptor level: recent developments. *Physiol. Plant.* 100, 577–582.

- Sharma SS, Dietz K. 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of experimental botany* 57, 711-726.
- Sharma SS, Dietz K. 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in plant science* 14, 43-50.
- Shaw SL and Long SR. 2003. Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume. *Plant Physiology* 132, 2196-2004.
- Shi, Q y Zhu Z. 2008. Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. *Environmental and experimental botany* 63, 317-326.
- Simon-Plas F, Elmayan T, y Blein JP. 2002. The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *The Plant Journal* 3, 137-147.
- Singh A, Eapen S, Fulekar M. 2009. Potential of *Medicago sativa* for uptake of cadmium from contaminated environment. *Romanian Biotechnological Letters* 14, 4164-4169.
- Sinha AK, Jaggi M, Raghuram B, Tuteja N. 2011. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. . 6, 196–203.
- Smirnoff N y Wheeler GL. 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35, 291-314.
- Sobrinho-Plata J, Herrero J, Carrasco-Gil S, Pérez-Sanz A, Lobo C, Escobar C, Millán R, Hernández LE. 2013. Specific stress responses to cadmium, arsenic and mercury appear in the metallophyte *Silene vulgaris* when grown hydroponically. *RSC Advances*.
- Sobrinho-Plata J, Ortega-Villasante C, Flores-Cáceres ML, Escobar C, Del Campo FF, Hernández LE. 2009. Differential alterations of antioxidant defenses as bioindicators of mercury and cadmium toxicity in alfalfa. *Chemosphere* 77, 946-954.
- Sottomayor M, Duarte P, Figueiredo R, Ros Barceló A. 2008. A vacuolar class III peroxidase and the metabolism of anticancer indole alkaloids in *Catharanthus roseus*: can peroxidases, secondary metabolites and arabinogalactan proteins be partners in microcompartmentation of cellular reactions? *Plant Signal. Behav.* 3, 899–901
- Souza VL, de Almeida AA, Lima SG, de M Cascardo JC, D da C Silva, Mangabeira PA, Gomes FP. 2011. Morphophysiological responses and programmed cell death induced by cadmium in *Genipa americana* L. (Rubiaceae) *Biomaterials* 24, 59–71
- Steele RA, Opella SJ. 1997. Structures of the reduced and mercury-bound forms of MerP, the periplasmic protein from the bacterial mercury detoxification system. *Biochemistry* 36, 6885-6895.
- Sun P, Tian QY, Chen J, Zhang WH. 2010. Aluminium-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. *Journal of experimental botany* 61, 347-356.

- Suzuki N, Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Mittler R. 2005. Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional coactivator multiprotein bridging factor 1c. *Plant Physiology* 139, 1313-1322.
- Suzuki N, Koizumi N, y Sano H. 2001. Screening of cadmium-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* 24, 1177-1188.
- Tamás L, Ďurčková K, Huttová J, Mistrík I, Ollé M. 2007. Rhizosphere localized cationic peroxidase from barley roots is strongly activated by cadmium and correlated with root growth inhibition. *Chemosphere* 66, 1292-1300.
- Timperio AM, Egidi MG, Zolla L. 2008. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics* 71, 391-411.
- Torres MA, Dangl JL. 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 397-403.
- Tseng TS, Tzeng SS, Yeh KW, Yeh CH, Chang FC, Chen YM, Lin CY. 1993. The heat-shock response in rice seedlings: isolation and expression of cDNAs that encode class I low-molecular-weight heat-shock proteins. *Plant and cell physiology* 34, 165-168.
- Turner JG, Ellis C, Devoto A. 2002. The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14 (suppl.), S153-S164.
- UNEP. 2008-2010. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Fuente <http://www.unep.org/spanish>.
- Van Assche F y Clijsters H. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell & Environment* 13, 195-206.
- Van Gestelen P, Asard H, Caubergs RJ. 1997 Solubilization and separation of a plant plasma membrane NADPH-O₂⁻ synthase from other NAD(P)H oxidoreductases. *Plant Physiol.* 115, 543-550.
- Vangronsveld J y Clijsters H. 2008. Toxic Effects of Metals. *Plants and the chemical elements* 1, 149.
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lang A, Chalasani S, Demkiv LO, Rea PA. 2004. Phytochelatase synthase, a dipeptidyl transferase that undergoes multisite acylation with gamma-glutamylcysteine during catalysis. Stoichiometric and site-directed mutagenic analysis of AtPCS1-catalyzed phytochelatase synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 279:22449-22460.
- Vázquez S y Carpena-Ruiz R. 2005. Use of perlite in cadmium plant studies: an approach to polluted soil conditions. *Journal of Environmental Monitoring*, 1355-1358.
- Verbruggen N, Hermans C, Schat, H. 2009. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current opinion in plant biology* 12, 364-372.
- Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA, Reichheld J, Muroy S, Brown S, Maughan SC, Cobbett CS, Van Montagu M, Inzé D. 2000. The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *The Plant Cell Online* 12, 97-109.

- Vidali M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry* 73, 1163-1172.
- Vögeli-Lange R y Wagner GJ. 1990. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves implication of a transport function for cadmium-binding peptides. *Plant Physiology* 92, 1086-1093.
- Vögeli-Lange R y Wagner GJ. 1996. Relationship between cadmium, glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedlings. *Plant Science*, 114(1), 11-18.
- Wang W, Vinocur B, Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218, 1-14.
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science* 9, 244-252.
- Wang KLC, Li H, Ecker JR. 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell Online*, 14(suppl 1), S131-S151.
- Waters ER, Lee GJ, Vierling E. 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany* 47, 325-338.
- Watkins CB. 2006. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnology advances* 24, 389-409.
- Wesenberg D, Krauss GJ, Schaumlöffel D. 2011. Metallo-thiolomics: Investigation of thiol peptide regulated metal homeostasis in plants and fungi by liquid chromatography-mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 307(1), 46-54.
- Wójcik M, Tukiendorf A. 2011. Glutathione in adaptation of *Arabidopsis thaliana* to cadmium stress 55, 125–132.
- Wójcik M, Pawlikowska-Pawłęga B, Tukiendorf A. 2009. Physiological and ultrastructural changes in *Arabidopsis thaliana* as affected by changed GSH level and Cu excess. *Russian Journal of Plant Physiology* 56, 820-829.
- Wollgiehn R y Neumann D. 1999. Metal Stress Response and Tolerance of Cultured Cells from *Silene vulgaris* and *Lycopersicon peruvianum*: Role of Heat Stress Proteins. *Journal of plant physiology* 154, 547-553.
- Wu FB, Chen F, Wei K, Zhang GP. 2004. Effect of cadmium on free amino acid, glutathione and ascorbic acid concentrations in two barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.) differing in cadmium tolerance. *Chemosphere* 57, 447-454.
- Xiang C y Oliver DJ. 1998. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 10, 1539-1550.
- Xiang C, Werner BL, E'Lise MC, Oliver DJ. 2001. The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiology* 126, 564-574.
- Yang Z y Chu C. 2011. Towards understanding plant response to heavy metal stress.

- Yeh CM, Hung WC, Huang HJ. 2003. Copper treatment activates mitogen-activated protein kinase signaling in rice. *Physiologia Plantarum* 119,392-399
- Yang SF y Hoffman NE. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants *Annu. Rev. Plant Physiol*, 35, 155–189
- Yannarelli GG, Fernández-Alvarez AJ, Santa-Cruz DM, Tomaro ML. 2007. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry* 68, 505-512.
- Yruela I. 2005. Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 145-156.
- Yuan G, Sun B, Yuan J y Wang Q. 2010. Effect of 1-methylcyclopropene on shelf life, visual quality, antioxidant enzymes and health-promoting compounds in broccoli florets. *Food Chemistry* 118, 774-781.
- Zahrán HH. 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology reviews* 63, 968-989.
- Zawoznik MS, Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP. 2007. Endogenous salicylic acid potentiates cadmium-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 173, 190-197.
- Zenk MH. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants-a review. *Gene* 179, 21-30.
- Zhao FJ, Jiang RF, Dunham SJ, McGrath SP. 2006. Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist* 172, 646-654.
- Zhao L, Sun Y, Cui S, Chen M, Yang H, Liu H, Chai T, Huang F. 2011. Cd-induced changes in leaf proteome of the hyperaccumulator plant *Phytolacca americana*. *Chemosphere* 85, 56-66.
- Zhen Y, Qi J, Wang S, Su J, Xu G, Zhang M, Miao L, Peng X, Tian D, Yang Y. 2007. Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean. *Physiologia Plantarum* 131, 542-554.
- Zhou ZS, Wang SJ, Yang, ZM, 2008. Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Chemosphere* 70, 1500-1509.
- Zhu YL, Pilon-Smits EA, Tarun AS, Weber SU, Jouanin L, Terry N. 1999. Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiology* 121, 1169-1177.

ANEXO. CURRICULUM VITAE

ANEXO. CURRICULUM VITAE

DATOS PERSONALES

Nombres y Apellidos completos: María Laura Flores-Cáceres

Dirección: Avda. Pablo Iglesias 22, EC 1º B, Madrid CP. 28003 **Teléfono móvil:** +34-638180939

Correo electrónico: laura.flores@uam.es **NIE:** X-9478750-J

Nacionalidad: Argentina. **Fecha y lugar de nacimiento:** 14 de junio de 1982. Argentina.

Categoría profesional actual: Personal Investigador en Formación, Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

TITULACIÓN ACADÉMICA

Diploma de Estudios Avanzados dentro del programa de doctorado: Biología Vegetal: Aspectos Moleculares, Fisiológicos y Biotecnológicos. UAM, España. Programa con Mención de Calidad del Ministerio de Ciencia e Innovación. 2009.

Ingeniera Agrónoma. Universidad Nacional de Cuyo (UNCuyo), Argentina. 2000-2006.

EXPERIENCIA DOCENTE

Dictado de seminarios: Máster Biotecnología, Asignatura Biotecnología, UAM. 2011-2012.

Co-dirección Proyecto Fin de Carrera de Licenciatura en Biología:

- **2011-2012:** *Análisis de contribución del glutatión en homeostasis redox de plantas expuestas a Cu y Cd*, por Silvia Garcia, UAM.
- **2010-2011:** *Prospección de parámetros fisiológicos de estrés en plantas de alfalfa (M. sativa) expuestas a Cd y Cu*, por Belén Santamaría, UAM.
- **2008-2009:** *Caracterización de la respuesta antioxidante plántulas de alfalfa (M. sativa) a Hg y Cd*, por M^ª Eugenia de Castro, UAM.

EXPERIENCIA PROFESIONAL

2007-SIGUE: Personal Investigador en Formación, Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología, UAM, España.

2007: Relevamiento, organización y elaboración de encuestas de información ambiental en el ámbito de la UNCuyo, para elaboración de base de datos ambiental multimedia, Instituto de Ciencias Ambientales (ICA), Argentina.

2005-2007: Ayudante de Docencia. Biología molecular, Cátedra Fisiología Vegetal, UNCuyo. Argentina.

2004-2007: Relevamiento, formulación y evaluación de proyectos. Organización, Encuestas y procesamiento de información del Censo Socioeconómico departamento de Calingasta. Fundación Cordón del Plata. Argentina.

Auxiliar en estudios ambientales. Relevamientos, encuestas para estudios de impacto ambiental. Proyectos de Medio Ambiente para Reforestaciones. Fundación Desarrollo y Ambiente DYA. Argentina.

2003-2004: Ayudante en trabajo de investigación: mediciones a campo y procesamiento de datos, Cátedra de Fisiología Vegetal, UNCuyo. Argentina.

MANEJO DE SOFTWARE

- Genemapper (Applied Biosystems) software de análisis de datos de ADN.
- Image Lab Software (Life Science Research, Bio-Rad): Software de captura, análisis y edición de imágenes digitales de geles de poliacrilamida.
- IBM SPSS Statistics: Software de análisis predictivo.
- Adobe Photoshop CS6: Software editor de imágenes.
- Windows 7 y Paquete Office 2010.

PARTICIPACION EN PROYECTOS I+D

- **2011-2013.** *Bases científicas para desarrollar programas de fitorrestauración de emplazamientos afectados por mercurio natural en la comarca de Almadén.* Entidad financiadora: Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. Entidades participantes: UCLM y UAM.
- **2007-2010.** *Caracterización de los mecanismos de resistencia de las plantas a metales pesados.* Entidad financiadora: Fundación Ramón Areces. Entidad participante: UAM.
- **2005-2006.** *Red Datos Vitivinícolas,* Cátedra de Química General e Inorgánica, UNCuyo. Argentina.
- **2005-2007.** *Biotechnología de la vid,* Cátedra de Fisiología Vegetal, UNCuyo. Argentina.

PUBLICACIONES

Artículos:

Sobrinio-Plata J, Ortega-Villasante C, Flores-Cáceres ML, Escobar C, Del Campo FF, HERNÁNDEZ LE. 2009. *Differential alterations of antioxidant defenses as bioindicators of mercury and cadmium toxicity in alfalfa.* Chemosphere 77:946–954.

Capítulos de Libro

- Hernández LE, Sobrinio-Plata J, Flores-Cáceres ML, Carrasco-Gil S, Ortega-Villasante C, Escobar C, del Campo FF. 2012. *Alteraciones fisiológicas en plantas asociadas a la contaminación por metales pesados. Técnicas de análisis holístico.* En: Evaluación y recuperación de emplazamientos degradados y/o contaminados. Eds. Rocío Millán Gómez y Carmen Lobo Bedmar. Editorial Ciemat, Madrid. pp: 291-318. ISBN: 978-84-7834-680-6.
- Sobrinio-Plata J, Ortega-Villasante C, Flores-Cáceres ML, del Campo FF, HERNÁNDEZ LE. 2008. *Antioxidant responses of alfalfa plants treated with mercury and cadmium.* En: *Presente y futuro de la nutrición mineral de las plantas.* Romero-Monreal L (ed.). Indema, Granada, pp: 503-518.

Comunicaciones y Ponencias Presentadas a Congresos

- Flores-Cáceres ML, Montero-Palmero MB, F. del Campo F, Escobar C, Hernández LE. *Mercury and cadmium induced distinct early antioxidant responses in alfalfa seedlings.*

- XIV Simposio Hispano-Luso de Nutrición Mineral de las Plantas, Madrid, Julio 2012. Oral.
- Flores-Cáceres ML, Montero-Palmero MB, F. del Campo F, Escobar C, Hernández LE. *Mercury and cadmium generate specific antioxidant responses in alfalfa seedlings*. XIV Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (SEFV). XII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Castellón de la Plana, Junio 2011. Póster.
 - Montero-Palmero MB, Escobar C, Flores-Cáceres ML, Sánchez-Torres IM, F. del Campo F, Alonso JM, Hernández LE. *Ethylene is involved in the early responses of plants exposed to mercury*. XIV Reunión de la SEFV. XII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Castellón de la Plana, Junio 2011. Oral.
 - Flores-Cáceres ML, Hattab S, Santamaría B, Boussetta H, Banni M, Hernández LE. *Copper and cadmium homeostatic antioxidant responses in alfalfa plants*. XIV Reunión de la SEFV. XII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Castellón de la Plana, Junio 2011. Oral.
 - Flores-Cáceres ML, Montero Palmero MB, F. del Campo F, Escobar C, Hernández LE. *Homeostatic responses to mercury and cadmium in alfalfa*. XXVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo, Argentina. Octubre 2010. Póster.
 - Flores-Cáceres ML, Montero-Palmero MB, F. del Campo F, Escobar C, Hernández LE. *Antioxidant responses are early components of mercury and cadmium homeostasis in alfalfa seedlings*. XIII Simposio Ibérico de Nutrición Mineral de las Plantas, Donostia-San Sebastián, Septiembre 2010. Póster.
 - Flores-Cáceres ML, Montero-Palmero MB, F. del Campo F, Escobar C, Hernández LE. *Homeostatic responses to mercury and cadmium in alfalfa*. XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Argentina. Septiembre 2010. Póster.
 - Carpena RO, Carrasco-Gil S, Flores-Cáceres ML, Sobrino-Plata J, Pérez Sanz A, García P, Millán-Gómez R, Lobo MC, Hernández LE. *Responses of the metallophyte Silene vulgaris to Hg, Cd and As: Assessment of its phytoremediation potential*. COST Action 859 Final Conference. Phytotechnologies to promote sustainable land use and improve food safety. Ascona (Suiza), Octubre 2009. Póster.
 - Montero-Palmero MB, Escobar C, Sobrino-Plata J, Flores-Cáceres ML, Hernández LE. *Ethylene responsive genes are part of early responses of alfalfa plants to mercury*. XX Internacional Conference on Plant Growth Substances, IPGSA Conference 2010, Tarragona, Junio de 2010. Póster.
 - Montero-Palmero MB, Flores-Cáceres ML, Rivas-Castellanos S, Sobrino-Plata J, de Castro-de Antonio ME, Escobar C, Hernández LE. *Transcriptomic and proteomic analyses of the early responses of alfalfa to toxic elements*. XVIII Reunión de la SEFV. XI Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Zaragoza, Septiembre 2009. Oral.
 - Hernández LE, Montero-Palmero MB, Flores-Cáceres ML, Rivas-Castellanos S, Sobrino-Plata J, Escobar C. *Early responses to toxic elements: A transcriptomic and proteomic approach. Uptake, Sequestration and Detoxification-An Integrated Approach*. Workshop of COST Action 859. Szeged (Hungria), Abril 2009. Póster.

- Sobrino-Plata J, Ortega-Villasante C, Flores-Cáceres ML, Montero-Palmero B, F. Del Campo F, Escobar C, Hernández LE. *Redox Homeostasis Alteration Induced by Mercury and Cadmium in Alfalfa Plants*. International Conference on Plant Abiotic Stress Tolerance, Viena (Austria), Febrero 2009. Póster.
- Sobrino-Plata J, Ortega-Villasante C, Flores-Cáceres ML, F. del Campo F, Hernández LE. *Respuestas antioxidantes de plantas de alfalfa tratadas con mercurio y cadmio*. XII Simposio Ibérico sobre Nutrición Mineral de las Plantas, Granada, Octubre 2008. Oral.
- Flores-Cáceres ML, Guiñazú M, Agüero C, Martínez, L. *Identificación molecular de clones de vid de la variedad Syrah*. BioVeg 2007, VI Congreso Internacional de Biotecnología y Agricultura, Cuba 2007. Póster.
- Martínez L, Flores-Cáceres ML, Guiñazú M, Agüero C, Scarsi, H. *Caracterización molecular de clones de vid de la variedad Syrah*. XXVI Reunión de la Asociación Argentina de Fisiología Vegetal. Argentina 2006. Póster.
- Martínez L, Agüero C, Guiñazú M, Cavagnaro P, Flores-Cáceres ML, Castañeda J, Scarsi H, Robles P. *Biotecnología de la vid: Caracterización molecular de clones y obtención de plantas transformadas para estudios de interacción planta-patógeno*. XX Jornadas de Investigación y II Jornadas de Posgrado de la UNCuyo, Argentina 2006. Póster.
- Flores-Cáceres ML. *Plan de Forestación con Efluentes de Reuso*. II Taller-Seminario sobre el Bosque como Defensa contra la Desertificación y el Cambio Climático y Reservorio para la Biodiversidad, Bolivia 2005. Oral.
- Flores-Cáceres ML. *Desarrollo de estrategias para minimizar impactos de efluentes industriales*. IV Curso Interactivo sobre Lucha Contra la Desertificación y Defensa contra la Sequía y las Inundaciones, Colombia 2004. Oral.

FORMACIÓN COMPLEMENTARIA

2012

- Seminario Agilent *Nuevas tendencias en el laboratorio analítico*, Instituto de Investigación en Ciencias de Alimentación (CIAL), CSIC, UAM, España.

2008

- Seminario *Real-Time PCR y Secuenciación masiva de DNA. Aplicaciones*. Parque Científico de Madrid, UAM, España
- “Protein Sciences Seminar”, GE Healthcare Life Sciences, Universidad Complutense de Madrid, España

2007

- Curso de Posgrado *Histoquímica vegetal*. UAM, Madrid, España.
- Curso de Posgrado *Biotecnología de plantas*. UAM, Madrid, España.
- Curso de Posgrado *Sistemas rizosféricos, estructura y funcionamiento. Efectos fisiológicos de la interacción. Aspectos biotecnológicos*. UAM, Madrid, España.
- Curso de Posgrado *Biorremediación*. UAM, Madrid, España

- Curso de Posgrado *Genotipificación y secuenciación de ADN con secuenciadores automáticos de capilares – Análisis de datos con programas Genemapper y Sequencing Análisis – Aplicaciones en proyectos biotecnológicos*. UNCuyo, Argentina.
- Curso de Posgrado *Genética de la Vid*. UNCuyo, Argentina.
- *XIV Curso Internacional de Restauración Hidrológico-Forestal, Control de la Erosión y Lucha contra la Desertificación*, Empresa de Transformación Agraria S.A. (TRAGSA), Dirección General para la Biodiversidad (DGB) y la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), España.
- *Protein Sciences Seminar*, GE Healthcare Life Sciences, Universidad Complutense de Madrid, España.
- *Seminario Gestión del Ruido Ambiental*, Departamento de Higiene y Seguridad, Dirección de Gestión Ambiental y Desarrollo. Argentina.

2006

- *Curso On-Line Gestión de Mercadeo y Ventas*, Programa de Desarrollo de Competencias Organizacionales, Asociación Grupo de Análisis y Desarrollo Institucional y Social –GADIS–, Argentina y Corporación PARTICIPA, Chile.
- *Curso Teórico-Práctico de Capacitación para Inspectores en Certificación de Calidad de alimentos, EUREPGAP y de Sistemas de Producción Orgánica*, Food Safety y Fundación Cullum, Argentina.
- *I Taller de Responsabilidad Social Empresaria en las islas Galápagos*, Fundación Cordón del Plata, Ecuador.
- *Curso de Plantas aromáticas, nativas y cultivadas*, Instituto de Desarrollo Rural, Argentina.

2005

- *II Taller-Seminario sobre el Bosque como Defensa contra la Desertificación y el Cambio Climático y Reservorio para la Biodiversidad*, AECI, Bolivia.
- *Curso de Biología molecular*, UNCuyo, Argentina.
- *Curso de Cultivo “in vitro”*, UNCuyo, Argentina.
- *Curso de Sistemas de Producción Hortícola*, UNCuyo, Argentina.

2004

- *IV Curso Interactivo sobre Lucha Contra la Desertificación y Defensa contra la Sequía y las Inundaciones*, AECI, Colombia.
- *I Jornadas Iberoamericanas sobre Agrotecnología de Plantas Medicinales y II Simposio de Plantas Medicinales del Género Smilax*, AECI, Guatemala.

