



**Consejo Superior de
Investigaciones Científicas**



Departamento de Nutrición Vegetal
**Estación Experimental de Aula Dei
Zaragoza**

Tesis Doctoral

**Respuesta Fisiológica, Bioquímica y Molecular
de las Leguminosas a Estreses Abióticos**

Memoria presentada por

Dña Loreto Naya Aquilué

Licenciada en Bioquímica, para optar al grado de Doctor en Ciencias

Zaragoza, Noviembre, 2007

D. Manuel Becana Ausejo, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y D. Javier Ramos Escribano, Contratado Postdoctoral del Ministerio de Educación y Ciencia (Programa “Juan de la Cierva”),

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “*Respuesta Fisiológica, Bioquímica y Molecular de las Leguminosas a Estreses Abióticos*” ha sido realizada por la Licenciada en Bioquímica Dña. Loreto Naya Aquilué en el Departamento de Nutrición Vegetal de la Estación Experimental de Aula Dei del Consejo Superior de Investigaciones Científicas bajo nuestra dirección y reúne, a nuestro juicio, las condiciones requeridas para optar al Grado de Doctor en Ciencias.

Zaragoza, Noviembre 2007

Dr. Manuel Becana Ausejo

Dr Javier Ramos Escribano

*A mis padres y
mi hermano Andrés*

A mis abuelas

Agradecimientos

Han transcurrido unos cuantos años desde que llegué a la Estación Experimental de Aula Dei y han sido muchas las personas que han colaborado en la elaboración de esta Tesis. Espero ser capaz de nombrar a todos y transmitir mi sincero agradecimiento.

Agradezco al Dr. Manuel Becana haber confiado en mí para realizar el doctorado en su grupo y por su ayuda y colaboración como director de esta Tesis e investigador principal de los proyectos que la han financiado. La beca del programa de Formación de Personal Investigador (BES-2003-1462) y los proyectos del Plan Nacional (AGL2002-02876 y AGL2005-01404) han sido financiados por el Ministerio de Educación y Ciencia y Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER).

He tenido la suerte de realizar algunas estancias durante esta Tesis. En el grupo del Dr. Michael Udvardi en el Max Planck de Golm (Alemania), donde aprendí mucho en poco tiempo, agradezco especialmente a Thomas Ott su ayuda con los “arrays” y su paciencia con mi inglés.

Al grupo del Dr. Sergio Encarnación en el Centro de Ciencias Genómicas de Cuernavaca (México), agradecer la colaboración y el interés prestado, a Gabriel y Magda por enseñarme los geles 2D, a Sandra y Miguel por los análisis de espectrometría de masas y al resto del grupo por su simpatía. Y muchas muchas gracias a mis tres amigos desde entonces, Ana Laura y Edgardo por darme alojamiento, intentar enseñarme a comer tacos y presentarme a Sarita y familia, y por supuesto también a Miguel por las excursiones a DF y alrededores.

Al grupo del Dr. César Arrese-Igor de la Universidad Pública de Navarra, a la Dra. Esther González por su ayuda en la planificación de los experimentos de sequía y a Rubén Ladrera por su simpatía y por mostrarme cómo se mide la actividad nitrogenasa.

A mi grupo al completo debo agradecer su inestimable ayuda; hemos compartido mucho tiempo y he aprendido algo de cada uno de ellos. A Carmen, mil gracias por su paciencia, su organización en el “labo”, su ayuda pinzas en mano para cosechar los nódulos de alfalfa y por su sentido del humor, y a Javier Ramos, mi co-director, por enseñarme a temer el poder destructor de las RNAsas y todo lo que sé sobre biología molecular, y por supuesto, por las conversaciones surrealistas. A María le agradezco su ayuda en los comienzos y las charlas terapéuticas; a Jorge su compañerismo en el laboratorio y después en la oficina y que nos acercase a Zaragoza en su “fordfi”. Después volvió Manu, le agradezco sus consejos en serio y en broma, sus cassettes de los 80 y sus batallitas de los otros tiempos. A continuación llegó MC desde Holanda, muchísimas gracias por su ayuda con los geles de las SODs, por los buenos consejos y las palabras de ánimo. Al final de la Tesis llegaron Pilar, gracias por dar “vidilla al labo”, y Joaquín, gracias por su simpatía, ha sido una suerte haber coincidido con los dos.

A mi otra compañera de despacho, Victoria por escucharme, compartir su experiencia y especialmente por su sentido del humor que han hecho más llevaderos estos meses de retiro.

A las personas del departamento de Nutrición Vegetal y del resto de departamentos de la EEAD por el tiempo compartido en el uso de las instalaciones. En particular, las conversaciones y las risas en el comedor o tomando un café, y también fuera de Aula Dei con alguna cena: Marian, Merche, María M, Irene, David, Manuel, Víctor, Ade, Rubén, Leticia, Ana, Ana Flor, Jorge, Santiago, Conchi, Sara S, Ruth, Vanesa, Sara L, Bea, Mariví, Miguel, Ricardo, Aurora, M^a Ángeles, Tere y Mariví Ramiro. A los que ya se han ido y les echo de menos María B, Sergio, Jorge A, Olfá, Meriam, Raquel, Iñaki, Sofía A, Sofía Edafol, Fermín, María S, Samia, Alfonso y Lorena. Debo agradecer a Conchita su presencia siempre amable y su estupendo café y a todo el personal de administración, mantenimiento e informática su ayuda siempre que la he necesitado.

A las personas involucradas en mi estancia en Ginebra, debo agradecer a la Dra. María Fillat haber sido mi tutora y al Dr. Francisco Barja enseñarme a trabajar en un laboratorio y haber conocido a Rubén Ortega, Malou, Arlette, Javier, Greta e Ismael, y especialmente a Marta Cotado. Todos ellos junto, a la Dra. Marisa Peleato, influyeron directamente en mi decisión de continuar en la investigación.

Y por último gracias a mi familia y amigos, que aunque esto de “estresar a las alfalfas” les daba un poco de risa, han sido un gran apoyo todo este tiempo. A mis padres, a mi hermano Andrés y Ruth, y todos los demás por poder contar siempre con ellos. A mis abuelas por haber sido siempre un ejemplo de superación. A mis amigos gracias por las charlas acompañadas, a veces, de unas cañas: Eva, Ruth, Jesús, Teresa, Ana, Mario, Marta y Javi, y también a Marcos y Jara. A mis compañeros de clase Clara, Chechu, y en particular a Ana Pina por soportar mis historias y preguntas.

ABREVIATURAS

ABA	ácido abscísico
β Ala	β -alanina
ANA	actividad nitrogenasa aparente
APX	ascorbato peroxidasa
DHA	deshidroascorbato
DR	deshidroascorbato reductasa
DTNB	5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico)
DTT	ditiotreitól
γ EC	γ -glutamilcisteína
γ ECS	γ -glutamilcisteína sintetasa
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EPPS	ácido <i>N</i> -[2-hidroxi-etil]piperacina- <i>N'</i> -3-propanosulfónico
ES	error estándar de la media
Gal	galactosa
GOGAT	glutamato sintasa
(h)GSH	(homo)glutación
(h)GSHS	(homo)glutación sintetasa
GR	glutación reductasa
IA	invertasa alcalina
ICDH	isocitrato deshidrogenasa
kD	kilodalton
α KG	α -cetogluturato
Lb	leghemoglobina
MAPK	"mitogen-activated protein kinases"
MBB	monobromobimano
MDA	malondialdehído
MDHA	monodeshidroascorbato
MR	monodeshidroascorbato reductasa
MS	espectrometría de masas
OAA	oxalacetato
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
(h)PC	(homo)fitoquelatina
PCS	fitoquelatina sintetasa
PF	peso fresco
PS	peso seco
PVDF	fluoruro de polivinilideno
RNS	especies reactivas de nitrógeno
ROS	especies reactivas de oxígeno
RT-PCR _c	RT-PCR cuantitativa en tiempo real
SDS	dodecil sulfato de sodio
SOD	superóxido dismutasa
SS	sacarosa sintasa
TBA	ácido tiobarbitúrico
TEMED	tetrametiletlenodiamina
TBP	tributilfosfina
Ψ_w	potencial hídrico

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Fijación de nitrógeno.....	1
1.2. Simbiosis rizobio-leguminosa.....	3
1.2.1. Clasificación de los rizobios y leguminosas.....	3
1.2.2. Preinfección e infección de las raíces por los rizobios.....	4
1.2.3. Estructura y desarrollo de los nódulos.....	5
1.2.4. Complejo enzimático nitrogenasa.....	7
1.2.5. Metabolismo del carbono y nitrógeno en el nódulo.....	9
1.2.6. Regulación de la concentración de oxígeno.....	12
1.3. Especies reactivas.....	13
1.3.1. Especies reactivas de oxígeno	13
1.3.2. Especies reactivas de nitrógeno	14
1.3.3. Especies reactivas como moléculas señal.....	15
1.3.4. Producción de especies reactivas en plantas.....	15
1.4. Defensas antioxidantes de plantas.....	17
1.4.1. Antioxidantes liposolubles.....	17
1.4.2. Ascorbato y glutatión.....	18
1.4.3. Ciclo ascorbato-glutatión.....	18
1.4.4. Catalasa.....	19
1.4.5. Superóxido dismutasas.....	20
1.4.6. Glutatión peroxidasas y peroxirredoxinas.....	20
1.4.7. Ferritina.....	21
1.5. Daño oxidativo a biomoléculas	22
1.6. Estrés abióticos y estrés oxidativo en plantas.....	24
1.6.1. Estrés hídrico.....	24
1.6.2. Estrés salino.....	26
1.6.3. Estrés por metales pesados.....	27
1.6.4. Estrés oxidativo en plantas.....	33
1.7. Estrés abiótico y genómica funcional en plantas.....	36

2. OBJETIVOS	41
3. MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.1. Reactivos químicos y bioquímicos.....	45
3.2. Material biológico.....	45
3.2.1. Plantas.....	45
3.2.2. Microorganismos.....	46
3.3. Estrés hídrico.....	47
3.4. Tratamiento de Lotus con metales pesados.....	47
3.5. Análisis de la expresión génica en nódulos de alfalfa.....	48
3.6. Electroforesis y análisis western.....	50
3.7. Determinación de actividades enzimáticas.....	55
3.7.1. Enzimas antioxidantes.....	55
3.7.2. Enzimas del metabolismo del carbono y nitrógeno.....	56
3.8. Determinación de metabolitos.....	57
3.8.1. Ácidos orgánicos y sacarosa.....	57
3.8.2. Ascorbato y deshidroascorbato.....	57
3.8.3. Glutación y homoglutación.....	58
3.9. Medidas de actividad nodular.....	59
3.9.1. Actividad nitrogenasa y parámetros relacionados.....	59
3.9.2. Leghemoglobina.....	59
3.9.3. Proteína soluble.....	60
3.10. Daño oxidativo a lípidos y proteínas.....	60
3.11. Fitoquelatina sintasas en levaduras.....	61
3.11.1. Expresión de fitoquelatina sintasas recombinantes.....	61
3.11.2. Actividad fitoquelatina sintasa <i>in vivo</i>	62
3.11.3. Actividad fitoquelatina sintasa <i>in vitro</i>	63
3.11.4. Estudios con quelatos en levaduras.....	63
3.11.5 Espectrometría de masas.....	64
3.12. Análisis de transcriptoma.....	65
3.13. Análisis estadístico.....	66
4. RESULTADOS	69
4.1. Metabolismo de los nódulos de alfalfa en condiciones de estrés hídrico.....	69
4.1.1. Fijación de nitrógeno y respiración en nódulos de alfalfa.....	69
4.1.2. Ácidos orgánicos, sacarosa y enzimas del metabolismo del carbono.....	73
4.1.3. Expresión de enzimas antioxidantes en las células de los nódulos y en los bacteroides.....	75
4.1.4. Concentración de metabolitos antioxidantes.....	79
4.1.5. Daño oxidativo a lípidos y proteínas.....	80

4.2. Genes y proteínas fitoquelatina sintasa de Lotus.....	82
4.2.1. Aislamiento de los genes <i>LjPCS1</i> y <i>LjPCS3</i> y expresión en levaduras.....	82
4.2.2. Efecto de los medios de cultivo sin y con metales sobre la actividad fitoquelatina sintasa.....	83
4.2.3. Síntesis de fitoquelatinas en levaduras.....	86
4.2.4. Actividades fitoquelatina sintasa de <i>LjPCS1</i> y <i>LjPCS3</i>	86
4.2.5. Activación de <i>LjPCS1</i> y <i>LjPCS3</i> por hierro y aluminio.....	91
4.2.6. Actividad fitoquelatina sintasa <i>in vitro</i> en presencia de cobre.....	94
4.3. Transcriptoma de raíces de Lotus tratadas con cadmio.....	95
4.4. Proteoma de nódulos de alfalfa en condiciones de estrés hídrico y salino...	98
5. DISCUSIÓN.....	105
5.1. Efecto del estrés hídrico sobre la fijación de nitrógeno y el metabolismo de los nódulos de alfalfa.....	105
5.2. Caracterización de <i>LjPCS1</i> y <i>LjPCS3</i> de Lotus	109
5.3. Transcriptoma de raíces de Lotus: efecto del estrés por cadmio.....	113
5.4. Proteoma de nódulos de alfalfa: efecto del estrés hídrico y salino.....	114
6. CONCLUSIONES.....	119
7. BIBLIOGRAFÍA.....	123

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Fijación de nitrógeno

El nitrógeno se encuentra distribuido en la atmósfera, litosfera y biomasa. El N de la litosfera participa escasamente en el intercambio de este elemento entre los distintos reservorios (ciclo del N), por lo que la mayor parte del N que precisan las plantas para su crecimiento proviene en último término de la atmósfera (Aparicio-Tejo y cols, 2000). El N disponible en los suelos cultivados es muy bajo y debe ser suministrado en forma de fertilizantes nitrogenados, que son sintetizados mediante la reacción de Haber-Bosch ($N_2 + 2H_2 \rightarrow 2NH_3$, 500°C y 350 atm). Se estima que se fijan unos 275 millones de Tm de N_2 por año (de Felipe, 2006). De ellos, 30 se fijan por causas naturales (descargas eléctricas de las tormentas, erupciones volcánicas), 75 por fijación industrial y 175 por fijación biológica de nitrógeno (FBN), bien por fijadores de vida libre (35) o por fijadores en simbiosis (140). En resumen, las plantas pueden incorporar N por absorción del suelo en forma de NO_3^- y NH_4^+ , o bien por reducción del N_2 atmosférico estableciendo asociaciones simbióticas con diversas bacterias. En agricultura, el uso de fertilizantes no suple las carencias de N a escala mundial y su producción tiene un alto coste económico y energético. Además, constituye un riesgo para el medio ambiente, en primer lugar, por la acumulación de nitratos en aguas superficiales y subterráneas que pueden llegar a ser una amenaza para la salud pública, y en segundo lugar, por la liberación de gases nitrogenados (N_2O , NO_x , NH_3) a la atmósfera, lo que contribuye al efecto invernadero, la destrucción de la capa de ozono y la lluvia ácida. Por tanto, la FBN representa una alternativa más económica y ecológicamente sostenible frente a la fijación química.

La FBN es catalizada por el complejo nitrogenasa (ver **1.2.4**), que se encuentra exclusivamente en procariotas y es muy sensible al O₂. Los organismos fijadores de N₂ (organismos diazotrofos) se pueden encontrar en prácticamente cualquier hábitat, bien en vida libre o en simbiosis. Los organismos del primer grupo pertenecen a las arqueobacterias y eubacterias, pueden ser quimiotrofos o fototrofos, e incluyen bacterias anaerobias estrictas (*Clostridium*), anaerobios facultativos (*Klebsiella*, *Citrobacter*) o microaeróbicas (*Azospirillum*, *Xanthobacter*). También se encuentran bacterias aerobias como *Azotobacter* que pueden fijar N₂ en presencia de O₂ gracias al aumento de la actividad respiratoria inducido por un cambio en el contenido de citocromos (“protección respiratoria”) y por la formación de un complejo inactivo, pero estable al O₂, entre los dos componentes de la nitrogenasa y una tercera ferrosulfoproteína (“protección conformacional”). Las cianobacterias, cuyas células vegetativas realizan fotosíntesis oxigénica similar a las plantas, son capaces de fijar N₂ atmosférico (más de la tercera parte de la fijación biológica total) en condiciones aerobias y microaerobias. En presencia de O₂, algunas cianobacterias como *Anabaena* y *Nostoc* fijan N₂ gracias a la diferenciación de parte de sus células en heterocistos, que expresan la enzima nitrogenasa. Los heterocistos tienen una pared celular más gruesa y carecen de fotosistema II. Algunas cianobacterias (*Oscillatoria*, *Gloeotheca*) pueden fijar N₂ en aerobiosis separando temporalmente la fotosíntesis, que ocurre durante el día, y la respiración y fijación de N₂, que se producen durante la noche. Otras cianobacterias son capaces de establecer simbiosis con briofitos, gimnospermas y angiospermas como es el caso de *Nostoc* con *Gunnera*.

Entre los fijadores en simbiosis, además de los rizobios (ver **1.2**), se incluye al actinomiceto *Frankia* que establece una relación simbiótica con plantas actinorrícicas. Suelen ser arbustos o árboles que habitan suelos pobres en N o en climas adversos y que desarrollan nódulos en sus raíces al ser infectadas por *Frankia*. Esta característica les confiere una gran importancia ecológica al ser plantadas entre árboles de cultivo en suelos deficientes en N (Aparicio-Tejo y cols, 2000).

1.2. Simbiosis rizobio-leguminosa

1.2.1. Clasificación de los rizobios y leguminosas

La simbiosis rizobio-leguminosa es la más importante desde un punto de vista agronómico y se establece entre bacterias englobadas bajo el término rizobios y las raíces de las leguminosas. Como resultado se forman los nódulos fijadores de N_2 en cuyo interior las bacterias se diferencian en bacteroides. Los rizobios son aerobios gram-negativos, pertenecen a los subgrupos α y β de las Proteobacterias, tienen morfología normalmente bacilar y son móviles por la presencia de un flagelo polar o subpolar y de dos a seis flagelos peritricos. La taxonomía de los rizobios está siendo revisada continuamente y la clasificación actual, basada en criterios moleculares, aunque no es definitiva, divide a los rizobios en cinco géneros: *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* (**Tabla 1.1**). El género *Rhizobium* forma nódulos en leguminosas de origen templado y crece rápidamente acidificando el medio de cultivo. Este género muestra una especificidad de hospedador bastante estricta y los genes relacionados con la fijación se encuentran localizados en plásmidos generalmente de gran tamaño y formando “clusters”. *Bradyrhizobium* establece simbiosis con plantas de origen tropical y subtropical. Son bacterias generalmente de crecimiento lento, producen alcalinización del medio, poseen una mayor resistencia intrínseca a los antibióticos y una menor especificidad de hospedador. Los genes relacionados con la simbiosis están en el cromosoma. La taxonomía actual añade el género *Mesorhizobium* que presenta una velocidad de crecimiento intermedia entre *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* y cuyos genes simbióticos se localizan en el cromosoma. El género *Sinorhizobium* posee una similitud del 95-96% en el rRNA 16S de *Rhizobium* y recientemente se ha propuesto denominarlo *Ensifer*. El género *Azorhizobium* supone una excepción por su capacidad para desarrollar nódulos en los tallos, además de en las raíces, de unas pocas especies tropicales, siendo la más representativa *Sesbania rostrata*. Además, es capaz de fijar N_2 no simbióticamente, en presencia de hasta un 3% de O_2 , (Aparicio-Tejo y cols, 2000; Ramos y Bisseling, 2004).

Tabla 1.1. Principales simbiosis rizobio-leguminosa

Género	Especie (Biovariedad)	Planta hospedadora
<i>Rhizobium</i>	<i>leguminosarum (phaseoli)</i>	Judía
	<i>leguminosarum (trifolii)</i>	Trébol
	<i>leguminosarum (viciae)</i>	Haba, guisante, lenteja
	<i>galegae</i>	<i>Galega</i>
	<i>tropici</i>	Judía, <i>Leucaena</i>
	<i>etli</i>	Judía, <i>Leucaena</i>
<i>Sinorhizobium</i>	<i>meliloti</i>	Alfalfa
	<i>fredii</i>	Soja
	<i>huakuii</i>	<i>Astragalus</i>
	<i>saheli</i>	Acacia, <i>Sesbania</i>
	<i>teranga</i>	Acacia, <i>Sesbania</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>loti</i>	Lotus
	<i>ciceri</i>	Garbanzo
	<i>mediterraneum</i>	Garbanzo
	<i>huakuii</i>	<i>Astragalus</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	Soja
	sp. (<i>Lupinus</i>)	Lupino
	sp. (<i>cowpea</i>)	<i>Vigna</i> , cacahuete, acacia
	sp. (<i>BTAil</i>)	<i>Aeschynomene</i>
<i>Azorhizobium</i>	<i>caulinodans</i>	<i>Sesbania</i>

Modificado de Aparicio-Tejo y cols (2000).

1.2.2. Preinfección e infección de las raíces por los rizobios

La rizosfera es colonizada por una gran variedad de microorganismos, aunque en algunos casos la composición química de los exudados de la raíz puede condicionar una cierta selectividad de las bacterias. Los rizobios viven como saprofitos en el suelo donde compiten con bacterias quimioheterótrofas. Los flavonoides, a concentraciones bajas (nM), provocan una quimiotaxis activa de los rizobios que se desplazan hacia la superficie radical y, a mayores concentraciones (μM), inducen la expresión de los genes responsables de la nodulación (genes *nod*). Estos genes se localizan normalmente en un plásmido y codifican los factores Nod que son excretados induciendo distintas respuestas en la raíz. Estudios recientes demuestran la similitud entre los mecanismos requeridos para establecer la simbiosis y la patogénesis (Soto y cols, 2006). La base genética de la especificidad de la simbiosis mutualista rizobio-leguminosa hace que la interacción se establezca sólo si la planta dispone del receptor capaz de reconocer el correspondiente factor Nod sintetizado por la bacteria. Los factores Nod son lipoquito-

oligosacáridos, constituidos por un esqueleto oligosacárido de *N*-acetilglucosamina sustituido en su extremo no reductor por un ácido graso. La exclusividad de la simbiosis viene dada, en parte, por la especificidad de estas moléculas, que es a su vez determinada por grupos acetato o sulfato añadidos al oligosacárido y también por el grado de saturación del ácido graso. Se sabe que los factores Nod son reconocidos por receptores de alta afinidad en la membrana plasmática de la raíz, induciendo diferentes respuestas en los pelos radicales y otras células de la epidermis. Tras la interacción con los factores Nod, se produce una deformación de la raíz, alcalinización del medio, una entrada de Ca a nivel del ápice del pelo radical, despolarización de la membrana e inducción de los genes *ENOD11* y *ENOD12* en la epidermis de la raíz. También son indispensables para el proceso de infección otras moléculas como los exopolisacáridos y lipopolisacáridos de los rizobios (Ramos y Bisseling, 2004).

1.2.3. Estructura y desarrollo de los nódulos

El desarrollo de un nódulo requiere que las células corticales se desdiferencien para formar un primordio nodular y que las bacterias entren en la planta de forma controlada. Los rizobios establecen microcolonias o biopelículas en la superficie de las raíces, interviniendo en este proceso moléculas como las adhesinas y lectinas. Después las bacterias invaden los pelos radicales emergentes provocando su curvatura y dando lugar a una típica morfología denominada “cayado de pastor”. Las bacterias quedan atrapadas en el hueco de dicha curvatura y provocan la hidrólisis local de las células de la pared vegetal y la invaginación de la membrana plasmática. Se forma el llamado canal de infección, una estructura tubular por la que penetran, y en la que proliferan, los rizobios. El canal de infección avanza hasta alcanzar la base del pelo radical y las bacterias son liberadas al espacio intercelular, estableciéndose un nuevo canal de infección en las células corticales (**Fig. 1.1**).

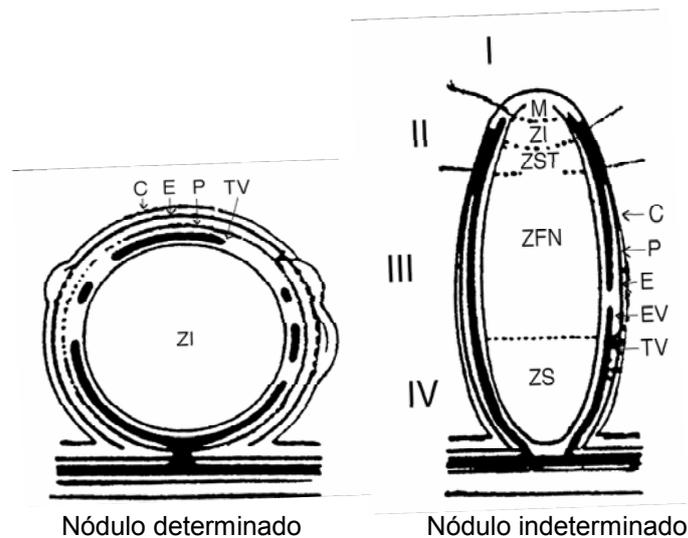


Figura 1.1. Esquema de las estructuras de los nódulos determinados e indeterminados. Nódulo determinado: C, córtex; E, endodermis; P, parénquima; TV, tejido vascular; y ZI, zona infectada que incluye la zona fijadora de N_2 . Nódulo indeterminado: M, meristemo; ZI, zona de invasión; ZST, zona de simbiosis temprana; ZFN, zona fijadora de N_2 ; ZS, zona senescente; C, córtex; P, parénquima; E, endodermis; TV, tejido vascular. *Modificado de Hirsch (1992).*

Existen dos tipos de nódulos, determinados e indeterminados, que se forman dependiendo de la planta hospedadora. Los nódulos indeterminados se caracterizan por tener un meristemo persistente, se originan a partir de primordios establecidos en el córtex interno y son alargados, mientras que los determinados se inician en el córtex externo y son esféricos. El meristemo persistente hace que los nódulos indeterminados presenten un gradiente de edad, desde el meristemo distal, donde constantemente se añaden células nuevas, a la zona de unión a la raíz, que es la zona más senescente. Existen cuatro zonas diferenciadas, zona I (meristemo), zona II (zona de invasión), zona III (fijadora de N_2) y zona IV (zona senescente). En la zona III, presente en los dos tipos de nódulos, es donde se encuentran las células infectadas y también células no infectadas (células intersticiales) que tienen una función especial en la asimilación del N. Esta zona central está rodeada por un córtex, endodermis y parénquima nodulares. El tejido más externo contiene el haz vascular. Los rizobios que logran infectar las células de las raíces se diferencian en bacteroides, en cuyo interior se produce la fijación de N_2 . Los bacteroides se encuentran rodeados de una membrana de origen vegetal constituyendo un nuevo compartimento denominado simbiosoma. Los simbiosomas de los nódulos indeterminados están ocupados por un único bacteroide mientras que los de nódulos determinados pueden contener un número variable. Las leguminosas de clima

templado (alfalfa, guisante, haba) desarrollan nódulos indeterminados y transportan el N fijado a la parte aérea en forma de amidas, mientras que las de clima tropical o subtropical (Lotus, soja, judía) desarrollan nódulos determinados y exportan ureidos (ver **Tabla 1.2**).

Tabla 1.2. Características diferenciales de nódulos determinados e indeterminados

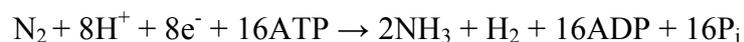
Característica	Determinado	Indeterminado
Planta hospedadora	Soja, judía, Lotus	Alfalfa, guisante, trébol
Origen geográfico	Tropical y subtropical	Templado
Forma del nódulo	Esférica	Alargada, a menudo ramificada
Divisiones celulares iniciales	Córtex externo	Córtex interno
Tipo de sistema vascular	“Cerrado”	“Abierto”
Células infectadas	Generalmente no vacuoladas	Generalmente vacuoladas
Producto exportado	Ureidos	Amidas
Moléculas inductoras de genes <i>nod</i>	Isoflavonas	Flavonas y flavononas

Modificado de Aparicio-Tejo y cols (2000) y Hirsch (1992).

1.2.4. Complejo enzimático nitrogenasa

Este complejo consta de dos subunidades, una ferroproteína (Fe-proteína) o dinitrogenasa reductasa, y una ferromolibdenoproteína (FeMo-proteína) o dinitrogenasa.

La reacción estequiométrica es:



La Fe-proteína, codificada por el gen *nifH*, es un homodímero que contiene un núcleo activo [4Fe-4S] y recibe los electrones de la ferredoxina. La FeMo-proteína está codificada por los genes *nifDK*, es un tetrámero de estructura $\alpha_2\beta_2$ y contiene dos grupos activos, el cofactor homocitrato-hierro-molibdeno o FeMo-co [7Fe-9S-Mo-X-homocitrato; X = N, C, O] y el grupo P compuesto por [8Fe-7S]. La unión del grupo FeMo-co a la proteína es a través de una Cys con el Fe y a una His con el Mo, que a su vez también está unido al homocitrato. La localización de la Fe-proteína en la interfase $\alpha\beta$ justo en la parte superior al grupo P sugiere que éste es el aceptor de los electrones que posteriormente cede al grupo FeMo-co y que finalmente reduce los sustratos.

El **mecanismo** no se conoce en detalle aunque se podría resumir en los siguientes pasos. La Fe-proteína se une a dos MgATP y se reduce; después, se une a la MoFe-proteína y le transfiere un electrón; finalmente el complejo se disocia y la Fe-proteína intercambia MgADP por MgATP para iniciar de nuevo el ciclo. Se necesitan ocho electrones para reducir una molécula de N₂, aunque en teoría serían seis debido a la inevitable reducción de protones. Una vez que se han acumulado los electrones suficientes, el sustrato es reducido por la FeMo-proteína. La reducción de protones o acetileno precisa la acumulación de dos electrones en la MoFe-proteína (Olivares, 2006).

La **regulación** del complejo enzimático nitrogenasa debe responder a la disponibilidad de N, a la presencia de O₂ y al estado redox (**Fig. 1.2**). La nitrogenasa se sintetiza muy activamente en el bacteroide para mantener el crecimiento de la planta utilizando N₂ atmosférico como fuente de N. Los genes *nifHDK* suelen encontrarse contiguos en el genoma y el más conservado es *nifH*. Otros genes *nif* son necesarios para la síntesis del cofactor FeMo-co, la maduración del enzima o el transporte de electrones.

La proteína NifA, junto al factor σ^{54} de la RNA polimerasa, activa la transcripción de los genes *nif*. Generalmente la actividad de NifA depende de la concentración de N₂ fijado en los rizobios de vida libre y de la concentración de O₂ o del estado redox en los fijadores simbióticos. La hemoproteína de membrana FixL de *S. meliloti*, que presenta actividad kinasa, se une reversiblemente al O₂ y activa por fosforilación a FixJ, que induce la transcripción de los genes *nif*. En *Bradyrhizobium japonicum*, sin embargo, NifA es regulado a través del sistema RegS/RegR que es sensible al estado redox (Dixon y Kahn, 2004).

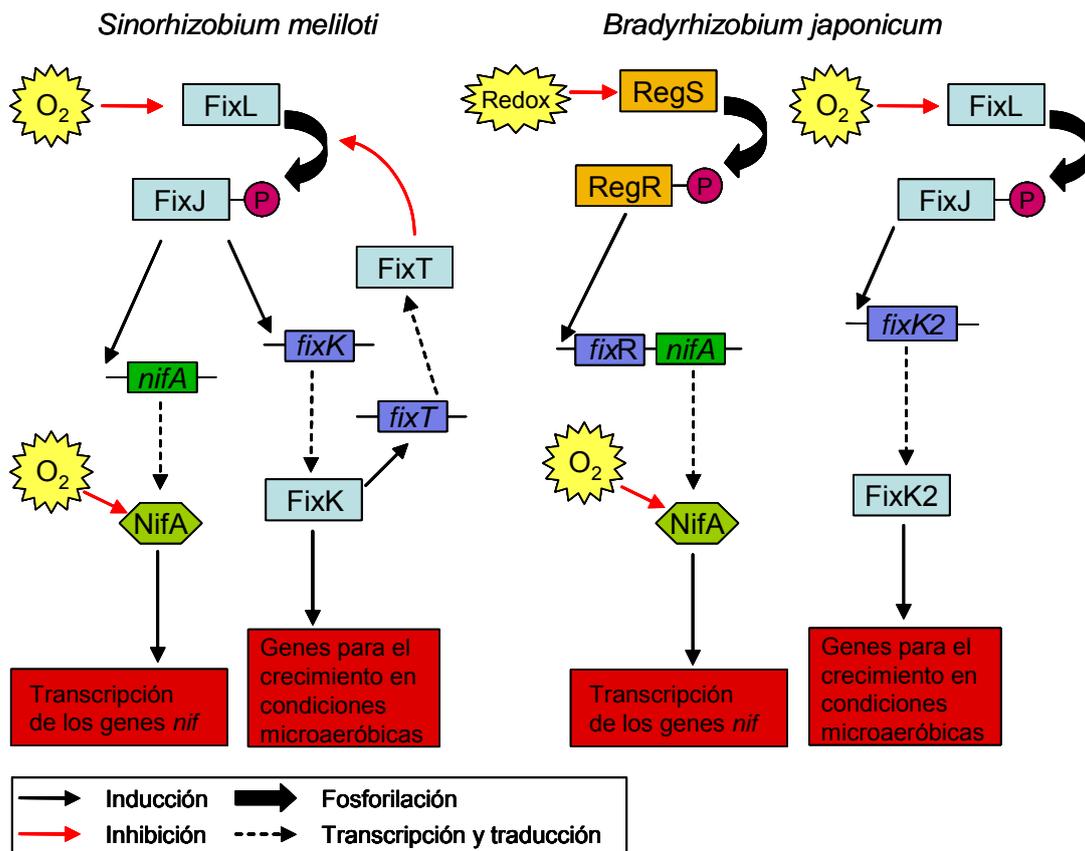


Figura 1.2. Regulación de la expresión de los genes *nif* dependiente de la concentración de O₂ y del estado redox. Se representan los mecanismos de regulación de dos fijadores simbióticos, *Sinorhizobium meliloti* y *Bradyrhizobium japonicum*.

1.2.5. Metabolismo del carbono y nitrógeno en el nódulo

En los nódulos debe existir un equilibrio entre el metabolismo del C y N para garantizar el crecimiento de la planta. La sacarosa, procedente de la parte aérea de la planta vía floema, es catabolizada por las actividades sacarosa sintasa (SS, reacción 1) e invertasa alcalina (IA, reacción 2):



En los nódulos, donde existe un gran consumo de compuestos carbonados, la SS funciona normalmente en el sentido de degradación de sacarosa a pesar de ser capaz de

catalizar la reacción inversa. La SS, a diferencia de la IA, puede producir hexosas fosfato con un elevado contenido energético, que pueden reaccionar con pirofosfato para producir glucosa-1-fosfato (Glc-1-P) y UTP sin necesidad de consumir ATP. Esta capacidad supone una gran ventaja teniendo en cuenta la limitación de ATP en los nódulos donde el medio es pobre en O₂. En casi todas las especies existen diversas isoformas de la SS codificadas por distintos genes cuya expresión está regulada transcripcional y postranscripcionalmente. Ni la concentración de O₂, que varía de forma muy limitada en los nódulos, ni el ácido abscísico (ABA), que actúa como molécula señal en diversos estreses, parecen ser reguladores de esta enzima. Se ha demostrado la regulación de la SS por fosforilación en el residuo Ser-11 por parte de una kinasa dependiente de Ca (Winter y Huber, 2000). Aunque no se conoce con seguridad la función de este mecanismo de regulación, sí que parece estar relacionado con la localización intracelular de la enzima que permanecería asociada a membrana en su forma no fosforilada.

En la fracción vegetal del nódulo existe una elevada actividad glucolítica (**Fig 1.3**) que produce fosfoenolpiruvato (PEP), el cual se transforma en oxalacetato (OAA) mediante la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC). A continuación, el OAA se convierte en malato por la malato deshidrogenasa (MDH). Los ácidos dicarboxílicos son la principal fuente de C en los bacteroides y son transportados desde el citosol a través de la membrana del simbiosoma. El malato es el ácido orgánico más abundante y el sustrato principal de la respiración bacteroidal. Los bacteroides exportan el N₂ fijado mayoritariamente en forma de amonio, que difunde al espacio peribacteroidal y de ahí pasa al citosol vegetal a través, probablemente, de un canal iónico situado en la membrana simbiosomal. Debido a su toxicidad, el amonio es rápidamente asimilado en el citosol a través del ciclo GS/GOGAT, de forma que se mantiene el gradiente de concentración de amonio entre el citosol y el bacteroide. Es importante que el amonio no llegue a acumularse en el interior del bacteroide porque podría llegar a inhibir el complejo nitrogenasa y causar daño celular. La glutamina sintetasa (GS) cataliza la síntesis de Gln a partir de amonio y Glu consumiendo una molécula de ATP. La glutamato sintasa (GOGAT) transfiere el grupo amida de la Gln a α -cetoglutarato (α KG) generando dos moléculas de Glu. La Gln puede ceder su grupo amida al Asp para formar Asn mediante la actividad asparragina sintetasa. El amonio también puede ser asimilado por la NADH-glutamato deshidrogenasa, que incorpora un grupo amino al α KG para producir Glu. Se ha propuesto recientemente que la planta suministra Glu a

los bacteroides, además de dicarboxilatos; el Glu atravesaría la membrana por transporte pasivo y el bacteroide produciría Asp o posiblemente Ala a partir de OAA. Así, los bacteroides exportarían estos dos aminoácidos al citosol además de amonio (Lodwig y cols, 2003).

En los amiloplastos de la zona infectada el Asp es sintetizado por la aspartato aminotransferasa a partir de Glu y OAA del ciclo de los ácidos tricarbónicos produciendo también α KG, que es necesario para la asimilación de amonio como Glu mediante la actividad GOGAT. Otra de las enzimas clave en la relación del metabolismo del C y el N es la isocitrato deshidrogenasa (ICDH), que cataliza la descarboxilación oxidativa de isocitrato a α KG acoplada a la reducción de NADP^+ o NAD^+ en presencia de Mn^{2+} o Mg^{2+} . El 95% de la actividad ICDH se encuentra en el citosol.

Los nódulos exportan el N asimilado en forma de amidas o ureidos a la parte aérea de la planta. Los ureidos (alantoína, ácido alantoico, citrulina) se sintetizan a partir de las amidas y precisan síntesis *de novo* de purinas que deben ser oxidadas. Los ureidos son menos solubles pero suponen un ahorro de C para el nódulo respecto a las amidas (González y cols, 2006).

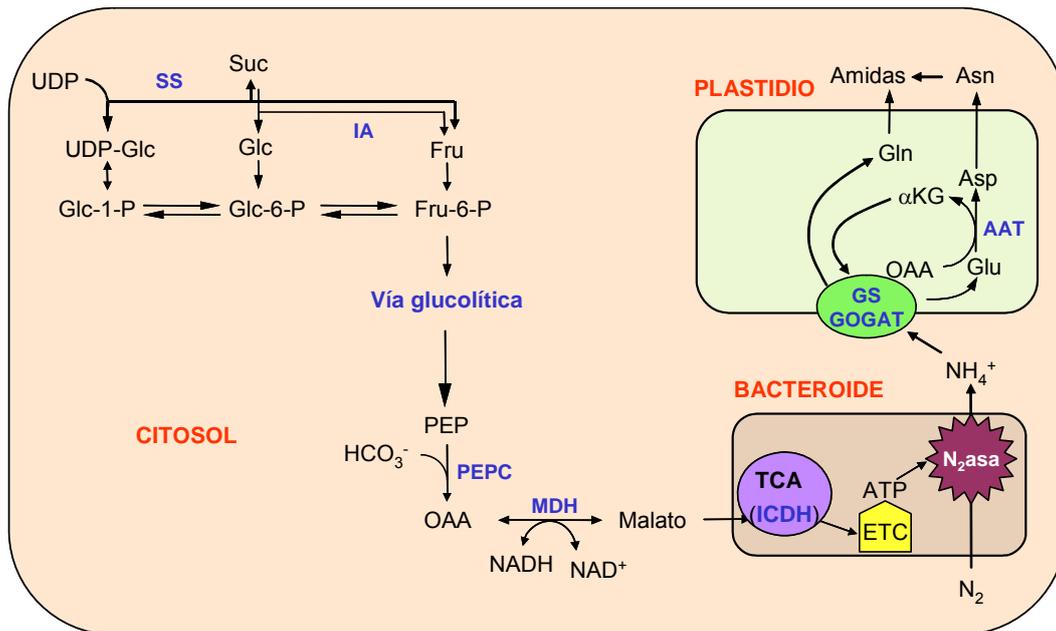


Figura 1.3. Esquema del metabolismo del carbono y del nitrógeno en una célula de un nódulo indeterminado (productor de amidas). *Abreviaturas adicionales:* AAT, Asp aminotransferasa; ETC, cadena de transporte de electrones; GS, Gln sintetasa; OAA, oxalacetato; N₂asa, complejo nitrogenasa; SS, sacarosa sintasa; IA, invertasa alcalina; PEP, fosfoenolpiruvato; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; MDH, malato deshidrogenasa; TCA, ciclo de los ácidos tricarbóxicos; ICDH, isocitrato deshidrogenasa. *Modificado de Arrese-Igor y cols (1999).*

1.2.6. Regulación de la concentración de O₂

La concentración de O₂ en los nódulos debe estar estrictamente regulada para asegurar que se mantengan simultáneamente elevadas la actividad nitrogenasa y la respiración. Esta regulación es llevada a cabo en los nódulos por diversos mecanismos.

Barrera de resistencia a la difusión de O₂

Existe una barrera de resistencia variable a la difusión de O₂, localizada en el córtex interno, que regula el paso de este gas hacia la zona central o infectada. Este mecanismo se demostró en experimentos en los que se incrementaba gradualmente la concentración de O₂ externa de los nódulos y también mediante la medición directa de la concentración de O₂ en el interior de los nódulos por microelectrodos selectivos. Al aumentar la concentración de O₂ externa se produce un aumento transitorio de este gas en la zona infectada, recuperándose después el valor inicial. Esto indica que existe una resistencia en el córtex interno que se ajusta ante cambios en la cantidad de O₂ en el

exterior del nódulo o en situaciones de estrés. Se desconoce el mecanismo celular y molecular de esta resistencia, aunque diversos modelos matemáticos del flujo de O₂ sugieren que la resistencia puede ser regulada mediante cambios en la cantidad de agua en los espacios intercelulares, debido a que la baja solubilidad del O₂ en agua limitaría la velocidad de paso de este gas hacia la zona infectada. La cantidad de agua en los espacios intercelulares puede variar, a su vez, en virtud de cambios conformacionales en las glicoproteínas o alteraciones en la concentración de sacarosa que determinan por ósmosis la entrada o salida de agua.

Leghemoglobina

La leghemoglobina (Lb) es una hemoproteína que transporta O₂ desde la membrana plasmática hasta la membrana simbiosomal en las células infectadas. Una vez que el O₂ atraviesa el espacio peribacteroidal, alcanza las oxidasas terminales de alta afinidad del bacteroide. La Lb, y las elevadas tasas respiratorias de los bacteroides, mantienen la concentración de O₂ entre 20-100 nM en el citosol de las células infectadas. La Lb se encuentra en el citosol a concentraciones de 1-5 mM y consta de un polipéptido de 16 kD y un grupo protohemo IX que se une reversiblemente al O₂, ambos sintetizados por la planta. De hecho, tan sólo una pequeña parte del O₂ se encuentra libre (≈ 10 nM), estando el resto unido a la Lb con elevada afinidad ($K_m \approx 48-60$ nM), formando oxileghemoglobina (LbO₂). El Fe que contiene la Lb debe estar en estado reducido para que la proteína sea funcional. La proporción de Lb reducida (ferroleghemoglobina) y oxidada (ferrileghemoglobina) varía según la especie de leguminosa, la edad del nódulo o el estrés aplicado (Becana y Klucas, 1990). Recientemente, se ha demostrado que en las plantas de Lotus transgénicas en las que se había suprimido la expresión de las Lbs por RNA de interferencia (RNAi) no se detectaba proteína NifD ni se producía FBN, y además la relación ATP/ADP era inferior y la concentración de O₂ libre superior respecto a la de las plantas control (Ott y cols, 2005).

1.3. Especies reactivas

1.3.1. Especies reactivas de oxígeno

Desde que la atmósfera fue enriqueciéndose en O₂, debido principalmente a la proliferación de las cianobacterias fotosintéticas, existió el riesgo de producción de

especies reactivas de oxígeno (ROS). El O_2 es una molécula relativamente estable que, sin embargo, puede generar especies mucho más reactivas a través de reacciones de transferencia de energía o de electrones. Las ROS son moléculas con moderada (H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; O_2^- , radical superóxido) o elevada ($\cdot OH$, radical hidroxilo; 1O_2 , oxígeno singlete) reactividad química que se generan durante el metabolismo celular y pueden dañar a distintas biomoléculas (ver **1.5**). El radical $\cdot OH$ se origina por reducción del H_2O_2 por cantidades traza de Fe^{2+} y Cu^+ (reacciones Fenton). Este radical $\cdot OH$ es extremadamente oxidante y reacciona instantáneamente con moléculas próximas. Un ejemplo de gran importancia biológica es su capacidad para iniciar la peroxidación de lípidos. En cambio, el radical O_2^- o el H_2O_2 no causan daño oxidativo por sí mismos, pero si intervienen en la formación de ROS y RNS con mayor capacidad oxidante (Halliwell y Gutteridge, 2007). El 1O_2 oxida a diferentes biomoléculas en función de su localización intracelular, daña las membranas e incluso interviene en la inducción de la muerte celular (Ryter y Tyrrell, 1998).

1.3.2. Especies reactivas de nitrógeno

Las RNS son moléculas que contienen N y muestran una moderada o alta reactividad. Destacan el óxido nítrico (NO), un radical libre gaseoso que difunde fácilmente a través de las membranas, y el peroxinitrito ($ONOO^-$), que se forma por reacción entre el NO y el O_2^- o entre el nitrito y el H_2O_2 . El NO en plantas se puede originar por reducción del nitrato o nitrito, catalizadas por la nitrato o nitrito reductasas. Puede actuar como pro-oxidante al generar $ONOO^-$, o como antioxidante al unirse a Fe catalítico y O_2^- evitando así reacciones tipo Fenton. Como molécula señal el NO interviene en diversos procesos tales como el cierre estomático, la regulación de la biosíntesis de etileno, ácido jasmónico y ácido salicílico, la modulación de la expresión génica, el desarrollo y senescencia, y la respuesta de las plantas a estreses abióticos y bióticos. Se ha detectado producción de NO en nódulos de lupino y hojas de guisante. Asimismo, se ha demostrado que el NO puede unirse a la Lb, formando un complejo nitrosilo y se ha sugerido que la Lb puede de esta manera modular la actividad biológica del NO así como el flujo de O_2 en los nódulos. El papel del NO en los nódulos necesita ser investigado ya que la nitrogenasa de los bacteroides es inhibida *in vitro* por el NO (Hérouart y cols, 2002).

Se ha demostrado que los inhibidores de la óxido nítrico sintasa (NOS) de animales también suprimen la aparición de NO en plantas y que un anticuerpo anti-NOS reconoce una proteína en células vegetales, si bien esto podría ser atribuible a la citocromo P-450 reductasa. Asimismo, se ha determinado en plantas actividad NOS como producción de L-citrulina a partir de L-Arg, pero no se ha identificado la proteína responsable (Neill y cols, 2002).

1.3.3. Especies reactivas como moléculas señal en plantas

Recientemente se han realizado importantes avances en el estudio del papel de las ROS en las plantas como moléculas señal. El equilibrio entre la producción de ROS y los sistemas antioxidantes determinan la intensidad y localización de las señales. Las ROS pueden actuar a tres niveles: (i) al ser detectadas por ciertos sensores, induciendo cascadas de señalización que afectan en último término a la expresión génica; (ii) oxidando directamente algún componente de una cascada, por ejemplo la inhibición de fosfatasas; y (iii) modificando la actividad de factores de transcripción y por tanto la expresión génica. En fases posteriores de la señalización podría participar el Ca y la calmodulina, así como la activación de proteínas G. En Arabidopsis se han identificado algunas MAPK kinasas (MAPK3 y MAPK6) que son activadas por H₂O₂ y NO (Neill y cols, 2002), y una tirosina fosfatasa (PTP1) que es inactivada por H₂O₂. A nivel transcripcional, se conoce la existencia de elementos *cis* en secuencias de promotores que confieren sensibilidad al estrés oxidativo (Apel y Hirt, 2004; Mittler y cols, 2004).

1.3.4. Producción de especies reactivas en plantas

En las plantas, las ROS se producen principalmente en la fotosíntesis, respiración, metabolismo celular, respuesta a estrés y fijación de N₂.

Cloroplastos

En los cloroplastos el fotosistema I puede reducir el O₂ a radical O₂⁻ a través de la reacción de Mehler (fotorreducción de O₂) y el fotosistema II puede generar radicales O₂⁻ y [•]OH. En el interior de los cloroplastos se puede producir ¹O₂ cuando la clorofila

transfiere la energía de excitación al O₂ (Apel y Hirt, 2004; Halliwell y Gutteridge, 2007).

Mitocondrias

Durante la respiración mitocondrial se reduce el O₂ a H₂O a través de la cadena de transporte electrónico. Esta reducción puede tener lugar por un mecanismo tetravalente (citocromo *c* oxidasa, oxidasa alternativa), pero, inevitablemente, un 1-2% del O₂ consumido genera ROS. Esto ocurre principalmente en los complejos I (NADH deshidrogenasa) y III (ubiquinol-citocromo *c* oxidorreductasa) de la membrana interna mitocondrial. La Mn-superóxido dismutasa (MnSOD) mitocondrial actúa sobre el radical O₂⁻ transformándolo en H₂O₂, que puede a su vez ser reducido por iones Fe²⁺ o Cu⁺ a radicales [•]OH en reacciones tipo Fenton (Navrot y cols, 2007). En las mitocondrias se genera también NO que puede interferir con la actividad del complejo III (Yamasaki y cols, 2001).

Peroxisomas

En los peroxisomas se produce H₂O₂, entre otros procesos, durante la fotorrespiración mediante la glicolato oxidasa, la β-oxidación de los ácidos grasos y la dismutación del radical O₂⁻ por la MnSOD y CuZnSOD. Se ha demostrado también la formación de O₂⁻ y NO en los peroxisomas, y se ha propuesto que estas moléculas tienen una función señalizadora. El O₂⁻ se origina en la matriz por acción de la xantina oxidasa y en la membrana por un mecanismo dependiente de NAD(P)H (del Río y cols, 2006). En cambio, no se ha identificado todavía la enzima productora de NO que está presente en peroxisomas de hojas de guisante (Barroso y cols, 1999). La capacidad de producir y regular la liberación de ROS y RNS al citosol, así como la proliferación de peroxisomas en respuesta a diversos estreses y durante la senescencia, determinan que estos orgánulos desempeñen un papel clave en la respuesta al estrés oxidativo en las plantas (Corpas y cols, 2001; del Río y cols, 2002).

Nódulos

En los nódulos de las leguminosas existe un riesgo elevado de formación de ROS. La elevada tasa respiratoria de las mitocondrias y bacteroides, así como la cadena de transporte electrónico del complejo nitrogenasa, son fuentes potenciales de O₂⁻ y H₂O₂. La Lb (ver **1.2.6**) constituye, paradójicamente, una fuente potencial de ROS, ya que puede autooxidarse liberando O₂⁻ en las condiciones de pH ligeramente ácido de los

nódulos. En los peroxisomas de los nódulos determinados existe una alta actividad urato oxidasa, necesaria para la síntesis de ureidos, pero que origina abundante H_2O_2 . Durante el desarrollo del nódulo, las ROS juegan un papel esencial y similar al que se establece durante la infección de patógenos. Se ha detectado O_2^- en los canales de infección y en las células infectadas de los nódulos jóvenes (Hérouart y cols, 2002) y H_2O_2 en las proximidades del canal de infección. En los nódulos indeterminados al menos parte del H_2O_2 detectado en los canales de infección es producido por la acción secuencial de una NADPH oxidasa y la CuZnSOD citosólica (Rubio y cols, 2004). Además, el H_2O_2 está relacionado con la senescencia ya que en los nódulos maduros se ha observado acumulación de esta especie en la zona II y en torno a los bacteroides en la zona IV (Bestwick y cols, 1997; Hérouart y cols, 2002). En el interior de los bacteroides no se encuentra H_2O_2 debido a la existencia de un sistema antioxidante muy eficaz, constituido por enzimas como las SODs y catalasas, que resultan indispensables en la simbiosis (ver 1.4).

1.4. Defensas antioxidantes de las plantas

1.4.1. Antioxidantes liposolubles

Existen diversos compuestos hidrofóbicos presentes en las membranas que protegen de la peroxidación lipídica. El β -caroteno, además de funcionar como pigmento en la fotosíntesis, elimina el $^1\text{O}_2$ y actúa como “quencher” del estado triplete de la molécula de clorofila. Un exceso de luz induce la de-epoxidación enzimática y reversible de la violaxantina, formándose zeaxantina y constituyéndose así un ciclo de fotoprotección mediante disipación del exceso de energía de excitación. Otro metabolito importante es el α -tocoferol o vitamina E, que se encuentra en las membranas tilacoidales particularmente asociado al fotosistema I y que actúa inactivando al $^1\text{O}_2$. También repara las estructuras de radical libre de algunos aminoácidos como la Thr, Tyr, Met e His (Dalton, 1995). Los nódulos de soja tanto jóvenes como maduros contienen unos 15 μg por gramo de α -tocoferol. Los flavonoides y otros polifenoles, presentes en los nódulos a concentraciones entre 0,4-4 mM, protegen a las membranas de la peroxidación lipídica por neutralización de los radicales lipídicos (Matamoros y cols, 2003). El ácido fítico y algunos compuestos fenólicos son capaces de quelar el Fe en

una forma catalíticamente inactiva, evitando así el daño oxidativo tanto a lípidos como a proteínas *in vitro*. Las poliaminas son muy abundantes en los nódulos y tienen capacidad para asociarse con fosfolípidos, estabilizando las membranas, y con el DNA, protegiéndolo frente al ataque oxidativo por ROS.

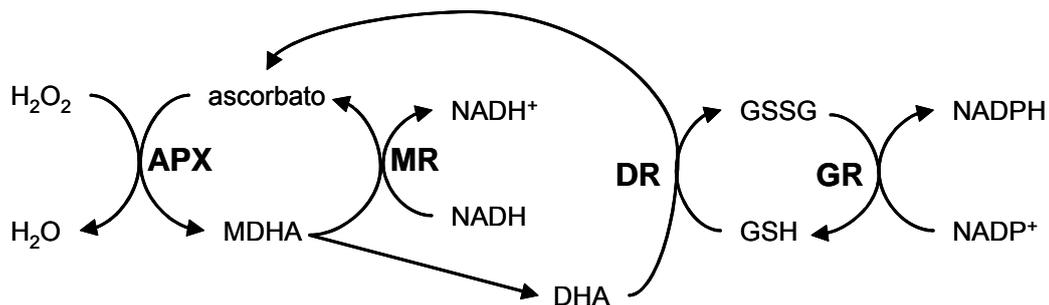
1.4.2. Ascorbato y glutatión

Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran el ascorbato y el glutatión (GSH; γ Glu-Cys-Gly) 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 monodeshidroascorbato (MDHA) y deshidroascorbato (DHA). El ascorbato se regenera a través del ciclo ascorbato-GSH (ver **1.4.3**). Por otra parte, el ascorbato es el cofactor de las dioxigenasas, participa en la regulación del ciclo celular y en la organogénesis, y es esencial para mantener la funcionalidad de los nódulos, donde se encuentra a una concentración elevada (1-2 mM). El GSH es el compuesto tiólico más abundante en el citosol (0,5-1 mM en nódulos). Las leguminosas se caracterizan por contener, además o en lugar de GSH, homoglutatión (hGSH; γ Glu-Cys- β Ala), un tripéptido en el que una β Ala sustituye a la Gly. La funcionalidad del hGSH se considera similar a la del GSH. Sus funciones incluyen la eliminación directa de radicales \cdot OH, O_2^- y radicales orgánicos, el mantenimiento del estado redox celular, la regulación del ciclo celular, el transporte y almacenamiento de azufre, la desintoxicación de metales pesados (ver **1.6.3**) y la percepción y respuesta de las plantas a condiciones de estrés abiótico y biótico.

1.4.3. Ciclo ascorbato-glutatión

El ciclo ascorbato-GSH o de Halliwell-Asada está constituido por cuatro enzimas, siendo la más abundante la ascorbato peroxidasa (APX), que requiere ascorbato para reducir el H_2O_2 a H_2O . El MDHA puede ser reducido a ascorbato de nuevo por la monodeshidroascorbato reductasa (MR), que requiere NADH, o bien puede desproporcionarse a ascorbato y DHA. A continuación, la deshidroascorbato reductasa (DR) 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. En los nódulos la APX representa el 0,9% de la proteína soluble y se encuentra en el citosol y en las mitocondrias, aunque muy probablemente existan otras isoformas en los peroxisomas y plastidios, al igual que ocurre en las hojas. La APX citosólica es estable en ausencia de ascorbato a diferencia de la isoforma plastidial. Las actividades MR y DR se localizan en el citosol y en la mitocondrias, mientras que la GR se encuentra en el citosol, mitocondrias y bacteroides (Dalton, 1995; Matamoros y cols, 2003).



1.4.4. Catalasa

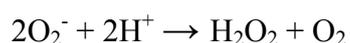
Las catalasas de plantas son hemoproteínas tetraméricas (220 kD) que catalizan la descomposición de H₂O₂ a O₂ y H₂O sin necesidad de poder reductor. Esta ventaja energética frente a las peroxidasas es contrarrestada por la baja afinidad de la enzima por el H₂O₂ ($K_m = 8-100$ mM). Por tanto, la catalasa es activa tan sólo a altas concentraciones de H₂O₂ como ocurre en los peroxisomas y glioxisomas, donde existen distintas isoformas de la enzima (**Fig. 1.4**). Una función importante de la catalasa es eliminar el H₂O₂ generado en los peroxisomas de nódulos determinados como consecuencia de la síntesis de ureidos (Matamoros y cols, 2003). La expresión de la enzima está regulada durante el desarrollo, pero también responde a diversas señales ambientales como el exceso de luz y las temperaturas extremas, ya que generalmente la enzima se inhibe tanto a temperaturas bajas como ante un shock térmico (Dat y cols, 2000).

La catalasa es también una enzima importante de los rizobios (63-77 kD). En *S. meliloti* existen tres genes *kat* que se expresan en las bacterias en vida libre de forma diferencial. El gen *katB* se expresa de forma constitutiva y, a diferencia de *katA* y *katC*, no se induce por estrés oxidativo. La proteína codificada por *katB* tiene actividad

catalasa-peroxidasa En simbiosis, el gen *katA* se expresa en los bacteroides y los genes *katB* y *katC* en las bacterias del canal de infección (Sigaud y cols, 1999; Jamet y cols, 2003).

1.4.5. Superóxido dismutasas

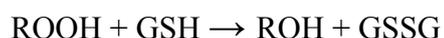
Las SODs son metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical O_2^- :



Se clasifican en tres tipos, todas ellas codificadas en el núcleo, según el cofactor metálico. Las CuZnSODs son proteínas diméricas (32 kD) que pueden encontrarse en el citosol, plastidios y apoplasto de tejidos vegetales (Kanematsu y Asada, 1990) y en el espacio periplásmico de los bacteroides (Ampe y cols, 2003). Las FeSODs forman dímeros (56 kD) y son características de los cloroplastos o plastidios, si bien se han detectado también en el citosol. Las MnSOD de plantas son proteínas tetraméricas (82 kD) y se encuentran en las mitocondrias y peroxisomas (Bowler y cols, 1994) (**Fig. 1.4**). Los bacteroides contienen una MnSOD dimérica (43 kD) en el citosol. La actividad CuZnSOD es inhibida por cianuro y H_2O_2 , la FeSOD tan sólo por H_2O_2 , y la MnSOD por ninguno de los dos (Fridovich, 1986).

1.4.6. Glutatión peroxidasas y peroxirredoxinas

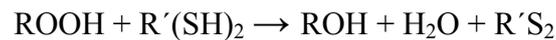
Las glutatión peroxidasas (GPXs) son una familia de enzimas que catalizan la reducción de hidroperóxidos orgánicos y peróxidos de lípidos, tales como los que se originan en las membranas en situación de estrés, utilizando GSH como donador de electrones:



Las GPXs se describieron primero en animales donde se caracterizan por tener en su secuencia un aminoácido no común, la selenocisteína, en el que el S de la Cys ha sido sustituido por Se; sin embargo, en plantas este aminoácido aparece sustituido por una Cys (Böck y cols, 1991). Son proteínas monoméricas (19-26 kD) que se encuentran en el citosol, plastidios y mitocondrias. En *Arabidopsis* se encontraron ocho genes *GPX* cuya transcripción está regulada diferencialmente por diversas hormonas como el ácido

salicílico, ácido jasmónico o ABA (Rodríguez Milla y cols, 2003). En Lotus, nuestro grupo ha identificado seis genes *GPX*, que responden al estrés salino. De hecho, diversos estudios han concluido que las *GPXs* se inducen por la salinidad y otros estreses abióticos y bióticos (Eshdat y cols, 1997). Recientemente se ha propuesto que las *GPXs* constituyen una clase de peroxirredoxinas (*PRXs*).

Las *PRXs* son una familia de peroxidases no hémicas, que catalizan la reducción del H_2O_2 a agua, y de los peróxidos orgánicos a los correspondientes alcoholes:



Son homodímeros y su actividad depende de la presencia de al menos una Cys en su centro catalítico. Esta Cys es regenerada por la acción de las tiorredoxinas o glutarredoxinas (Vieira Dos Santos y Rey, 2006).

1.4.7. Ferritina

La ferritina es una proteína constituida por 24 monómeros idénticos (28 kD) que se localiza en los cloroplastos y amiloplastos. Es capaz de almacenar hasta 4500 átomos de Fe controlando la disponibilidad de este metal para los procesos metabólicos y evitando su participación en reacciones tipo Fenton. Los nódulos contienen gran cantidad de esta proteína tanto en los plastidios como en los amiloplastos. La ferritina podría aportar el Fe necesario para la síntesis de Lb y nitrogenasa. Durante la senescencia natural o inducida por estrés de los nódulos se ha observado un aumento de la expresión de ferritina debida probablemente a la liberación de Fe procedente de la degradación proteica (Lucas y cols, 1998; Matamoros y cols, 1999a).

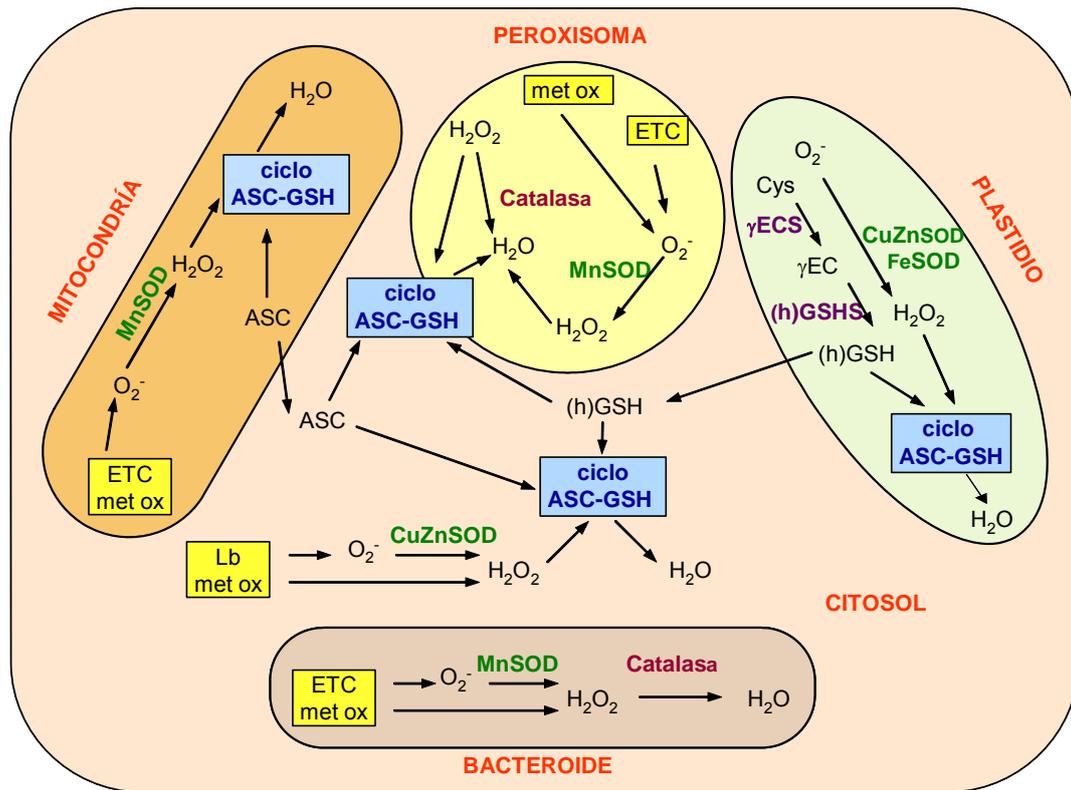


Figura 1.4. Esquema de la producción de ROS y de los principales sistemas antioxidantes en los nódulos de leguminosas. *Abreviaturas adicionales:* ETC, cadena de transporte de electrones; ox met, metabolismo oxidativo. *Modificado de Matamoros y cols (2003).*

1.5. Daño oxidativo a biomoléculas

En determinadas situaciones, las defensas antioxidantes de la planta son insuficientes para controlar los niveles intracelulares de ROS y/o RNS y éstos pueden llegar a producir daño oxidativo a lípidos, proteínas y DNA, entre otras biomoléculas esenciales. La acumulación de los correspondientes productos de oxidación en las células es considerado como evidencia de un “estrés oxidativo” (si intervienen ROS) o de un “estrés nitrosativo” (si intervienen RNS).

Daño oxidativo a lípidos

Los ácidos grasos insaturados pueden sufrir peroxidación en presencia de ROS, afectando a la estructura y función de las membranas. Las principales consecuencias son la descompartimentación de iones, la pérdida del potencial de membrana, la inhibición

del transporte de metabolitos y la modificación de los receptores de hormonas, produciéndose finalmente la muerte celular. Los productos de la peroxidación lipídica pueden ser aldehídos citotóxicos como el malondialdehído (MDA), que se utiliza como marcador de daño oxidativo en tejidos animales y vegetales. La peroxidación de algunos ácidos grasos poliinsaturados produce la formación de mensajeros químicos como el ácido jasmónico, el ácido metil-jasmónico y otras oxilipinas implicados en la respuesta defensiva frente a las ROS (Moller y cols, 2007; Wasternack, 2007).

Daño oxidativo a proteínas

Las proteínas expuestas a ROS y/o RNS son susceptibles de modificaciones covalentes y posterior degradación con consecuencias muy negativas para la célula. La mayor parte de estas modificaciones son irreversibles con la excepción de cambios en aminoácidos que contienen S. La modificación más común consiste en la formación de grupos carbonilo. En presencia del radical $\cdot\text{OH}$ las proteínas sufren alteraciones estructurales pudiendo sufrir fragmentaciones espontáneas o bien ser más susceptibles de proteólisis.

En animales, se ha relacionado la formación de grupos carbonilo en proteínas con ciertas patologías y el envejecimiento (Stadtman, 1992). En plantas, se ha comprobado un aumento del nivel de proteínas oxidadas en hojas y nódulos de leguminosas tratadas con Cd^{2+} y durante la senescencia. En *Arabidopsis* aumenta la proporción de grupos carbonilo durante la etapa vegetativa y disminuye durante la etapa reproductiva, quizá para evitar la transferencia de componentes dañados a la senescencia (Johansson y cols, 2004). En hojas de trigo la carbonilación de proteínas es mayor en mitocondrias que en peroxisomas y cloroplastos (Bartoli y cols, 2004). Por ejemplo, se han identificado 20 proteínas modificadas en las mitocondrias, entre las que se encuentran enzimas del ciclo de Krebs, enzimas redox, chaperonas y proteínas antioxidantes como la MnSOD (Moller y cols, 2007).

Daño oxidativo a DNA

El daño oxidativo a DNA ha sido estudiado en mucha menor medida que el de proteínas y lípidos. Se sabe que sólo el radical $\cdot\text{OH}$ tiene suficiente reactividad para provocar la rotura de la doble hélice y la oxidación de la desoxirribosa y de las bases, generando mutaciones (Moller y cols, 2007). La 8-hidroxiguanina es una base púrica modificada que se acumula en plantas de judía y guisante expuestas a estrés por ozono (Floyd y cols, 1989). Esta molécula se utiliza como marcador de daño oxidativo al DNA. La xantina e

hipoxantina se acumulan en nódulos de soja senescentes, quizás como productos del ataque a las purinas por el NO y otras RNS (Evans y cols, 1999).

1.6. Estréses abióticos y estrés oxidativo en las plantas

La exposición de las plantas a estrés hídrico, salinidad, temperaturas extremas o metales pesados provoca una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que afectan negativamente al crecimiento y productividad de los cultivos. De hecho, el estrés hídrico y salino son los dos factores más limitantes en la producción agrícola, afectando al 10% de la tierra cultivable. Las plantas son capaces de percibir el estrés abiótico y responder con diversas estrategias para poder sobrevivir. La tolerancia viene dada por genes ubicuos en las plantas que, al expresarse con un determinado patrón, dan lugar a un fenotipo tolerante, aunque todavía se desconocen los mecanismos. Los trabajos más recientes acerca de la respuesta a estrés hídrico y salino, pero también a otros estréses abióticos, sugieren la existencia de una vía independiente y otra dependiente de ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006).

1.6.1. Estrés hídrico

El estrés hídrico atenúa el crecimiento de la planta y provoca la deshidratación celular, al ser liberada parte del agua del citosol y de la vacuola al espacio extracelular; además, se incrementa la producción de ROS (ver **1.6.4**) y disminuye la fotosíntesis, entre otros procesos metabólicos. La limitación de la fotosíntesis detectable ante un estrés hídrico moderado se debe a una disminución de la disponibilidad de CO₂ por cierre estomático regulado por ABA (McAinsh y cols, 1996). En condiciones de estrés hídrico moderado, los contenidos de clorofila y ATP y la actividad Rubisco, entre otros parámetros fotosintéticos, se encuentran afectados al descender la conductancia estomática por debajo de un valor umbral (0,05-0,1 mol H₂O m⁻² s⁻¹). Un estrés hídrico moderado inhibe rápidamente el crecimiento de la parte aérea, mientras que la elongación de la raíz se mantiene como un mecanismo de adaptación que posibilita la absorción de agua de capas más profundas del suelo (Sharp y cols, 1988). Un estrés hídrico severo daña el metabolismo de la planta produciendo un desequilibrio en el balance de C. La

respiración disminuye al descender la disponibilidad de fotosintatos, aunque en determinadas especies puede incluso aumentar. En general, la respiración se mantiene más constante que la fotosíntesis debido en parte a la existencia de una vía respiratoria alternativa en las plantas (Flexas y cols, 2006).

Los mecanismos que confieren tolerancia al estrés hídrico incluyen un aumento de ABA, la activación de cascadas de percepción y transducción de la señal, la inducción de determinados genes, la acumulación de osmolitos (azúcares, Pro, glicinabetaína) y la protección con chaperonas y acuaporinas. Se ha demostrado la activación de rutas de señalización en las que participan diferentes tipos de kinasas: MAPK, kinasas tipo SNF-1 (que detectan variaciones en el cociente ATP/AMP) y kinasas dependientes de Ca. Se han examinado los promotores de algunos genes inducidos durante la sequía y se ha comprobado que contienen elementos *cis* comunes, que responden a la deshidratación (DRE) o al ABA (ABRE). Los factores de transcripción que inducen genes relacionados con el estrés osmótico son proteínas bZIP (cremallera de Leu), proteínas con estructura de “dedos de Zn”, Myb y AP2/ERF, entre otros (Bartels y Sunkar, 2005).

En los **nódulos**, la sequía inhibe la fijación de N₂, incluso antes que la caída de la fotosíntesis en la parte aérea. Diversos estudios en soja, judía y guisante sugieren que este efecto es debido a un descenso de la permeabilidad del O₂ (Durand y cols, 1987; Serraj y Sinclair, 1996; Ramos y cols, 1999) y de la actividad metabólica (Díaz del Castillo y Layzell, 1995) de los nódulos. En concreto, la actividad SS, a diferencia de otras enzimas del metabolismo del C, disminuye rápidamente en nódulos expuestos a estrés hídrico y se ha propuesto que es determinante de la inhibición de la nitrogenasa en varias leguminosas (Gordon y cols, 1997; González y cols, 1998; Ramos y cols, 1999). De hecho, se ha demostrado que el mutante de guisante *rug4*, que posee tan sólo un 10% de la actividad SS del genotipo salvaje, carece de actividad fijadora (Gordon y cols, 1999). Este trabajo y otros posteriores (Gálvez y cols, 2005; Marino y cols, 2006) indican que la SS es importante en la regulación del metabolismo de C y en la respuesta temprana de la fijación de N₂ al estrés hídrico. Además, se ha demostrado que el mecanismo de inhibición de la SS es independiente de ABA (González y cols, 2001). Se ha propuesto que la inhibición de SS causa una restricción de la disponibilidad de malato y otros ácidos dicarboxílicos necesarios para la respiración del bacteroide, lo que en último término inhibe la actividad nitrogenasa (Gordon y cols, 1997; Gálvez y cols, 2005). Otro de los efectos del estrés hídrico es la acumulación de ureidos en los nódulos;

así, en judía se ha detectado un descenso de la actividad aspartato-aminotransferasa asociado a la inhibición de la fijación de N_2 y a una importante acumulación de ureidos.

1.6.2. Estrés salino

La salinidad causa deshidratación celular, como ocurre en la sequía (ver **1.6.1**), y estrés osmótico, debido al aumento de la concentración intracelular de iones Na^+ que puede resultar tóxico y provocar un desequilibrio o deficiencia de la nutrición mineral. Una de las primeras respuestas fisiológicas de la parte aérea es el cierre estomático para disminuir la transpiración y prevenir así el aumento de la concentración de iones que son transportados desde la raíz. Como consecuencia, disminuye la fotosíntesis y el crecimiento general de la planta. Otro efecto generalizado es la acumulación de Pro (Hasegawa y cols, 2000).

La tolerancia a la salinidad es la capacidad de las plantas para crecer y completar su ciclo vital en un sustrato que contiene concentraciones altas de NaCl. De esta manera se diferencian plantas halofitas, que son tolerantes al estrés salino, y plantas glicofitas, que no son tolerantes. Los principales mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que confieren tolerancia a la salinidad son la inducción de determinados genes, la acumulación o exclusión selectiva de iones a nivel celular, el control de la absorción de iones y agua por parte de las raíces y su transporte a la parte aérea, la biosíntesis de osmolitos (glicinabetaína, sacarosa, poliaminas) y la inducción de enzimas antioxidantes (ver **1.6.4**) (Sairam y Tyagi, 2004; Parida y Das, 2005). Para restablecer la homeostasis iónica las plantas disponen de diversos mecanismos: sistemas que restringen la entrada de Na^+ en la planta, regulación de los transportadores de K^+ y Na^+ , y bombas Na^+/H^+ en la membrana plasmática y en la membrana vacuolar (Shi y Zhu, 2002). Se ha demostrado que el aporte externo de Ca^{2+} reduce los efectos tóxicos del NaCl al regular el transporte Na^+/K^+ . El Ca^{2+} actúa de este modo como molécula señal en la ruta SOS (Bartels y Sunkar, 2005).

La salinidad inhibe rápidamente la actividad nitrogenasa y el crecimiento de los nódulos de soja, alfalfa y judía, siendo esta última la leguminosa más sensible (Serraj y cols, 1998). En garbanzo se inhibe también la nodulación (Soussi y cols, 1999) y en condiciones de estrés salino severo disminuye el contenido de Lb (Comba y cols, 1998).

1.6.3. Estrés por metales pesados

Se consideran metales pesados aquellos elementos de transición de la Tabla Periódica con densidad $> 5 \text{ g cm}^{-3}$. Pueden ser esenciales (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni o Mo) o no esenciales (Cd, Pb, Hg, Cr), y también se incluyen en el grupo algunos metaloides (As, Se) con efectos contaminantes. La mayoría de los metales pesados tienden a presentarse como cationes asociados a diversos ligandos orgánicos e inorgánicos (Carpena y cols, 2006). Las plantas superiores absorben los metales pesados del suelo en función de su concentración y disponibilidad biológica, la composición de los exudados de la raíz, la presencia de micorrizas y materia orgánica en el suelo, el pH, el potencial redox, la temperatura y la concentración de otros elementos (Pal y cols, 2006). Las plantas no tienen un mecanismo de transporte específico para los metales no esenciales por lo que utilizan sistemas de transporte de moléculas similares, como es el caso del Cd, que emplea canales de Ca, y del arseniato (AsO_4^{3-}), que utiliza el sistema de transporte del fosfato (Ullrich-Eberius y cols, 1989). Según la capacidad de distribución del metal pesado se habla de plantas acumuladoras, que almacenan activamente el elemento tóxico en sus tejidos y disponen de un sistema eficaz de transporte desde la raíz a la parte aérea, y de plantas exclusoras, que tienen restringidos tanto la absorción del metal como su transporte a la parte aérea (Carpena y cols, 2006).

Los metales pesados provocan diversos efectos tóxicos en las plantas, algunos de ellos comunes a otros estreses abióticos, como son la inhibición del crecimiento y de la formación de pelos radicales. Por otra parte, los metales pesados inactivan algunas enzimas del ciclo de Calvin (Rubisco, fosfoenolpiruvato carboxilasa), dañan la membrana plasmática e inducen la formación de ROS (Dietz y cols, 1999; Pal y cols, 2006). El Cd es uno de los metales pesados más fácilmente absorbido por las plantas. Se ha demostrado que inhibe la absorción de diversos elementos esenciales (Fe, Zn, K, Na, Cu, N y P) y la actividad de numerosas enzimas al unirse a grupos SH, al inducir cambios conformacionales y al sustituir iones metálicos como el Zn en las metaloproteínas (Clemens, 2006).

Las plantas disponen de diversos mecanismos para evitar la toxicidad de los metales pesados a nivel celular, siendo el objetivo final impedir su acumulación en el citosol. A continuación, se resumen los más importantes (Hall, 2002).

Pared celular. La capacidad de retención de un metal pesado en la pared celular depende de las características y concentración del elemento tóxico y de la especie

vegetal. En lupino, el 66-70% del Cd aplicado a la planta se encuentra en la raíz, y valores similares se han encontrado en maíz y guisante. En plantas de guisante cultivadas en hidropónico un 70% del Pb se localizó en la raíz, mientras que sólo el 30-50% del Hg o el 5% del As permanecieron retenidos en las paredes de las células de la raíz. Un proceso relacionado son los **exudados de la raíz** que contienen moléculas que se unen a los metales pesados. Se han identificado ácidos orgánicos como el ácido oxálico, que es exudado por la raíz de *Fagopyrum esculentum* y se une al Al (Ma y cols, 1997), o el citrato y la His, que se unen al Ni.

Transportadores. En la membrana plasmática de las bacterias existen dos tipos de sistemas de transporte activo de metales desde el citosol al exterior: transportadores tipo ABC (“ATPase binding cassette”) y bombas de intercambio catiónico H^+/M^+ (Silver, 1996). En la membrana de las vacuolas de *S. pombe* se encuentra Hmt1, un transportador tipo ABC que transporta complejos fitoquelatina-Cd (Ortiz y cols, 1995). En la membrana plasmática de *S. cerevisiae* se localiza Ycf1, un transportador tipo ABC (Li y cols, 1997) y PCA1, una bomba Cd^{2+}/H^+ , relacionados también con la resistencia a Cd (Adle y cols, 2007). Sin embargo, en las plantas no hay evidencias de estos sistemas, aunque sí que se conocen transportadores implicados en la tolerancia; por ejemplo, un genotipo de la especie *H. lanatus*, tolerante al As debido, al menos en parte, a la ausencia del transportador de fosfato de alta afinidad (Meharg y Macnair, 1992). Otro transportador de membrana confiere tolerancia al Ni pero hipersensibilidad a Pb en tabaco. Además, es probable que exista un sistema similar a Hmt1 de levaduras en las vacuolas de las células vegetales.

Chaperonas. Desempeñan un papel importante en la protección y reparación de proteínas dañadas en condiciones de estrés. Se han descrito chaperonas que se unen específicamente a Cu y lo distribuyen a orgánulos como el aparato de Golgi o a proteínas que requieren dicho metal (Clemens, 2001). En arroz algunas chaperonas de bajo peso molecular se inducen transcripcionalmente en presencia de metales pesados y la chaperona HSP70 responde al estrés por Cd.

Ácidos orgánicos (ácido málico, cítrico y oxálico) y **aminoácidos** (His). Favorecen la tolerancia ante determinados metales pesados. El citrato establece complejos con el Cd, Cu, Zn y Ni, el malato con el Zn y la His con el Ni. Algunos metales como el Cu, Ni y Zn son transportados desde la raíz a la parte aérea formando complejos con citrato o His (Rauser, 1999; Clemens, 2001). Se han localizado complejos de oxalato con Al (estequiometría 1:3) en hojas de *Fagopyrum esculentum* (Ma y cols, 1997).

Metalotioneínas (MTs). Son proteínas sintetizadas a partir de la traducción de mRNA que se encuentran distribuidas en todos los organismos eucariotas, así como en la cianobacteria *Synechococcus*. Son proteínas de bajo peso molecular que unen metales con gran afinidad ya que poseen numerosas Cys. Las MTs propias de las plantas (clase II), a diferencia de las de animales (clase I), no presentan en su secuencia un nivel tan estricto de conservación de Cys. A su vez, las MTs de clase II pueden clasificarse en cuatro grupos según la secuencia de aminoácidos. La identificación de MTs en plantas es complicada por su inestabilidad en presencia de O₂. Las propiedades de unión a metales de diversas MTs se han analizado expresándolas en sistemas heterólogos. Mediante la expresión de una MT de guisante en *E. coli* se demostró su unión a Cd, Zn y, con mayor afinidad, a Cu. Se obtuvieron resultados similares para Zn y Cu expresando MTs de *Arabidopsis* en levaduras deficientes en MTs y en *Synechococcus*. La función de las MTs en animales parece ser la protección contra la toxicidad del Cd; sin embargo, en plantas está demostrado que las PCs son las que cumplen dicha finalidad y las MTs estarían implicadas en la tolerancia y homeostasis del Cu. De hecho, se ha demostrado que las MTs de plantas son capaces de unirse a Cu y que la expresión de algún gen codificante de MTs se induce por este metal (Cobbett y Goldsbrough, 2002).

Fitoquelatinas (PCs). Son polipéptidos de composición $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, donde $n=2-11$, que fueron inicialmente identificados en plantas expuestas a metales pesados. Existen variantes estructurales en las que 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 y cols, 1986). La síntesis de PCs es catalizada por la enzima fitoquelatina sintasa (PCS), una dipeptidil transpeptidasa que se expresa de forma constitutiva en plantas y otros organismos (Grill y cols, 1989; Ha y cols, 1999; Rea y cols, 2004).

En la figura 1.5 se muestra un esquema de la ruta biosintética de las (h)PCs. Los tioles precursores de estos polipéptidos son el GSH y su homólogo estructural hGSH (ver 1.4.2). El GSH y hGSH se sintetizan en dos etapas dependientes de ATP: la γ -glutamilcisteína (γEC) sintetasa (γECS) cataliza la síntesis de γEC a partir de Glu y Cys, y posteriormente la glutatión sintetasa (GSHS) o la homoglutatión sintetasa

(hGSHS) incorporan, respectivamente, Gly o β Ala a la γ EC. Finalmente, la PCS cataliza la incorporación de una unidad de γ EC procedente de una molécula de GSH (unida al sitio “donador” de la enzima) a otra molécula de GSH, hGSH, PC_{n-1} o h/PC_{n-1} (unida al sitio “aceptor” de la enzima) en presencia de metales pesados, según la reacción:

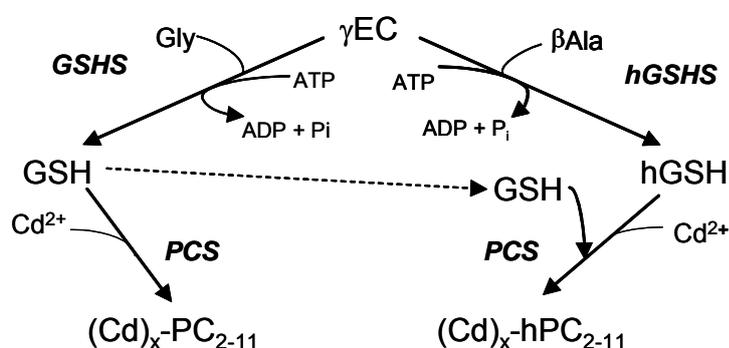


Figura 1.5. Ruta de la biosíntesis de las (h)PCs en las leguminosas.

Se desconoce si existen enzimas específicos para la síntesis de hPCs (es decir, homofitoquelatina sintasas) a partir de hGSH, o bien si la propia PCS es capaz de utilizar indistintamente GSH y hGSH como sustratos, según su disponibilidad. A nivel bioquímico, la actividad PCS en plantas se demostró inicialmente en cultivos celulares de *Silene cucubalus* (Grill y cols, 1989). La proteína purificada tenía una masa de 95 kD, estaba formada aparentemente por cuatro subunidades y catalizaba la síntesis de PCs a partir de GSH, en presencia de metales pesados como el Cd, Ag, Bi, Pb, Zn, Cu, Hg y Au. No fue hasta diez años después cuando tres grupos, independientemente, clonaron el primer gen codificante de una PCS. Estos genes fueron el *AtPCS1* de Arabidopsis, identificado a partir del mutante *cad1* sensible a Cd (Ha y cols, 1999) y caracterizado mediante su expresión en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Vatamaniuk y cols, 1999), y el gen *TaPCS1* de trigo también identificado en genotecas de expresión (Clemens y cols, 1999). Posteriormente, se han identificado clones de cDNA parciales o

completos de PCS en otras plantas como guisante, maíz y *Brassica juncea* (Klapheck y cols, 1995; Meuwly y cols, 1995; Heiss y cols, 2003), y un segundo gen *AtPCS2* de *Arabidopsis* (Cazale y Clemens, 2001), cuya expresión es significativamente inferior a la de *AtPCS1*. Curiosamente, la masa molecular de la PCS estimada a partir de los clones de cDNA se sitúa en el rango de 42-70 kD, muy diferente del encontrado para la proteína purificada (Grill y cols, 1989). En cuanto a la respuesta de la PCS a metales, los datos indican mayoritariamente que es una enzima constitutiva que se activa postraduccionalmente por Cd y algunos otros metales (Cd, Ag, Bi, Pb, Zn, Cu, Hg y Au) y metaloides (As). Los análisis de expresión han generado resultados contradictorios. Mientras que el Cd no afecta a los niveles de mRNA de *AtPCS1* y *AtPCS2* (Ha y cols, 1999; Cazale y Clemens, 2001), se induce la expresión de los genes *TaPCS1* de trigo (Clemens y cols, 1999) y *BjPCS1* de *B. juncea* (Heiss y cols, 2003).

Sabemos que las PCS se encuentran también en algunas levaduras como *Schizosaccharomyces pombe* (Ha y cols, 1999), en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Clemens y cols, 2001) y en la ameba *Dictyostelium discoideum* (Cobbett y Goldsbrough, 2002). Las secuencias de aminoácidos de las PCS de levaduras, animales y plantas muestran una mayor homología en el extremo N-terminal que en el C-terminal, por lo que se propuso que el primero es el importante catalíticamente mientras que el segundo actuaría como un sensor de la concentración de metales indispensables para la síntesis de PCs (Zenk, 1996). Posteriormente, se demostró que la Cys-56 constituía el primer sitio de acilación en *AtPCS1* y que la enzima requiere como sustratos de la reacción GSH libre y el tiolato GS-metal (Vatamaniuk y cols, 2004; Romanyuk y cols, 2006). No obstante, el mayor avance en la elucidación del mecanismo de reacción de la PCS se produjo con el estudio de una PCS de cianobacteria, considerada precursora de las PCS de plantas. La PCS de *Nostoc* sp. PCC7120 (NsPCS) contiene el dominio catalítico N-terminal de las PCS de planta, pero no el dominio C-terminal (Harada y cols, 2004). La NsPCS cataliza la primera parte de la reacción, la formación del dipéptido γ EC a partir de GSH, pero es incapaz de sintetizar PCs y la actividad no está influenciada por la presencia de metales. La cristalización y el análisis estructural a 2 Å de resolución de la proteína NsPCS (Vivares y cols, 2005) confirmaron que la Cys-56 del dominio N-terminal es el primer sitio de acilación y que, en ausencia del segundo sitio de acilación, la enzima libera γ EC (o, lo que es lo mismo, utiliza agua en lugar de GSH como aceptor). Además de la Cys-56, otros dos aminoácidos, His-162 y Asp-180, resultan indispensables para la actividad PCS. Se desconoce la localización del segundo

sitio de acilación (Romanyuk y cols, 2006). Otro punto discutible fue si los metales debían unirse directamente a la enzima (Oven y cols, 2002b) o simplemente estimulaban la actividad PCS mediante interacción con el dominio C-terminal (Romanyuk y cols, 2006). Experimentos recientes con la proteína AtPCS1 truncada han demostrado que el extremo C-terminal no es esencial para la catálisis, aunque confiere termoestabilidad, y que la ausencia de los últimos 113 aminoácidos afecta la respuesta de la enzima a algunos metales como Hg y Zn (Ruotolo y cols, 2004). En el caso de las PCS de levadura, plantas y animales, el producto son las PCs unidas a metal. Así, parece ya generalmente admitido que en el lado aceptor de la proteína se une el tiolato metálico y no el GSH (o la PC en crecimiento) libre. Por ejemplo, para la síntesis de PC₂ en respuesta a Cd, se requiere una molécula de GSH libre en el lado donador y una molécula de tiolato Cd(GS)₂ en el lado aceptor. Como resultado, se forman complejos PC-Cd con estequiometrías complejas. En plantas y células de *S. pombe*, se han descrito dos tipos de complejos. Inicialmente, se forman complejos LMW (PCs-Cd) de bajo peso molecular en el citosol, a los que después se añaden grupos sulfuro, que aportan estabilidad y aumentan la capacidad para quelar Cd, formándose los complejos de alto peso molecular HMW (Rauser, 1995). Estudios en *S. pombe* demuestran que el transportador Hmt1, localizado en la membrana vacuolar, es el responsable de la transferencia de los complejos PC-Cd a la vacuola, donde se forman los complejos HMW, ya que en el mutante *hmt1* no se detectan HMW (Ortiz y cols, 1995; Cobbett y Goldsbrough, 2002).

Recientemente se ha demostrado, tanto en experimentos *in vitro* (Beck y cols, 2003) como *in vivo* (Blum y cols, 2007), que la PCS puede intervenir también en la desintoxicación de xenobióticos conjugados a GSH. Por ejemplo, la PCS de *S. cucubalus* o *Arabidopsis* es capaz de degradar el aducto GSH-monobromobimano (GSH-MBB) a γ EC-MBB, lo cual no es sorprendente teniendo en cuenta que los tiolatos con metales son co-sustratos de la PCS (se unen al lado aceptor de la proteína) y presentan el grupo tiol bloqueado, como es el caso de los aductos de GSH con xenobióticos. Esta doble función de las PCS (carboxipeptidasa y dipeptidiltransferasa) explicaría, al menos en parte, por qué esta enzima se encuentra en los tejidos vegetales de forma constitutiva, es decir, incluso en ausencia de metales pesados. Teniendo en cuenta que la presencia en el suelo de Cd, As o Hg es fundamentalmente de origen antropogénico, y por tanto relativamente reciente, las PCS deben tener una función adicional a la desintoxicación de metales pesados. Otra posibilidad es que participen en

la homeostasis de metales esenciales como el Zn o Cu.

1.6.4. Estrés oxidativo en plantas

En las plantas, la senescencia natural y los estreses abióticos como la sequía y la salinidad pueden desencadenar un estrés oxidativo que en último término causa la muerte celular (ver **1.5**). Existen numerosos trabajos con diferentes especies vegetales en los que se analizan la respuesta de los sistemas antioxidantes a los estreses abióticos (Smirnoff, 1998; Shalata y cols, 2001). Se ha comprobado que las plantas transgénicas que sobreexpresan enzimas antioxidantes como SODs (Bowler y cols, 1991; Gupta y cols, 1993), catalasas, APX y GPX toleran mejor el estrés oxidativo (Allen, 1995; Roxas y cols, 1997). Sin embargo, los resultados son a veces contradictorios y dependen del tipo e intensidad del estrés aplicado, de la especie y tejido vegetal analizado, y de la edad de la planta. De hecho, la exposición de las plantas a ROS puede potenciar o reducir su capacidad antioxidante (Foyer y Noctor, 2005).

Estrés hídrico

El estrés osmótico inducido por la sequía provoca la formación de ROS que pueden dañar las membranas y otros componentes celulares. No obstante, el estrés oxidativo podría modular la respuesta a estrés hídrico ya que las ROS actuarían como moléculas señal, activando los sistemas antioxidantes (ver **1.3.3**). A partir de estudios en hojas de guisante y Lotus, así como en nódulos de alfalfa, se concluyó que la respuesta de los sistemas antioxidantes al estrés hídrico depende de la especie y cultivar en estudio, así como del grado de estrés aplicado. Describiremos a continuación algunos ejemplos. En la parte aérea de plantas de guisante se incrementaron los niveles de mRNA de CuZnSODc y APXc y la actividad catalasa durante la sequía, mientras que las actividades y contenidos de proteínas CuZnSODc, CuZnSODp y APXc aumentaron durante la sequía y la subsiguiente recuperación (Mittler y Zilinskas, 1994). En hojas de Lotus se describió un aumento de la actividad SOD total y la inducción de las tres isoformas de CuZnSODs tras 4 h de sequía (Borsani y cols, 2001). En cambio, en hojas de guisante de los cultivares Frilene y Lincoln (Moran y cols, 1994; Iturbe-Ormaetxe y cols, 1998) sometidas a sequía se observó un descenso (superior en el primer cultivar) de la mayoría de las actividades antioxidantes, así como la acumulación de peróxidos de lípidos. En plantas de alfalfa transgénica que sobreexpresaban MnSOD en las

mitocondrias o en el citosol, o FeSOD en los cloroplastos, la actividad fotosintética fue un 2% superior respecto al genotipo salvaje, en condiciones de sequía moderada. Sin embargo, en general no se observaron cambios importantes en los principales marcadores de estrés oxidativo y de actividad metabólica entre las alfalfas transgénicas y control (Rubio y cols, 2002). La aplicación de NO en hojas cortadas de trigo aumentó la tolerancia a la sequía al retener mayor contenido de agua debido al cierre estomático mediado por ABA y al inducir la expresión de genes tipo LEA (Mata y Lamattina, 2001). Por otra parte, se sabe que los canales de Ca^{2+} están implicados en el mecanismo de cierre estomático, lo que hace pensar que el NO regula la actividad de éstos y otros canales iónicos como ocurre en los animales (Bartels y Sunkar, 2005).

El estrés oxidativo inducido por la sequía podría estar implicado en la inhibición de la **fijación de N_2** . Recientemente se ha observado que la aplicación al sistema radicular de guisante de paraquat, un generador de radical O_2^- , inhibe la actividad SS de los nódulos antes que la actividad nitrogenasa, lo que sugiere que esta enzima es especialmente vulnerable al estrés oxidativo que tiene lugar en los nódulos (Marino y cols, 2006). La exposición de las plantas a oscuridad continua o estrés hídrico causa un descenso de las defensas antioxidantes e induce la senescencia prematura de los nódulos (Swaraj y cols, 1994; Gogorcena y cols, 1995; 1997; Hernández-Jiménez y cols, 2002; Porcel y cols, 2003). Sin embargo, se desconoce la respuesta de los antioxidantes a nivel molecular en los nódulos sometidos a estrés hídrico.

Estrés salino

El estrés iónico, junto al estrés osmótico que conlleva la salinidad, puede provocar la formación de ROS. Se ha descrito la acumulación de H_2O_2 , peróxidos de lípidos y proteínas carboniladas en cloroplastos y mitocondrias de hojas de guisante (Gómez y cols, 1999). Durante el estrés salino se ha demostrado la inducción de algunas actividades antioxidantes en especies tolerantes. Así, en la parte aérea de plantas de trigo se indujeron las actividades APX, GR, MR y DR aunque disminuyeron en la raíz (Meneguzzo y cols, 1999). En una variedad tolerante de guisante (cv. Granada), aumentó la expresión (mRNA y actividad) de MnSOD, APX, GR y MR, mientras que en plantas de guisante sensibles a la salinidad (cv. Chillis) no se observaron cambios significativos (Hernández y cols, 2000). El estrés oxidativo inducido por el estrés salino también podría ser responsable, al menos parcialmente, de la inhibición de la fijación de N_2 . En nódulos de judía se ha demostrado que disminuye la actividad catalasa y APX

pero aumenta la FeSOD (Jebara y cols, 2005). Los nódulos de judía formados por rizobios menos tolerantes a la salinidad que la cepa silvestre poseían menores actividades de algunas enzimas como APX, GR y MR (Tejera y cols, 2004).

La función de las enzimas antioxidantes en la tolerancia a la salinidad se ha estudiado también utilizando plantas transgénicas y mutantes (Hasegawa y cols, 2000). Algunos ejemplos son las plantas de tabaco deficientes en catalasa, que mostraron una sensibilidad mayor al estrés oxidativo respecto a las plantas control (Willekens y cols, 1997), y la sobreexpresión en citrus de una GPX, que confirió una mayor tolerancia al estrés oxidativo (Holland y cols, 1993). Sin embargo, la sobreexpresión de una FeSOD cloroplástica en plantas de tabaco no mejoró su tolerancia a la salinidad (Van Camp y cols, 1996).

Estrés por metales pesados

Existen evidencias de que en las plantas expuestas a Cd o algunos otros metales pesados aumenta el contenido de ROS y se induce un estrés oxidativo con acumulación de H_2O_2 y activación de la peroxidación lipídica. No obstante, las respuestas de los antioxidantes varían en función de la concentración del metal y del tejido analizado (Pal y cols, 2006). En plantas de guisante tratadas con Cd se detectó peroxidación lipídica y carbonilación de proteínas. En las hojas se observó producción de H_2O_2 y O_2^- y un descenso de las actividades SOD y catalasa, mientras que en la raíz aumentaron las actividades APX y GR (Sandalió y cols, 2001; Romero-Puertas y cols, 2004). En raíces de cebada tratadas con Cd se incrementaron los contenidos de ácido salicílico y Pro y la peroxidación lipídica. Asimismo, se demostró que un pretratamiento con ácido salicílico prevenía la peroxidación lipídica en respuesta a Cd, aunque el mecanismo no parecía implicar un aumento de las actividades antioxidantes (Metwally y cols, 2003). En ausencia de metal pesado, la planta hiperacumuladora de Cd, *Thlaspi caerulescens*, poseía una actividad catalasa tres órdenes de magnitud superior al de una planta no acumuladora como el tabaco. Además, la actividad SOD y el contenido de GSH eran superiores. En presencia de Cd, no aumentaba el contenido de H_2O_2 ni se inhibía el crecimiento de *T. caerulescens*, aunque aumentó la concentración de peróxidos de lípidos (Boominathan, 2003). Los tratamientos con otros metales pesados como el Pb indujeron la peroxidación de lípidos y la actividad APX y GR en cultivos celulares de maíz (Zacchini y cols, 2003).

1.7. Estrés abiótico y genómica funcional en plantas

La comunidad científica dispone ya de las secuencias completas de los genomas de plantas modelo como *Arabidopsis* y arroz. También se encuentran en fase de secuenciación los genomas de trigo, de las leguminosas modelo *Lotus* y *Medicago truncatula*, y de las leguminosas cultivadas soja y judía. Asimismo se ha completado la secuenciación de los genomas de *S. meliloti* y *M. loti*, y se está secuenciando el de *R. etli*, todos ellos de gran interés para el estudio de la simbiosis rizobio-leguminosa. Esta avalancha de información está permitiendo el desarrollo de la genómica funcional que incluye, entre otros tipos de estudios, los análisis de expresión diferencial en orgánulos celulares, etapas del desarrollo de la planta, senescencia y respuesta a estreses bióticos y abióticos. En este último caso ha sido posible el análisis global de la expresión génica (“microarrays”), la caracterización funcional de los genes de interés (sobreexpresión e inactivación en plantas transgénicas) y el desarrollo de líneas estables con tolerancia al estrés (Sreenivasulu y cols, 2007). En esta Tesis se han empleado dos técnicas, geles 2D de proteínas y “arrays” de cDNA, para el estudio de la respuesta a estrés hídrico y al tratamiento con Cd en alfalfa y *Lotus*, respectivamente (ver 4.3 y 4.4).

Transcriptoma

Recientemente se han realizado diversos análisis del transcriptoma de *Arabidopsis* y arroz en respuesta a estreses abióticos y, más concretamente, a la sequía, salinidad y bajas temperaturas (Kreps y cols, 2002; Dubouzet y cols, 2003). Entre los genes implicados en la respuesta al estrés se encuentran factores de transcripción, proteína kinasas, fosfatasa y enzimas implicadas en el metabolismo de lípidos, así como proteínas de unión a la calmodulina. Los genes relacionados con la tolerancia al estrés incluyen los que codifican chaperonas, proteínas LEA, osmotina, proteínas “anticongelación”, proteínas de unión a mRNA, enzimas de la biosíntesis de osmolitos, enzimas antioxidantes, enzimas del metabolismo de ácidos grasos e inhibidores de proteasas. En algún caso se han identificado las secuencias de los promotores que interactúan con factores de transcripción durante el estrés, tales como DREB (“dehydration responsive element binding protein”) y ABRE (“abscisic acid responsive element”) (Zhang y cols, 2005).

La función de gran parte de los genes identificados en los análisis

transcriptómicos ha sido verificada mediante su sobreexpresión en plantas transgénicas, dando lugar a fenotipos tolerantes al estrés. Se han encontrado más de 300 genes inducidos por estrés, de los cuales más de la mitad lo hacen en respuesta tanto al estrés hídrico como al estrés salino, mientras que sólo el 10% de los genes responden también a un estrés por baja temperatura. Según sea la inducción en el tiempo de estos genes se pueden clasificar en dos grupos. El primero incluye aquellos genes que se inducen de forma rápida y transitoria ante el estrés, alcanzando el máximo tras unas horas y descendiendo después, como ocurre con los factores de transcripción y los factores de regulación de proteínas. El segundo grupo incluye genes que se inducen 10 h después de la aplicación del tratamiento, tales como las proteínas funcionales LEA, proteínas de desintoxicación y enzimas de la biosíntesis de osmoprotectores (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006). Asimismo, se han publicado varios estudios sobre los cambios producidos en el transcriptoma de la planta o de la bacteria durante el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa (Ampe y cols, 2003; Colebatch y cols, 2004; Barnett y Fisher, 2006), pero se dispone de escasa información sobre el efecto de los estreses abióticos en el transcriptoma de leguminosas.

Proteoma

Los estudios convencionales de proteomas vegetales requieren la separación de las proteínas en geles 2D y la identificación de las proteínas seleccionadas por espectrometría de masas (MS) (MALDI-TOF y MS/MS). Más recientemente, han surgido técnicas que evitan la utilización de los geles 2D, consistentes en la separación directa de los péptidos por HPLC y en su posterior identificación por espectrometría de masas (LS/MS/MS). La técnica DIGE está siendo ampliamente empleada para la cuantificación y comparación de muestras que pueden ser analizadas simultáneamente. Consiste en la utilización de marcadores de fluorescencia, uno para cada tipo de muestra, lo que permite separar las proteínas en los mismos geles y cuantificar las diferencias. El primer factor limitante cuando se pretende realizar un estudio proteómico es la complejidad de las muestras, ya que los órganos vegetales están compuestos por células con proteomas muy diferentes. Aunque la mayoría de los análisis en geles 2D siguen realizándose a partir de extractos totales de tejidos, la tendencia actual es utilizar las proteínas de determinados compartimentos celulares o bien subproteomas estructurales o funcionales, lo que permite optimizar los resultados (Rossignol y cols, 2006). Recientemente, se han publicado estudios de proteomas de proteínas de bajo peso

molecular (Zhang y cols, 2006) y de proteínas modificadas postraduccionalmente por fosforilación (Chitteti y Peng, 2007), nitrosilación (Lindermayr y cols, 2005), carbonilación (Kristensen y cols, 2004) o glutationilación (Dixon y cols, 2005). Los estudios del efecto de estreses abióticos sobre el proteoma se centran mayoritariamente en la sequía y salinidad por su importancia agronómica, utilizándose *Arabidopsis* como planta modelo y otras de interés agronómico como el arroz (Yan y cols, 2005), maíz (Riccardi y cols, 2004) y caña de azúcar (Hajheidari y cols, 2005).

La secuenciación de los genomas de *Lotus* y *M. truncatula*, y de sus correspondientes rizobios, ha proporcionado una información muy valiosa sobre los cambios en los proteomas de los rizobios de vida libre en distintas condiciones metabólicas (Encarnación y cols, 2003), de las raíces de las leguminosas en respuesta a la nodulación (Ulrike y cols, 2001) y durante el establecimiento de la simbiosis (Natera y cols, 2000; Saalbach y cols, 2002). Asimismo, se ha analizado el proteoma de leguminosas frente a diferentes estreses abióticos y bióticos. Como resultado, se han identificado las proteínas que se inducen en raíces de *M. truncatula* tras la infección con el oomiceto *Aphanomyces euteiches* (Colditz y cols, 2004), en mitocondrias de hojas de guisante expuestas a paraquat, sequía o bajas temperaturas (Taylor y cols, 2005) y, muy recientemente, en nódulos de *M. truncatula* expuestos a estrés hídrico (Larrainzar y cols, 2007).

2. OBJETIVOS

1. Analizar la expresión de la nitrogenasa (mRNA, proteína y actividad) en respuesta al estrés hídrico y posterior recuperación en nódulos de alfalfa.
2. Estudiar la respuesta del metabolismo del carbono y las defensas antioxidantes en nódulos de alfalfa en condiciones de estrés hídrico y en la subsiguiente recuperación de las plantas.
3. Caracterizar bioquímicamente la proteína LjPCS3 de Lotus mediante su expresión en células de levadura y determinar la capacidad de activación de diversos metales.
4. Estudiar el transcriptoma de raíces de Lotus en condiciones de estrés por metales pesados y el proteoma de nódulos de alfalfa en condiciones de estrés hídrico y salino.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos químicos y bioquímicos

Los reactivos químicos empleados en la elaboración de las soluciones nutritivas para el cultivo de las plantas fueron de grado analítico de Panreac (Barcelona). Las fases móviles para el análisis de HPLC se prepararon con disolventes orgánicos de grado HPLC (Panreac). La procedencia de la mayoría de los reactivos bioquímicos empleados fue de la máxima calidad de Sigma-Aldrich (St Louis, EEUU). La referencia de los reactivos de biología molecular se muestra entre paréntesis junto a cada producto.

En la preparación de las soluciones nutritivas se utilizó agua desionizada por ósmosis inversa y los experimentos bioquímicos y de biología molecular se llevaron a cabo con agua Milli Q (Millipore, Milford, EEUU).

3.2. Material biológico

3.2.1. Plantas

Las semillas de alfalfa (*Medicago sativa* cv. Aragón) o Lotus (*Lotus japonicus* cv. MG20) se esterilizaron con etanol al 70% durante 5 min, se lavaron con abundante agua

destilada y se germinaron en placa Petri durante 5-7 días con luz o 2 días en oscuridad, respectivamente. Las semillas de Lotus se escarificaron con papel de lija, antes de su esterilización con etanol, para facilitar la germinación. Posteriormente, se transfirieron entre 6 y 8 plantas a macetas que contenían una mezcla de perlita: vermiculita (2:1) para alfalfa y sólo vermiculita para Lotus.

Las plantas de alfalfa se regaron tres veces por semana, una vez con solución nutritiva suplementada con 0,5 mM NH_4NO_3 (Gogorcena y cols, 1997) y dos con agua. Las plantas de Lotus se regaron una vez por semana con solución nutritiva BD (Broughton y Dilworth, 1971). Las condiciones controladas establecidas en la cámara de cultivo fueron las siguientes: 16 h de fotoperiodo, $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa, un régimen de temperaturas día/noche $25^\circ\text{C}/18^\circ\text{C}$ y una humedad relativa del 70%.

3.2.2. Microorganismos

Rizobios

Las cepas de rizobio fueron *Sinorhizobium meliloti* 102F78 para alfalfa y *Mesorhizobium loti* NZP2235 para Lotus. Las bacterias se pusieron a crecer 2 días después de la germinación de las semillas, se dejaron crecer 4-5 días y se utilizaron para inocular las plántulas (≈ 2 mL de inóculo por planta).

Levaduras

Las células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 fueron suministradas por el Prof. J.I. Schroeder (University of California, San Diego, EEUU). Los cultivos se establecieron en medio YNB (Pronadisa, Madrid) o en el mismo medio YNB sin iones divalentes (Q-BIOgene, Irvine, EEUU). Ambos se suplementaron con un complemento de aminoácidos que no contiene uracilo (CSM-minus uracil, Q-BIOgene) y/o D(+)-rafinosa (Fluka) o D(+)-galactosa (Gal) (Panreac), ambas al 2%.

3.3. Estrés hídrico

Los experimentos de estrés hídrico se realizaron con plantas de alfalfa cv. Aragón x *S. meliloti* 102F78. Cuando las plantas alcanzaron los 50-55 días después de la germinación, coincidiendo con el final del periodo vegetativo, las macetas se distribuyeron al azar en cuatro grupos. Las plantas control (C) se mantuvieron en condiciones hídricas óptimas, mientras que se interrumpió el riego de las macetas utilizadas para los tratamientos de sequía moderada (S1), sequía severa (S2) y recuperación (R). Este último tratamiento se estableció regando plantas S2 durante 2 días. Los tratamientos se establecieron midiendo los potenciales hídricos (ψ_w) de la hoja y del nódulo 2 h después del comienzo del fotoperiodo. El ψ_w foliar se midió en hojas representativas situadas en el tercio superior de la parte aérea con una bomba de presión (Soil Moisture Equipment, Santa Barbara, EEUU). El ψ_w nodular se determinó con una cámara C52 acoplada a un microvoltímetro HR-33T (Wescor, Logan, EEUU), utilizando 20-30 mg PF de nódulos por muestra (**Tabla 3.1**). Los nódulos se cosecharon en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C.

Tabla 3.1. Potenciales hídricos foliares y nodulares

	C	S1	S2	R
ψ_w hoja	-0,6 ± 0,2	-1,3 ± 0,1	-2,1 ± 0,2	-0,6 ± 0,2
ψ_w nódulo	-0,8 ± 0,1	-1,5 ± 0,1	-2,5 ± 0,1	-0,7 ± 0,1

Los valores se expresan en MPa y son medias ± ES (n ≥ 4).

3.4. Tratamiento de Lotus con cadmio

Cuando las plantas de Lotus alcanzaron los 35 días (plantas noduladas) o 45 días (plantas no noduladas) de edad se regaron con CdCl₂ 100 μM durante 1 ó 4 días. Las plantas control se regaron con solución nutritiva y se cosecharon simultáneamente a las tratadas con el metal pesado. Las raíces de las plantas se recogieron en N₂ líquido y el material se conservó a -80°C hasta su análisis.

3.5. Análisis de la expresión génica en nódulos de alfalfa

Para la extracción de RNA total a partir de nódulos de alfalfa se utilizó el kit RNAqueous (Ambion Austin, EEUU). Se realizó un tratamiento con DNasa I (Roche, Basilea, Suiza) durante 30 min a 37°C para eliminar la contaminación con DNA genómico. La síntesis del correspondiente cDNA se llevó a cabo con un cebador poliT y la retrotranscriptasa del virus Moloney Murine Leukemia (Promega, Madison, EEUU) durante 1 h a 37°C, en presencia de dNTPs e inhibidor de RNasas (Roche).

Se comprobó la ausencia de DNA genómico, después del tratamiento con DNasa, mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCRc), utilizando los cebadores de los genes de referencia. Los cebadores para la cuantificación de transcritos por RT-PCRc se diseñaron con el programa Primer Express v 2.0 (Applied Biosystems) a partir de secuencias consenso de alfalfa o en su defecto de *Medicago truncatula* (www.tigr.org, www.ncbi.nlm.nih.gov) (**Tablas 3.2 y 3.3**). Se comprobó que los cebadores no formasen dímeros entre sí mediante RT-PCRc en ausencia de cDNA.

El análisis RT-PCRc se realizó con un equipo iCycler iQ System (Bio-Rad, Hercules, EEUU) utilizando el reactivo iQ SYBR-Green Supermix (Bio-Rad). El programa de PCR comenzaba con una etapa inicial de 5 min a 95°C para la desnaturalización y activación de la enzima *Taq*, seguido de 50 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C, durante el cual se produce la hibridación de los cebadores con el cDNA correspondiente. Se realizó una curva de temperaturas de fusión en un rango de 55-95°C para comprobar la presencia de un único pico, correspondiente a la amplificación de un solo producto de PCR, asegurando por tanto la especificidad de los cebadores. Todas las reacciones se hicieron por duplicado. Los niveles de cDNA de los genes de alfalfa se normalizaron con *EF1- α* (El Yahyaoui y cols, 2004) y los de *S. meliloti* frente a *smc00324* y *smc02641* (Becker y cols, 2004) (**Tablas 3.2 y 3.3**). Los valores obtenidos para cada tratamiento de nódulos de plantas tratadas se relativizaron frente al tratamiento control utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Tabla 3.2. Secuencias de los cebadores empleados para la cuantificación de los mRNAs de enzimas antioxidantes y proteínas relacionadas de nódulos de alfalfa

Gen	Identificador	Secuencia
<i>EF1α</i>	TC106470	TGCCAGTTGGACGTGTTGAG TCATGCTGCATGACCGTGAT
<i>CuZnSODc</i>	TC106823	TGGGAAAGGTGGTCATGAGC ACAAGCTACTCTGCCACCAGC
<i>CuZnSODp</i>	AF056621	ACTGGAAATGCCGGTGGAA TGGAGTCAAGCCAACCACAC
<i>FeSOD</i>	AF377344	AGGAGAGCTGGAGGCACTCA CGGTGGCTTCAGCTCAAAC
<i>MnSOD</i>	AY145894	AATCTGGCTCCTGTTCTGTGAA CAGGGCTTCCTTTGGTGGTT
<i>APXc</i>	AY054988	GCCACCAAGGGTTCTGACC CCCCATAGCTTTGCCAAACA
<i>Catalasa</i>	TC100988	CGCACCTGACTTGTGCAGAT CCCCATAGCTTTGCCAAACA
<i>γECS</i>	AF041340	CGCTTCCTCATCCTCTCCCT GAAGTTATGCGGTGTTGCGTC
<i>GSHS</i>	TC108090	GATGAAGCCCCAGAGAGAAGG GAGGGTGTCTCGCACTGCAT
<i>hGSHS</i>	TC101364	AGGGTGTGGAGTTTGGAGGA TTCGCAATCGCTTCATTAACA
<i>Ferritina</i>	X97059	CGTGGTGGAAAGAGTGGTGCT AAATTCCGAGGGAGGGCTC
<i>GRc</i>	TC107373	CGGTGGGAATACATCCATCG CTGAGCGCATGGTCACAAAT
<i>Lb3</i>	M91077	GTCCTCAACTCCAAGCTCACG GAGTCACGCACCATTCACAAA
<i>SS</i>	AF049487	TGAGAGCCGCCGCTATCTT AGCCAATTTGCGGTACTIONGAG

Se indican las secuencias de los cebadores *sentido* (arriba) y *antisentido* (abajo) de cada gen en dirección 5' \rightarrow 3'. Los cebadores de *EF1 α* , *CuZnSODc*, *catalasa*, *γ ECS*, *GSHS* y *hGSHS* se diseñaron en base a secuencias de cDNA de *M. truncatula* y para el resto de genes se diseñaron a partir de secuencias de cDNA de *M. sativa*.

Tabla 3.3. Secuencias de los cebadores empleados para la cuantificación de los mRNAs de enzimas antioxidantes de los bacteroides de nódulos alfalfa

Gen	Identificador	Secuencia
<i>Smc00324</i>	AL591783	TGCCAGTTGGACGTGTTGAG TCATGCTGCATGACCGTGAT
<i>Smc02641</i>	AJ222661	CGAAAGCCTATGTAGACGCGA AGCTCAAGCATGTTCCACGAC
<i>nifH</i>	M55229	GCGAAAACAAGGCTCAGGAA CCATCATCTCACCGGACATG
<i>katA</i>	RMU59271	GGGACTACTGGTCCCTGTCTG TCAGGATCGTCACCTGATGC
<i>katB</i>	AE007314	AGCCCTATCCACCAGAGCCT ACCACCCGTCAGCAATTCAT
<i>katC</i>	AF121348	GACCTCGTCGGGAACAACAT CTTGATTGCGTCCTGGATGA
<i>sodA</i>	AF110770	GTGCCTATGTTCCGCTGACA TCCTCTTGGCATGGATTTCG
<i>sodC</i>	AL591786	CGTGCTGATCGAGATGGAGA GCCACCCAGGTATCCTTCG

Se indican los cebadores *sentido* (arriba) y *antisentido* (abajo) correspondientes a cada gen de *S. meliloti* en dirección 5' → 3'. Se diseñaron a partir de secuencias de cDNA de *S. meliloti*.

3.6. Electroforesis y análisis western

Electroforesis 1D

Para la extracción de proteína total se utilizaron 50 mg de nódulos y tampón KP_i 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM y Triton X-100 0,1% (v/v). Para aislar los bacteroides se utilizaron 75-100 mg de nódulos de alfalfa que tras homogeneizar con 0,75-1 mL de tampón KP_i 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM se centrifugaron (800g x 5 min, 4°C) para eliminar los restos insolubles del extracto. Se recogió el sobrenadante que contiene los bacteroides y se centrifugó (8000g x 10 min, 4°C) para precipitarlos. A continuación los bacteroides se resuspendieron en 50 mM KP_i (pH 7,8), EDTA 0,1 mM y Triton X-100 0,1% y se rompieron por sonicación (6 ciclos x 30 segundos). Después se cuantificó la proteína en los sobrenadantes recuperados tras centrifugar (10000g x 10 min, 4°C).

Las proteínas se separaron en geles SDS (Laemmli, 1970) al 10 ó 12,5% de

acrilamida:bisacrilamida utilizando un sistema Mini-Protean III (Bio-Rad). La cantidad de proteína por carril fue de 10-50 μg y se resuspendieron en tampón de carga [Tris-HCl 62 mM (pH 6,8), SDS 2,3% (p/v) y glicerol 10% (v/v)]. El tampón de electroforesis fue Tris 25 mM (pH 8,3), Gly 192 mM y SDS 0,1% (p/v). La composición de los geles concentrador y separador se indica en la **Tabla 3.4**.

Tabla 3.4. Composición del gel concentrador y del gel separador para SDS-PAGE

Reactivo	Gel concentrador		Gel separador	
% acrilamida	4,6%	10%	12,5%	
Acrilamida: bisacrilamida 40%	1,5 mL	2,25 mL	2,81 mL	
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), SDS 0,4%	-	3 mL	3 mL	
Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), SDS 0,4%	2,85 mL	-	-	
H ₂ O destilada	6 mL	3,75 mL	3,19 mL	
Persulfato de amonio 10%	50 μL	50 μL	50 μL	
TEMED	10 μL	10 μL	10 μL	

Transferencia a membranas de PVDF

Una vez separadas las proteínas en el gel de electroforesis se realizó la transferencia a membranas BioTrace PVDF (Pall Life Sciences, Pensacola, EEUU) con el sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad). El tampón de transferencia fue Tris 25 mM, Gly 192 mM y metanol 20% (v/v) y las condiciones de transferencia fueron 100 V durante 75 min o 15 V durante \approx 16 h, ambas a 4°C.

Inmunoblot

Las membranas se bloquearon con leche desnatada 5% (p/v) en tampón TBS [Tris-HCl 200 mM (pH 7,5), NaCl 5 M] durante 1 h a temperatura ambiente o bien por la noche a 4°C. Después de un aclarado con TBS conteniendo Tween-20 0,05% (TBST) se incubaron con un anticuerpo primario (**Tabla 3.5**) diluido en TBST durante 1 h. Se hicieron tres lavados de 5, 10 y 15 min en TBST y se incubaron con el anticuerpo secundario contra IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich) (1:20000 en TBST y leche desnatada 5%). Tras otros tres lavados de 30 min en TBST se detectaron las proteínas sobre la membrana por quimioluminiscencia con el kit

“Supersignal West Pico Chemiluminiscent substrate” (Pierce, Rockford, EEUU).

Tabla 3.5. Anticuerpos policlonales

Proteína	Especie	Procedencia	dilución
Kp1 y Kp2 (nitrogenasa)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P.W. Ludden (Madison, EEUU)	1:5000
SS	Soja	A.J. Gordon (Aberyswyth, RU)	1:3000
CuZnSODc	Espinaca	S. Kanematsu (Miyazaki, Japón)	1:3000
APXc	Soja	D.A. Dalton (Reed College, EEUU)	1:3000
Lb	Guisante	T. Bisseling (Wageningen, Holanda)	1:5000

Electroforesis 2D

Para la extracción de proteínas totales (Hurkman y Tanaka, 1986) se partió de 0,5 g de nódulos de alfalfa, que se pulverizaron en N₂ líquido y se homogeneizaron con 2,5 mL de tampón de extracción (**Tabla 3.6**). La mezcla se transfirió a tubos Corex de 15 mL, se incubó a 4°C durante 10 min y se añadió un volumen de fenol saturado en Tris-HCl (pH 7) (Sigma-Aldrich). Se agitó durante 10 min y se centrifugó (5000g x10 min, 4°C) para separar las fases. Se recuperó la fase fenólica y se realizó una segunda extracción con un mismo volumen de tampón de extracción. Tras recuperar la fase fenólica se precipitaron las proteínas con 5 volúmenes de acetato amónico 0,1 M en metanol frío (-20°C) durante toda la noche. Se centrifugó (5000g x 15 min, 4°C) y el pellet se lavó 3 veces con acetato amónico 0,1 M en metanol y por último con acetona 80%. Se secó el pellet con un liofilizador Speed-Vac SC-110 (Savant; New York, EEUU) y se solubilizaron las proteínas con un tampón de solubilización que contenía urea (**Tabla 3.7**). La proteína se cuantificó siguiendo un protocolo de Bradford modificado (Ramagli y Rodriguez, 1985).

Tabla 3.6. Composición del tampón de extracción de proteínas totales para 2D

Reactivo	Concentración final
Sacarosa	0,7 M
Tris-base	0,5 M
KCl	0,1 M
HCl	30 mM
EDTA	50 mM
β -mercaptoetanol	2% (v/v)
PVPP	12 mg/mL

Tabla 3.7. Composición del tampón de solubilización utilizado para 2D

Reactivo	Concentración final
Urea	7 M
Tiourea	2 M
3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS)	4%
Tributilfosfina (TBP)	2 mM
Anfolitos	2%
Ditiotreitol (DTT)	60 mM

En cada gel preparativo de 1D se cargaron 500 μ g de proteína. Los geles para la primera dimensión se prepararon en tubos capilares con una mezcla de acrilamida/urea/IGP/CHAPS a la que se añadieron anfolitos de pH 3-10 (0,015%) y pH 4-8 (0,05%) (Genomic Solutions, Ann Arbor, EEUU). Tras el isoelectroenfoque se procedió a separar las proteínas en la 2D una vez incubados los geles en un tampón con DTT. Se utilizaron geles 20 cm x 20 cm de 12 % acrilamida (**Tabla 3.8**).

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se sumergieron en solución fijadora (metanol 40%, ácido acético 10%) al menos 1 h. Después se procedió a la tinción del gel con azul de Coomassie coloidal (Candiano y cols, 2004).

Tabla 3.8. Composición del gel de 2D

Reactivo	Volumen (mL)
Acrilamida	21,1
Duracrilamida	21,1
Agua	36,1
Tris-HCl (pH 8,8)	26,1
SDS 10%	2,34
TEMED	0,075
Persulfato de amonio 10%	0,58

Una vez teñidos los geles se escanearon (escáner GS800; Bio-Rad) y las imágenes se analizaron con el programa PD-QUEST (Bio-Rad) para la comparación de los distintos tratamientos.

Análisis MALDI-TOF y LC-ESI-MS/MS para la identificación de las proteínas

Se seleccionaron aquellas proteínas con una expresión diferente en condiciones de sequía y/o salinidad frente al tratamiento control. Se cortaron manualmente con la ayuda de un bisturí y se guardaron en tubos eppendorf de 1,5 mL. Los segmentos de gel conteniendo las proteínas se destañaron en una disolución de acetonitrilo (ACN) 50% con $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 2,5 mM durante dos ciclos de 2 h. A continuación, se deshidrataron con ACN 100%. Se eliminó éste y se almacenaron a -70 °C durante toda la noche. Las piezas de gel completamente deshidratadas se trataron con DTT 30 mM durante 30 min a temperatura ambiente y con iodoacetamida 100 mM otros 30 min. De nuevo, se deshidrataron las muestras mediante 2 incubaciones con ACN y una rehidratación intercalada con $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 2,5 mM. Las proteínas se digirieron después con una solución de tripsina (Promega) en $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 5 mM a 37 °C durante toda la noche. Por último, se extrajeron las proteínas digeridas en ACN 50%, conteniendo ácido fórmico 2% (Shevchenko y cols, 1996; Encarnación y cols, 2005). Para el análisis por MALDI-TOF-MS se utilizó un equipo Autoflex Daltonics Bruker (Bruker Daltonics, Bellerica, EEUU). La mezcla peptídica se analizó utilizando una solución saturada de ácido α -

ciano-4-hidroxycinámico en ACN 50% conteniendo TFA 0,1%. La lista de los picos correspondientes a las masas de los péptidos para identificar se analizaron con la base de datos NCBIInr y el programa de búsqueda Mascot (Matrix Science, Ltd; London, RU; <http://www.matrixscience.com>).

3.7. Determinación de actividades enzimáticas

Todas las enzimas fueron extraídas de nódulos de alfalfa a 0-4°C y sus actividades se midieron a 25°C en el rango lineal.

3.7.1. Enzimas antioxidantes

Actividad superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1). Para la determinación de actividad SOD los nódulos (50 mg) se homogeneizaron en 400 µL de tampón KP_i 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM, PVP-10 1% (p/v) y Triton X-100 0.1% (v/v). La actividad SOD total se determinó por el método del ferricitocromo *c* con modificaciones (Rubio y cols, 2002), utilizando 25 µg de proteína. Las isoformas CuZnSODc, CuZnSODp, FeSOD plastidial y MnSOD mitocondrial se visualizaron individualmente en geles nativos (**Tabla 3.9**) y se identificaron mediante incubación con KCN (inhibe la CuZnSOD) y H₂O₂ (inhibe la CuZnSOD y FeSOD).

Tabla 3.9. Composición de los geles nativos

Reactivo	Gel concentrador 4%	Gel separador 15%
Acrilamida:bisacrilamida 40% (mL)	0, 21	1,52
Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) (mL)	0,5	-
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8) (mL)	-	1
Agua (mL)	1,29	1,48
TEMED (µL)	2	4
Persulfato de amonio 10% (µL)	20	40

Actividad ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11) y **catalasa** (EC 1.11.1.6). La APXc y catalasa se extrajeron de 50 mg de nódulos con 500 µL de KP_i 50 mM (pH 7) y PVP-10

0,5% (soluble). Se midió la desaparición de ascorbato a 290 nm ($\epsilon=2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en el caso de la APXc (Asada y Lester, 1984) y la descomposición de H_2O_2 a 240 nm ($\epsilon=39,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para la determinación de catalasa (Aebi, 1984). La ausencia de ascorbato en el medio de extracción permitió ensayar separadamente la actividad APXc ya que las isoformas de los orgánulos se inactivan durante la extracción.

Actividad glutatión reductasa (EC 1.6.4.2). Para la determinación de actividad GR, se homogeneizaron 50 mg de nódulos de alfalfa con 500 μL de Tricina 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,2 mM, β -mercaptoetanol 10 mM y PVP-10 1%. Para el ensayo, se siguió la oxidación de NADPH a 340 nm ($\epsilon=6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y la actividad GR medida corresponde a la suma de las actividades de las isoformas citosólica y plastidial (Dalton y cols, 1986).

3.7.2. Enzimas del metabolismo del carbono y nitrógeno

Las enzimas se extrajeron de 100 mg de nódulos con 500 μL de tampón MOPS 50 mM (pH 7), PVPP 20%, DTT 10 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, KCl 20 mM y MgCl_2 5 mM. Los extractos se desalaron y se utilizaron para el ensayo de las enzimas, así como para la medida de proteína.

Sacarosa sintasa (EC 2.4.1.13). La mezcla de reacción contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7,0), MgCl_2 5 mM, KCl 20 mM, sacarosa 0,1 M, pirofosfato 1 mM, glucosa-1,6-difosfato 0,02 mM, NAD^+ 1 mM, UDP 2 mM y 10 U de UDP glucosa pirofosforilasa, fosfoglucomutasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. El ensayo se realizó con 240 μL de mezcla de reacción y 10 μL de extracto desalado, midiendo la reducción de NAD^+ a 340 nm ($\epsilon=6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Invertasa alcalina (EC 3.2.1.26). La mezcla de reacción contenía imidazol 50 mM (pH 8,5), MgCl_2 5 mM, sacarosa 0,1 M, NAD^+ 1 mM, ATP 1 mM, 10 U de hexokinasa, 12 U de fosfoglucomutasa y 3 U de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. El ensayo se realizó con 240 μL de mezcla de reacción y 10 μL de extracto desalado, midiendo la reducción de NAD^+ a 340 nm.

Isocitrato deshidrogenasa (EC 1.1.1.42). La composición del medio de reacción fue Bicina 100 mM (pH 8,5), $MgCl_2$ 5 mM, isocitrato 1 mM y $NADP^+$ 0,5 mM. El ensayo se realizó con 240 μ L de mezcla de reacción y 10 μ L de extracto desalado siguiendo la reducción de $NADP^+$ a 340 nm.

Glutamato sintasa (EC 1.4.1.13). El medio de reacción contenía Bicina 100 mM (pH 8,6), DTT 10 mM, NADH 0,4 mM y α KG 2 mM. Cada ensayo se realizó con 225 μ L de medio, 12,5 μ L de extracto desalado y 12,5 μ L de Gln 100 mM para iniciar la reacción, y la actividad enzimática se determinó siguiendo la oxidación de NADH a 340 nm.

3.8. Determinación de metabolitos

3.8.1. Ácidos orgánicos y sacarosa

Los ácidos orgánicos (malato, succinato y α KG) y sacarosa se extrajeron de 100 mg de nódulos con ácido tricloroacético 5% (p/v), y los extractos se procesaron según Wilson y Harris (1966) con pequeñas modificaciones (Gálvez y cols, 2005). El extracto se centrifugó (5000g x 10 min, 4°C), se recuperó el sobrenadante y se lavó 5 veces con éter dietílico saturado con agua. Tras desechar el éter se conservó la fase acuosa, que se burbujeó con N_2 durante 2 min, y se pasó a través de un filtro de 0,45 μ m. A continuación, se congelaron las muestras en N_2 líquido y se guardaron a -20°C hasta su análisis. Los ácidos orgánicos se cuantificaron mediante cromatografía iónica en un DX-500 System (Dionex, Sunnyvale, EEUU) utilizando una columna IonPac AS11 (Dionex) y un gradiente (NaOH 2,5 mM/MeOH 18% a NaOH 45 mM/MeOH 18% en 13 min). La sacarosa se determinó por electroforesis capilar con un equipo PACE 5500 (Beckman Coulter, Fullerton, EEUU) acoplado a un detector de diodos (Marino y cols, 2006).

3.8.2. Ascorbato y deshidroascorbato

El ascorbato y DHA se midieron según Bartoli y cols (2000), con modificaciones (Matamoros y cols, 2006). Los extractos se realizaron con 100 mg de nódulos de alfalfa (que habían sido congelados directamente en N_2 líquido) con 500 μ L de $HClO_4$ 1 M.

Tras centrifugar los extractos (13000g x 10 min), el sobrenadante se dividió en dos alícuotas de 200 μ L. Ambas alícuotas se neutralizaron con 100 μ L de K_2CO_3 1 M. Una de ellas se utilizó para seguir la oxidación de ascorbato a 265 nm con 0,05 U de ascorbato oxidasa de calabaza (Sigma-Aldrich), midiendo el ascorbato reducido presente en el extracto. La otra alícuota se trató previamente con 1,4-ditioeritritol 0,4 mM. El DHA se calculó como la diferencia entre el ascorbato total (ascorbato + DHA) y el reducido. El tampón para la reacción fue HEPES 100 mM (pH 5,6).

3.8.3. Glutación y homoglutación

Los tioles se extrajeron a partir de 50 mg de nódulos con 375 μ L HPO_3 al 2% (p/v) y EDTA 1 mM (Marino y cols, 2006). Los extractos se centrifugaron y se trataron con DTT 65 mM durante 15 min a temperatura ambiente. El análisis se realizó por electroforesis capilar con un equipo PACE 5500 asociado a un detector de diodos. El tampón “background” fue NaH_2PO_4 60 mM (pH 7), NaCl 60 mM y 0,0001% de bromuro de hexadimetrina. El detector de UV se fijó en 200 y 265 nm. Se inyectaron alícuotas de los extractos reducidos con DTT, cuantificando así el GSH y hGSH totales. Para la calibración se utilizaron GSH (Sigma-Aldrich) y hGSH (Bachem).

La proporción de tioles oxidados (GSSG y hGSSG) se determinó por un método enzimático basado en la reducción de los grupos tiol por la GR de levadura (Sigma-Aldrich). Los grupos tiol reducidos son derivatizados con 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) produciendo un compuesto coloreado que absorbe a 412 nm. Los tioles de nódulos de alfalfa (30 mg) se extrajeron con 300 μ L de ácido sulfosalicílico 5% (p/v). Tras una centrifugación (13000g x 20 min), la concentración de tioles totales (GSH + GSSG, hGSH + hGSSG) se midió con 25 μ L de extracto en presencia de 1 U de GR, DTNB 0,6 mM, NADPH 0,21 mM, EDTA 5 mM y KP_i 128 mM (pH 7,4). Una alícuota de 90 μ L se derivatizó con vinilpiridina y trietanolamina para bloquear los grupos SH y determinar de manera similar la concentración de los tioles oxidados (GSSG + hGSSG). Las reacciones enzimáticas se siguieron midiendo la desaparición de NADPH a 340 nm.

3.9. Medidas de actividad nodular

3.9.1. Actividad nitrogenasa y parámetros relacionados

Actividad nitrogenasa aparente. Se midió la producción de H₂ en plantas de alfalfa cv. Aragón intactas (con las raíces encerradas herméticamente) con un sensor electroquímico de H₂ (Qubit Systems, Canada) a un flujo continuo de 500 mL min⁻¹ (Witty y Minchin, 1998). Las medidas se realizaron en una atmósfera de 79% N₂ (v/v) y 21% O₂ (v/v). El sensor de H₂ fue calibrado con gases de alta pureza, utilizando el mismo flujo que para las muestras.

Actividad nitrogenasa total y respiración de la raíz. Ambos parámetros se midieron en plantas intactas utilizando un sistema de flujo continuo con un detector de H₂ (Witty y Minchin, 1998). Las macetas con las plantas de alfalfa cv. N4 sometidas a estrés hídrico moderado ($\psi_w -1,5 \pm 0,1$ MPa) se sellaron; el sistema se dejó estabilizar durante 18 h en una corriente de aire enriquecido con 500 μ L CO₂ L⁻¹ y después las raíces noduladas se expusieron a una mezcla de 79% (v/v) Ar y 21% (v/v) de O₂.

La producción de CO₂ respiratorio se midió utilizando un analizador infrarrojo y la actividad nitrogenasa utilizando un sensor electroquímico de H₂ (City Technology, Portsmouth, RU). Después de alcanzar las condiciones de equilibrio tras la exposición a Ar/O₂ (≈ 65 min), se incrementó la concentración de O₂ en la corriente de gas del 21% hasta el 50% (8,55-20,45 mmol O₂ L⁻¹). La actividad nitrogenasa asociada a la respiración se calculó como la relación lineal entre los cambios en la respiración total de la raíz y la producción de H₂ durante el aumento gradual de concentración de O₂ (Witty y cols, 1983).

3.9.2. Leghemoglobina

La concentración de Lb se determinó por el método de piridina-hemocromo (Appleby y Bergersen, 1980). Los extractos se realizaron con 30 mg de nódulos y 600 μ L de KP_i 50 mM (pH 7), y se centrifugaron (13000g x 15 min, 4°C). A 400 μ L de sobrenadante se añadieron 1,2 mL de piridina y se ajustó el volumen a 2,2 mL con agua. La mezcla se dividió en dos cubetas, una de referencia donde se añadió una traza de K₃Fe(CN)₆

(grupo hemo oxidado) y una cubeta de muestra donde se añadió una traza de ditionito (grupo hemo reducido). La concentración de Lb se calculó como la diferencia de absorbancia a 556 nm y 539 nm ($\epsilon = 23,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.9.3. Proteína soluble

La proteína soluble de los extractos se cuantificó por el método de Bradford, utilizando un microensayo convencional (Bio-Rad). El calibrado se realizó con albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich) como estándar en el rango de 0-10 μg .

3.10. Daño oxidativo a lípidos y proteínas

Determinación de daño oxidativo a lípidos

El MDA es un aldehído citotóxico que se genera en pequeñas cantidades durante la peroxidación de lípidos (Aruoma y cols, 1989), especialmente a partir del ácido araquidónico. La cuantificación del aducto coloreado $(\text{TBA})_2\text{-MDA}$, que se forma entre el MDA y el ácido tiobarbitúrico (TBA), en medio ácido y a temperatura elevada (95°C), se realizó por HPLC con detección a 532 nm. Puesto que algunos aminoácidos y otros compuestos como el ascorbato también reaccionan con el TBA formando aductos que absorben en la zona cercana a 532 nm, la separación por HPLC nos permitió determinar específicamente la cuantificación del aducto $(\text{TBA})_2\text{-MDA}$.

Los nódulos (40 mg) se extrajeron en 240 μL de HPO_3 al 5% (p/v) y butilhidroxitolueno 0,04% (p/v) y se centrifugaron ($13000g \times 20 \text{ min}$, 4°C). El ensayo contenía 100 μL de extracto, butilhidroxitolueno 0,1%, TBA 0,25%, NaOH 12,5 mM y HCl 6,25%. Se utilizaron blancos correspondientes a cada muestra omitiendo el TBA. La reacción se dejó transcurrir 30 min a 95°C y se detuvo en un baño de hielo, y el aducto $(\text{TBA})_2\text{-MDA}$ se extrajo en butanol. Las muestras se secaron en un liofilizador y el pellet se almacenó a -80°C hasta su análisis por HPLC. El sistema de HPLC (Waters, Milford, EEUU) estaba equipado con un detector de fotodiodos (PDA 996; Waters) controlado por el software Millennium (Waters). El flujo fue 1 mL min^{-1} y la fase móvil KPi 50 mM (pH 7,0), acetonitrilo 15% (v/v) y tetrahidrofurano 0,6% (v/v). El compuesto $(\text{TBA})_2\text{-MDA}$ se separó en una columna analítica Ultrasphere C_{18} (4,6 x 250 mm, 5 μm ; Baker Phillipsburg, EEUU) y se detectó a 532 nm. Se verificó que el

espectro tenía un máximo de absorbancia a 532 nm y un hombro a 495 nm (Iturbe-Ormaetxe y cols, 1998). El calibrado se realizó con 1,1,3,3-tetraetoxipropano (Sigma-Aldrich) en el rango 0-1 nmol.

Determinación de daño oxidativo a proteínas

Se utilizó el kit comercial “OxyBlot protein oxidation” (Chemicon, Temecula, EEUU), basado en la derivatización de los grupos carbonilo con dinitrofenilhidrazina y la separación de las proteínas en un gel SDS al 10%. Los grupos dinitrofenilhidrazona de las proteínas oxidadas se detectaron en membranas de PVDF utilizando un anticuerpo primario de conejo (dilución 1:150) que reconoce los grupos dinitrofenilhidrazona, y un anticuerpo secundario contra IgG de conejo (dilución 1:3000) (Sigma-Aldrich). La señal de quimioluminiscencia se detectó con el kit “Supersignal West Pico” (Pierce).

3.11. Fitoquelatina sintasas en levaduras

3.11.1. Expresión de fitoquelatina sintasas recombinantes

Para establecer la estructura de los genes *PCS* y demostrar que eran funcionales, se aisló RNA total de raíces y nódulos y se sintetizaron los correspondientes cDNAs (Ramos y cols, 2007). Se utilizaron cebadores específicos para amplificar las secuencias correspondientes a *LjPCS1-8R* (*sentido*: AACATATGGCGATGGCGGGGTTG; *antisentido*: TACTCGAGCTAAGACAAAGGTACACC) y *LjPCS3-7N* (*sentido*: AACATATGCATTGCATACCACCA; *antisentido*: ATCTCGAGTTCGTTCTCCATATTTTCATCAAG), respectivamente. Las secuencias completas de *LjPCS1-8R* y *LjPCS3-7N* se introdujeron en el plásmido de expresión bacteriana Champion pET TOPO (Invitrogen; Paisley, RU), entre los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* (fragmentos subrayados en las secuencias de los cebadores), para ser sobreexpresadas en *E. coli*. Se utilizó resistencia a ampicilina como marcador de selección y se comprobó que las secuencias eran correctas. Se obtuvieron así las secuencias de cDNA de las proteínas de interés unidas a una cola de 6xHis en el extremo N-terminal. Debido a la dificultad para sobreexpresar *LjPCS3* en forma soluble y medir la actividad PCS, se decidió intentar su expresión en levaduras. *LjPCS1-8R* y *LjPCS3-7N* se clonaron en el vector pYES2.1 TOPO TA (Invitrogen). Los plásmidos se introdujeron en la cepa de levadura INVSc1

para expresar las proteínas bajo el control del promotor *GALI* (Giniger y cols, 1985). Las colonias transformadas se seleccionaron con medio sin uracilo ya que el plásmido también contiene el gen *URA3*.

El cultivo de levaduras se inició a partir de colonias en placa, se dejaron crecer durante 2 días en medio YNB suplementado con CSM sin uracilo (CSM-U) y con L-rafínosa 2% (p/v). Se utilizó $\approx 0,5-1$ mL de este cultivo inicial para ajustar la DO 600 nm a 0,1 y se inocularon con dicho cultivo 14,5 mL de medio YNB con CSM-U pero sin metales divalentes (BIO101 Q-Biogene) y 2% de rafínosa. Los cultivos crecieron a 250 rpm y 30°C durante 20 h. La inducción se inició entonces con Gal 2% durante 4 h. Al mismo tiempo se añadió GSH 2 mM y el correspondiente metal o metaloide: CdCl₂ 50 μ M, ZnSO₄.7H₂O 200 μ M, PbCl₂ 200 μ M, KH₂AsO₄ 200 μ M, FeCl₃.6H₂O 50 μ M, HgCl₂ 50 μ M o AlCl₃ 200 μ M. A continuación, las levaduras se recogieron por centrifugación (7000g x 2 min, 4°C) y se lavaron con agua destilada para eliminar los restos de medio de cultivo. Los pellets se pesaron y se resuspendieron en 150 μ L de TFA 0,1%, con ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) 0,5 mM. Las levaduras se rompieron por agitación 3 x 4 min con bolas de vidrio (425-600 μ m, Sigma-Aldrich) a 4 °C, haciendo 2 lavados con 100 μ L de TFA 0,1%, DTPA 0,5 mM. Los extractos con los restos de levaduras sin romper y membranas, se recogieron por decantación y se centrifugaron (13000g x 15 min, 4°C). Los sobrenadantes se almacenaron a -80°C hasta su análisis por HPLC.

3.11.2. Actividad fitoquelatina sintasa *in vivo*

Las concentraciones de PCs en levadura se determinaron por HPLC tras derivatización post-columna con DTNB, utilizando dos columnas C₁₈ (4,6 x 250 mm, 5 μ m; Baker) conectadas en serie y un detector de fotodiodos (PDA 996, Waters) (Loscos y cols, 2006). El gradiente utilizado con las fases A (TFA 0,1%) y B (TFA 0,1%; acetonitrilo 20%) fue el siguiente: 0 min 100% A, 3 min 50% A-50% B, 35 min 100% B, 38 min 100% A, con un flujo total de 0,8 mL min⁻¹. La reacción de derivatización se realizó con DTNB 75 μ M en KP_i 80 mM (pH 7,8) a 0,8 mL min⁻¹ a lo largo de un capilar metálico sumergido en un baño a 50°C. Se emplearon estándares de γ EC, GSH (Sigma-Aldrich), hGSH (Bachem), PCs (suministradas por el Prof. Zenk) y hPCs (sintetizadas químicamente por Biosyntan) para la

identificación de los picos. Las muestras se filtraron (0,45 μm Ultrafree-MC; Millipore) y se inyectaron (100 μL) en el HPLC.

3.11.3. Actividad fitoquelatina sintasa *in vitro*

Para ensayar la actividad PCS *in vitro*, los cultivos de levadura se dejaron crecer durante 20 h (ver **3.11.1**) y se indujo la expresión de la proteína con Gal, pero sin añadir GSH ni metal. Las células se rompieron con bolas de vidrio en tampón Tris-HCl 300 mM (pH 8,0), conteniendo β -mercaptoetanol 1 mM, y en ese mismo medio, sin extraer las bolas, se ensayó la actividad añadiendo GSH 5 mM y CdCl_2 500 μM o $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 μM . Después de incubar las muestras a 35°C durante 2 h, las reacciones se detuvieron con TFA 1,2 %. Las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se almacenaron a -80°C hasta su análisis por HPLC (ver **3.11.2**).

3.11.4. Estudios con quelatos de metales

Para verificar que la PCS era activada por Fe y Al, dos metales no considerados como activadores de la enzima (Oven y cols, 2002b), se investigó el efecto de los quelantes metálicos desferrioxamina (DFO) y ácido etilendiamino di(*o*-hidroxifenil acético) (EDDHA). Los cultivos de levadura se incubaron durante 20 h (ver **3.11.1**), se indujeron con Gal 2% y se suplementaron con GSH 2 mM y una mezcla de metal ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 50 μM ; CdCl_2 50 y 200 μM ; AlCl_3 200 μM) con su respectivo quelante (DFO 500 μM ; EDDHA 200 μM). La proporción quelante:metal fue 1:10 para Fe y Cd con DFO, y 1:1 para Al y Cd con EDDHA. Tras una incubación de 30 min para permitir la formación del quelato, las células se dejaron crecer durante 4 h y se procesaron del mismo modo que para el análisis de la actividad PCS mediante la cuantificación de las PCs producidas (ver **3.11.2**).

3.11.5. Espectrometría de masas

La purificación de las fitoquelatinas se realizó por dos métodos de HPLC. El primero consistió en la derivatización precolumna de los polipéptidos con MBB (Calbiochem; San Diego, EEUU) y la detección del compuesto derivatizado por fluorescencia (detector 474; Waters) con longitudes de onda de excitación a 380 nm y emisión a 480 nm. La derivatización con MBB se realizó con 250 μ L de extracto de levaduras rotas en TFA 0,1% (ver 3.11.2), 450 μ L de tampón EPPS 200 mM, DTPA 0,5 mM y MBB 1,4 mM (concentración final) durante 1 h a 45°C. El segundo método fue por HPLC sin derivatización con detección a 220 nm. Los polipéptidos purificados se trataron consecutivamente con DTT 10 mM durante 1 h y con iodoacetamida 55 mM durante 1 h para asegurar la reducción y alquilación completa de los tioles. Los polipéptidos derivatizados con MBB o iodoacetamida se purificaron con una columna C₁₈ Sep-Pak (Waters), de la que se eluyeron con ACN 100% y se secaron con un liofilizador Speed-Vac SC-110 (Savant) antes de ser analizados por MS.

Los análisis por MS de alta resolución se realizaron con un espectrómetro de masas “Apex ultra hybrid quadrupole-F_T” (Bruker Daltonics) equipado con un imán de 7 Teslas. Los iones se generaron con una fuente combinada MALDI/ESI. Para la ionización por electrospray se aplicó a la aguja un voltaje de 4500 V, situándose el capilar de entrada a un voltaje de 300 V. Las muestras se prepararon añadiendo una solución de metanol:agua:ácido fórmico 70:29.9:0,1 (v/v/v) en una proporción 1 a 5% para obtener una relación señal-ruido óptima. La adquisición y procesamiento de los datos se realizó, respectivamente, con los programas ApexControl (v2.0.0) y DataAnalysis (v3.4) de Bruker Daltonics.

Los experimentos de nESI-IT MS/MS (“nano-electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry”) se realizaron con un espectrómetro de masas “Finnigan LCQ ion trap” (Thermo Fisher Scientific; Waltham, EEUU) equipado con una fuente de nanospray (Protana; Dinamarca). El spray se generó con un voltaje de 0,85 kV y la temperatura del capilar fue 110°C. Para los experimentos MS/MS y MSⁿ, se utilizó una ventana de 3 Da para el aislamiento de los iones precursores y una energía relativa de colisión de 25-50%, dependiendo de la muestra.

La cuantificación de Cu para los ensayos *in vivo* de la actividad LjPCS se realizó por ICP-AEO (IRIS Intrepid II XDL; Thermo Fisher Scientific). Después de incubar las células con $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 μM durante 4 h, se lavaron dos veces con EDTA 1 mM para eliminar el Cu adsorbido, se resuspendieron en TFA 0,1% y se rompieron con bolas de vidrio. La fracción soluble de las células rotas se liofilizó antes de ser enviadas las muestras para análisis. Se realizaron controles omitiendo el Cu y otros en los que el Cu se retiraba inmediatamente después de haber sido añadido. Ambos controles, así como los reactivos usados para el procesamiento de las muestras, no contenían niveles detectables de Cu ($<0,002 \mu\text{g mg}^{-1}$ de peso fresco).

3.12. Análisis de transcriptoma

Las extracciones de RNA se realizaron con el RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen; Hilden, Alemania) tras pulverizar 200-250 mg de raíces de Lotus congeladas en N_2 líquido con un molinillo (MM200 Retsch; Haan, Alemania). Se cuantificó el RNA por espectrofotometría y se comprobó la ausencia de contaminación con DNA genómico en geles de agarosa al 1%. Después se procedió a la síntesis de cada cDNA a partir de 10 μg de RNA en presencia de poliT₁₂₋₁₈ 1,5 μg , $\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP 60 mCi, dNTPs 0,42 mM, DTT 8,3 mM, inhibidor de RNAsas 80 U y transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen) 400 U. La reacción se dejó transcurrir 1 h a 42°C. Finalmente, se hidrolizó el RNA en medio básico y se eliminaron los $\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP no incorporados. La eficiencia del marcaje se cuantificó con un contador de centelleo LS6500. Los arrays LjKDRI fueron desarrollados por el grupo del Dr. Michael Udvardi en el Max-Planck-Institute of Molecular Plant Physiology (Golm, Alemania), en colaboración con el Dr. Tabata (Kazusa DNA Research Institute, Japón). Contenían 12K ESTs de Lotus (cv. Gifu) obtenidas a partir de nódulos maduros, raíces enriquecidas en primordios nodulares, raíces no infectadas y yemas. Se emplearon un total de cuatro arrays de nylon 20 x 20 cm LjKDRI. Antes de la hibridación con cada cDNA, se realizó una hibridación de referencia para conocer la cantidad de DNA en cada punto del “array”, consistente en hibridar cada uno de las membranas que se van a utilizar con un oligonucleótido marcado con $\gamma^{33}\text{P}$ dATP cuya secuencia pertenece al vector en el que fueron clonadas las ESTs. El siguiente paso fue hibridar los arrays con el cDNA marcado con $\alpha^{33}\text{P}$ -

dCTP durante aproximadamente 24 h a 42°C en un tampón con formamida 50%, pirofosfato sódico 40 mM pH 8, SDS 1%, BSA 0,5%, esperma de arenque 10 µg/mL y tampón SSC 5X (SSC 20X: NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 M, pH 7). Después de tres lavados de 20 min cada uno en SDS 0,1%, pirofosfato sódico 4 mM (pH 7,2), y SSC 1X, 0,2X y 0,1X, respectivamente, se expusieron las membranas en un sistema Fuji film durante toda la noche. Al día siguiente se escanearon los films en un escáner BAS-1800 II Bioimager (Fujifilm) y se eliminó el marcaje radiactivo de cada array para ser reutilizado.

El análisis de las imágenes mediante el programa AIS permitió realizar el “gridding” de cada hibridación, que consiste en ajustar los puntos de hibridación a un esquema del array, para posteriormente tomar los datos de intensidades de emisión. El tratamiento estadístico se realizó con el programa en red Haruspex Expression Database Version 1.04 8. En un primer paso se descargaron los archivos almacenados en AIS y se procedió a la normalización de los datos capturados en relación con los datos de las hibridaciones de referencia para cada filtro. En este punto ya se pudo calcular la expresión relativa de cada uno de los tratamientos con Cd referida a la del control.

3.13. Análisis estadístico

El número de réplicas se especifica en las leyendas de las figuras o pies de las tablas. Para cada grupo de medidas se calculó la media y su correspondiente error estándar (ES). En los resultados del estudio del estrés hídrico en nódulos de alfalfa se compararon las medias de cada tratamiento con el control mediante análisis ANOVA y el *t*-test de Student ($P < 0,05$) utilizando el programa SPSS 11.0.

4. RESULTADOS

4.1. Metabolismo de los nódulos de alfalfa en condiciones de estrés hídrico

4.1.1. Fijación de nitrógeno y respiración en nódulos de alfalfa

Para el estudio del efecto de la sequía sobre el metabolismo nodular se utilizaron plantas de alfalfa crecidas hasta el final del periodo vegetativo, momento en el que se separaron en cuatro grupos. Un grupo de plantas, mantenido en óptimas condiciones hídricas ($\Psi_w = -0,6 \pm 0,2$ MPa), sirvió de control, y a los otros tres grupos se les aplicó, respectivamente, un estrés hídrico moderado (S1; $\Psi_w = -1,3 \pm 0,1$ MPa), un estrés hídrico severo (S2; $\Psi_w = -2,1 \pm 0,2$ MPa) y un tratamiento de recuperación (R; $\Psi_w = -0,6 \pm 0,2$ MPa). Este último consistió en la riego de las plantas S2 durante 2 días. Todos los experimentos se realizaron con el cv. Aragón, excepto la determinación de los parámetros asociados a la respiración nodular, que se llevó a cabo con el cv. N4, también de interés agronómico. Las plantas intactas se utilizaron directamente para las medidas de nitrogenasa *in vivo*, o bien los nódulos se cosecharon inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis bioquímico o molecular.

La primera parte del trabajo consistió en analizar la expresión de la nitrogenasa a nivel de mRNA, proteína y actividad enzimática (**Fig. 4.1**). El mRNA del gen *nifH* que codifica la Fe-proteína del complejo nitrogenasa se cuantificó por RT-PCRc, y los resultados se normalizaron con respecto a los genes control (“housekeeping”) del bacteroide (**Tabla 3.3**) y se expresaron como porcentaje respecto a los valores de las plantas control. El umbral de significación que aplicamos a nuestros datos de RT-PCRc fue el aceptado generalmente en los análisis de transcriptómica (El Yahyaoui y cols, 2004). Esto es, se consideró significativo un aumento del nivel mRNA cuando $2^{-\Delta\Delta Ct} > 2$ y un descenso cuando $2^{-\Delta\Delta Ct} < 0,5$. Según este criterio, la expresión de *nifH* no resultó afectada por los niveles de estrés hídrico S1 o S2, pero sí disminuyó significativamente en R (**Fig. 4.1.A**). También se estimaron los contenidos de Fe-proteína (39 kD) y MoFe-proteína (67 kD) en los bacteroides por análisis western con anticuerpos policlonales monoespecíficos y densitometría de las membranas (**Fig. 4.1.B**). Los resultados expresados respecto a los valores de los nódulos control revelaron un descenso significativo de la Fe-proteína y la FeMo-proteína en S1 ($0,8 \pm 0,13$; $0,53 \pm 0,11$) y S2 ($0,53 \pm 0,13$; $0,48 \pm 0,10$), respectivamente. Asimismo, en las plantas R, la Fe-proteína recuperó completamente el nivel control y la FeMo-proteína lo hizo parcialmente (64%). Finalmente, la actividad nitrogenasa aparente se determinó en plantas intactas siguiendo la producción de H₂ en un sistema de flujo continuo con una atmósfera de 79% N₂ y 21% O₂. Dicha actividad disminuyó muy marcadamente en S1 (-43%) y en S2 (-82%) y se recuperó un 75% en R respecto al tratamiento control.

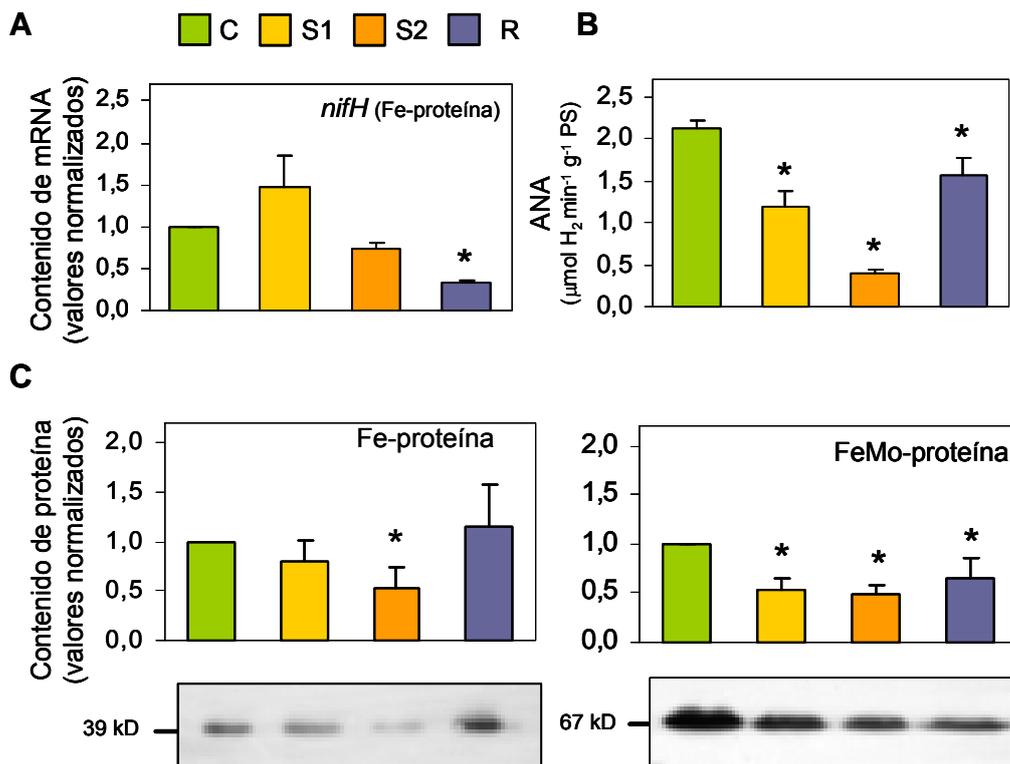


Figura 4.1. Expresión de la nitrogenasa en nódulos de alfalfa durante la sequía y subsiguiente recuperación. Los tratamientos corresponden a (C) control, (S1) estrés hídrico moderado, (S2) estrés hídrico severo y (R) recuperación. **A**, Niveles de mRNA de *nifH*. Los valores son medias \pm ES de 6 réplicas biológicas correspondientes a RNAs de nódulos de plantas diferentes. Los valores de S1, S2 y R están normalizados respecto a los de las plantas control. **B**, La actividad nitrogenasa aparente (ANA) se midió en plantas intactas con un sensor electroquímico de H_2 acoplado a un sistema de flujo continuo. Los valores se expresan por gramo de peso seco de nódulos y son medias \pm ES de 5-6 réplicas correspondientes a medidas en plantas diferentes. **C**, Detección de Fe-proteína (39 kD) y MoFe-proteína (67 kD) en membranas con anticuerpos específicos, y estimación de los contenidos de ambas proteínas en nódulos. Los valores son medias \pm ES de 3 réplicas. Los valores de S1, S2 y R están normalizados respecto a los de las plantas control.

Se determinaron la actividad nitrogenasa y la respiración nodular en plantas de alfalfa cv. N4 en un sistema de flujo continuo midiendo la producción de H_2 con un sensor electroquímico de H_2 y la producción de CO_2 mediante análisis infrarrojo (**Tabla 4.1**). La actividad nitrogenasa disminuyó pronunciadamente (81%) en S1 y este descenso estuvo acompañado por disminuciones menos pronunciadas de la respiración total de la raíz (-54%) y de la respiración asociada a la nitrogenasa (-66%). La discrepancia entre el grado de inhibición de la actividad nitrogenasa y el de su respiración asociada es probablemente debida a un aumento importante del coste de

carbono de la nitrogenasa (+126%) y al incremento de la resistencia a la difusión de O₂ en los nódulos (+158%).

Tabla 4.1. Efecto de la sequía sobre la actividad nitrogenasa y varios parámetros relacionados con la respiración en nódulos de alfalfa

Parámetro ^a	Unidades	C	S1	Δ (%)
Nitrogenasa	μmol H ₂ min ⁻¹ planta ⁻¹	1.40	0.27*	-81
TRR	μmol CO ₂ min ⁻¹ planta ⁻¹	6.82	3.12*	-54
GMR	μmol CO ₂ min ⁻¹ planta ⁻¹	3.45	2.03 *	-41
NLR	μmol CO ₂ min ⁻¹ planta ⁻¹	3.43	1.15*	-66
Coste de carbono	mol CO ₂ mol ⁻¹ H ₂	1.96	4.42*	+126
R (-Ar)	s m ⁻¹ , x 10 ⁻⁶	0.26	0.67*	+158
R (+Ar)	s m ⁻¹ , x 10 ⁻⁶	0.56	1.04*	+86

^aTRR, respiración total de la raíz; GMR, respiración asociada al crecimiento y mantenimiento de la raíz nodulada; NLR, respiración asociada a la actividad nitrogenasa; R (-Ar), resistencia a la difusión de O₂ en 79% N₂ + 21% O₂; R (+Ar), resistencia a la difusión de O₂ en 79% Ar + 21% O₂. Los valores son medias ± ES de 6 réplicas y se señala con un asterisco las diferencias significativas basadas en el *t*-test de Student ($P < 0,05$).

Medidas de actividad nodular

La proteína soluble y la Lb son dos parámetros indicativos de la actividad nodular (Gogorcena y cols, 1997). La proteína soluble disminuyó durante la sequía (21% en S1 y 25% en S2) mientras que en R recuperó el valor control. Sin embargo, el contenido nodular de Lb, determinado por la técnica de la piridina-hemocromo, no resultó afectado significativamente, manteniéndose en torno a 0,12 mg mg⁻¹ proteína (3 réplicas y ES<10%) en todos los tratamientos. Este resultado fue confirmado mediante análisis western con un anticuerpo producido frente a la Lb de guisante (**Fig. 4.2**).

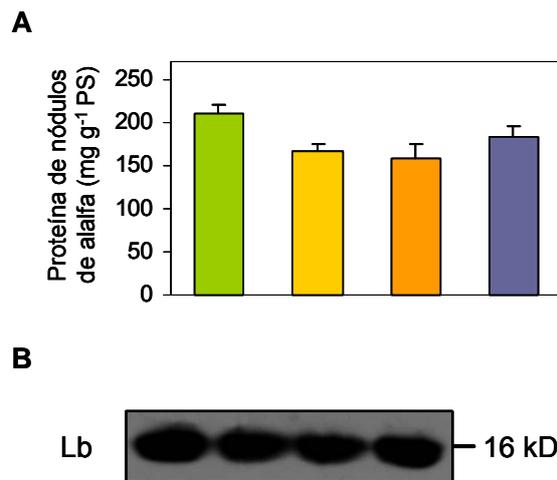


Figura 4.2. **A**, Contenido de proteína soluble total en nódulos de alfalfa durante la sequía y subsiguiente recuperación. Los valores se expresan por gramo de peso seco de nódulos y son medias \pm ES de 10 réplicas. **B**, Análisis western de la Lb con un anticuerpo frente a Lb de guisante (1:5000) (ver 3.6). Los tratamientos se designan como en la leyenda de la **Figura 4.1**.

4.1.2. Ácidos orgánicos, sacarosa y enzimas del metabolismo del carbono

La sacarosa es el azúcar transportado mayoritariamente desde la parte aérea de la planta a los nódulos. En el citosol de las células nodulares la sacarosa es oxidada a ácidos dicarboxílicos, que constituyen el principal sustrato respiratorio de los bacteroides (Temple y cols, 1998). En este trabajo utilizamos cromatografía iónica para cuantificar succinato, α KG y malato, y electroforesis capilar para cuantificar sacarosa en los nódulos en condiciones de estrés hídrico y durante su posterior recuperación del estrés (**Fig. 4.3**). La sequía moderada produjo una acumulación de sacarosa (+58%) y un descenso del α KG (-23%) mientras que no tuvo efecto sobre el resto de los ácidos orgánicos analizados. La intensificación de la sequía (S2) no provocó un descenso mayor del α KG pero sí una acumulación muy marcada de succinato (+68%), malato (+42%) y sacarosa (+435%). Tras la reirrigación de las plantas (R), el succinato y la sacarosa recuperaron los niveles del control, pero las concentraciones de α KG y malato sufrieron un importante descenso (-48%).

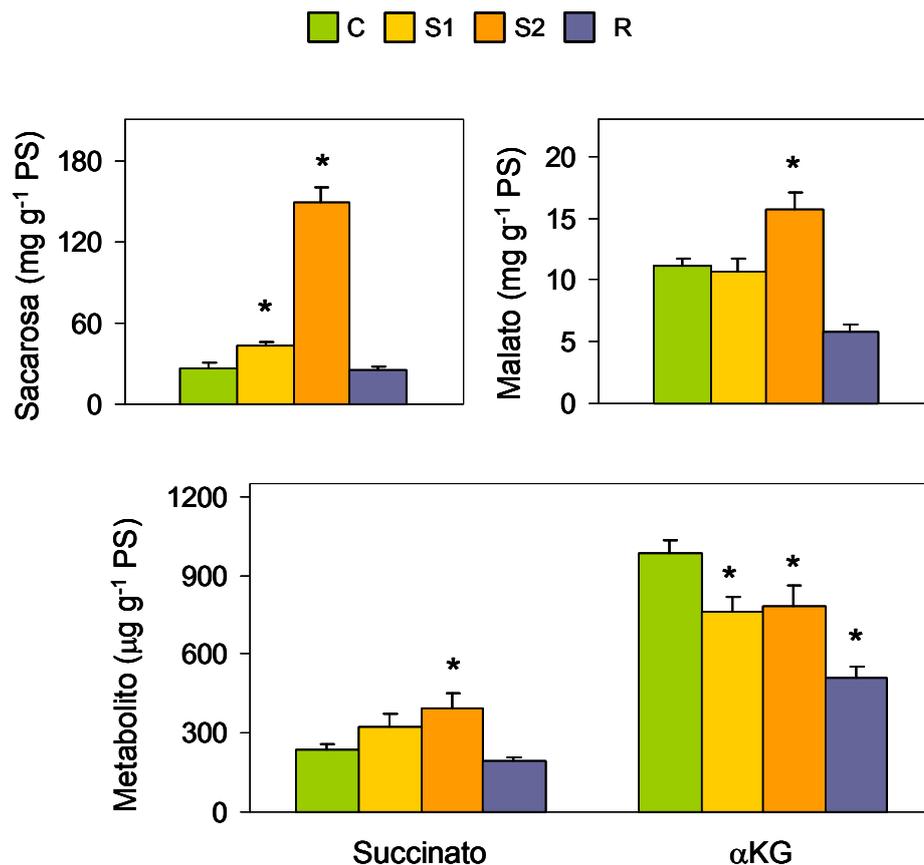


Figura 4.3. Contenido de los principales ácidos dicarboxílicos y sacarosa en nódulos de alfalfa durante la sequía y subsiguiente recuperación. Los tratamientos se designan como en la leyenda de la **Figura 4.1**. Los valores se expresan por gramo de peso seco de nódulos y son medias \pm ES de 5-6 réplicas correspondientes a nódulos de plantas independientes.

Se determinaron también algunas de las actividades enzimáticas del metabolismo del C y el N en los nódulos (**Fig. 4.4**). El tratamiento S1 no causó cambios significativos en ninguna de las actividades, pero el S2 produjo descensos moderados en la actividad ICDH (-12%) y en las actividades SS, IA y GOGAT (-30%). En las plantas R, la actividad SS volvió al nivel control, mientras que las actividades ICDH e IA aumentaron un 20% y la actividad GOGAT no se recuperó. El nivel de mRNA de la SS, cuantificado por RT-PCRc, no fue afectado en S1, disminuyó en S2 y se recuperó en R (**Fig. 4.4**). Sin embargo, el contenido de proteína SS permaneció similar al control durante la sequía y recuperación.

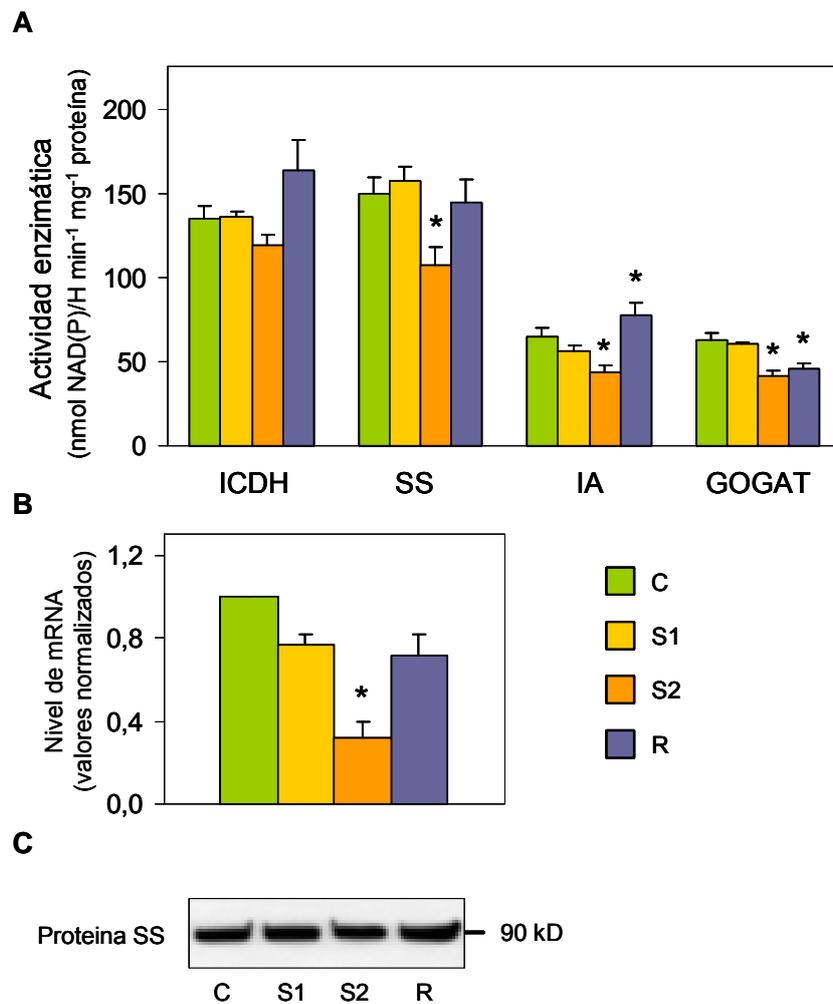


Figura 4.4. **A**, Actividades de las enzimas del metabolismo del carbono en nódulos de alfalfa durante la sequía y subsiguiente recuperación. Los valores son medias \pm ES de 7-11 réplicas correspondientes a extractos de plantas de alfalfa distintas. **B**, Cuantificación del mRNA de SS. Los valores son medias \pm ES de 3-4 réplicas correspondientes a RNAs de plantas distintas. **C**, Análisis western de la SS. El gel contiene 50 μ g de proteína de cada muestra y se utilizó un anticuerpo frente a la SS de soja (ver 3.6).

4.1.3. Expresión de enzimas antioxidantes en las células de los nódulos y en los bacteroides

Los niveles de mRNA de los principales enzimas antioxidantes se determinaron por RT-PCR, una técnica de elevada especificidad y sensibilidad. En la **Tabla 3.2** se indican los cebadores específicos utilizados para cuantificar los mRNAs que codifican la CuZnSODc, CuZnSODp, MnSOD mitocondrial, FeSOD plastidial, APXc, GRc, catalasa, tiol sintetasas (γ ECS, GSHS, hGSHS) y otras proteínas relacionadas como la

Lb y ferritina (Fer). Los niveles de mRNA de los genes *CuZnSODc* y *FeSODp* se incrementaron en S1 pero no en S2 ni R, el de *CuZnSODp* se mantuvo constante en S1 y S2 y aumentó en R, y el de *MnSOD* no se modificó en ninguno de los tratamientos. Con respecto al resto de los genes estudiados sólo se observó un aumento significativo del mRNA de *GRc* en S1 y de *APXc* en S2, y un descenso del mRNA de *hGSHS* en S2 (**Fig. 4.5**). Para completar el estudio de la expresión de estas enzimas se midieron las actividades SOD, CAT, APXc y GR (**Tabla 4.2**) y se estimó por análisis western la cantidad de proteína de aquellas enzimas cuyos niveles de mRNA habían sido modificados por los tratamientos. No se observaron cambios en la cantidad de APXc mientras que la proteína CuZnSODc aumentó en S1 (+25), S2 (+30%) y R (+148%). Las actividades enzimáticas no variaron significativamente, excepto la catalasa, que descendió un 20% en S1 y S2. En el caso de las SODs, se utilizaron geles de actividad, en ausencia o presencia de inhibidores selectivos, para separar e identificar las diferentes isoformas de los nódulos. No se observaron cambios en las actividades FeSOD (citósolica + plastidial), MnSOD (mitocondrial) y MnSOD (bacteroidal). En los geles de actividad no fue posible visualizar las CuZnSODs, debido probablemente a su poca abundancia en los nódulos maduros de alfalfa (datos no mostrados).

Tabla 4.2. Efecto de la sequía en las actividades de las enzimas antioxidantes de nódulos de alfalfa

	C	S1	S2	R
APXc ^a	1,0 ± 0,08	1,0 ± 0,02	1,1 ± 0, 2	1,2 ± 0, 16
Catalasa ^a	94,4 ± 7,84	76,7 ± 2,95	73,0 ± 5,08	92,4 ± 6,32
SOD ^b	39,2 ± 0,65	45,8 ± 1,88	44,2 ± 0,32	42,4 ± 1,87
GR ^a	31,7 ± 2,39	30,0 ± 3,10	31,7 ± 2,47	29,9 ± 3,31

^aLas actividades APXc, catalasa y GR se expresan en $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína. Los valores son medias \pm ES de 3-4 réplicas.

^b La actividad SOD se expresa en U mg^{-1} proteína. Los valores son medias \pm ES de 3-4 réplicas.

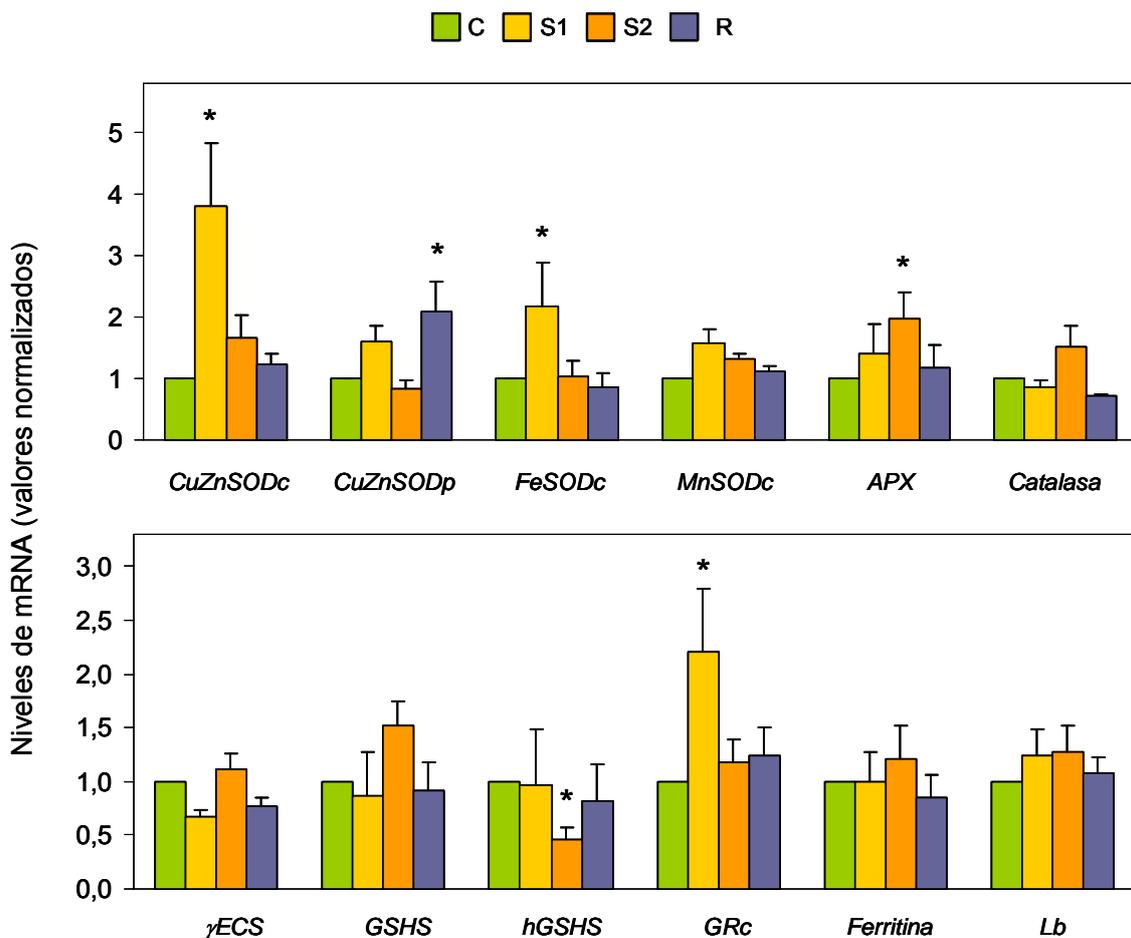


Figura 4.5. Niveles de mRNA que codifican enzimas antioxidantes y otras proteínas en nódulos de alfalfa en condiciones de estrés hídrico y recuperación. Los valores están normalizados con respecto a los de nódulos control, se expresan en unidades relativas y son medias \pm ES de 3-6 réplicas correspondientes a extracciones de RNA de plantas distintas.

Las bacterias de vida libre y los bacteroides de *S. meliloti* contienen dos isoformas de SOD y tres isoformas de catalasa (ver 1.4). La MnSOD (*sodA*) se encuentra en el citosol (Santos y cols, 1999), mientras que la CuZnSOD (*sodC*) se localiza en el periplasma (Ampe y cols, 2003). La catalasa A (*katA*) se expresa principalmente en los bacteroides, la catalasa B (*katB*) tanto en las bacterias de vida libre como en los bacteroides (Jamet y cols, 2003), y la catalasa C (*katC*) en los canales de infección. Cuando se inoculan raíces de alfalfa con mutantes de *S. meliloti* para cada gen *kat* se desarrollan nódulos con capacidad fijadora de N_2 debido probablemente a la expresión simultánea de al menos dos genes con actividad catalasa. Sin embargo, cuando las plantas se inoculan con dobles mutantes *katAkatC* y *katBkatC* tan sólo se desarrollan nódulos en el 75 y 45% de las raíces, respectivamente. El mutante *katAkatC*

presenta un descenso importante en el número de nódulos de 5 y 9 semanas, mientras que en los nódulos de mutantes *katBkatC* no se observan bacteroides a pesar de la presencia de abundantes canales de infección (Sigaud y cols, 1999; Jamet y cols, 2003).

En esta Tesis diseñamos cebadores específicos para la cuantificación por RT-PCRc de los mRNAs de las SODs y catalasas del bacteroide en condiciones de sequía y durante la posterior recuperación (**Tabla 3.3**). Los resultados mostraron un leve aumento del mRNA de *sodA* en S1 que retornó al nivel control en S2 e incluso descendió significativamente en R (**Fig. 4.6**). Sin embargo, la expresión de *sodC* no resultó afectada durante la sequía ni tampoco en la recuperación. Asimismo, la RT-PCRc nos permitió detectar y cuantificar los transcritos de las tres catalasas de los bacteroides. El mRNA de *katA* resultó ser mayoritario, unas 7 veces más abundante que el de *katB* y unas 100 veces más abundante que el de *katC*. Además, los tres genes *kat* se comportaron de modo diferente ante el estrés hídrico, si bien los cambios fueron leves. El nivel de mRNA de *katA* descendió significativamente en S2, el de *katB* aumentó en ambos tratamientos de sequía y recuperó el valor control en R, y el de *katC* se incrementó en S1 pero no en S2 (**Fig. 4.6**).

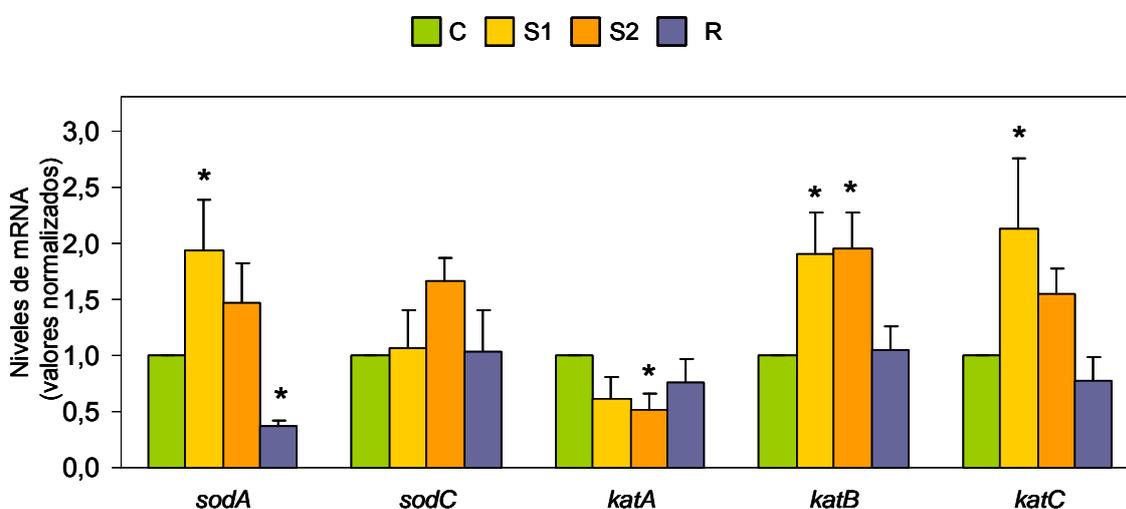


Figura. 4.6. Niveles de mRNA de las enzimas antioxidantes de los bacteroides de nódulos de alfalfa durante la sequía y subsiguiente recuperación. Los datos están normalizados con respecto a los de los bacteroides de nódulos control. Los valores son medias \pm ES de 3-6 réplicas correspondientes a extracciones de RNA de plantas distintas.

4.1.4. Concentración de metabolitos antioxidantes

Se utilizaron métodos enzimáticos y electroforesis capilar para determinar las concentraciones y el estado redox de los principales antioxidantes de bajo peso molecular en nódulos de alfalfa (**Fig. 4.7**). El contenido de ascorbato total (ascorbato + deshidroascorbato) en nódulos control fue de $6,3 \mu\text{mol g}^{-1}$ PS ($0,94 \mu\text{mol g}^{-1}$ PF), que se encuentra en el rango descrito para nódulos de otras leguminosas (Dalton y cols, 1986; Gogorcena y cols, 1997). El ascorbato descendió en S1 (-31%) y S2 (-59%), recuperándose un 74% respecto al control en los nódulos de las plantas R. El deshidroascorbato disminuyó (-30%) en S1 y S2, y retornó al nivel control en R. La proporción de deshidroascorbato respecto al ascorbato total fue un 14% en nódulos control y S1, aumentando hasta el 24% en S2 y R. Estos porcentajes son inferiores al rango 30-80% observado en nódulos de guisante en un estado de desarrollo comparable (Groten y cols, 2006).

Los nódulos de alfalfa maduros contienen aproximadamente dos terceras partes de GSH y una tercera parte de hGSH, siendo la concentración total de los tripéptidos 0,5-1 mM (Matamoros y cols, 1999b). Estos valores fueron verificados en esta Tesis. Así, pudimos determinar que los nódulos control contienen $4 \mu\text{mol g}^{-1}$ PS ($0,67 \mu\text{mol g}^{-1}$ PF) de GSH y $2,1 \mu\text{mol g}^{-1}$ PS ($0,32 \mu\text{mol g}^{-1}$ PF) de hGSH. Sin embargo, la sequía afectó de forma distinta a ambos tioles. Mientras que el GSH permaneció constante en S1 y S2 y descendió en R (-30%), el hGSH aumentó en S2 y R (+33%). Como consecuencia, la proporción de GSH disminuyó desde un 67% en los nódulos control al 52% en S2 y R. La proporción de las formas oxidadas de los dos tripéptidos permaneció prácticamente constante y muy baja (< 4%) durante el estrés hídrico y la subsiguiente recuperación.

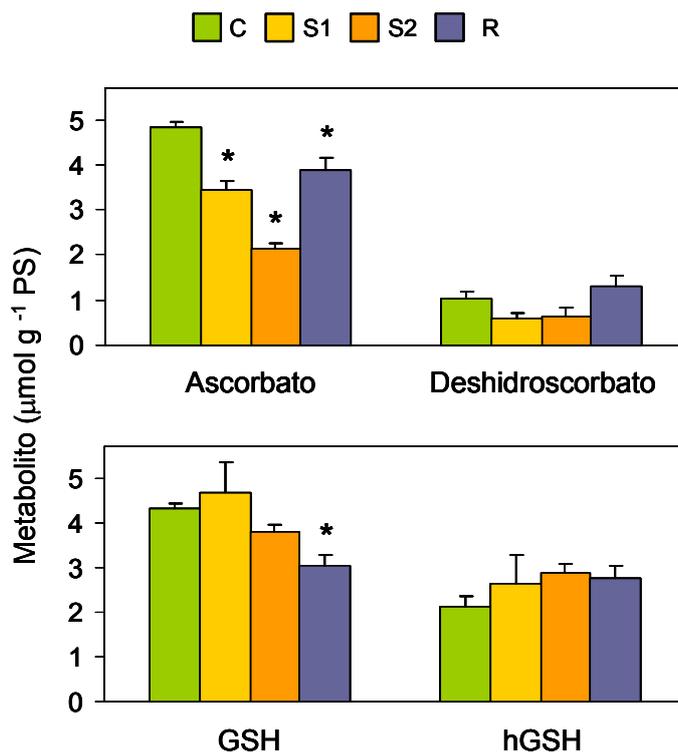


Figura 4.7. Contenido de metabolitos antioxidantes en nódulos de alfalfa durante la sequía y subsiguiente recuperación. Los valores son medias \pm ES de 4-7 réplicas de muestras de nódulos independientes.

4.1.5. Daño oxidativo a lípidos y proteínas

La acumulación de lípidos y proteínas dañados oxidativamente es un marcador de estrés oxidativo en células animales (Stadtman, 1992; Halliwell y Gutteridge, 2007) y vegetales (Iturbe-Ormaetxe y cols, 1998; Moller y cols, 2007). Para determinar si la sequía causa estrés oxidativo, se estimaron los niveles de peroxidación lipídica (MDA) y de proteínas oxidadas (grupos carbonilos totales) en los nódulos de alfalfa.

El MDA es uno de los productos principales de la peroxidación de los lípidos y reacciona con el TBA a pH ácido y en caliente formando el aducto $(\text{TBA})_2\text{-MDA}$. Este compuesto puede ser fácilmente cuantificado por HPLC con detector visible o de fluorescencia. La utilización del HPLC confiere una elevada especificidad a la técnica de determinación de MDA y es importante pues otros metabolitos pueden formar aductos inespecíficos con el TBA. En nuestro caso pudimos confirmar que el pico de HPLC correspondía al auténtico aducto $(\text{TBA})_2\text{-MDA}$ mediante coelución con estándar y por su espectro UV-visible obtenido con el detector de diodos. Los dos niveles de

estrés hídrico causaron un aumento importante (60-73%) del contenido de MDA de los nódulos y este aumento se mantuvo en las plantas R (**Fig. 4.8**).

El contenido de proteínas oxidadas y su perfil electroforético en los nódulos se determinó tras derivatizar los grupos carbonilo con 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH), utilizando un anticuerpo comercial que reconoce las correspondientes hidrazonas (**Fig. 4.9**). Se realizaron tres réplicas que nos permitieron estimar un incremento en las proteínas modificadas oxidativamente en S1 y S2. Sin embargo, a diferencia de lo encontrado en la peroxidación de lípidos, en las plantas R el patrón de proteínas oxidadas fue similar al control.

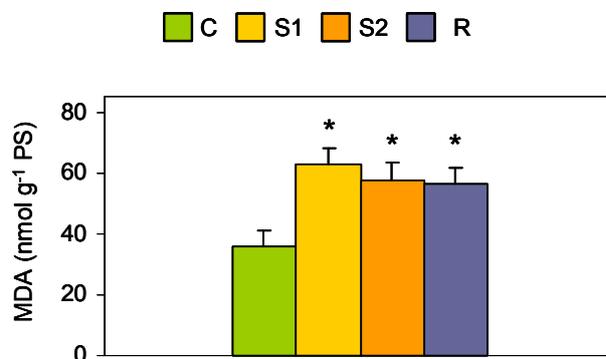


Figura 4.8. Daño oxidativo a lípidos en nódulos de alfalfa durante la sequía y posterior recuperación. Los valores son medias \pm ES de 5 réplicas.

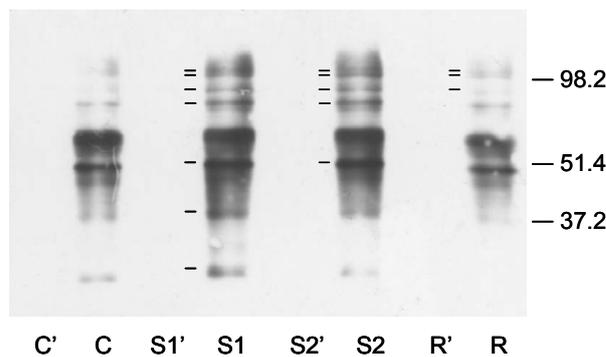


Figura 4.9. Detección de proteínas oxidadas en nódulos de alfalfa mediante derivatización de los grupos carbonilos con DNPH y análisis western con un anticuerpo comercial que reconoce las correspondientes hidrazonas. Los carriles C', S1', S2' y R' corresponden a los controles negativos de cada extracto (C, S1, S2 y R), en los que se ha omitido el paso de derivatización con DNPH. Se utilizaron geles con 10% de acrilamida y se cargaron 15 μ g de proteína de cada muestra. Los marcadores de peso molecular se muestran a la derecha y se indican con barras las proteínas con incremento de señal inmunoreactiva en los tratamientos S1, S2 y R respecto al control.

4.2. Genes y proteínas fitoquelatina sintasa de *Lotus japonicus*

4.2.1. Aislamiento de los genes *LjPCS1* y *LjPCS3* y expresión en levaduras

Se identificaron tres genes *PCS* de *Lotus* a partir del análisis de genotecas genómicas utilizando cebadores basados en la secuencia *PCS* de soja (*GmhPCS1*, AF411075). Se designaron *LjPCS1*, *LjPCS2* y *LjPCS3* y se cartografiaron (69 cM, cromosoma 1). Para establecer la estructura de los genes y demostrar que eran funcionales, se aisló RNA total de raíces y nódulos, y se sintetizaron los correspondientes cDNAs. Se identificaron cuatro tipos de mRNAs, uno para *LjPCS1* de 8 exones que se aisló de cDNA de raíz (*LjPCS1-8R*), dos de ellos codificados por el mismo gen (*LjPCS2-7R* y *LjPCS2-7N*), y otro correspondiente a *LjPCS3* de 7 exones obtenido a partir de cDNA de nódulo (*LjPCS3-7N*). El análisis filogenético de las proteínas *PCS* mostró que *LjPCS1-8R* (en adelante *LjPCS1*) presentaba una alta homología con la *PCS* de soja, mientras que las dos *LjPCS2* y *LjPCS3-7N* (en adelante *LjPCS3*) compartían una identidad del 90% entre ellas, pero sólo un 55% de homología con *LjPCS1* y otras *PCS* de plantas superiores (Ramos y cols, 2007). Una vez obtenidas las secuencias de los cuatro mRNAs de *LjPCS* se investigó si las correspondientes proteínas eran funcionales. Las secuencias teóricas de las cuatro proteínas contenían los tres aminoácidos esenciales para la actividad *PCS* (“triada catalítica”), Cys-56, His-162 y Asp-180 (Rea y cols, 2004; Ruotolo y cols, 2004). Sin embargo, *LjPCS2-7R*, *LjPCS2-7N* y *LjPCS3* carecían de 2 residuos de Cys (Cys-144 y Cys-378) que están conservados en todas las secuencias *PCS* descritas en plantas superiores. En un trabajo previo se demostró la actividad enzimática de *LjPCS1* mediante expresión en *E. coli*, tanto en extractos solubles de las bacterias como con la enzima purificada (Loscos y cols, 2006).

Como parte de esta Tesis se decidió caracterizar funcionalmente *LjPCS3*. Inicialmente se intentó expresar *LjPCS3* en *E. coli*, pero la proteína se encontraba mayoritariamente en los cuerpos de inclusión y sólo era detectable en los análisis western tras la extracción con urea. Por ello, se decidió expresar *LjPCS3* en levadura que, al ser un sistema heterólogo eucariota, podría resultar más ventajoso para la expresión de proteínas de planta (Clemens y cols, 1999). Tras introducir las secuencias de *LjPCS3* y *LjPCS1* (esta última como control) en el plásmido pYES2.1 TOPO TA, se transformaron células de levadura (ver 3.11.1). Sin embargo, el análisis western reveló de nuevo que sólo se detectaba la proteína *LjPCS3* al realizar los extractos con ácido

tricloroacético o urea. Se intentó eliminar gradualmente los agentes desnaturalizantes pero no se consiguió renaturalizar la proteína. Por este motivo se diseñó un ensayo *in vivo* de actividad PCS y demostrar así la funcionalidad de LjPCS3. En este estudio se incluyó LjPCS1 como control positivo.

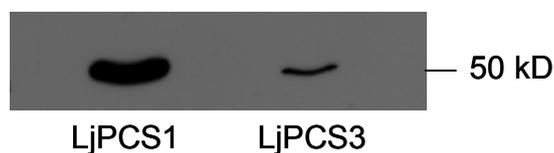


Figura. 4.10. Análisis western de LjPCS1 y LjPCS3 expresadas en levadura. Las células se rompieron, en presencia de ácido tricloroacético, por agitación con bolas de vidrio, y los extractos (25 μg de proteína) se cargaron en geles de poliacrilamida 10%. Las PCS se detectaron con un anticuerpo comercial diluido (1:3000) que reconoce la cola de poli-His. Se observa claramente una mayor abundancia de LjPCS1 respecto a LjPCS3.

4.2.2. Efecto de los medios de cultivo sin y con metales sobre la actividad fitoquelatina sintasa

Para ensayar la actividad LjPCS se precisaba un medio de cultivo de levadura con un contenido bajo en metales para evitar interferencias con la determinación de la actividad PCS. Se eligieron dos medios comerciales YNB (“yeast nitrogen base”), uno de ellos convencional (“+ metales”) y otro similar al anterior pero sin metales divalentes (“- metales”) (ver 3.11.1). En ambos medios se determinó la concentración de 69 elementos por espectroscopía de emisión atómica (ICP-AEO) y por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) (Tabla 4.3). Los dos medios contenían la misma concentración de Na, K, P, S y Mo, mientras que el medio “- metales” no contenía Ca, Fe, Cu, Mg, Mn y Zn. Se establecieron cultivos de levaduras, transformadas con *LjPCS1* y *LjPCS3*, que contenían $\approx 5\%$ del medio “+ metales” para que las levaduras pudieran crecer (ver 3.11.1).

Varios controles mostraron que incluso en ausencia de metal añadido al medio “+ metales” se detectaban cantidades considerables de $\text{PC}_2 + \text{PC}_3$: $200,2 \pm 13,1 \text{ nmol g}^{-1}$ PF para LjPCS1 y $608,7 \pm 31,1 \text{ nmol g}^{-1}$ PF para LjPCS3. En el medio “- metales” las cantidades de $\text{PC}_2 + \text{PC}_3$ fueron muy inferiores: $69,0 \pm 13,4$ y $132,9 \pm 18,5 \text{ nmol g}^{-1}$ PF para LjPCS1 y LjPCS3, respectivamente. Además, se detectó la presencia de un polipéptido derivado de la PC_2 en las levaduras crecidas en el medio “- metales” (Fig.

4.10). La mayor proporción de PCs en el medio “+ metales” se atribuyó a la presencia de Zn y otros metales que inducen la actividad PCS (Beck y cols, 2003; Loscos y cols, 2006). De acuerdo a estos resultados, se decidió utilizar el medio “- metales” para caracterizar la actividad PCS *in vivo* en presencia de diversos metales y metaloides.

Tabla 4.3. Contenido de algunos elementos en los medios YNB “+ metales” y “- metales”. Las cantidades de Na, P, S y K fueron prácticamente las mismas en ambos medios. Los valores se expresan en mg por gramo de medio. -, no detectable.

	Mg	Ca	Mn	Zn	Mo	Fe	Ba	Sr	Cu
YNB + metales	13,8	4,5	0,019	0,017	0,01	0,008	0,006	0,004	0,002
YNB - metales	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-

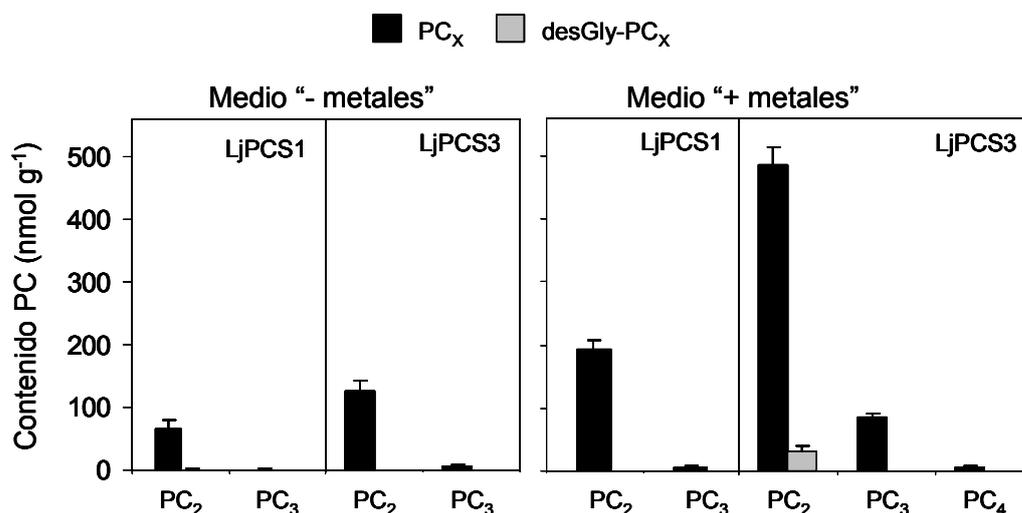


Figura 4.11. Comparación de la formación de PCs por LjPCS1 y LjPCS3 en células de levadura cultivadas en los medios YNB “+ metales” y “-metales”. Las levaduras crecieron a 30°C durante 20 h y se suplementaron con Gal 2% (para inducir la expresión de las proteínas) y GSH 2 mM (para optimizar la síntesis de PCs). Las células se incubaron durante 4 h en ausencia de metales. Los polipéptidos PC₂, PC₃ y PC₄ (negro) y los correspondientes derivados (gris) se analizaron por HPLC y derivatización post-columna. Los valores se expresan como nmol de PCs (equivalentes de GSH) por gramo de peso fresco y representan medias ± ES de 3-7 réplicas correspondientes a diferentes cultivos celulares.

A continuación, se investigó la tolerancia a Cd de las células de levadura en los dos medios (**Fig. 4.12**). Se suplementó el medio “- metales” sólido con un 5% de medio “+metales”. Las levaduras transformadas con cada LjPCS y con el plásmido vacío crecieron rápidamente en el medio “+ metales” en ausencia de Cd. Sin embargo, en

presencia de Cd 200 μM sólo las levaduras que expresaban LjPCS1 o LjPCS3 pudieron crecer en ambos medios, aunque a una velocidad ostensiblemente inferior en el medio “- metales”. Para confirmar estos resultados, las células de levadura crecieron en dos medios líquidos, “+ metales” o “- metales” suplementado con Ca y Mg, y en presencia de CdCl₂ 100 μM (ver 3.11.1). Las células que expresaban cualquiera de las dos LjPCS eran más tolerantes a Cd en el medio “+ metales”.

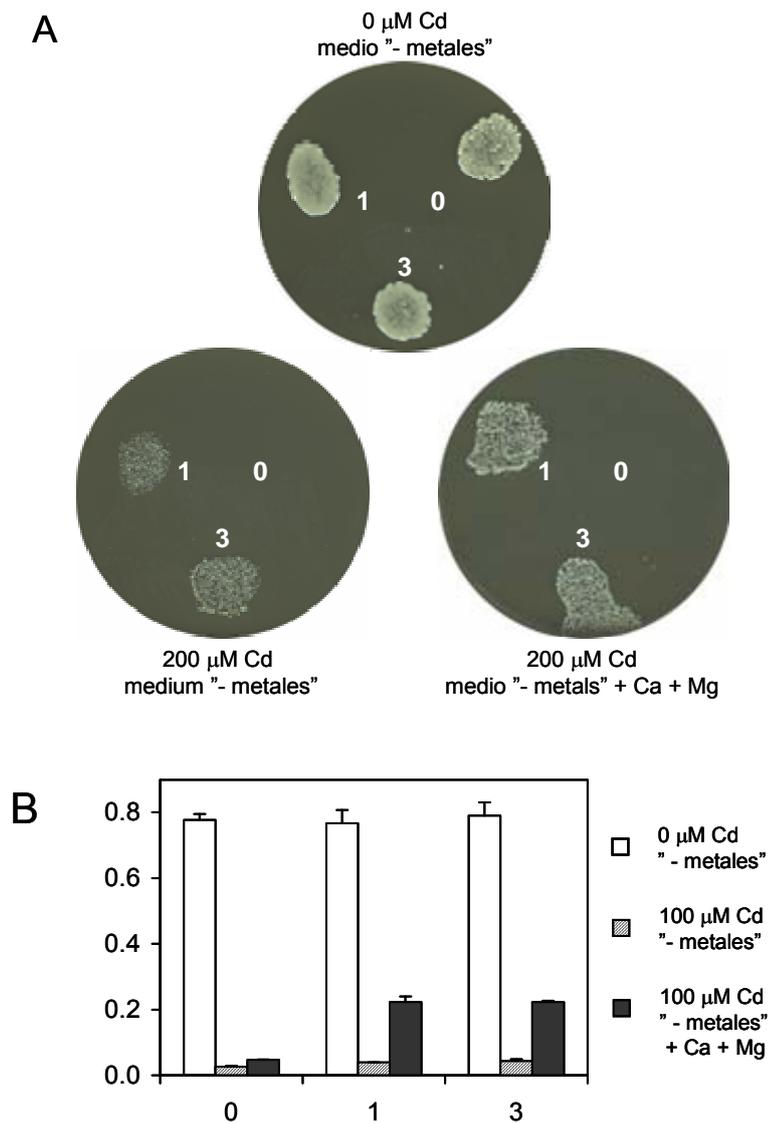


Figura. 4.12. Ensayo de la tolerancia a metales de levaduras transformadas con el plásmido vacío (0) o con las construcciones LjPCS1 (1) y LjPCS3 (3) en medio sólido (A) y en medio líquido (B). Las células crecieron a 30 °C en el medio “- metales” y se suplementaron con el 5% del medio “+ metales” y, donde se indica, CdCl₂ 100 ó 200 μM , 0,11 mM de Ca, y 0,57 mM de Mg. El crecimiento de las levaduras se siguió durante 48 h en el medio sólido y 24 h en medio líquido.

4.2.3. Síntesis de fitoquelatinas en levaduras

La levadura *S. cerevisiae* no contiene ningún gen *PCS* (Mewes y cols, 1997; Clemens y cols, 1999). Se analizaron por HPLC extractos de cultivos de levadura, transformadas con el plásmido pYES2.1 TOPO TA sin inserto, que habían sido inducidos 4 h con Gal 2% en ausencia de metal o con CdCl_2 50 μM . En presencia de Cd se detectaron 25 nmol g^{-1} , mientras que en ausencia de metales la levadura no fue capaz de sintetizar PCs. Por tanto, las células de *S. cerevisiae* pueden sintetizar PCs por un mecanismo alternativo a PCS, pero que también requiere la presencia de metales. Recientemente, estudios con mutantes han demostrado que las PCs podrían ser sintetizadas por una serina-carboxipeptidasa localizada en las vacuolas de las levaduras (Wünschmann y cols, 2007). Por otro lado, los controles con las levaduras que expresaban LjPCS1 y LjPCS3 en ausencia de Gal y metal no produjeron PCs. Sin embargo, en ausencia de Gal pero con CdCl_2 50 μM durante 4 h, se detectó una producción considerable de PCs por parte de la LjPCS1 (1103 nmol g^{-1}) y muy inferior por parte de la LjPCS3 (37 nmol g^{-1}), lo que indica un “escape” significativo de expresión, especialmente de la proteína LjPCS1.

4.2.4. Actividades fitoquelatina sintasa de LjPCS1 y LjPCS3

Una vez comprobada la idoneidad del medio “- metales” para ensayar la actividad PCS *in vivo*, se ensayó la capacidad de síntesis de PCs con una serie de metales y metaloides. Se ensayó la actividad con micronutrientes de la planta (Zn, Cu, Fe) y con elementos químicos que pueden estar presentes en el suelo y que tienen efectos fitotóxicos (Cd, Pb, As, Hg, Al). La primera observación destacable fue la detección de unos polipéptidos tiólicos, relacionados estructuralmente con las PCs, que se inducían en presencia de As y, aunque en menor proporción, con otros metales. Se consideró que estos compuestos eran derivados de las PCs porque se detectaban por derivatización postcolumna con DTNB a 412 nm y porque eluían inmediatamente después de las PC_2 y PC_3 (**Fig. 4.13**).

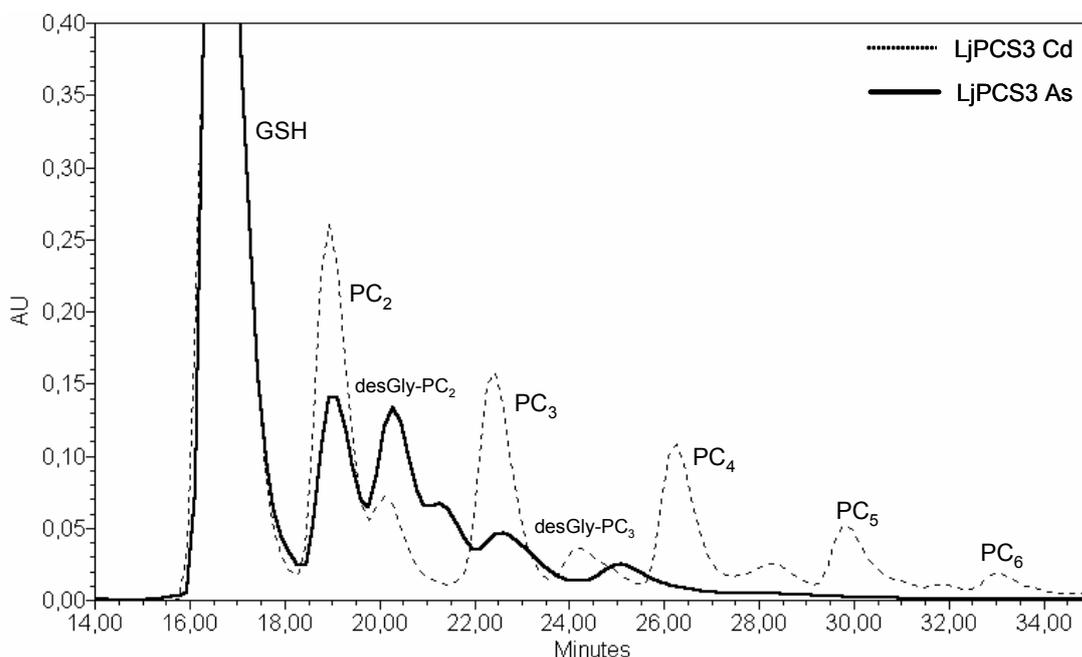


Figura 4.13. Cromatogramas de HPLC con derivatización post-columna en presencia de DTNB y detección a 412 nm. Se muestran las PCs y desGly-PCs detectadas tras la inducción de la actividad LjPCS3 por Cd 50 μM (línea discontinua) y As 200 μM (línea continua).

Las PCs desconocidas se purificaron por HPLC tras ser derivatizadas con MBB y se analizaron por MS. El análisis por FT-ICR (espectrometría de masas de alta resolución por transformada de Fourier) y por nESI-IT MS/MS (“nano-electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry”) reveló que el polipéptido que eluía después de PC₂ tenía una masa molecular de 863,2720 ($\text{C}_{36}\text{H}_{47}\text{N}_8\text{O}_{13}\text{S}_2$ tiene una masa molecular teórica de 863,2710) y una estructura química idéntica a una molécula de PC₂ sin la Gly C-terminal (desGly-PC₂). Las identidades de los dos polipéptidos se confirmaron por coelución con estándares de desGly-PC₂ y desGly-PC₃ y derivatización post-columna con DTNB en el HPLC (**Fig. 4.14**).

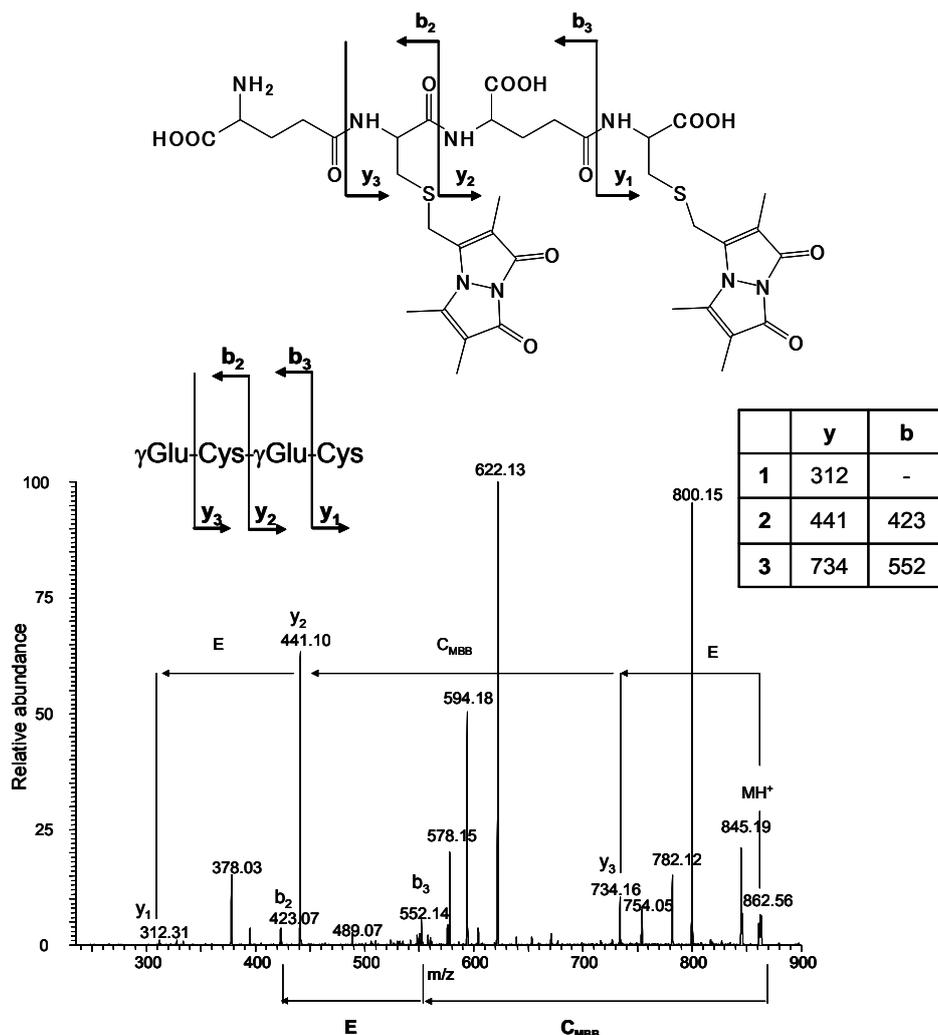
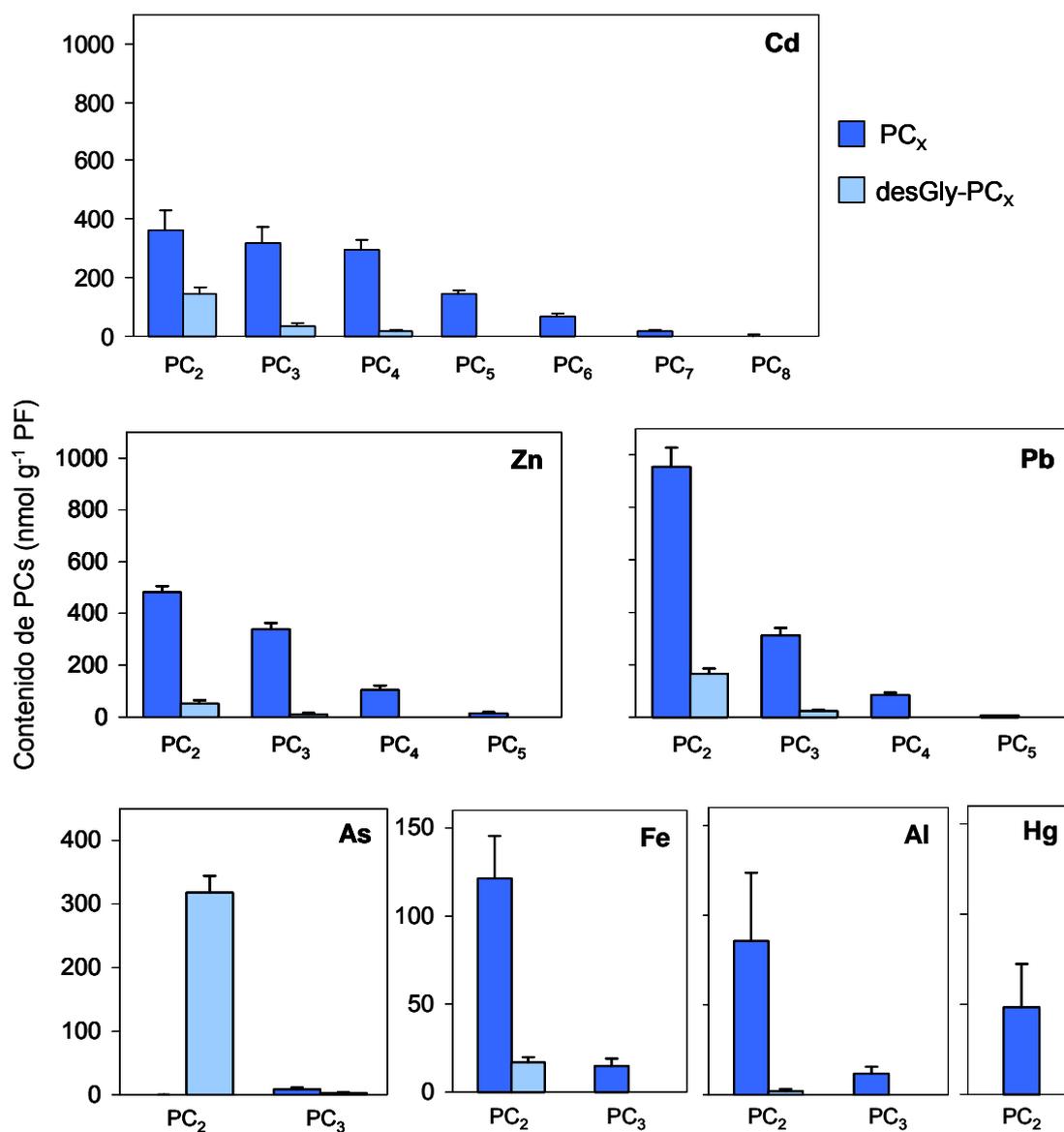


Figura 4.14. Identificación por MS del polipéptido desGly-PC₂ como el principal compuesto sintetizado por LjPCS1 en respuesta a As. El polipéptido se derivatizó con MBB, se purificó por HPLC y el derivado se secuenció en un espectrómetro de masas con trampa de iones acoplado a una fuente de nanospray. El espectro MS/MS con un m/z 863 muestra casi todos los iones de las series b e y con una sola carga, lo que permitió su asignación inequívoca. El mismo espectro de masas se obtuvo para los polipéptidos menos abundantes aislados de LjPCS3 en presencia de As y Zn, así como para el estándar desGly-PC₂

Todos los metales excepto el Cu fueron capaces de activar, aunque en diferente medida, a LjPCS1 y LjPCS3 en células de levadura intactas (ver 3.11.2). Las determinaciones de PCs con cada metal se representan en las Figuras 4.15 para LjPCS1 y 4.16 para LjPCS3. Los cantidades de PCs se corrigieron con los valores de PC₂, PC₃ y desGly-PC₂ obtenidos en ausencia de metal. Las diferencias más relevantes entre la actividad de las dos proteínas se pueden resumir como sigue. (i) Los niveles más altos de PCs se alcanzaron con Cd y Pb para LjPCS1 y con Zn para LjPCS3. Las PCs de mayor longitud se detectaron en presencia de Cd; en las condiciones descritas, se detectó hasta PC₈ con LjPCS1 y hasta PC₆ con LjPCS3. (ii) El As activó de forma más pronunciada la LjPCS3. Además, para la LjPCS1 se

detectó principalmente desGly-PC₂, muy poca PC₃ y desGly-PC₃, y nada de PC₂. (iii) Fe y Al inducen la síntesis de PCs en las levaduras transformadas con ambas PCS, pero la activación de LjPCS3 es significativamente mayor. Debido a la novedad y posible relevancia fisiológica de estos últimos resultados se llevaron a cabo experimentos adicionales para confirmarlos (ver 4.2.5).



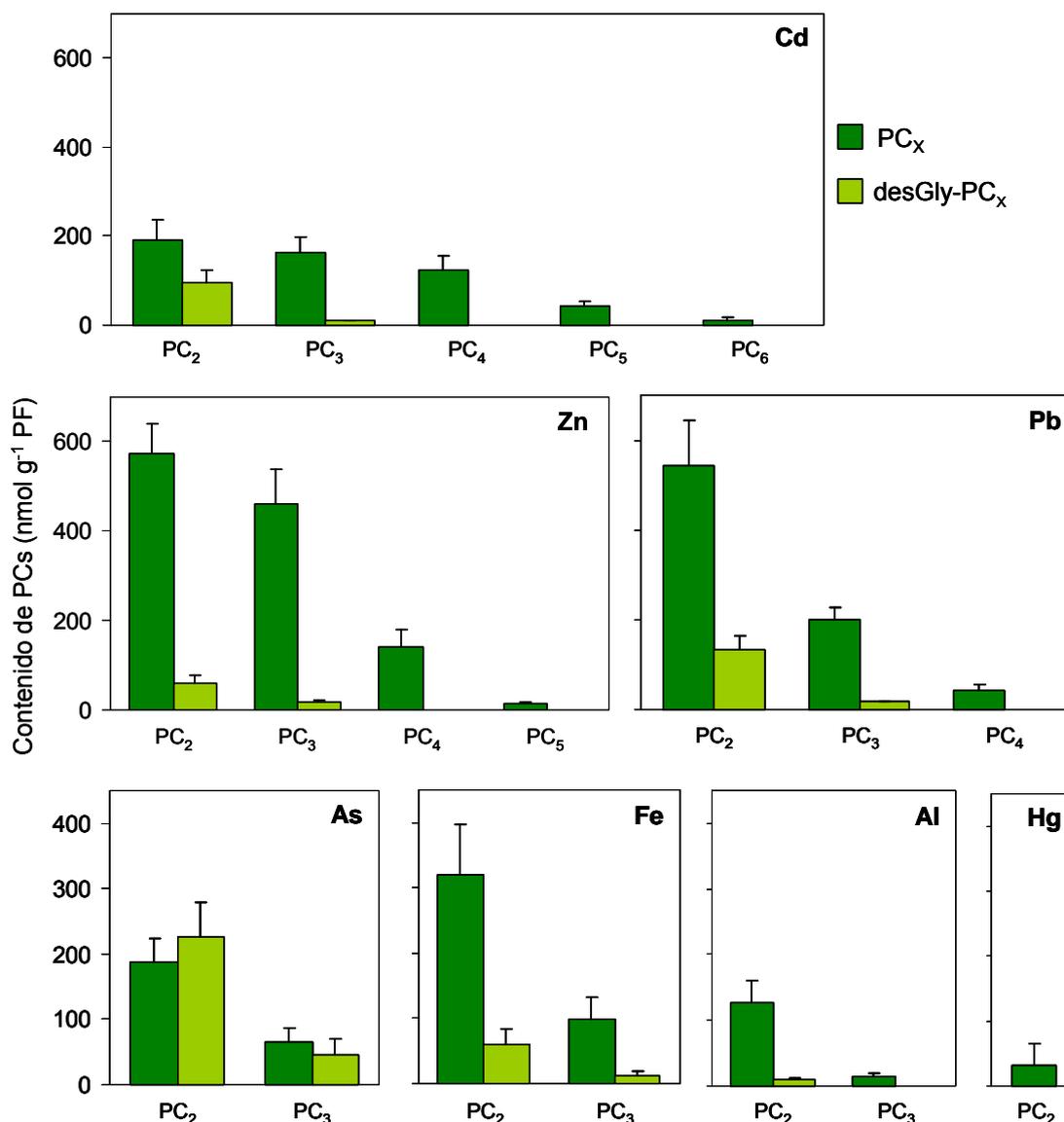


Figura 4.16. Síntesis de PCs por la LjPCS3 al ser expresada en células de levaduras expuestas a distintos metales y As. Los polipéptidos PC_x (verde oscuro) y sus derivados correspondientes desGly-PC_x (verde claro) se cuantificaron por HPLC y derivatización post-columna con DTNB. Los valores se expresan en nmol de PCs (equivalentes de GSH) por gramo de peso fresco y representan medias ± ES de 3-6 réplicas correspondientes a diferentes cultivos celulares.

Para comparar las cantidades totales de PCs y desGly-PCs producidas por LjPCS1 y LjPCS3 se normalizaron los valores obtenidos con los diferentes metales con respecto a aquellos cuantificados con Cd, considerando que este metal activa de forma similar a ambas proteínas (**Fig. 4.17**). Los resultados de la comparación de los datos normalizados confirman una mayor activación de LjPCS3 con Zn, As, Fe y Al, respecto a LjPCS1. Ambas enzimas presentan el mismo nivel relativo de activación con Pb y el mínimo con Hg.

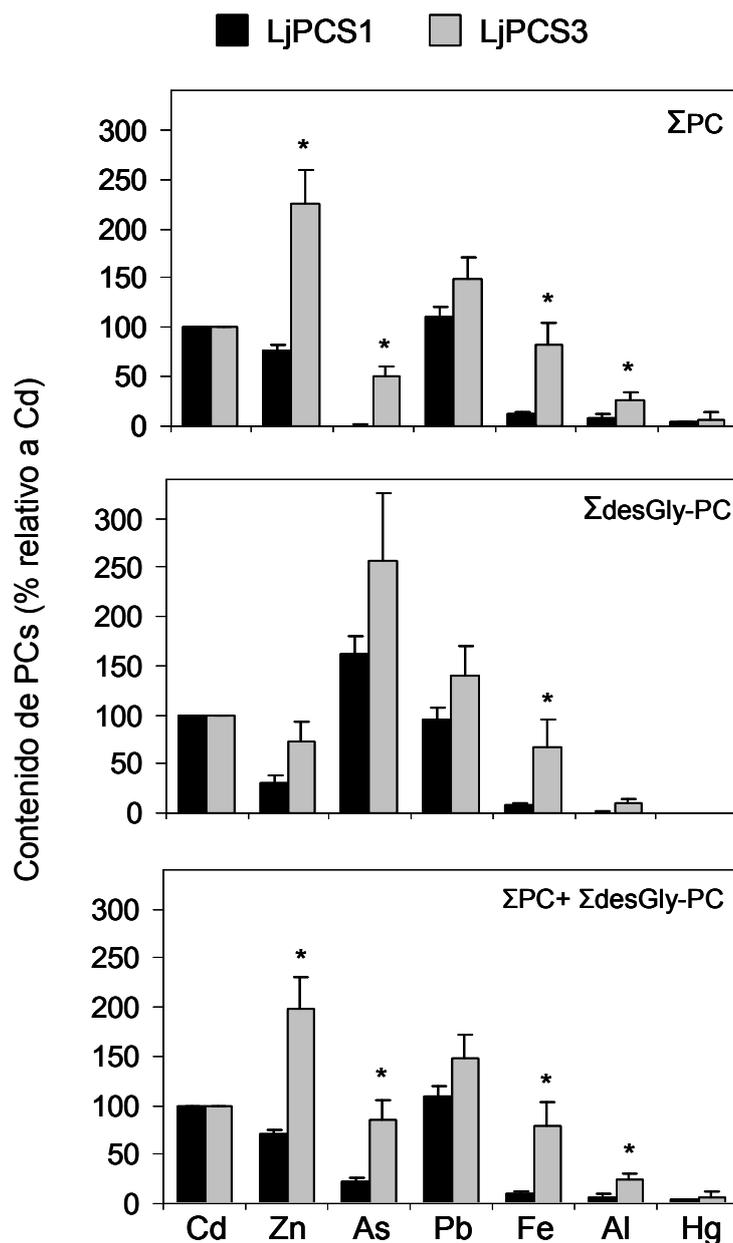


Figura 4.17. Comparación de la producción total de PCs por LjPCS1 (negro) y LjPCS3 (gris) expresadas en células de levadura expuestas a metales y As. Los datos corresponden a la suma de los polipéptidos individuales representados en las **Figuras 4.15** y **4.16**, y se muestran el total de PCs (Σ PC) y desGly-PCs (Σ desGly-PCs), así como la suma de ambos, normalizados respecto a los valores obtenidos con Cd. Los datos son medias \pm ES de 3-6 réplicas correspondientes a diferentes cultivos de células de levadura. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las medias de LjPCS1 y LjPCS3.

4.2.5. Activación de LjPCS1 y LjPCS3 por Fe y Al

El Fe es un micronutriente esencial para las plantas (Mengel y Kirkby, 2001) pero puede catalizar reacciones tipo Fenton que generan radical \cdot OH (ver **1.2.1**), mientras que el Al es un elemento no esencial con efectos inhibitorios sobre el crecimiento de la raíz

(Doncheva y cols, 2005). A pesar de los efectos tóxicos de estos dos metales no se había detectado síntesis de PCs *in vivo* (Grill y cols, 1986) o *in vitro* (Grill y cols, 1989; Oven y cols, 2002b) en presencia de Fe o Al. Sin embargo, recientemente nuestro grupo demostró que el Fe es capaz de activar a las proteínas LjPCS1 y AtPCS1 purificadas (Loscos y cols, 2006). Para demostrar que la actividad PCS detectada se debía a la presencia de Fe y Al, en este trabajo de Tesis se diseñaron dos estrategias. Primero, se realizaron medidas de actividad PCS en presencia de quelantes para ambos metales. Se utilizaron desferrioxamina (DFO), un quelante con alta especificidad por el Fe^{3+} (Gower y cols, 1989), y ácido etilendiamino di(*o*-hidroxifenil acético) (EDDHA), un quelante más específico del Al^{3+} (Rajan y cols, 1981). Los datos se representan como porcentaje de actividad residual respecto a un control que no contiene el quelante pero sí el metal (**Fig. 4.18**). El efecto de los compuestos quelantes sobre la actividad PCS puso de manifiesto importantes diferencias entre las dos proteínas. Las actividades LjPCS1 y LjPCS3 se redujeron un 69% y 46%, respectivamente en presencia de Fe+DFO, y un 71% y 22% en presencia de Al+EDDHA. La actividad LjPCS1 no resultó afectada en presencia de Cd+DFO o Cd+EDDHA, como era previsible, mientras que LjPCS3 descendió un 48% con Cd+DFO y un 14% Cd+EDDHA. Además, se demostró que la DFO no tenía ningún efecto sobre el Al ya que no se inhibía la actividad LjPCS3 inducida por Al.

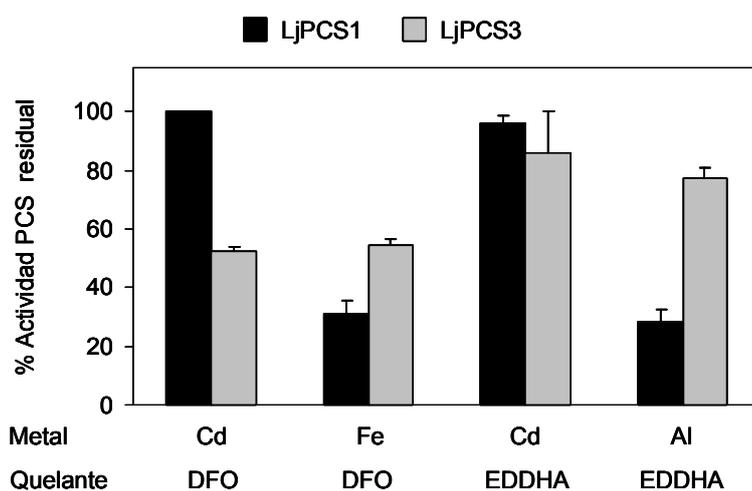


Figura 4.18. Efecto de los compuestos quelantes en las actividades LjPCS1 (negro) y LjPCS3 (gris). El protocolo para el crecimiento de las levaduras fue el mismo que para la **Figura 4.11**, excepto que las células se incubaron durante 4 h con Cd 50 μM , Fe 50 μM o Al 200 μM , en presencia o ausencia de DFO 500 μM o EDDHA 200 μM . El metal y el quelante se incubaron \approx 30 min antes de ser añadidos a los cultivos. Los valores se expresan en nmol de PCs producidos (equivalentes de GSH) por gramo de peso fresco y representan medias \pm ES de 2 réplicas correspondientes a diferentes cultivos de células.

La segunda estrategia fue la purificación por HPLC de los polipéptidos producidos por ambas enzimas expuestas a Fe o Al. Se derivatizaron con iodoacetamida en presencia de ditioneitol como reductor (ver 3.11.5) y se analizaron por nESI-IT MS/MS. Los patrones de fragmentación (MS^n) fueron idénticos a los de la PC_2 estándar (Fig. 4.19).

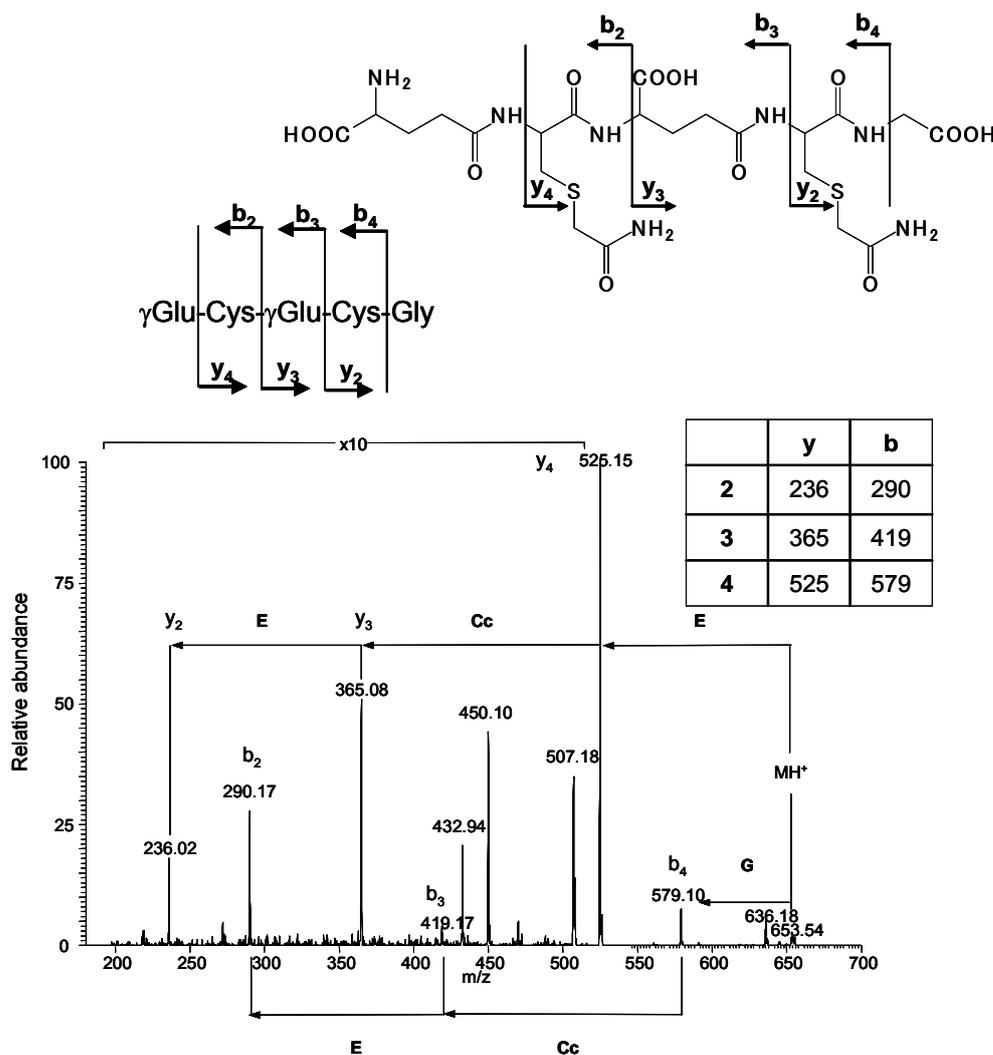


Figura 4.19. Identificación por MS del polipéptido PC_2 sintetizado por LjPCS3 en respuesta a Fe. El polipéptido se purificó con HPLC, se trató con ditioneitol y se derivatizó con iodoacetamida (ver 3.11.5). El derivado se secuenció en un espectrómetro de masas con trampa de iones acoplado a una fuente de nanospray. El espectro MS/MS muestra casi todos los iones de las series b e y con una sola carga, lo que permitió su asignación inequívoca. El mismo espectro de masas se obtuvo para el polipéptido producido por LjPCS3 en presencia de Al.

4.2.6. Actividad fitoquelatina sintasa *in vitro* en presencia de Cu

Dado que el Cu sí que activaba las enzimas purificadas LjPCS1 (Loscos y cols, 2006), AtPCS1 (Vatamaniuk y cols, 2000; Oven y cols, 2002a; Beck y cols, 2003) y GmPCS1 (Oven y cols, 2002b), resultó sorprendente que este metal fuera incapaz de activar la LjPCS1 y LjPCS3 expresadas en células de levadura. Se decidió entonces ensayar la actividad PCS en extractos de levaduras rotas (ver 3.11.3), en presencia de GSH+Cu o GSH+Cd (este último como control positivo). Se optó por una concentración menor de Cu respecto a Cd porque en presencia de Cu 500 μM la actividad de LjPCS3 era muy baja. La actividad PCS en presencia de Cd fue muy superior para LjPCS1 ($3556,3 \pm 932,7 \text{ nmol g}^{-1}$) que para LjPCS3 ($395,3 \pm 232,1 \text{ nmol g}^{-1}$). Sin embargo, la actividad inducida por Cu era muy parecida para ambas PCS y se situó en torno a 1500 nmol g^{-1} PCs totales (Fig. 4.20). Se observó producción de PC_2 y PC_3 para ambas actividades y para los dos metales, aunque no se detectaron desGly- PC_n . Los resultados indicaron que el Cu activa a las dos PCS en extractos de levaduras rotas y que es un mejor activador de LjPCS3 que el Cd, y nos permitieron concluir que el Cu no puede acceder a la enzima en las levaduras intactas. Puesto que existen dos transportadores de alta afinidad para el Cu, Ctr1 y Ctr3, en las células de *S. cerevisiae* (Peña y cols, 2000), el metal debería haber entrado durante las 4 h del ensayo *in vivo*, como ocurre con el resto de metales. Para descartar que el Cu no hubiese entrado en las células de levadura, éstas se rompieron tras haber sido incubadas 4 h con CuCl_2 100 μM . El contenido de Cu en estas células rotas fue $0,084 \pm 0,013 \mu\text{g mg}^{-1}$ de peso fresco, mientras que no se pudo detectar Cu ($<0,002 \mu\text{g mg}^{-1}$ de peso fresco) en los dos tipos de control (sin Cu añadido o con Cu añadido y eliminado por lavado de las células inmediatamente tras su adición). Por tanto, el metal es incorporado por las células de levadura y éstas deben disponer de un mecanismo alternativo de desintoxicación del Cu (ver 5.2).

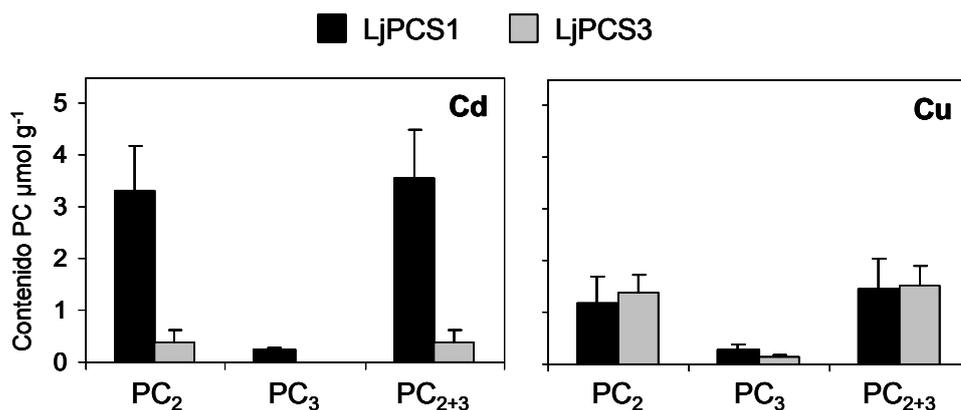


Figura 4.20. Actividad PCS *in vitro* de la LjPCS1 (negro) y LjPCS3 (gris) en presencia de Cd o Cu. Las células crecieron a 30°C durante 20 h, se añadió Gal 2%, y las células se rompieron con bolas de vidrio en un medio de ensayo óptimo para la actividad PCS que contenía Cd 500 μ M o Cu 100 μ M. Los valores se expresan en nmol de PCs producidos (equivalentes de GSH) por gramo de peso fresco y representan medias \pm ES de 2-4 réplicas correspondientes a diferentes cultivos de células de levadura.

4.3. Transcriptoma de raíces de Lotus tratadas con Cd

Tras realizar las hibridaciones de los cDNAs correspondientes a las raíces control y tratadas con Cd 100 μ M durante 1 ó 4 d se llevó a cabo un análisis bioinformático consistente en la cuantificación de la intensidad de la señal de cada spot, el análisis estadístico de las réplicas biológicas y técnicas, y el cálculo de los cocientes (R) entre las intensidades de señal de cada gen en el control y en cada tratamiento. El criterio de significación considerado fue el utilizado generalmente en los análisis de arrays de cDNA (ver 4.1.1). De este modo se obtuvieron 21 genes con mayor expresión y 95 con menor expresión tras 1 d de tratamiento con Cd, y 79 genes con mayor expresión y 81 genes con menor expresión tras 4 días de tratamiento con Cd. La identificación de los genes se realizó mediante comparación de las secuencias en la base de datos de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. De los 79 genes inducidos en el tratamiento de 4 días con Cd (Fig. 4.21), 26 no mostraron homología (33%), 26 (33%) carecían de función conocida, 11 (14%) estaban implicados en metabolismo, 5 (6%) en señalización, 4 (5%) participaban en la transcripción y 3 (4%) en transporte. Además, se encontraron dos genes (3%) que codificaban oxidorreductasas, un gen codificante de una posible proteína vacuolar y un gen implicado en la síntesis de proteínas.

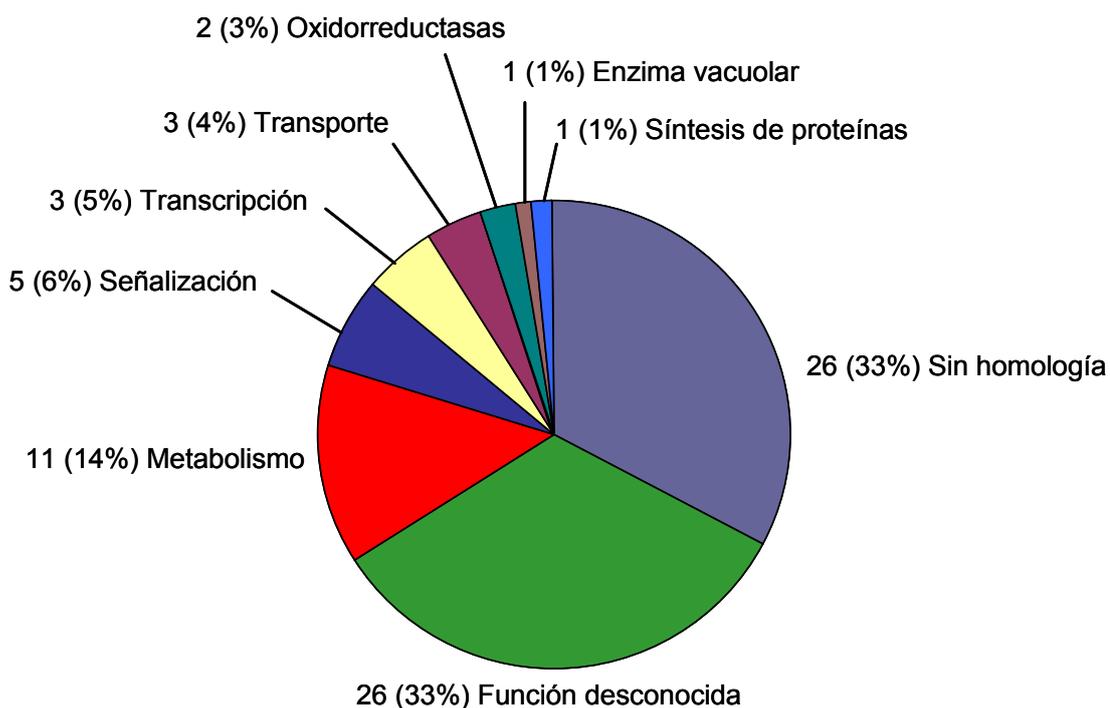


Figura 4.21. Diagrama de las categorías funcionales de los 79 genes que se inducen en raíces de Lotus tras ser expuestas a CdCl_2 100 μM durante 4 d.

En la **Tabla 4.4** se indican los genes que presentaban mayor inducción ($2,1 < R < 18,8$; $P < 0,01$) tras el tratamiento con Cd durante 1 y 4 días. De esos 7 genes ($R > 2$, $P < 0,01$), dos codifican proteínas posiblemente implicadas en la transcripción. El primero (BP069759) con un $R=16,2$ y $18,8$ tras 1 y 4 días con Cd, respectivamente, presentaba similitud con una proteína con un motivo de unión a AG, mientras que el otro gen (AB092677) codifica una proteína reguladora de la transcripción de la familia bZIP. También se ha identificado una posible proteína de membrana (BP069543) y otra con cierta similitud a una 8-amino-7-oxononanoato sintasa (BP070259). Entre los genes restantes, dos de ellos (BP069620 y BP069061) codificaban proteínas con similitud con proteínas de Arabidopsis sin función conocida, y para la última EST (BP072423) no se encontró homología.

Tabla 4.4. Genes inducidos por el tratamiento con Cd 100 μ M durante 1 y 4 días. La identificación tentativa se realizó con el programa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Clon	EST	TC	R 4 d ^a	P 4 d	R 1 d ^b	P 1 d	Identificación tentativa
GNf033c10	BP069759	TC9934	18,8	0,014	16,2	0,042	similar a UPI BAC98494 (BAC98494) proteína-4 con motivo de unión a AG
GNf030d11	BP069543	TC18645	8,1	0,006	5,7	0,042	UPI O52080 (O52080) precursor de una proteína exterior de membrana parcial (7%)
GNf039g04	BP070259	TC16157	7,1	0,050	6,8	0,052	debilmente similar a UPI Q8GW43 (Q8GW43) una posible 8-amino-7-oxonanoato sintasa
GNf031d10	BP069620	TC16969	6,7	0,017	5,5	0,037	similar a GBI AAO29976 proteína desconocida de Arabidopsis
GNf020a07	AB092677		3,9	0,007	3,3	0,044	proteína bZIP con un motivo "Ring-finger" de Lotus
GNf023g07	BP069061	TC19328	2,8	0,006	2,5	0,055	similar a UPI O48525 (O48525) At2g42180 proteína parcial 30% 73.53ID%
GNf068b02	BP072423		2,1	0,053	2,4	0,021	sin homología

^a Cociente entre la intensidad de señal de cada gen en el tratamiento con Cd 4 d y el control ($P < 0,01$).

^b Cociente entre la intensidad de señal de cada gen en el tratamiento con Cd 1 d y el control ($P < 0,01$).

4.4. Proteoma de nódulos de alfalfa en condiciones de estrés hídrico y salino

Se establecieron los tratamientos a partir de plantas de alfalfa noduladas y crecidas hasta el final del periodo vegetativo. El estrés hídrico fue equivalente al estadio S2 descrito en 4.1 y el estrés salino consistió en el tratamiento de las plantas con NaCl 150 mM durante 14 d, alternando con riegos de solución nutritiva. Se realizaron las extracciones de proteína total (ver 3.6) con tres o cuatro muestras de nódulos por cada tratamiento y se separaron las proteínas en geles 2D. De este modo las muestras contenían tanto las proteínas de la fracción vegetal como del bacteroide. Las proteínas se intentaron identificar primero por MALDI-TOF y aquéllas que no dieron resultado positivo se analizaron por LC-ESI-MS/MS, lo que permitió la secuenciación de los péptidos por fragmentación. La lista de los picos correspondientes a las masas de los péptidos para identificar se analizaron con la base de datos NCBI y el programa MASCOT (Matrix Science; London, RU; <http://www.matrixscience.com>). Por tanto, entre las proteínas identificadas se encontraron homologías con proteínas de alfalfa y otras plantas, y también con las proteínas de *S. meliloti* (Shevchenko y cols, 1996; Encarnación y cols, 2003).

A pesar de que se seleccionaron 42 proteínas (“spots”), tan sólo se pudieron identificar 14 de ellas cuya expresión en condiciones de estrés difería significativamente respecto al control. En las **Tablas 4.5 y 4.6** se resumen las proteínas analizadas con sus coordenadas en el gel 2D (M_r y pI), así como la técnica de MS utilizada, la valoración (“score”), la M_r teórica y el número de péptidos identificados. Respecto a las proteínas inducidas en ambos tipos de estrés se identificaron dos proteínas de membrana de *S. meliloti* y una proteína de alfalfa activada por ABA (T09670). En estrés salino se inducían tres proteínas con homología a una fosfopiruvato hidratasa (glicolisis) y una triosa fosfato isomerasa (glicolisis) de *S. cerevisiae*, y a una gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa (ciclo de Calvin) de *Petroselinum crispum*. Se observó un cambio de posición en el gel de una proteína en sequía respecto al control, dicha proteína presentaba una elevada homología con las fosfoglicerato kinasas de guisante y *Arabidopsis*, pero no se pudo demostrar si presentaba modificaciones postraduccionales (**Tabla 4.5**).

Se identificaron tres proteínas que eran más abundantes en el control que en los dos tratamientos de estrés: una aconitato hidratasa, una proteína S1 ribosomal de la

unidad 30S y la Fe-proteína del complejo nitrogenasa, todas ellas de *S. meliloti*. Entre las proteínas con menor expresión en el estrés hídrico se identificaron dos proteínas de *S. meliloti* (CAC46026 y CAC41692). Otra proteína con menor abundancia en estrés salino se identificó como una subunidad α de una probable ATP sintasa de *S. meliloti* (**Tabla 4.6**).

Tabla 4.5. Proteínas con mayor expresión en condiciones de estrés hídrico (S) y/o salino (NaCl).

Tratamiento	M _r	pI	Técnica	Score	M _r teórica	Número de péptidos	Organismo	Proteína ^a
S, NaCl	38,7	6,75	MALDI-TOF	85	34,8	8	<i>M. sativa</i>	Proteína activada por ABA (T09670)
S, NaCl	51,2	4,82	ESI-MS/MS	36	66,2	5	<i>S. melloti</i>	Probable proteína transmembrana interior
S, NaCl	33,9	4,89	MALDI-TOF	105	31,4	11	<i>S. melloti</i>	Probable proteína transmembrana exterior
NaCl	26,8	5,77	MALDI-TOF	36	26,6	5	<i>S. cerevisiae</i>	Triosa-fosfato isomerasa
NaCl	38,6	6,28	ESI-MS/MS	91	36,5	6	<i>P. crispum</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
NaCl	51,0	6,16	ESI-MS/MS	329	46,8	9	<i>S. cerevisiae</i>	Fosfopiruvato hidratasa
S	43,2	5,69	MALDI-TOF	127	42,3	12	<i>P. sativum</i>	Fosfoglicerato kinasa citosólica
C	43,4	5,55	ESI-MS/MS	55	50,2	2	<i>A. thaliana</i>	Fosfoglicerato kinasa

^a Identidad más probable de acuerdo con la base de datos NCBInr y el programa de búsqueda MASCOT (Matrix Science; London, RU; <http://www.matrixscience.com>)

Tabla 4.6. Proteínas con menor expresión en condiciones de estrés hídrico (S) y/o salino (NaCl).

Tratamiento	M _r	pI	Técnica	Score	M _r teórica	Número de péptidos	Organismo	Proteína ^a
S,NaCl	75,2	5,06	MALDI-TOF	85	97,3	6	<i>S. meliloti</i>	Probable aconitato hidratasa
S,NaCl	62,8	4,92	MALDI-TOF	133	62,6	10	<i>S. meliloti</i>	30S Proteína ribosomal S1
S	53,1	6,08	ESI-MS/MS	159	46,2	4	<i>S. meliloti</i>	Proteína hipotética (CAC46026)
S	45,9	5,50	ESI-MS/MS	191	32,3	7	<i>S. meliloti</i>	Fe-proteína nitrogenasa (A95318)
S	60,4	5,10	ESI-MS/MS	109	62,6	2	<i>S. meliloti</i>	Proteína hipotética (CAC41692)
NaCl	52,3	6,79	ESI-MS/MS	332	54,7	7	<i>S. meliloti</i>	Probable cadena α ATP sintasa
NaCl	34,4	5,66	ESI-MS/MS	449	32,3	13	<i>S. meliloti</i>	Fe- proteína nitrogenasa (A95318)

^a Identidad más probable de acuerdo con la base de datos NCBInr y el programa de búsqueda MASCOT (Matrix Science; London, RU; <http://www.matrixscience.com>)

5. DISCUSIÓN

5.1. Efecto del estrés hídrico sobre la fijación de nitrógeno y el metabolismo de los nódulos de alfalfa

Inhibición de la fijación de nitrógeno durante el estrés hídrico

La alfalfa fue elegida para realizar este estudio por ser una leguminosa forrajera de gran interés agronómico y por mostrar una tolerancia al estrés hídrico superior al de otras especies como el guisante (Moran y cols, 1994) y soja (Sinclair y Serraj, 1995). Los resultados del estudio del metabolismo del C y del N en nódulos de alfalfa sometidos a dos intensidades de estrés hídrico demuestran que en la sequía moderada el descenso de la nitrogenasa no conlleva una inhibición de la actividad SS pero sí una restricción metabólica de los bacteroides. Esto podría ser debido a alteraciones en la **disponibilidad de O₂** o en la **respiración de los bacteroides** y al **daño oxidativo** de diferentes componentes de las células del nódulo. Diversos estudios (Díaz del Castillo y Layzell, 1995; Serraj y Sinclair, 1996) habían descrito que un incremento de la concentración externa de O₂ restauraba parcialmente la actividad nitrogenasa inhibida por la sequía, lo que llevó a los autores a sugerir que una limitación metabólica de los nódulos es la responsable de la inhibición de la fijación de N₂. Un factor potencialmente limitante de la disponibilidad de O₂, y por tanto del metabolismo, es la degradación de

la Lb como resultado de la sequía (Guerin y cols, 1990; Irigoyen y cols, 1992). Sin embargo, esto no se observó en los nódulos de alfalfa (**Fig 4.2**), guisante (González y cols, 1998) y soja (Gordon y cols, 1999). La acumulación de succinato y malato (**Fig 4.3**), principales sustratos de la respiración bacteroidal (Lodwig y Poole, 2003), y el descenso de la respiración asociada a la nitrogenasa (**Tabla 4.1**), sugieren que la limitación de la capacidad respiratoria de los bacteroides en la sequía inhibe la actividad fijadora de N₂ (Díaz del Castillo y Layzell, 1995). El aumento de la resistencia a la difusión del O₂ en la zona infectada (**Tabla 4.1**), debido al descenso de la respiración bacteroidal, apoyaría esta hipótesis. Resultados previos parecen indicar que la inhibición de la actividad nitrogenasa se debe más bien a una disminución de la capacidad respiratoria y no de la disponibilidad de O₂ (Díaz del Castillo y Layzell, 1995). Nuestros datos no permiten concluir si la alteración de la respiración de los bacteroides es una causa o una consecuencia de la inhibición de la actividad nitrogenasa. Aunque el análisis de la expresión de la nitrogenasa mostró que tanto la sequía moderada como la severa no afectaron significativamente el nivel de mRNA de *nifH*, sí disminuyeron los contenidos de las Fe- y FeMo-proteínas. Por tanto, el descenso de la actividad nitrogenasa se debió a la degradación de las proteínas, entre otros posibles factores como una menor disponibilidad de ATP en los bacteroides. En la recuperación de las plantas, y a pesar de la disminución del mRNA de *nifH*, los niveles de proteínas de la nitrogenasa se recuperaron parcial (FeMo-proteína) o totalmente (Fe-proteína), lo que puede atribuirse a un aumento de la traducción de mRNA o a una mayor estabilidad de las proteínas. No obstante, la actividad nitrogenasa tampoco se recuperó totalmente (75%), lo que sugiere que el metabolismo general de los nódulos no se restableció completamente tras 2 días de reirrigación. Los descensos de malato y actividad GOGAT de los nódulos tras la recuperación indican que éstos experimentaron una reactivación de la respiración y de la fijación de N₂, aunque igualmente señalan que el restablecimiento del metabolismo de los bacteroides fue incompleto (**Fig 4.3 y 4.4**). De hecho, la actividad GOGAT, que participa en la asimilación del N y en el desarrollo del nódulo (Groat y Vance, 1981; Temple y cols, 1998), podría estar limitada por una baja disponibilidad de α KG (**Fig 4.3**). Además, esta enzima parece ser especialmente sensible al estrés hídrico (Becana y cols, 1984).

Efecto de la sequía sobre el metabolismo del carbono de los nódulos de alfalfa

Existen dos diferencias principales en la respuesta a la sequía del metabolismo del C de los nódulos de alfalfa respecto a lo que ocurre en otras leguminosas. Primero, una sequía moderada inhibió la actividad nitrogenasa un 43% (**Fig. 4.1**) pero no afectó los niveles de actividad o mRNA de SS (**Fig. 4.4**), mientras que las actividades SS y nitrogenasa descienden simultáneamente en nódulos de judía (Ramos y cols, 1999), guisante (Gálvez y cols, 2005) y soja (González y cols, 1995). Segundo, en los nódulos de alfalfa sometidos a una sequía severa las concentraciones de malato y succinato aumentaron, respectivamente, un 40% y 68% (**Fig. 4.3**), mientras que en nódulos de guisante descendieron progresivamente (Gálvez y cols, 2005). Estos hechos demuestran que los nódulos de alfalfa expuestos a estrés hídrico moderado poseen una actividad SS suficiente para mantener la producción de ácidos orgánicos a partir de la sacarosa. El incremento de sacarosa en ambos niveles de estrés hídrico también se observó en nódulos de otras leguminosas y fue atribuido a una inhibición de la actividad SS (Gogorcena y cols, 1995; Ramos y cols, 1999; Gálvez y cols, 2005). Nuestros resultados permiten descartar esta explicación para la sequía moderada, y sugieren que la acumulación de sacarosa en los nódulos durante la sequía se debe a un transporte de sacarosa desde la parte aérea, junto con una limitación de su consumo en los nódulos debido a una menor actividad respiratoria de los bacteroides. La acumulación de ácidos dicarboxílicos y sacarosa en los nódulos indicó que el metabolismo nodular, en particular la fijación de N₂ y la respiración, no estaba limitado por el suministro de sustratos carbonados. Además, el exceso de sacarosa en los nódulos podría tener una función osmoprotectora frente a la deshidratación causada por la sequía (Bartels y Sunkar, 2005). El mRNA de la SS disminuyó en la sequía severa (**Fig. 4.4B**) mientras que en nódulos de soja la expresión de esta enzima se inhibió ante un estrés hídrico más moderado (Gordon y cols, 1997). No obstante, la ausencia de cambios en la abundancia de proteína SS coincide con lo descrito en nódulos de soja (González y cols, 1995). En la recuperación, los niveles de mRNA y actividad SS alcanzaron valores similares al control y la actividad IA fue la única que aumentó por encima del valor control, quizá para contribuir a la reactivación de la vía glucolítica en los nódulos.

Estos resultados demuestran que en la alfalfa la SS no es la enzima responsable de la caída de la fijación de N₂, al menos en condiciones de sequía moderada, a diferencia de lo que ocurre en soja o guisante (González y cols, 1995; Gálvez y cols,

2005). Por tanto, en esta leguminosa debe existir un mecanismo, independiente de la SS, responsable de la inhibición de la actividad nitrogenasa en condiciones de sequía. De hecho, la ausencia de inhibición de la actividad SS en los nódulos de alfalfa sometidos a sequía moderada podría ser uno de los motivos por los que esta especie es más tolerante al estrés hídrico que otras leguminosas.

Efecto de la sequía sobre los antioxidantes de los nódulos de alfalfa

La acumulación de peróxidos de lípidos y de proteínas oxidadas en los nódulos de alfalfa sometidos a sequía demostró inequívocamente que se produce estrés oxidativo (**Fig. 4.8 y 4.9**). Una conclusión similar fue obtenida en nódulos (Moran y cols, 1994) y hojas (Iturbe-Ormaetxe y cols, 1998) de guisante en condiciones de estrés hídrico. Asimismo, la inducción de los genes antioxidantes *CuZnSODc*, *FeSOD*, *APXc*, *GRc*, *sodA*, *katB* y *katC* (**Fig. 4.5 y 4.6**) indicó que el estrés oxidativo afectaba tanto a las células del nódulo como a los bacteroides. Se podría considerar que al menos dos factores contribuyen a la aparición de estrés oxidativo en los nódulos de alfalfa. Primero, la disminución de ascorbato y probablemente de NAD(P)H (Gogorcena y cols, 1995), sustratos del ciclo ascorbato-GSH, mermó la capacidad del ciclo para eliminar H₂O₂, a pesar de que la actividad APX y otras actividades antioxidantes ensayadas *in vitro* (catalasa, SOD y GRc) permanecían constantes durante el estrés hídrico. Segundo, la presencia en los nódulos de metales catalíticamente activos (Fe, Cu), capaces de generar ROS altamente oxidantes a través de reacciones tipo Fenton (Stadtman, 1992; Halliwell y Gutteridge, 2007). De hecho, la concentración de Fe libre (Gogorcena y cols, 1995; Evans y cols, 1999) y la producción de radical ·OH (Becana y Klucas, 1992) aumentan en los nódulos senescentes. Existen numerosos trabajos sobre el incremento de las ROS y de la expresión de enzimas antioxidantes durante el estrés hídrico. Algunos ejemplos son la inducción de *CuZnSODc*, *CuZnSODp* y *APXc* en hojas guisante (Mittler y Zilinskas, 1992, 1994; Iturbe-Ormaetxe y cols, 1998) y la inducción de una *CuZnSOD* en hojas de *Lotus corniculatus* (Borsani y cols, 2001). Sin embargo, existen pocos estudios sobre los efectos del estrés hídrico en la capacidad antioxidante de los nódulos. Gogorcena y cols (1995) describieron, en nódulos de guisante sometidos a una sequía severa, un descenso generalizado, aunque leve (15-30%), de las enzimas del ciclo ascorbato-GSH, SOD y catalasa, y un descenso más marcado del contenido de ascorbato y GSH. En nódulos de soja, las actividades APX y GR descendían levemente, mientras que SOD y CAT experimentaban un aumento poco significativo (Porcel y cols, 2003).

La respuesta de los sistemas antioxidantes frente a la sequía en leguminosas puede variar con la especie y cultivar, los tejidos vegetales y la intensidad y duración del estrés hídrico aplicado. Estudios con plantas “knockout” y mutantes de diversas enzimas antioxidantes (catalasa, APX) confirman que dichas actividades pueden ser complementarias, ya que todos estos mutantes son viables; no obstante las diferencias en los fenotipos evidencian la importancia de cada uno de ellos en la respuesta a ROS y a estrés abiótico (Mittler y cols, 2004).

5.2. Caracterización de LjPCS1 y LjPCS3 de Lotus

Las células de S. cerevisiae sintetizan PCs

Los genes que codifican proteínas PCS se encuentran distribuidas en una gran variedad de organismos, incluyendo cianobacterias, algas, helechos, hongos y nematodos (Cobbett y Goldsbrough, 2002). Una excepción es la levadura *S. cerevisiae*, que carece de genes *PCS* (Clemens y cols, 1999), por lo que ha sido utilizada junto con mutantes de *S. pombe* deficientes en PCS, para caracterizar las enzimas de plantas (Clemens y cols, 1999; Ha y cols, 1999). En esta Tesis se utilizaron células de levadura como sistema heterólogo para expresar LjPCS3 (una PCS atípica de Lotus) y LjPCS1 (como control) con el objetivo de caracterizar la respuesta a metales de ambas actividades enzimáticas. Para ello fue necesario verificar primero la composición de metales del medio de cultivo de las levaduras y determinar la capacidad de las células por sí mismas (transformadas con el plásmido vacío) para sintetizar PCs. Sorprendentemente, dichas células fueron capaces de producir PC₂ en presencia de CdCl₂ 50 μM, pero no cuando se omitía el metal. Por tanto, esta levadura debe disponer de un mecanismo alternativo a la actividad PCS (pero también dependiente de metales) para sintetizar PCs. Recientemente, se ha descrito que ese mecanismo podría involucrar a dos Ser-carboxipeptidasas vacuolares (Wünschmann y cols, 2007). Una segunda conclusión de este estudio inicial fue que la composición de metales en el medio de crecimiento es crítica para los ensayos de activación de las PCS. El medio “+ metales” contenía Zn y otros metales divalentes que son activadores de las PCS; por tanto, el nivel basal de PCs producidas por las células de levadura podría obstaculizar la detección de la síntesis de PCs, especialmente cuando la actividad era escasa, como ocurría con el Hg. Las levaduras en el medio “+ metales” presentaban una mayor tolerancia a Cd que en el medio “- metales” suplementado con

concentraciones bajas de Ca y Mg. Este hecho se debe probablemente a que el Cd compite con estos dos cationes por el mismo transportador, como ocurre con la proteína LCT1 que controla la entrada de Ca y Cd en las plantas (Clemens y cols, 1998). Así, la entrada de Cd en las células de levadura estaría más limitada en presencia de altas concentraciones de Ca y Mg, lo que unido a la capacidad de las células para sintetizar PCs sería suficiente para evitar la toxicidad del metal pesado.

Diferencias en la respuesta de LjPCS1 y LjPCS3 a distintos metales

Los niveles de expresión de LjPCS1 y LjPCS3 en el sistema heterólogo elegido fueron muy diferentes. La LjPCS1 pudo ser parcialmente recuperada en forma soluble tanto en *E. coli* como en las levaduras, mientras que LjPCS3 requería ser extraída con agentes desnaturalizantes. Esto es probablemente atribuible a que las dos proteínas poseen diferentes grados de interacción con las membranas. De hecho, los programas de predicción de estructura secundaria, TMpred (Hofmann y Stoffel, 1993) y TopPred (Claros y von Heijne, 1994), indican que LjPCS3 podría contener una región transmembrana de la que carece LjPCS1, lo que explicaría las diferencias de solubilidad entre ambas proteínas. El ensayo enzimático *in vivo* permitió comparar las actividades PCS y su dependencia con diversos metales. Dichos resultados demostraron que LjPCS1 y LjPCS3 eran activadas diferencialmente por los metales (**Fig 4.15 y 4.16**). En particular, el Cd y Pb fueron los mejores activadores de LjPCS1 mientras que el Zn fue el mejor activador de LjPCS3. Además el As, Fe y Al activaban más a LjPCS3 que a LjPCS1. La distinta capacidad de los metales para activar las dos enzimas es atribuible a las diferencias en el dominio C-terminal (posible sitio sensible a metales) ya que los últimos 200 aminoácidos de LjPCS3 sólo presentan un 43% de identidad con respecto a otras proteínas PCS de plantas. Esta explicación es apoyada por los datos de Ruotolo y cols (2004), quienes demostraron que la pérdida de la región C-terminal de AtPCS1 impedía casi por completo la activación del enzima por algunos metales (Zn, Hg) pero no por otros (Cd, Cu). Este hallazgo sugiere que la interacción de la proteína con los iones metálicos libres, con sus tiolatos, o con ambos, modulan la activación de la enzima. Sin embargo, no podemos descartar que algunas de las diferencias en la activación de las enzimas LjPCS1 y LjPCS3 por los distintos metales se deban a las distintas velocidades de entrada de los tiolatos metálicos en las células de levadura.

El hecho de que las dos proteínas, especialmente LjPCS3, fueran activadas por el Fe y Al se verificó con la identificación estructural de los productos PC₂ y PC₃ por MS.

Oven y cols (2002) habían observado que la AtPCS1 y GmPCS1 no eran activadas por el Fe o Al, una discrepancia con nuestros datos que puede justificarse por diferencias entre las proteínas o en las condiciones del ensayo enzimático, incluyendo los límites de detección de las PCs producidas. Es probable que la mayor actividad de LjPCS3 con Fe y Al respecto a LjPCS1 se deba también a la singularidad de su dominio C-terminal. Los principales mecanismos para evitar la toxicidad del Fe y Al en las plantas son la ferritina (Briat y Lobreaux, 1997) y la exudación de ácidos orgánicos por la raíz (Ma y cols, 1997), respectivamente. Sin embargo, las PCS podrían complementar la protección frente a Fe y Al, al menos en ambientes donde estos metales se encuentren altamente solubilizados como ocurre en los suelos ácidos de las regiones tropicales y subtropicales (Mengel y Kirkby, 2001).

Varios grupos, incluido el nuestro, han demostrado que el Cu activa la PCS de plantas tanto *in vitro* como *in vivo* (Clemens y cols, 1999; Ha y cols, 1999; Beck y cols, 2003; Loscos y cols, 2006). Estas observaciones, junto con el hecho de que el Cu activó LjPCS1 y LjPCS3 en las células de levadura rotas, pero no en las intactas, nos permitió concluir que el Cu no tenía acceso a las enzimas. Como las determinaciones de Cu intracelular muestran que este metal entra en las células de levadura durante las 4 h de exposición (ver 4.2.6), concluimos que estas levaduras disponen de otro mecanismo para evitar la toxicidad del Cu. Muy probablemente este mecanismo implique a las MTs, codificadas por los genes *CUP1* y *CRS5*, que contribuyen a la homeostasis y desintoxicación del Cu en *S. cerevisiae* (Jensen y cols, 1996).

Biosíntesis de desGly-PCs

Una contribución importante de este estudio fue la detección y cuantificación de desGly-PCs en las células de levadura que expresaban las enzimas recombinantes. Estos derivados estructurales de las PCs son funcionales ya que las células transformadas con LjPCS1 fueron tolerantes al As y sólo producían desGly-PC₂. Esta conclusión es coherente con el aislamiento, a partir de células de *S. pombe*, de complejos desGly-PC₃ y Cu⁺ (Mehra y Winge, 1988). La presencia de estos derivados estructurales ya había sido descrita en levaduras (Mehra y Winge, 1988; Hayashi y cols, 1991; Barbas y cols, 1992) y en algunas plantas superiores (Klapheck y cols, 1994; Meuwly y cols, 1995; Maitani y cols, 1996) expuestas a metales, pero se desconoce su origen. Varios autores sugieren que las desGly-PCs se generan catabólicamente a partir de las correspondientes PCs por acción de una carboxipeptidasa que eliminaría la Gly del extremo C-terminal

(Barbas y cols, 1992; Klapheck y cols, 1994; Meuwly y cols, 1995). No obstante, nuestros resultados mostraron que la proporción de desGly-PCs producidas difiere entre los distintos metales y entre las dos proteínas, lo que sugiere que no se trata de una actividad propia de las levaduras. Si se considera el diferente efecto del As sobre LjPCS1 (produce sólo desGly-PC₂) y LjPCS3 (produce PC₂, PC₃ y sus formas desglicinadas), la producción de desGly-PCs se explicaría por variaciones en la reacción biosintética catalizada por las PCS. Así, la desGly-PC₂ podría generarse por la transferencia de una unidad de γ Glu-Cys procedente de una molécula de GSH (unida al primer sitio de acilación o “donor”) a otra molécula γ Glu-Cys (unida al segundo sitio de acilación o “acceptor”). En *S. pombe* se ha demostrado la formación de polipéptidos (γ Glu-Cys)_n a partir de diferentes sustratos: GSH, γ Glu-Cys, o una combinación de ambos (Hayashi y cols, 1991). Según esta hipótesis, la producción de desGly-PCs en función de las enzimas y los metales podría explicarse por una diferente afinidad de γ Glu-Cys (o de sus tiolatos metálicos) por los sitios aceptores de LjPCS1 y LjPCS3. Una explicación alternativa, más improbable, es que la presencia de diferentes metales, o de una determinada LjPCS, influye en la actividad de las peptidasas de las levaduras.

Función de los iones metálicos en la actividad PCS

Algunas cuestiones importantes acerca del mecanismo de la actividad PCS permanecen sin respuesta. Por un lado, la localización del segundo sitio de acilación que requiere la unión de un tiol bloqueado con un metal o con otro tipo de molécula; por otro, cómo influyen los metales libres en la actividad PCS, es decir, cómo interaccionan con las Cys del dominio C-terminal. Un objetivo fundamental para resolver estas cuestiones sería determinar la estructura de una PCS eucariota, obteniendo si fuera posible cristales de la enzima unida al sustrato en el segundo sitio de acilación. Ruotolo y cols (2004) señalaron que cada metal afecta de forma específica a la actividad PCS, hipótesis que apoyan nuestros resultados con LjPCS1 y LjPCS3. Todo parece indicar que los metales libres, aunque no son indispensables, sí que estimulan la actividad PCS al interaccionar con el extremo C-terminal. Además, la presencia de metales pesados podría influir en la expresión de los genes *PCS*. Esto fue demostrado mediante la cuantificación de los niveles de mRNA de los tres genes *LjPCS* en raíces de Lotus. El mRNA de *LjPCS1* aumentó ligeramente tras 6 h de exposición a CdCl₂ 100 μ M, mientras que los mRNAs de *LjPCS2* y *LjPCS3* aumentaron transcurridas 6 h y mantuvieron la inducción 96 h

después del inicio del tratamiento (Ramos y cols, 2007). Otra cuestión pendiente de resolver es la localización subcelular de cada proteína LjPCS y la posible asociación de cada una de ellas con las membranas celulares. Asimismo, se desconoce todavía el grado de importancia de las PCs como mecanismo de tolerancia a metales pesados en las plantas, ya que dos estudios recientes demuestran que la sobreexpresión de AtPCS1 en *Arabidopsis* produce, paradójicamente, hipersensibilidad a Cd (Lee y cols, 2003) y potencia la tolerancia a As (Li y cols, 2004). Sin embargo, las plantas transgénicas de *B. juncea* que expresan AtPCS1 son más tolerantes a Cd y As, aunque no acumulan estos metales en mayor proporción que las plantas control (Gasic y Korban, 2007).

5.3. Transcriptoma de raíces de Lotus: efecto del estrés por Cd

Los análisis del transcriptoma mediante el uso de “macroarrays” de cDNA tienen una serie de limitaciones. Así, el estudio queda restringido a los genes representados en el filtro y puede existir hibridación cruzada entre determinados transcritos y clones inmovilizados en la membrana, especialmente cuanto mayor es la longitud de estos últimos. Éste es uno de los motivos que hacen necesaria la validación de los genes identificados en los “arrays” mediante RT-PCRc. Además, otra limitación de esta técnica es la sensibilidad, ya que los transcritos menos abundantes no se detectan, perdiéndose parte de la información (Colebatch y cols, 2004). En el análisis realizado para identificar los genes cuya expresión resultaba afectada por el Cd surgieron dificultades en la reproducibilidad entre las réplicas, derivadas de la variabilidad biológica, es decir, de la complejidad del órgano vegetal (en este caso, la raíz) y quizá de la aplicación del tratamiento. De los 16000 cDNAs que contenían los “macroarrays” utilizados, tan sólo un pequeño porcentaje se inducía en presencia del metal pesado.

La mayor parte de los genes inducidos tras 1 y 4 d con Cd eran desconocidos o codificaban proteínas hipotéticas, debido en parte a que el genoma de Lotus no está totalmente secuenciado. Los resultados mostraron que entre los genes cuya expresión resultaba más incrementada en ambos tratamientos con Cd se encontraban dos factores de transcripción, una proteína con un motivo de unión a AG y un miembro de la familia bZIP (**Tabla 4.5**). Otros genes de esta misma familia se inducían en plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés osmótico, salinidad o frío (Kreps y cols,

2002), mientras que se expresaban de forma constitutiva en *Arabidopsis halleri*, una planta hiperacumuladora de Zn (Becher y cols, 2004). Otra de las categorías funcionales de interés es la constituida por proteínas implicadas en señalización. Tras 4 d con Cd se indujeron una Ser/Thr kinasa, una PI3-kinasa y una receptor kinasa. Diversas proteínas tipo kinasa se inducían también en respuesta a los estreses por sequía, salinidad y frío en *Arabidopsis* (Seki y cols, 2002). En el tratamiento de Cd durante 4 d se inducían, además, un factor de transcripción tipo WRKY, la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa involucrada en la biosíntesis de etileno, y una glioxilasa, en común todos ellos con la respuesta a estreses abióticos en *Arabidopsis* (Seki y cols, 2002). Otros de los genes inducidos por ambos tratamientos con Cd fueron los que codifican una 8-amino-7-oxononanoato sintasa, enzima que participa en la síntesis de biotina, y una enzima localizada en la vacuola que quizá esté implicada en la acumulación de Cd en dicho orgánulo.

Es previsible que los genes desconocidos o sin homología se puedan identificar conforme se complete la secuenciación del genoma de *Lotus*. No obstante, resultó sorprendente que no resultara afectada la expresión de genes de respuesta a estrés abiótico, entre ellos los que codifican glutatión-S-transferasas, peroxidasas y GR, al contrario que en otros trabajos similares (Kreps y cols, 2002; Seki y cols, 2002). Además, sería interesante completar este estudio limitando el análisis a determinados grupos funcionales o estableciendo tiempos más cortos de tratamiento para detectar las respuestas más tempranas.

5.4. Proteoma de nódulos de alfalfa: efecto del estrés hídrico y salino

El objetivo de este estudio fue analizar la expresión diferencial de proteínas ante dos estreses abióticos de interés agronómico, utilizando electroforesis 2D y posterior análisis por MS. La ventaja de este tipo de técnicas es la gran información que se obtiene por cada experimento, pero también existen una serie de desventajas que perjudican la reproducibilidad de los resultados. Entre estos inconvenientes tuvimos que considerar la heterogeneidad de los nódulos indeterminados ya que están constituidos por diferentes tipos de tejidos celulares y de distinto origen (planta y rizobio), existiendo además un gradiente de edad. Asimismo, el establecimiento del estrés hídrico basándonos en un rango de potencial hídrico foliar supone una fuente inevitable de variabilidad biológica.

A estas consideraciones se suman las limitaciones intrínsecas de los geles 2D, ya que las proteínas con un pI cercano a los extremos del gradiente utilizado, con un peso molecular extremo o las que son muy poco abundantes, no se resuelven adecuadamente en el gel. En este caso, al no estar totalmente secuenciado el genoma de *M. truncatula*, la identificación por MS de las proteínas seleccionadas además de por MALDI exigía el uso de ESI-MS/MS, lo que permitió la secuenciación de los péptidos. Todos estos inconvenientes tuvieron como resultado que sólo 42 proteínas fueran seleccionadas y que de éstas sólo 14 fueran identificadas (**Tabla 4.4**).

La reproducibilidad entre experimentos de proteómica de grupos diferentes es bastante exigua, aunque en este estudio se han encontrado algunas similitudes e identificaciones interesantes. En la salinidad y en la sequía se detectó un descenso en el contenido de la **Fe-proteína** del complejo nitrogenasa, confirmando la inhibición de la fijación de N₂ como consecuencia de ambos estreses (ver **1.6** y **4.1**). Entre las proteínas inducidas por la salinidad se encuentran una enzima del ciclo de Calvin (**triosafosfato isomerasa**) y dos enzimas glucolíticas. También se induce una **triosafosfato isomerasa** en raíces de plantas de arroz tratadas con NaCl 150 mM durante 10 h y 24 h de salinidad (Chitteti y Peng, 2007). Las dos enzimas glucolíticas son una **gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa**, que al oxidarse actúa como molécula señal permitiendo a las plantas percibir y responder a algunos cambios ambientales (Foyer y Noctor, 2005), y una **fosfoenolpiruvato hidratasa** (enolasa) que cataliza la transformación de fosfoenolpiruvato a 2-fosfo-D-glicerato. En los nódulos de *M. truncatula*, una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y una enolasa se inducen también tras 3 d de sequía, aunque descienden tras 6 d (Larrainzar y cols, 2007).

Respecto a las proteínas con una misma respuesta en los estreses hídrico y salino cabe señalar la inducción de una **proteína activada por ABA**, que pertenece a la familia de las aldo/ceto reductasas. En otros análisis proteómicos de diversos estreses se encontraron incrementos de la expresión de proteínas que responden a ABA, como una proteína relacionada con la patogénesis, que se induce en estrés biótico en raíces de *M. truncatula* (Colditz y cols, 2004). Asimismo, una proteína, identificada como una posible **aconitato hidratasa** del bacteroide, que cataliza el intercambio de citrato e isocitrato en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, disminuyó en los dos estreses. Esta observación contrasta con la inducción de una aconitato hidratasa en suspensiones celulares de *Arabidopsis* en condiciones de estrés salino (Bongani y cols, 2005) y en nódulos de *M. truncatula* tras 6 d de sequía (Larrainzar y cols, 2007). Además, en el

estrés salino disminuye un polipéptido identificado como la **cadena α de la ATP sintasa**, que curiosamente se inducía en suspensiones celulares de *Arabidopsis* sometidas a ese mismo estrés (Bongani y cols, 2005). Por último, conviene señalar que pudimos detectar una alteración en la posición en los geles 2D de una **fosfoglicerato kinasa** en condiciones de sequía. Esta variación del pI de la proteína podría atribuirse a una modificación postraducciona que debe ser confirmada. Esta enzima interviene en la glicolisis y se induce en raíces de plantas de arroz sometidas a estrés salino (Chitteti y Peng, 2007).

En resumen, las proteínas que responden a la sequía y a la salinidad pertenecen a grupos funcionales diversos, que incluyen principalmente enzimas del metabolismo del C pero también factores de transcripción y proteínas implicadas en la señalización. Curiosamente, en este análisis proteómico no se detectaron cambios en los niveles de los enzimas antioxidantes en los nódulos en condiciones de estrés hídrico y salinidad, especialmente en el de la CuZnSODc, cuya expresión aumentó en la sequía moderada y severa (ver **4.1.3**). De hecho, en los estudios de los proteomas de hojas de caña de azúcar y de guisante se ha detectado la inducción de una CuZnSOD en condiciones de sequía (Hajheidari y cols, 2005; Taylor y cols, 2005). También en cultivos celulares de *Arabidopsis* se inducían una MnSOD y una PRX en condiciones de estrés salino (Bongani y cols, 2005). Otras cuestiones pendientes, y que completarían nuestro estudio sobre la respuesta de las leguminosas a estrés hídrico y salino, son la degradación y la modificación postraducciona de las proteínas, especialmente fosforilación, nitrosilación y glutationilación. Ninguna de estas modificaciones ha sido estudiada hasta la fecha en nódulos de leguminosas.

6. CONCLUSIONES

1. En los nódulos de alfalfa en condiciones de sequía, la inhibición de la actividad sacarosa sintasa es posterior a la caída de la fijación de N_2 y por tanto no puede ser causa de esta última. La inhibición de la actividad nitrogenasa en los nódulos de alfalfa se debe a tres factores: disminución de la capacidad respiratoria de los bacteroides, degradación de las proteínas de la nitrogenasa y daño oxidativo a componentes de las células nodulares.

2. El metabolismo respiratorio de los nódulos resulta seriamente afectado por el estrés hídrico. En la sequía moderada se acumula succinato y sacarosa en los nódulos debido al transporte de sacarosa desde la parte aérea, a la actividad de la vía glucolítica y al menor consumo de sacarosa y ácidos orgánicos por la disminución de la respiración. En la sequía severa se produce una enorme acumulación de sacarosa, y en menor medida de succinato y malato, por la inhibición de la sacarosa sintasa y la drástica reducción de la respiración bacteroidal. Por tanto, en ambos niveles de estrés la actividad respiratoria y nitrogenasa no están limitadas por el suministro de sustratos carbonados.

3. La acumulación de peróxidos de lípidos y proteínas oxidadas y el descenso de ascorbato demuestran que la sequía origina un estrés oxidativo en los nódulos. La inducción de los genes *CuZnSODc*, *FeSODp*, *GRc* y *APXc* de las células nodulares no conlleva un aumento de las correspondientes actividades enzimáticas. La inducción de los genes *sodA*, *katB* y *katC* de los bacteroides indica que éstos perciben el estrés oxidativo causado por la sequía.

4. La proteína LjPCS3 de la leguminosa modelo *Lotus japonicus* presenta una baja homología respecto a la típica fitoquelatina sintasa LjPCS1 y es mucho menos soluble cuando se expresa en sistemas heterólogos. La expresión de LjPCS3 en levadura demuestra inequívocamente que la enzima confiere tolerancia a cadmio *in vivo* y que cataliza las dos reacciones propias de las fitoquelatina sintasas (dipeptidil-transpeptidasas). Se propone que la activación diferencial de LjPCS1 y LjPCS3 por los distintos metales es debida a las diferencias en sus dominios C-terminal. Además, el Fe y Al, dos metales que hasta ahora no se consideraban activadores de las fitoquelatina sintasas, activan a LjPCS1 y especialmente a LjPCS3.

5. Muy probablemente, las fitoquelatinas que carecen de glicina C-terminal (desglicinil-fitoquelatinas), y que han sido detectadas en levaduras recombinantes, no se originan por degradación de las fitoquelatinas sino que se producen por la polimerización de unidades de γ -glutamilcisteína, catalizada por las fitoquelatina sintasas. Además, las desglicinil-fitoquelatinas son funcionales y evitan la toxicidad de los metales pesados porque la LjPCS1 únicamente produce este tipo de polipéptidos en células expuestas a arsénico.

6. El análisis del transcriptoma de raíces de *Lotus japonicus* tratadas con cadmio muestra la inducción de 79 genes pertenecientes a diversas categorías funcionales, incluyendo genes que codifican dos factores de transcripción y una enzima de la biosíntesis de biotina. Asimismo, el análisis del proteoma de nódulos de alfalfa en condiciones de estrés hídrico y salino indica que se inducen proteínas relacionadas con el metabolismo de carbono y una proteína activada por ácido abscísico. Ambos estudios constituyen el punto de partida para futuros análisis de la función de los genes y de las modificaciones postraduccionales de las proteínas implicadas en la respuesta a estrés abiótico en leguminosas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adle DJ, Sinani D, Kim H, Lee J** (2007) A cadmium-transporting P_{1B}-type ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **282**: 947-955
- Aebi H** (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* **105**: 121-126
- Allen RD** (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol* **107**: 1049-1054
- Ampe F, Kiss E, Sabourdy F, Batut J** (2003) Transcriptome analysis of *Sinorhizobium meliloti* during symbiosis. *Genome Biol* **4**: R15
- Aparicio-Tejo PM, Arrese-Igor C, Becana M** (2000) Fijación biológica de nitrógeno. *En* J Azcón-Bieto, M Talón, eds, *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill Interamericana. pp 193-213
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373-399
- Appleby C, Bergersen F** (1980) Preparation and experimental use of leghemoglobin. *In* FJ Bergersen, ed, *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. John Wiley, Chichester, pp 315-335
- Arrese-Igor C, Gonzalez EM, Gordon AJ, Minchin FR, Galvez L, Royuela M, Cabrerizo PM, Aparicio-Tejo PM** (1999) Sucrose synthase and nodule nitrogen fixation under drought and other environmental stresses. *Symbiosis* **27**: 189-212
- Aruoma OI, Halliwell B, Laughton MJ, Quinlan GJ, Gutteridge JMC** (1989) The mechanism of initiation of lipid-peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *Biochem J* **258**: 617-620
- Asada K, Lester P** (1984) Chloroplasts: formation of active oxygen and its scavenging. *Method Enzymol* **105**: 422-429
- Barbas J, Ellis WR, Santhanagopalan V, Blaszczyński M, Winge DR** (1992) Conversion in the peptides coating cadmium:sulfide crystallites in *Candida glabrata*. *J Inorg Biochem* **48**: 95-105

- Barnett MJ, Fisher RF** (2006) Global gene expression in the rhizobial-legume symbiosis. *Symbiosis* **42**: 1-24
- Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Sandalio LM, Valderrama R, Palma JM, Lupianez JA, del Rio LA** (1999) Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *J Biol Chem* **274**: 36729-36733
- Bartels D, Sunkar R** (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci* **24**: 23-58
- Bartoli CG, Gomez F, Martinez DE, Guamet JJ** (2004) Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Exp Bot* **55**: 1663-1669
- Bartoli CG, Pastori GM, Foyer CH** (2000) Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiol* **123**: 335-343
- Becana M, Aparicio-Tejo PM, Sánchez Díaz M** (1984) Effects of water stress on enzymes of ammonia assimilation in root nodules of alfalfa (*Medicago sativa*). *Physiol Plant* **61**: 653-657
- Becana M, Klucas RV** (1990) Enzymatic and nonenzymatic mechanisms for ferric leghemoglobin reduction in legume root nodules. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7295-7299
- Becana M, Klucas RV** (1992) Transition metals in legume root-nodules. Iron-dependent free radical production increases during nodule senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 8958-8962
- Beck A, Lenzian K, Oven M, Christmann A, Grill E** (2003) Phytochelatin synthase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates. *Phytochemistry* **62**: 423-431
- Becker A, Bergès H, Krol E, Bruand C, Rüberg S, Capela D, Lauber E, Meilhoc E, Ampe F, de Brujin F, Fourment J, Francnez-Charlot A, Kahn D, Küster H, Liebe C, Pühler A, Weidner S, Batut J** (2004) Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 292-303
- Becher M, Talke IN, Krall L, Krämer U** (2004) Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant J* **37**: 251-268
- Bestwick CS, Brown IR, Bennett MHR, Mansfield JW** (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell* **9**: 209-221
- Blum R, Beck A, Korte A, Stengel A, Letzel T, Lenzian K, Grill E** (2007) Function of phytochelatin synthase in catabolism of glutathione-conjugates. *Plant J* **49**: 740-749
- Böck A, Forchhammer K, Heider J, Baron C** (1991) Selenoprotein synthesis - an expansion of the genetic code. *Trends Biochem Sci* **16**: 463-467
- Bongani KN, Stephen C, William JS, Antoni RS** (2005) Identification of *Arabidopsis* salt and osmotic stress responsive proteins using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **5**: 4185-4196

- Boominathan R, Pauline MD** (2003) Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnol Bioeng* **83**: 158-167
- Borsani O, Diaz P, Agius MF, Valpuesta V, Monza J** (2001) Water stress generates an oxidative stress through the induction of a specific Cu/Zn superoxide dismutase in *Lotus corniculatus* leaves. *Plant Sci* **161**: 757-763
- Bowler C, Slooten L, Vandenbranden S, Derycke R, Botterman J, Sybesma C, Van Montagu M, Inze D** (1991) Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J* **10**: 1723-1732
- Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inze D** (1994) Superoxide dismutase in plants. *Crit Rev Plant Sci* **13**: 199 - 199
- Briat J-F, Lobreaux S** (1997) Iron transport and storage in plants. *Trends Plant Sci* **2**: 187-193
- Broughton BJ, Dilworth MJ** (1971) Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J* **125**: 1075-1080
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG** (2004) Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**: 1327-1333
- Carpena R, Esteban E, Lucena JJ, Peñalosa S, Vázquez P, Zornoza P, Gárate A** (2006) Simbiosis y fitorrecuperación de suelos. *En* EJ Bedmar, J González, C Lluch, MB Rodelas, eds, *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones*. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno, Granada, pp 255-268
- Cazale AC, Clemens S** (2001) *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Lett* **507**: 215-219
- Chitteti BR, Peng ZH** (2007) Proteome and phosphoproteome differential expression under salinity stress in rice (*Oryza sativa*) roots. *J Proteome Res* **6**: 1718-1727
- Claros MG, von Heijne G** (1994) TopPredII: an improved software for membrane-protein structure predictions. *Comput Appl Biosci* **10**: 685-686
- Clemens S** (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**: 475-486
- Clemens S** (2006) Evolution and function of phytochelatin synthases. *J Plant Physiol* **163**: 319-332
- Clemens S, Antosiewicz DM, Ward JM, Schachtman DP, Schroeder JI** (1998) The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12043-12048
- Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder JI** (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J* **18**: 3325-3333
- Clemens S, Schroeder JI, Degenkolb T** (2001) *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur J Biochem* **268**: 3640-3643
- Cobbett C, Goldsbrough P** (2002) Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 159-182

- Colditz F, Nyamsuren O, Niehaus K, Eubel H, Braun HP, Krajinski F** (2004) Proteomic approach: identification of *Medicago truncatula* proteins induced in roots after infection with the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Plant Mol Biol* **55**: 109-120
- Colebatch G, Desbrosses G, Ott T, Krusell L, Montanari O, Kloska S, Kopka J, Udvardi MK** (2004) Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *Plant J* **39**: 487-512
- Comba ME, Benavides MP, Tomaro ML** (1998) Effect of salt stress on antioxidant defence system in soybean root nodules. *Aus J Plant Physiol* **25**: 665-671
- Corpas FJ, Barroso JB, del Río LA** (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci* **6**: 145-150
- Dalton DA** (1995) Antioxidants defenses of plants and fungi. In S Ahmad, ed, *Oxidative Stress and Antioxidants Defenses in Biology*. Chapman and Hall, New York, USA, pp 298-355
- Dalton DA, Russell SA, Hanus FJ, Pascoe GA, Evans HJ** (1986) Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 3811-3815
- Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* **57**: 779-795
- de Felipe MR** (2006) Fijación biológica de dinitrógeno atmosférico en vida libre. En EJ Bedmar, J González, C Lluch, MB Rodelas, eds, *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones*. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno, Granada, pp 9-16
- del Río LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gomez M, Barroso JB** (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot* **53**: 1255-1272
- del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB** (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol* **141**: 330-335
- Díaz del Castillo L, Layzell DB** (1995) Drought stress, permeability to O₂ diffusion, and the respiratory kinetics of soybean root nodules. *Plant Physiol* **107**: 1187-1194
- Dietz KJ, Baier M, Krämer U** (1999) Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In Prasad MNV, Hagemeyer J, eds, *Heavy Metal Stress in Plants: from Molecules to Ecosystems*. Springer-Verlag. pp 73-79
- Dixon DP, Skipsey M, Grundy NM, Edwards R** (2005) Stress-induced protein S-glutathionylation in Arabidopsis. *Plant Physiol* **138**: 2233-2244
- Dixon R, Kahn D** (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol* **2**: 621-631

- Doncheva S, Amenos M, Poschenrieder C, Barcelo J** (2005) Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. *J Exp Bot* **56**: 1213-1220
- Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2003) *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J* **33**: 751-763
- Durand JL, Sheehy JE, Minchin FR** (1987) Nitrogenase activity, photosynthesis and nodule water potential in soybean plants experiencing water deprivation. *J Exp Bot* **38**: 311-321
- El Yahyaoui F, Kuster H, Ben Amor B, Hohnjec N, Puhler A, Becker A, Gouzy J, Vernie T, Gough C, Niebel A, Godiard L, Gamas P** (2004) Expression profiling in *Medicago truncatula* identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program. *Plant Physiol* **136**: 3159-3176
- Encarnación S, Guzmán Y, Dunn M, Hernández M, Vargas M, Mora J** (2003) Proteome analysis of aerobic and fermentative metabolism in *Rhizobium etli* CE3. *Proteomics* **3**: 1077-1085
- Encarnación S, Hernández M, Martínez-Batallar G, Contreras S, Vargas M, Mora J** (2005) Comparative proteomics using 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools to dissect stimulons and regulons in bacteria with sequenced or partially sequenced genomes. *Biol Proceed Online* **7**: 117-135
- Eshdat Y, Holland D, Faltin Z, BenHayyim G** (1997) Plant glutathione peroxidases. *Physiol Plant* **100**: 234-240
- Evans PJ, Gallesi D, Mathieu C, Hernández MJ, de Felipe M, Halliwell B, Puppo A** (1999) Oxidative stress occurs during soybean nodule senescence. *Planta* **208**: 73-79
- Flexas J, Bota J, Galmes J, Medrano H, Ribas-Carbo M** (2006) Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiol Plant* **127**: 343-352
- Floyd RA, West MS, Hogsett WE, Tingey DT** (1989) Increased 8-hydroxyguanine content of chloroplast DNA from ozone-treated plants. *Plant Physiol* **91**: 644-647
- Foyer CH, Noctor G** (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ* **28**: 1056-1071
- Fridovich I** (1986) Superoxide dismutases. *Adv Enzymol* **58**: 61-97
- Gálvez L, González EM, Arrese-Igor C** (2005) Evidence for carbon flux shortage and strong carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. *J Exp Bot* **56**: 2551-2561
- Gasic K, Korban SS** (2007) Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) plants expressing an Arabidopsis phytochelatin synthase (AtPCS1) exhibit enhanced As and Cd tolerance. *Plant Mol Biol* **64**: 361-369
- Giniger E, Varnum SM, Ptashne M** (1985) Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* **40**: 767-774

- Gogorcena Y, Gordon AJ, Escuredo PR, Minchin FR, Witty JF, Moran JF, Becana M** (1997) N₂ fixation, carbon metabolism, and oxidative damage in nodules of dark stressed common bean plants. *Plant Physiol* **113**: 1193-1201
- Gogorcena Y, Iturbe-Ormaetxe I, Escuredo PR, Becana M** (1995) Antioxidant defenses against activated oxygen in pea nodules subjected to water stress. *Plant Physiol* **108**: 753-759
- Gómez JM, Hernández JA, Jiménez A, del Rio LA, Sevilla F** (1999) Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. *Free Rad Res* **31**: S11-S18
- González EM, Aparicio-Tejo PM, Gordon AJ, Minchin FR, Royuela M, Arrese-Igor C** (1998) Water deficit effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules. *J Exp Bot* **49**: 1705-1714
- González EM, Gálvez D, Marino D, Ladrera R, Larrainzar E, Arrese-Igor C** (2006) Metabolismo carbonado y nitrogenado en nódulos. *En* EJ Bedmar, J González, C Lluch, MB Rodelas, eds, *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones*. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno, Granada, pp 194-206
- González EM, Gálvez L, Arrese-Igor C** (2001) Abscisic acid induces a decline in nitrogen fixation that involves leghaemoglobin, but is independent of sucrose synthase activity. *J Exp Bot* **52**: 285-293
- González EM, Gordon AJ, James CL, Arrese-Igor C** (1995) The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. *J Exp Bot* **46**: 1515-1523
- Gordon AJ, Minchin F, James CL, Komina O** (1999) Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiol* **120**: 867-877
- Gordon AJ, Minchin F, Skot L, James CL** (1997) Stress-induced declines in soybean N₂ fixation are related to nodule sucrose synthase activity. *Plant Physiol* **114**: 937-946
- Gower JD, Healing G, Green CJ** (1989) Determination of desferrioxamine-available iron in biological tissues by high-pressure liquid-chromatography. *Anal Biochem* **180**: 126-130
- Grill E, Gekeler W, Winnacker EL, Zenk HH** (1986) Homo-phytochelatin are heavy metal-binding peptides of homo-glutathione containing Fabales. *FEBS Lett* **205**: 47-50
- Grill E, Löffler S, Winnacker EL, Zenk MH** (1989) Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6838-6842
- Groat RG, Vance CP** (1981) Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.) *Plant Physiol* **67**: 1198-1203
- Groten K, Dutilleul C, Van Heerden PDR, Vanacker N, Bernard S, Finkemeier I, Dietz KJ, Foyer CH** (2006) Redox regulation of peroxiredoxin and proteinases by ascorbate and thiols during pea root nodule senescence. *FEBS Lett* **580**: 1269-1276

- Guerin V, Trinchant J-C, Rigaud J** (1990) Nitrogen fixation (C_2H_2 reduction) by broad bean (*Vicia faba* L.) nodules and bacteroids under water-restricted conditions. *Plant Physiol* **92**: 595-601
- Gupta AS, Webb RP, Holaday AS, Allen RD** (1993) Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress (induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants). *Plant Physiol* **103**: 1067-1073
- Ha SB, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS** (1999) Phytochelatin synthase genes from Arabidopsis and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* **11**: 1153-1163
- Hajheidari M, Abdollahian-Noghabi M, Askari H, Heidari M, Sadeghian S, Ober E, Salekdeh G** (2005) Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics* **5**: 950-960
- Hall JL** (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* **53**: 1-11
- Halliwell B, Gutteridge JMC** (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Oxford University Press, UK
- Harada E, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S** (2004) A cyanobacterial protein with similarity to phytochelatin synthases catalyzes the conversion of glutathione to γ -glutamylcysteine and lacks phytochelatin synthase activity. *Phytochemistry* **65**: 3179-3185
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu J-K, Bohnert HJ** (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**: 463-499
- Hayashi Y, Nakagawa CW, Mutoh N, Isobe M, Goto T** (1991) Two pathways in the biosynthesis of cadystins $(\gamma EC)_nG$ in the cell-free system of the fission yeast. *Biochem Cell Biol* **69**: 115-121
- Heiss S, Wachter A, Bogs J, Cobbett C, Rausch T** (2003) Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. *J Exp Bot* **54**: 1833-1839
- Hernández-Jiménez MJ, Mercedes Lucas M, de Felipe MR** (2002) Antioxidant defence and damage in senescing lupin nodules. *Plant Physiol Biochem* **40**: 645-657
- Hernández JA, Jiménez A, Mullineaux P, Sevilla F** (2000) Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ* **23**: 853-862
- Hérouart D, Baudouin E, Frendo P, Harrison J, Santos R, Jamet A, Van de Sype G, Touati D, Puppo A** (2002) Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume-*Rhizobium* symbiosis? *Plant Physiol Biochem* **40**: 619-624
- Hirsch AM** (1992) Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol* **122**: 211-237
- Hofmann K, Stoffel W** (1993) TMbase - a database of membrane spanning protein segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **374**: 166

- Holland D, Benhayyim G, Faltin Z, Camoin L, Strosberg AD, Eshdat Y** (1993) Molecular characterization of salt-stress-associated protein in citrus: protein and cDNA sequence homology to mammalian glutathione peroxidases. *Plant Mol Biol* **21**: 923-927
- Hurkman WJ, Tanaka CK** (1986) Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol* **81**: 802-806
- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sanchez Diaz M** (1992) Phosphoenolpyruvate carboxylase, malate- and alcohol-dehydrogenase activities in alfalfa (*Medicago sativa*) nodules under water stress. *Physiol Plant* **84**: 61-66
- Iturbe-Ormaetxe I, Escuredo PR, Arrese-Igor C, Becana M** (1998) Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiol* **116**: 173-181
- Jamet A, Sigaud S, Van de Sype G, Puppo A, Hérouart D** (2003) Expression of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti-Medicago sativa* symbiosis and their crucial role during the infection process. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 217-225
- Jebara S, Jebara M, Limam F, Aouani ME** (2005) Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *J Plant Physiol* **162**: 929-936
- Jensen LT, Howard WR, Strain JJ, Winge DR, Culotta VC** (1996) Enhanced effectiveness of copper ion buffering by CUP1 metallothionein compared with CRS5 metallothionein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**: 18514-18519
- Johansson E, Olsson O, Nystrom T** (2004) Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **279**: 22204-22208
- Kanematsu S, Asada K** (1990) Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. *Plant Cell Physiol* **31**: 99-112
- Klapheck S, Fliegner W, Zimmer I** (1994) Hydroxymethyl-phytochelatin [(γ -glutamylcysteine)_n-serine] are metal-induced peptides of the Poaceae. *Plant Physiol* **104**: 1325-1332
- Klapheck S, Schlunz S, Bergmann L** (1995) Synthesis of phytochelatin and homophytochelatin in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol* **107**: 515-521
- Kreps JA, Wu Y, Chang H-S, Zhu T, Wang X, Harper JF** (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol* **130**: 2129-2141
- Kristensen BK, Askerlund P, Bykova NV, Egsgaard H, Moller IM** (2004) Identification of oxidised proteins in the matrix of rice leaf mitochondria by immunoprecipitation and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* **65**: 1839-1851
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

- Larrainzar E, Wienkoop S, Weckwerth W, Ladrera R, Arrese-Igor C, González EM** (2007) *Medicago truncatula* root nodule proteome analysis reveals differential plant and bacteroid responses to drought stress. *Plant Physiol* **144**: 1495-1507
- Lee S, Moon JS, Ko TS, Petros D, Goldsbrough PB, Korban SS** (2003) Overexpression of Arabidopsis phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress. *Plant Physiol* **131**: 656-663
- Li YJ, Dhankher OP, Carreira L, Lee D, Chen A, Schroeder JI, Balish RS, Meagher RB** (2004) Overexpression of phytochelatin synthase in Arabidopsis leads to enhanced arsenic tolerance and cadmium hypersensitivity. *Plant Cell Physiol* **45**: 1787-1797
- Li Z-S, Lu Y-P, Zhen R-G, Szczypka M, Thiele Dennis J, Rea Philip A** (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 42-47
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J** (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol* **137**: 921-930
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**: 402-408
- Lodwig E, Poole P** (2003) Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *Crit Rev Plant Sci* **22**: 37-78
- Lodwig EM, Hosie AHF, Bourdes A, Findlay K, Allaway D, Karunakaran R, Downie JA, Poole PS** (2003) Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature* **422**: 722-726
- Loscos J, Naya L, Ramos J, Clemente MR, Matamoros MA, Becana M** (2006) A reassessment of substrate specificity and activation of phytochelatin synthases from model plants by physiologically relevant metals. *Plant Physiol* **140**: 1213-1221
- Lucas MM, Van de Sype G, Hérouart D, Hernández MJ, Puppo A, de Felipe MR** (1998) Immunolocalization of ferritin in determinate and indeterminate legume root nodules. *Protoplasma* **204**: 61-70
- Ma JF, Zheng SJ, Matsumoto H, Hiradate S** (1997) Detoxifying aluminium with buckwheat. *Nature* **390**: 569-570
- Maitani T, Kubota H, Sato K, Yamada T** (1996) The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol* **110**: 1145-1150
- Marino D, González EM, Arrese-Igor C** (2006) Drought effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules can be mimicked by paraquat: evidence for the occurrence of two regulation pathways under oxidative stresses. *J Exp Bot* **57**: 665-673
- Mata CG, Lamattina L** (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol* **126**: 1196-1204

- Matamoros MA, Baird LM, Escuredo PR, Dalton DA, Minchin FR, Iturbe-Ormaetxe I, Rubio MC, Moran JF, Gordon AJ, Becana M** (1999a) Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical, and structural alterations. *Plant Physiol* **121**: 97-112
- Matamoros MA, Dalton DA, Ramos J, Clemente MR, Rubio MC, Becana M** (2003) Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiol* **133**: 499-509
- Matamoros MA, Loscos J, Coronado MJ, Ramos J, Sato S, Testillano PS, Tabata S, Becana M** (2006) Biosynthesis of ascorbic acid in legume root nodules. *Plant Physiol* **141**: 1068-1077
- Matamoros MA, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Rubio MC, Becana M** (1999b) Glutathione and homogluthathione synthesis in legume root nodules. *Plant Physiol* **121**: 879-888
- McAinsh MR, Clayton H, Mansfield TA, Hetherington AM** (1996) Changes in stomatal behavior and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Plant Physiol* **111**: 1031-1042
- Meharg AA, Macnair MR** (1992) Genetic correlation between arsenate tolerance and the rate of influx of arsenate and phosphate in *Holcus lanatus* *Heredity* **69**: 336-341
- Mehra RK, Winge DR** (1988) Cu(I) binding to the *Schizosaccharomyces pombe* γ -glutamyl peptides varying in chain lengths. *Arch Biochem Biophys* **265**: 381-389
- Meneguzzo S, Navari-Izzo F, Izzo R** (1999) Antioxidative responses of shoots and roots of wheat to increasing NaCl concentrations. *J Plant Physiol* **155**: 274-280
- Mengel K, Kirkby E** (2001) Principles of Plant Nutrition. Ed 5. Kluwer Academic, Dordrecht
- Metwally A, Finkemeier I, Georgi M, Dietz KJ** (2003) Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol* **132**: 272-281
- Meuwly P, Thibault P, Schwan AL, Rauser WE** (1995) Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. *Plant J* **7**: 391-400
- Mewes HW, Albermann K, Bahr M, Frishman D, Gleissner A, Hani J, Heumann K, Kleine K, Maierl A, Oliver SG, Pfeiffer F, Zollner A** (1997) Overview of the yeast genome. *Nature* **387**: 7-65
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* **9**: 490-498
- Mittler R, Zilinskas BA** (1992) Molecular-cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *J Biol Chem* **267**: 21802-21807
- Mittler R, Zilinskas BA** (1994) Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant J* **5**: 397-405
- Moller IM, Jensen PE, Hansson A** (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 459-481

- Moran JF, Becana M, Iturbe-Ormaetxe I, Frechilla S, Klucas RV, Aparicio-Tejo P** (1994) Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* **194**: 346-352
- Natera SHA, Guerreiro N, Djordjevic MA** (2000) Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 995-1009
- Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP** (2007) Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol Plant* **129**: 185-195
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT** (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* **53**: 1237-1247
- Olivares J** (2006) Nitrogenasa. Enzima clave en la fijación. *En* EJ Bedmar, J González, C Lluch, MB Rodelas, eds, *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones*. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno, Granada, pp 29-34
- Ortiz DF, Ruscitti T, McCue KF, Ow DW** (1995) Transport of metal-binding peptides by Hmt1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J Biol Chem* **270**: 4721-4728
- Ott T, van Dongen JT, Gunther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P, Udvardi MK** (2005) Symbiotic leghaemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr Biol* **15**: 531-535
- Oven M, Grill E, Golan-Goldhirsh A, Kutchan TM, Zenk MH** (2002a) Increase of free cysteine and citric acid in plant cells exposed to cobalt ions. *Phytochemistry* **60**: 467-474
- Oven M, Page JE, Zenk MH, Kutchan TM** (2002b) Molecular characterization of the homo-phytochelatin synthase of soybean *Glycine max*. *J Biol Chem* **277**: 4747-4754
- Pal M, Horvath E, Janda T, Paldi E, Szalai G** (2006) Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. *J Plant Nutr Soil Sci* **169**: 239-246
- Parida AK, Das AB** (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol Environ Saf* **60**: 324-349
- Peña MMO, Puig S, Thiele DJ** (2000) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J Biol Chem* **275**: 33244-33251
- Porcel R, Barea JM, Ruiz-Lozano JM** (2003) Antioxidant activities in mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of nodule senescence. *New Phytol* **157**: 135-143
- Rajan KS, Mainer S, Rajan NL, Davis JM** (1981) Studies on the chelation of aluminum for neurobiological application. *J Inorg Biochem* **14**: 339-350
- Ramagli LS, Rodriguez LV** (1985) Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* **6**: 559-563
- Ramos J, Bisseling T** (2004) Symbiotic nitrogen fixation. *In* Amâncio S and Stulen I, eds, *Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, pp 99-131

- Ramos J, Clemente MR, Naya L, Loscos J, Pérez-Rontomé C, Sato S, Tabata S, Becana M** (2007) Phytochelatin synthases of the model legume *Lotus japonicus*. A small multigene family with differential response to cadmium and alternatively spliced variants. *Plant Physiol* **143**: 1110-1118
- Ramos MLG, Gordon AJ, Minchin FR, Sprent JI, Parsons R** (1999) Effect of water stress on nodule physiology and biochemistry of a drought tolerant cultivar of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ann Bot* **83**: 57-63
- Rauser WE** (1995) Phytochelatin and related peptides (structure, biosynthesis, and function). *Plant Physiol* **109**: 1141-1149
- Rauser WE** (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys* **31**: 19-48
- Rea PA, Vatamaniuk OK, Rigden DJ** (2004) Weeds, worms, and more. Papain's long-lost cousin, phytochelatin synthase. *Plant Physiol* **136**: 2463-2474
- Riccardi F, Gazeau P, Jacquemot MP, Vincent D, Zivy M** (2004) Deciphering genetic variations of proteome responses to water deficit in maize leaves. *Plant Physiol Bioch* **42**: 1003-1011
- Rodríguez Milla M, Maurer A, Rodríguez Huete A, Perry Gustafson J** (2003) Glutathione peroxidase genes in Arabidopsis are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *Plant J* **36**: 602-615
- Romanyuk ND, Rigden DJ, Vatamaniuk OK, Lang A, Cahoon RE, Jez JM, Rea PA** (2006) Mutagenic definition of a papain-like catalytic triad, sufficiency of the N-terminal domain for single-site core catalytic enzyme acylation, and C-terminal domain for augmentative metal activation of a eukaryotic phytochelatin synthase. *Plant Physiol* **141**: 858-869
- Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, Gómez M, del Rio LA, Sandalio LM** (2004) Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂⁻ and H₂O₂ in pea leaves. *Plant Cell Environ* **27**: 1122-1134
- Rossignol M, Peltier JB, Mock HP, Matros A, Maldonado AM, Jorriin JV** (2006) Plant proteome analysis: a 2004-2006 update. *Proteomics* **6**: 5529-5548
- Roxas VP, Smith RK, Allen ER, Allen RD** (1997) Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat Biotechnol* **15**: 988-991
- Rubio MC, González EM, Minchin FR, Webb KJ, Arrese-Igor C, Ramos J, Becana M** (2002) Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. *Physiol Plant* **115**: 531-540
- Rubio MC, James EK, Clemente MR, Bucciarelli B, Fedorova M, Vance CP, Becana M** (2004) Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 1294-1305
- Ruotolo R, Peracchi A, Bolchi A, Infusini G, Amoresano A, Ottonello S** (2004) Domain organization of phytochelatin synthase: functional properties of truncated enzyme species identified by limited proteolysis. *J Biol Chem* **279**: 14686-14693

- Ryter SW, Tyrrell RM** (1998) Singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$): a possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radic Biol Med* **24**: 1520-1534
- Saalbach G, Erik P, Wienkoop S** (2002) Characterisation by proteomics of peribacteroid space and peribacteroid membrane preparations from pea (*Pisum sativum*) symbiosomes. *Proteomics* **2**: 325-337
- Sairam RK, Tyagi A** (2004) Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr Sci* **86**: 407-421
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gómez M, Romero-Puertas MC, del Rio LA** (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J Exp Bot* **52**: 2115-2126
- Santos R, Bocquet S, Puppo A, Touati D** (1999) Characterization of an atypical superoxide dismutase from *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **181**: 4509-4516
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J* **31**: 279-292
- Serraj R, Sinclair TR** (1996) Inhibition of nitrogenase activity and nodule oxygen permeability by water deficit. *J Exp Bot* **47**: 1067-1073
- Serraj R, Vasquez-Díaz H, Drevon JJ** (1998) Effects of salt stress on nitrogen fixation, oxygen diffusion, and ion distribution in soybean, common bean, and alfalfa. *J Plant Nutr* **21**: 475-488
- Shalata A, Mittova V, Volokita M, Guy M, Tal M** (2001) Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidative system. *Physiol Plant* **112**: 487-494
- Sharp RE, Silk WK, Hsiao TC** (1988) Growth of the maize primary root at low water potentials. I. Spatial distribution of expansive growth. *Plant Physiol* **87**: 50-57
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M** (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**: 850-858
- Shi H, Zhu JK** (2002) Regulation of expression of the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene *AtNHX1* by salt stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol* **50**: 543-550
- Sigaud S, Becquet V, Frendo P, Puppo A, Hérouart D** (1999) Differential regulation of two divergent *Sinorhizobium meliloti* genes for HP-II-like catalases during free-living growth and protective role of both catalases during symbiosis. *J Bacteriol* **181**: 2634-2639
- Silver S** (1996) Bacterial resistances to toxic metal ions - a review. *Gene* **179**: 9-19
- Sinclair TR, Serraj R** (1995) Legume nitrogen fixation and drought. *Nature* **378**: 344
- Smirnoff N** (1998) Plant resistance to environmental stress. *Curr Opin Biotech* **9**: 214-219

- Soto MJ, Oliva-García JJ, Sanjuán J, Olivares J** (2006) Simbiosis mutualista *Rhizobium*-leguminosa versus patogénesis. En EJ Bedmar, J González, C Lluch, MB Rodelas, eds, Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno, Granada, pp 137-147
- Soussi M, Lluch C, Ocaña A** (1999) Comparative study of nitrogen fixation and carbon metabolism in two chick-pea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under salt stress. *J Exp Bot* **50**: 1701-1708
- Sreenivasulu N, Sopory SK, Kishor PBK** (2007) Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. *Gene* **388**: 1-13
- Stadtman ER** (1992) Protein oxidation and aging. *Science* **257**: 1220-1224
- Swaraj K, Laura JS, Bishnoi NR** (1994) Dark treatment effects on nitrogen fixation and enzymes associated with scavenging hydrogen peroxide in clusterbean nodules. *Plant Physiol Biochem* **32**: 115-119
- Taylor NL, Heazlewood JL, Day DA, Millar AH** (2005) Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome. *Mol Cell Proteomics* **4**: 1122-1133
- Tejera NA, Campos R, Sanjuán J, Lluch C** (2004) Nitrogenase and antioxidant enzyme activities in *Phaseolus vulgaris* nodules formed by *Rhizobium tropici* isogenic strains with varying tolerance to salt stress. *J Plant Physiol* **161**: 329-338
- Temple SJ, Vance CP, Stephen Gantt J** (1998) Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends Plant Sci* **3**: 51-56
- Ulrike M, Keijzers U, Natera S, Weinman J, Djordjevic M, Rolfe B** (2001) Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. *Proteomics* **1**: 1424-1440
- Ullrich-Eberius CI, Sanz A, Novacky AJ** (1989) Evaluation of arsenate- and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* G1. *J Exp Bot* **40**: 119-128
- Van Camp W, Capiou K, Van Montagu M, Inze D, Slooten L** (1996) Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiol* **112**: 1703-1714
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lang A, Chalasani S, Demkiv LO, Rea PA** (2004) Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with γ -glutamylcysteine during catalysis. *J Biol Chem* **279**: 22449-22460
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA** (1999) AtPCS1, a phytochelatin synthase from Arabidopsis: isolation and *in vitro* reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 7110-7115
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA** (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase. *J Biol Chem* **275**: 31451-31459
- Vieira Dos Santos C, Rey P** (2006) Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *Trends Plant Sci* **11**: 329-334

- Vivares D, Arnoux P, Pignol D** (2005) A papain-like enzyme at work: native and acyl-enzyme intermediate structures in phytochelatin synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 18848-18853
- Wasternack C** (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* **100**: 681-697
- Wilson AM, Harris GA** (1966) Hexose-, inositol-, and nucleoside phosphate esters in germinating seeds of crested wheatgrass. *Plant Physiol* **41**: 1416-1419
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, VanMontagu M, Inze D, VanCamp W** (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO J* **16**: 4806-4816
- Winter H, Huber SC** (2000) Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Crit Rev Plant Sci* **19**: 31-67
- Witty JF, Minchin FR** (1998) Methods for the continuous measurement of O₂ consumption and H₂ production by nodulated legume root systems. *J Exp Bot* **49**: 1041-1047
- Witty JF, Minchin FR, Sheehy JE** (1983) Carbon costs of nitrogenase activity in legume root nodules determined using acetylene and oxygen. *J Exp Bot* **34**: 951-963
- Wünschmann J, Beck A, Meyer L, Letzel T, Grill E, Lenzian KJ** (2007) Phytochelatin synthesis is catalyzed by two vacuolar serine carboxypeptidases in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **581**: 1681-1687
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stress. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 781-803
- Yamasaki H, Shimoji H, Ohshiro Y, Sakihama Y** (2001) Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric Oxide* **5**: 261-270
- Yan SP, Tang ZC, Su W, Sun WN** (2005) Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics* **5**: 235-244
- Zacchini M, Rea E, Tullio M, de Agazio M** (2003) Increased antioxidative capacity in maize calli during and after oxidative stress induced by a long lead treatment. *Plant Physiol Biochem* **41**: 49-54
- Zenk MH** (1996) Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* **179**: 21-30
- Zhang KR, McKinlay C, Hocart CH, Djordjevic MA** (2006) The *Medicago truncatula* small protein proteome and peptidome. *J Proteome Res* **5**: 3355-3367
- Zhang W, Ruan J, Ho T-hD, You Y, Yu T, Quatrano RS** (2005) Cis-regulatory element based targeted gene finding: genome-wide identification of abscisic acid- and abiotic stress-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics* **21**: 3074-3081