



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

**Función de la Tiorredoxina (TRXo1) Mitocondrial  
y Nuclear: Avances en su Implicación en  
Señalización y Estrés Salino**

**D. Antonio María Sánchez Guerrero  
2019**





**“Función de la Tiorredoxina (TRXo1) Mitocondrial y Nuclear: Avances en su Implicación en Señalización y Estrés Salino”**

Memoria presentada para aspirar al  
Grado de Doctor por la Universidad de Murcia

**Antonio María Sánchez Guerrero**

Directoras:

**Dra. Francisca Sevilla Valenzuela**

**Dra. Ana María Jiménez Hurtado**



Los trabajos de investigación recogidos en la presente Memoria han sido financiados por los siguientes **Proyectos**:

- MICINN (Ref. BFU2014-52452-P y BFU2017-86585-P cofinanciados por Fondos FEDER).
- Fundación Séneca, Murcia (19876/GERM/15)

El firmante del presente trabajo de Tesis ha disfrutado de una beca predoctoral del Programa de Formación del Personal Investigador (FPI) (Ministerio de Economía y Competitividad).

Este trabajo ha sido presentado en los siguientes **Congresos**:

- **Sánchez-Guerrero, A.**, Nadal M., Del Saz-Fernández, N., Florez-Sarasa, I., Fernie, A., Ribas-Carbó, M., Flexas, J., Jiménez, A., Sevilla, F. *Lack and overexpression of Trxo1 in Arabidopsis affect mitochondrial metabolism and photosynthetic process under salinity*. XXIII Reunión bianual de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y el XVI Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Pamplona, 2019. Póster.
- Jiménez, A., **Sánchez-Guerrero, A.**, López Vidal, O., Calderón, A., Ortiz-Espín, A. *Caracterización funcional de Trxo1 e implicación de autofagia en la maduración de frutos*. ROSPLANT. Carmona, 2018. Comunicación Oral.
- Ortiz-Espín, A., **Sánchez-Guerrero, A.**, Calderón, A., Jiménez, A., Sevilla, F. *Buscando la huella de la Tiorredoxina o1 (Trxo1) en salinidad*. ROSPLANT. San Lúcar de Barrameda, 2018. Comunicación Oral.
- **Sánchez-Guerrero, A.** *Participación de la Trxo1 en el estrés salino y en ciclo celular*. Reunión de la Red de Excelencia ROSPLANT sobre Regulación redox y estrés oxidativo y nitrosativo en plantas. Aracena, 2017. Comunicación Oral.
- Jiménez, A., Sevilla, F., Calderón, A., **Sánchez-Guerrero, A.**, Ortiz-Espín, A. *Sistemas antioxidantes y redox en mitocondria y núcleo como integrantes de procesos de señalización y respuesta a estrés abiótico*. ROSPLANT. Carmona, 2016. Comunicación Oral.
- **Sánchez-Guerrero, A.**, Calderón, A., Ortiz-Espín, A., Martí, M.C., Camejo, D., Jiménez, A., Sevilla, F. *Lack of mitochondrial Trxo1: its effect under salinity stress in A. thaliana plants*. IV Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia. Murcia, 2018. Póster.
- Sevilla, F., Pallardó, F., Calderón, A., Ortiz-Espín, A., **Sánchez-Guerrero, A.**, Jiménez, A. *What is Trxo1 doing in plant nuclei?* XI Reunión del Grupo Español de Radicales Libres (GEIRLI) Granada, 2016. Comunicación Oral.
- **Sánchez-Guerrero, A.**, Martí, M.C., Sevilla, F., Jiménez, A. *Analysing the role of thioredoxin o1 under salt stress in Arabidopsis plants*. The 23<sup>rd</sup>

International Conference on Plant Growth Substances IPGSA2019. París, 2019.  
Póster.

- León González, H., Rosique Aznar, C.G., Ramírez, Y., **Sánchez-Guerrero, A.**, Jiménez, A. 2018. *Caracterización de plantas de Arabidopsis mutantes en una proteína redox en respuesta a ABA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*. Congreso I+D en Institutos de Educación Secundaria IDIES. Murcia 2018. Comunicación Oral y Póster.

Esta tesis ha dado lugar a las siguientes **Publicaciones científicas**:

**Sánchez-Guerrero, A.**, Del-Saz, N. F., Florez-Sarasa, I., Ribas-Carbó, M., Fernie, A. R., Jiménez, A., & Sevilla, F. (2019). Coordinated responses of mitochondrial antioxidative enzymes, respiratory pathways and metabolism in *Arabidopsis thaliana* thioredoxin *trxo1* mutants under salinity. *Environmental and Experimental Botany*, 162, 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.026>

Calderón, A.†, **Sánchez-Guerrero, A.†**, Ortiz-Espín, A., Martínez-Alcalá, I., Camejo, D., Jiménez, A., & Sevilla, F. (2018). Lack of mitochondrial thioredoxin o 1 is compensated by antioxidant components under salinity in *Arabidopsis thaliana* plants. *Physiologia Plantarum*, 164 (3), 251–267. <https://doi.org/10.1111/ppl.12708>(†These authors contributed equally).

Ortiz-Espín, A., **Sánchez-Guerrero, A.**, Sevilla, F., & Jiménez, A. (2017). The Role of Ascorbate in Plant Growth and Development BT - Ascorbic Acid in Plant Growth, Development and Stress Tolerance (M.A. Hossain, S. Munné-Bosch, D. J. Burritt, P. Diaz-Vivancos, M. Fujita, & A. Lorence, Eds.). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74057-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74057-7_2)

## AGRADECIMIENTOS

Si algo ha hecho que esta experiencia merezca la pena, son las personas que me han acompañado en el camino. He conocido en estos años a personas admirables, y uso este adjetivo porque realmente les admiro; me han inspirado en algún momento, he aprendido de ellas o sencillamente me han hecho más fuerte, más sereno y más resiliente. A todas estas personas dedico estas líneas de agradecimiento que, si bien forman parte de la liturgia de una tesis, son sinceras y guardan bonitos recuerdos y mucho cariño.

En primer lugar, agradezco mucho a mis directoras, las Dras. Francisca Sevilla y Ana Jiménez, por darme la oportunidad de crecer realizando esta Tesis Doctoral en su departamento, ellas han dirigido mis pasos procurando formarme como científico en el rigor experimental, la abnegación por el trabajo y la versatilidad que requiere una labor tan multidisciplinar como la que se realiza en este laboratorio.

Antes de llegar hubo unos “culpables” que me guiaron hasta aquí, y a quienes estoy muy agradecido, sobre todo porque creyeron en mí, me vieron capaz y me inspiraron para, al menos, intentarlo. El Dr. Andrés Borges del IPNA-CSIC supo inculcar, en un estudiante algo aburrido de años de clases y exámenes, un nuevo interés por la carrera científica que rápidamente me enganchó. Allí en Tenerife cogí una ola que me llevó a la EEZ-CSIC de Granada donde unas encantadoras Dras. Luisa M. Sandalio y María Romero me acogieron en su laboratorio donde aprendí las bases del amplio mundo de las ROS/RNS, agradezco mucho el trato y la formación recibida. Allí me pegué a María Sanz de quien debía aprender todo lo que pudiera, y eso hice entre las buenas risas y charlas que echamos, un auténtico placer. En este mismo laboratorio me encontré con una de las personas más entusiastas que conozco, la siempre risueña, trabajadora y solícita Laura Terrón, compañera de máster y de labo, la mejor simbiote que un vegetal o un biólogo pueden tener.

A Murcia llegué gracias a la confianza y formación recibida en la EEZ. Aquí en el CEBAS-CSIC he podido disfrutar de compañeros y compañeras que se volcaron conmigo en distintos momentos de la Tesis y con los que hice piña ante la adversidad. Aingeru Calderón (ahora doctor) fue mi primer amigo aquí, mi compañero y un gran maestro en mis primeros pasos, un orgullo haber sido su padaguan, gracias compa. Ana Ortiz dirigió mis manos inexpertas en mis primeras incursiones en la biología molecular, superamos un sinfín de obstáculos trabajando en equipo, creo que ambos aprendimos mucho y en muchos aspectos, gracias colega legal. Otra persona indispensable para la realización de esta Tesis ha sido Sandra Correa, una excelente técnico con la que he tenido la suerte de contar para todo, le debo a ella muy buenos ratos, la compañía y gran parte de la carga experimental de este trabajo, muchas gracias Sandri. Y bueno, al grande de Omar López, el gusano rojo de los mezcales, el maestro del ultimate frisbee y de los western-blot, a ti compañero agradecerte lo mucho que alegras el día a día de los que te rodean, espero poder ir pronto a tus montañas mejicanas, gracias carnal.

En mi primera estancia breve realizada en el CBGP de Madrid me acogió amablemente la Dra Isabel Díaz a quien agradezco la acogida y el buen trato recibido en su laboratorio así como el apoyo moral tras los primeros fracasos experimentales. Me encontré muy a gusto allí gracias a la dirección de las Dras. Blanca Velasco y Estrella Santamaría. Trabajar con ellas y con Andrea Gómez y Ana Arnaiz, quien me ofreció una inestimable ayuda para finalmente obtener resultados, fue un auténtico placer; muchísimas gracias a todo ese equipazo de mujeres admirables. No me olvido de Jose quien me ofreció su casa en un momento de dificultad sin casi conocerme, hay gente muy buena por ahí y muchos de ellos son canarios.

Mi último “esfuerzo experimental” lo realicé en el laboratorio del Dr. José León del IBMCP (Valencia), bajo su atenta dirección he obtenido los resultados de los que más orgulloso me siento en ésta Tesis, una vez más, muchísimas gracias Pepe. La gente que he conocido allí es, para mí, familia; rodearte de esa calidad humana es un privilegio. Empezando por Maricruz Castillo, que solo le faltaba decirme que me pusiera el chaquetón para ser mi madre valenciana, que habría sido de mí sin ti, moltes gràcies. Jorge Lozano y Ricardo Mir, chiquitos craks! los hermanos mayores a los que uno quiere parecerse, con esa gente voy donde haga falta. Lo mismo digo de la hiperactiva, espiritual y bellísima persona que es. Laetitia Poidevin, muchas gracias por ese viaje interior al son de los tambores. De Alberto Coego me llevo la serenidad, será la experiencia o la sangre cubana pero qué capacidad y cuánto conocimiento práctico acumulado, eso es oro para cualquier laboratorio, un absoluto placer. Y otro placer fue conocer a Irene García, que además de ser toda una promesa científica es una magnífica cocinera, y tanto sus tartas como su sonrisa le alegran la mañana a cualquiera. Ya casi sin espacio, os mando un fuerte abrazo al Dr. Álvaro Costa y a José Valenzuela a los que agradezco la ayuda, los consejos y los buenos ratos, espero que vengan más.

A mi familia por hacerme como soy, siempre fiel a lo aprendido en casa. Y a mi compañera de vida por sufrir todos estos años siempre conmigo, a mi lado, a 650 km de distancia. Os doy las gracias aquí, pero os vais a hartar cuando me ponga a devolveros todo lo que os debo, no te lo puedo contar chacho!

*“Respetar la vida e impulsarla.”*

Pepe Mujica.

**A mis padres,  
Yolanda y Antonio**

**A mi abuela,  
Leli**



# ÍNDICE



**ÍNDICE**

ABREVIATURAS .....	9
OBJETIVOS.....	15
INTRODUCCIÓN.....	21
1. Estrés en plantas.....	21
2. Estado redox y especies reactivas de oxígeno, de nitrógeno y de azufre.....	22
2.1. Especies reactivas de oxígeno.....	23
2.1.1. Producción de ROS en plantas.....	26
2.1.2. Estrés oxidativo y señalización: Efecto dual de las ROS .....	34
2.1.3. Modificaciones post-traduccionales producidas por ROS: Señalización redox .....	37
2.2. Especies reactivas de nitrógeno.....	39
2.2.1. Modificaciones post-traduccionales producidas por RNS.....	40
3. Sistemas antioxidantes.....	44
3.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos .....	45
3.1.1. Superoxido dismutasas (SODs, EC 1.15.1.1) .....	45
3.1.2. Catalasas (CAT, EC 1.11.1.6).....	47
3.1.3. Ciclo Ascorbato Glutación (ASC-GSH) .....	47
3.1.4. Oxidasa Alternativa (AOX EC 1.10.3.11).....	50
3.1.5. Tiorredoxinas .....	51
3.1.6. Peroxirredoxinas .....	68
3.1.7. Sulfirredoxinas .....	70
3.1.8. Glutarredoxina.....	72
3.2. Sistemas antioxidantes no enzimáticos .....	73
3.2.1. Ascorbato .....	73
3.2.2. Glutación .....	74
4. El ácido abscísico (ABA).....	76
4.1. La molécula de ABA: consideraciones generales y biosíntesis .....	76
4.2. Catabolismo del ABA.....	79
4.3. Papel del ABA en la señalización durante el estrés .....	81
4.4. Señalización independiente de ABA. ....	83
5. Estrés salino.....	84
MATERIALES Y MÉTODOS .....	91
1. Material vegetal.....	91

1.1.	Nicotiana benthamiana L. ....	91
1.2.	Pisum sativum L. ....	91
1.3.	Arabidopsis thaliana L. ....	92
1.3.1.	Cepas usadas.....	92
1.3.2.	Condiciones de cultivo .....	93
1.3.3.	Manipulación de las semillas .....	95
1.3.4.	Caracterización fisiológica .....	96
2.	Bacterias .....	97
2.1.	Escherichia coli .....	97
2.1.1.	Cepas empleadas .....	97
2.1.2.	Condiciones de cultivo .....	98
2.1.3.	Preparación de células termocompetentes.....	98
2.1.4.	Transformación por choque térmico.....	99
2.2.	Agrobacterium tumefaciens.....	100
2.2.1.	Cepas empleadas .....	100
2.2.2.	Condiciones de cultivo .....	100
2.2.3.	Preparación de electro-competentes.....	100
2.2.4.	Transformación por electroporación.....	101
3.	Genética molecular.....	101
3.1.	Diseño de oligonucleótidos .....	101
3.2.	ADN .....	103
3.2.1.	Extracción de ADN genómico.....	103
3.2.2.	Extracción de ADN plasmídico. ....	103
3.2.3.	Electroforesis de ADN en geles de agarosa .....	104
3.2.4.	Extracción de ADN de geles de agarosa.....	105
3.2.5.	Cuantificación de ADN en solución.....	105
3.3.	PCR .....	106
3.3.1.	PCR convencional.....	106
3.3.2.	PCR de colonia .....	108
3.3.3.	PCR anidada .....	108
3.4.	Manipulación enzimática del ADN .....	109
3.5.	Secuenciación.....	110
3.6.	ARN.....	111

3.6.1.	Tratamiento del material .....	111
3.6.2.	Métodos de extracción .....	111
3.6.3.	Electroforesis ARN .....	112
3.6.4.	Cuantificación de ARN en solución .....	113
3.6.5.	Retrotranscripción .....	114
3.7.	Obtención de insertos AtTRXo1, AtPYR1, PsTRXo1 y PsPYR1 .....	115
3.7.1.	Secuencias conocidas: AtTRXo1, AtPYR1, PsTRXo1 .....	115
3.7.2.	Secuencias desconocidas: PsPYR1 .....	116
3.8.	Estrategias de clonación.....	120
3.8.1.	Clonación convencional .....	120
3.8.2.	Clonación en pGEM®-T easy .....	121
3.8.3.	Sistema de clonación GATEWAY .....	123
3.8.4.	Clonación de AtTRXo1, AtPYR1, PsTRXo1 y PsPYR1 en pGEM.....	126
3.8.5.	Clonación de AtTRXo1, AtPYR1, PsTRXo1 y PsPYR1 en CD3-N/CGFP. ....	126
3.8.6.	Clonación de AtTRXo1, AtPYR1, PsTRXo1 y PsPYR1 en los vectores pCX, pXC, pNX y pXN.....	127
3.9.	Criopreservación de clones .....	128
4.	Estudio de interacción At/PsPYR1 como diana nuclear de At/PsTRXo1 .....	129
4.1.	Dot-Blot trampa .....	129
4.2.	Co-Inmunoprecipitación PsTRXo1-AtPYR1-His .....	130
4.3.	Complementación bimolecular fluorescente (BiFC) por biobalística .....	131
4.3.1.	Preparación de los microproyectiles .....	131
4.3.2.	Preparación del material vegetal.....	132
4.3.3.	Condiciones de bombardeo .....	132
4.3.4.	Microscopía confocal .....	132
4.4.	Complementación bimolecular fluorescente BiFC por agroinfiltración .....	133
4.4.1.	Preparación de Nicotiana benthamiana .....	133
4.4.2.	Preparación de Agrobacterium tumefaciens.....	133
4.4.3.	Microscopía confocal .....	134
4.5.	Caracterización fisiológica de respuesta a ABA. ....	135
4.5.1.	Respuesta estomática a ABA. ....	135
4.5.2.	Germinación en presencia de ABA. ....	135
5.	Proteómica .....	136
5.1.	Extracción de proteínas totales.....	136

5.2.	Extracto enriquecido en mitocondrias (EEM) .....	137
5.3.	Aislamiento de mitocondrias .....	138
5.4.	Expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	138
5.4.1.	Expresión de proteínas en E. coli.....	138
5.4.2.	Purificación de las proteínas recombinantes AtPyr1 y PsTRXo1CAM con tag de Histidina.....	139
5.4.3.	Eliminación del tag de Histidina en PsTRXo1CAM.....	140
5.5.	Electroforesis de proteínas .....	141
5.5.1.	Electroforesis nativas y desnaturizantes: PAGE y SDS-PAGE.....	141
5.6.	Tinción de proteínas.....	143
5.6.1.	Tinción con Coomassie.....	143
5.6.2.	Tinción con PageBlue™ .....	143
5.6.3.	Tinción con Imperial™ .....	144
5.7.	Concentración de proteínas.....	144
5.8.	Medida de concentración de proteínas.....	145
6.	Actividades enzimáticas .....	145
6.1.	Marcadores organulares .....	146
6.2.	Actividades antioxidantes .....	148
6.2.1.	Isoenzimas de SODs .....	148
6.2.2.	Ciclo ASC-GSH .....	149
6.2.3.	Ascorbato peroxidasa .....	149
6.2.4.	Monodeshidroascorbato reductasa .....	149
6.2.5.	Deshidroascorbato reductasa.....	150
6.2.6.	Glutación reductasa .....	150
7.	Medidas de respiración y fraccionamiento isotópico de oxígeno. ....	151
8.	Medidas de fotosíntesis.....	151
8.1.	Conductancia estomática.....	151
8.2.	Medición y análisis de la densidad estomática y el índice de apertura.....	151
8.3.	Pigmentos.....	152
8.4.	Parámetros fotosintéticos.....	153
9.	Recuperación de actividad de AtPyr1 oxidado mediada por PsTRXo1 .....	154
9.1.	Tratamientos previos de las proteínas recombinantes .....	154
9.2.	Actividad fosfatasa .....	155
10.	Técnicas inmunológicas: Western-blot, Dot-blot y Dot-blot trampa .....	157

10.1.	Mild Stripping .....	160
11.	Metabolitos.....	160
11.1.	Análisis de hormonas.....	160
11.2.	Metabolitos generales.....	161
11.3.	Determinación de peróxidos lipídicos .....	162
11.4.	Determinación de proteínas oxidadas .....	162
11.5.	Determinación de peróxido de hidrógeno .....	163
11.6.	Determinación de óxido nítrico.....	164
12.	Tratamiento estadístico .....	164
	RESULTADOS .....	167
1.	Estudio funcional de AtTRXo1 en mitocondrias .....	167
1.1.	Parámetros de crecimiento.....	167
1.2.	Aislamiento de las mitocondrias .....	169
1.3.	Medida de estrés oxidativo mitocondrial .....	171
1.4.	Medida de enzimas antioxidantes .....	173
1.5.	Medida de respiración y partición electrónica .....	176
1.6.	Inmunodetección y estado redox de AOX .....	178
1.7.	Perfil de metabolitos.....	180
2.	Análisis de la interacción TRXo1-PYR1.....	185
2.1.	Estudio de la interacción y regulación de PYR1 por TRXo1 .....	185
2.2.	Ensayo dot-blot trampa .....	185
2.3.	Ensayo de Co-inmunoprecipitación .....	188
2.4.	Ensayo de complementación bimolecular fluorescente.....	189
2.5.	Actividad de PYR1 mediada por TRXo1.....	194
2.6.	Caracterización de la sensibilidad a ABA de mutantes KO1 y OEX Attrxo1 ...	197
2.7.	Ensayo de deshidratación .....	198
2.8.	Germinación en presencia de ABA.....	199
2.9.	Dinámica estomática en respuesta a ABA .....	202
3.	Estudio funcional de AtTrxo1 en fotosíntesis.....	203
3.1.	Caracterización de parámetros de desarrollo.....	203
3.2.	Caracterización de parámetros fisiológicos: densidad estomática y contenido en clorofilas .....	206
3.3.	Medida de marcadores y metabolitos oxidativos.....	210
3.4.	Medida de glutatión, nitrosoglutatión y ascorbato .....	212

3.5. Medida de hormonas .....	214
3.6. Medida de metabolitos .....	216
3.7. Medida de parámetros fotosintéticos .....	220
DISCUSIÓN .....	225
1. Estudio del metabolismo respiratorio en mutantes <i>Attrxo1</i> en salinidad .....	225
1.1. Caracterización fisiológica, metabolismo oxidativo y antioxidante.....	225
1.2. Vías respiratorias.....	229
1.3. Cambios metabólicos.....	231
2. Estudio de la interacción TRXo1-PYR1.....	233
3. Estudio del proceso fotosintético en mutantes <i>Attrxo1</i> .....	237
3.1. Caracterización fisiológica.....	238
3.2. Metabolismo hormonal.....	245
3.3. Metabolismo oxidativo y antioxidante .....	249
3.4. Vía fotosintética .....	251
3.5. Cambios metabólicos.....	254
CONCLUSIONES PRINCIPALES .....	261
BIBLIOGRAFÍA.....	265
ANEXOS. ....	335
Anexo1. TABLA DE PRIMERS .....	335
Anexo 2. Análisis de ortólogos de PsPYR1. ....	337
Anexo 3. Vectores. ....	339

# **ABREVIATURAS**



## ABREVIATURAS

**ABRE:** ABA-responsive element

**ADNc:** ADN complementario

**ADNg:** ADN genómico

**Amp:** Ampicilina

**APX:** Ascorbato peroxidasa

**AR:** After-Ripening

**ASC:** Ascorbato reducido

**ATP:** Adenosín trifosfato

**BLAST:** Basic local alignment

**CAT:** Catalasa

**Cb:** Carbencilina

**Cys:** Cisteína

**Cit:** Citoplasma

**Cp:** Cys peroxidática

**Cr:** Cys resolutive

**Cit c:** Citocromo c

**CTE:** Cadena de transporte electrónico

**CTEm:** Cadena de transporte electrónico mitocondrial

**DEPC:** Dietilpirocarbonato

**DHA:** Deshidroascorbato

**DHAR:** Deshidroascorbato reductasa

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**EIM:** Espacio intermembrana mitocondrial

**Fd:** ferredoxina

**FNR:** ferredoxin-NADP + reductasa

**FTR:** tiorredoxina reductasa dependiente de ferredoxina

**GFP:** Green fluorescent protein

**GLDH:** L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa

**Gm:** Gentamicina

**GPXL:** glutatión peroxidasa-like

**GR:** Glutatión reductasa

**GRX:** Glutarredoxina

**GSH:** Glutatión reducido

**GSSG:** Glutatión oxidado

**IMS:** espacio intermembrana mitocondrial

**IPTG:** Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

**Km:** Kanamicina

**KO:** Mutante Knock Out

**MDA:** Malondialdehído

**MDHA:** Monodeshidroascorbato

**MDHAR:** Monodeshidroascorbato reductasa

**MES:** Tampón ácido 2-(N-morpholino) ethanosulfónico

**Mit:** Mitocondria

**NAD<sup>+</sup>/NADH:** Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada/reducida

**NADP<sup>+</sup>/NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada/reducida

**NIB:** Nuclear isolation buffer

**NTR:** NADPH/tiorredoxina reductasa

**Oxi-PTM:** Modificaciones postraduccionales generadas por ROS

**P:** promotor

**PCD:** Programmed cell death (Muerte celular programada)

**PEG:** Polietilenglicol

**PP2C:** Protein Phosphatase 2C

**PRX:** Peroxirredoxina

**PTM:** Modificaciones postraduccionales.

**RE:** Retículo endoplásmico

**RNR:** ribonucleotidoreductasa.

**RNS:** Reactive nitrogen species

**ROS:** Reactive oxygen species

**RR:** ribonucleótido reductasas

**RSH:** tiol reducido

**R-SOH:** acido sulfénico

**RSNO:** S-nitrosotiol

**RP-LP:** right border/left border primers

**SnRK2:** Kinase related to sugar cane

**SOD:** Superóxido dismutasa

**SRX:** sulfirredoxina

**TAE:** Tampón Tris-Acetato EDTA

**TBS:** Tampón Tris salino

**TBST:** Tampón Tris salino y Tween

**TBY-2:** Tobacco Bright Yellow-2

**TF:** Factor de transcripción

**TRX:** Tiorredoxina

**UQ:** Ubiquinona

**WT:** Wild type, genotipo silvestre



# **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

En nuestro grupo de investigación **“Estrés Abiótico, Producción y Calidad”** perteneciente al Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) de Murcia, una de las líneas de investigación que venimos desarrollando de forma recurrente, está enfocada al avance en la caracterización funcional de sistemas antioxidantes enzimáticos y de proteínas redox mitocondriales y nucleares. Concretamente la investigación más reciente está focalizada en determinar el papel de la tiorredoxinao1 (PsTRXo1 y AtTRXo1) mitocondrial y nuclear junto a la de su diana mitocondrial peroxirredoxina (PsPRXIIF), en procesos vinculados a la respuesta adaptativa a condiciones de estrés salino, como procesos de desarrollo, viabilidad y ciclo celular.

La funcionalidad de estas proteínas redox mitocondriales en sistemas animales y en levaduras se encuentra bien establecida, sin embargo en sistemas vegetales y más concretamente en plantas, la función celular ejercida por estas TRXs mitocondriales es prácticamente desconocida, en contraposición a los avances que en este sentido se han realizado para las TRXs cloroplastídicas y citosólicas. A este respecto es realmente sorprendente que en mitocondrias en las que la generación de ROS es importante, la presencia de TRXs encargadas de reducir proteínas oxidadas en sus cisteínas, sea muy escasa. Así entre los 30 a 45 genes que codifican TRXs, o bien proteínas similares a TRX, en las angiospermas solo uno o dos genes codifican para TRXs presentes en la mitocondria estando la mayoría ubicadas en los plástidos y en el citosol/núcleo.

En cuanto a la información actual a nivel de función celular de la tiorredoxina mitocondrial/nuclear, se ha propuesto la participación de TRXo1 en la regulación redox de la oxidasa alternativa (AOX), en la regeneración de PRXIIF, y en la activación por reducción y también en la desactivación de varias enzimas del ciclo TCA.

En nuestro laboratorio de forma similar se ha descrito la posible participación de PsTRXo1 en procesos relacionados con la respuesta a estrés abiótico, en el proceso de germinación de semillas y en muerte celular programada y se ha informado por primera vez sobre la identificación de determinados factores de transcripción implicados en su regulación génica. Así mismo hemos vinculado a PsTRXo1 con la proteína PCNA

(Antígeno Nuclear de Proliferación Celular) y en base a esta interacción, su vinculación con el proceso de proliferación celular y con el ciclo celular. En este contexto, la función celular de PsTRXo1 en el núcleo es de especial interés considerando la participación descrita para tiorredoxinas de origen bacteriano y animal en la regulación del ciclo celular y apoptosis. Con el fin de avanzar en la caracterización funcional de TRXo1 pensamos que es importante determinar de forma fehaciente sus proteínas diana tanto a nivel mitocondrial como nuclear, ya que la identificación y ratificación de las mismas constituye una vía que va a permitir conocer los procesos celulares en los que TRXo1 está involucrada. Por otro lado, la investigación sobre la participación de TRXo1 en respuesta a condiciones de estrés abiótico, concretamente en la respuesta adaptativa al estrés salino, requiere junto al análisis de los cambios inducidos en parámetros fisiológicos, bioquímicos, celulares, proteómicos y transcriptómicos en las plantas sometidas a estrés, el empleo de plantas alteradas en los contenidos celulares de TRXo1, concretamente mutantes *Knockout (KO)* y *Over-expressor (OEX)* en *TRXo1*. El empleo de estos genotipos mutantes constituye un aspecto importante para el establecimiento de la posible función ejercida por esta tiorredoxina en el mecanismo de adaptación de plantas de *Arabidopsis* a la salinidad, posiblemente extrapolable a otros cultivos.

En base a ello consideramos que la investigación realizada en esta Tesis Doctoral representa un avance en el estudio funcional de la TRXo1 al permitir identificar nuevos aspectos aún no descritos para la misma. De acuerdo con estas consideraciones, en este trabajo de Tesis Doctoral se han propuesto los siguientes.

### **Objetivos:**

**1.-**Analizar la participación de AtTRXo1 en respuesta a estrés salino a nivel de planta y en mitocondrias aisladas de plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres y mutantes homocigóticos *Knockout Attrxo1*.

**1.1.** Caracterizar el efecto de la salinidad en el metabolismo respiratorio y en los componentes del sistema antioxidante: Mn-SOD, Ciclo Ascorbato-Glutatión y AOX.

**1.2.** Identificar el patrón de metabolitos en los diferentes genotipos en condiciones no estresantes y de salinidad.

**2.-**Analizar la función en núcleo de TRXo1 (PsTRXo1 y AtTRXo1).

**2.1.** Corroborar la interacción PYR1 (Pyrabactin Resistance 1) y TRXo1 en núcleo mediante diversas aproximaciones experimentales.

**2.2.** Analizar la capacidad reductora de TRXo1 sobre su diana PYR1 y el efecto en su actividad.

**2.3.** Obtener una línea homocigótica sobre-expresante *Attrxo1* (OEX), comparar su respuesta a tratamientos con ABA con la presentada por mutantes KO *Attrxo1* y genotipo silvestre, mediante el análisis del proceso de germinación y del desarrollo y dinámica estomática.

**3.-**Caracterizar la participación de TRXo1 en la respuesta fotosintética al estrés salino en plantas mutantes KO*Attrxo1* y OEX *Attrxo1*.

**3.1.** Estudiar los cambios morfológicos, parámetros oxidativos, contenidos en hormonas y el desarrollo y cinética estomática, en plantas de los tres genotipos (KO, OEX y WT), en condiciones de salinidad y fotoperiodo de día corto.

**3.2.** Analizar diferentes parámetros fotosintéticos como transporte electrónico, asimilación fotosintética, conductancia estomática y del mesófilo y velocidad de carboxilación de RuBisCo en los tres genotipos.



# **INTRODUCCIÓN**



## INTRODUCCIÓN

### 1. Estrés en plantas

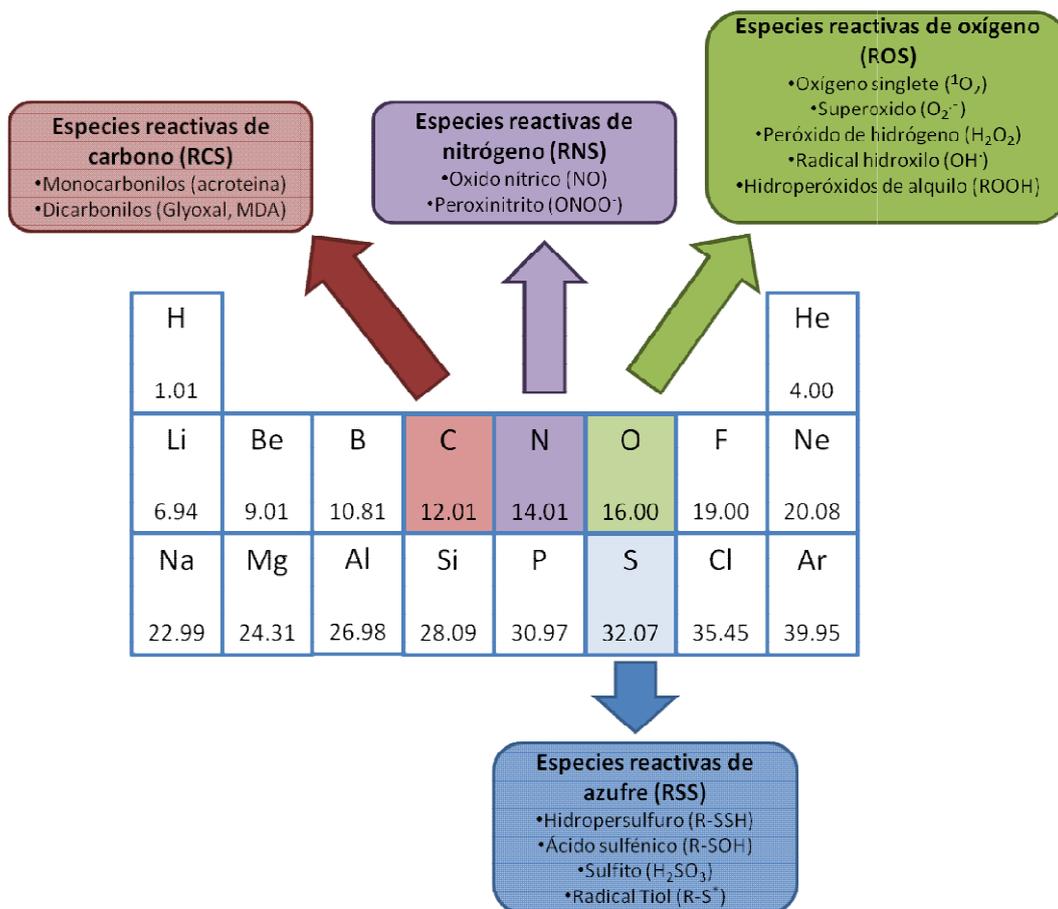
En la primera mitad del siglo XXI, se prevé que la población mundial superare los 9 mil millones, y el problema de obtener seguridad alimentaria para esta población masiva se está complicando cada vez más debido a los cambios frecuentes en las condiciones climáticas extremas, que constituyen quizás uno de los mayores desafíos a los que se enfrenta nuestra sociedad (Thornton y col., 2014). Las plantas por su naturaleza "sésil" están continuamente expuestas a cambios ambientales, algunos de los cuales ocurren cíclicamente (día/noche, estaciones) y otros son inesperados. Las situaciones inesperadas implican la incidencia de factores climáticos, bióticos y los derivados de la actividad humana (antropogénicos), que a menudo representan condiciones desfavorables o estresantes en su entorno, resultando limitantes para el crecimiento de la planta, la reproducción de las mismas, y el rendimiento agronómico, hasta el punto de poder reducirlo a nivel mundial, en más del 50-60 % en los principales cultivos. Las plantas han desarrollado medios sofisticados para poder sobrevivir y reproducirse en condiciones de estrés abiótico como el déficit de agua, las altas concentraciones de sal, intensidad lumínica elevada y temperaturas extremas, situaciones que requieren la activación de respuestas fisiológicas, metabólicas y genéticas, incluyendo mecanismos de reparación y protección, para permitir la supervivencia de las mismas. El concepto biológico de "estrés" recibió diferentes definiciones a lo largo del tiempo. En 1996, Lichtenthaler introdujo una definición de estrés en biología vegetal como *"cualquier condición desfavorable o sustancia que afecte o bloquee el metabolismo, crecimiento o desarrollo de una planta"* (Lichtenthaler, 1996). De hecho, el estrés ambiental inevitablemente reduce el rendimiento de los cultivos, dependiendo de su intensidad y duración, pero también de la fase fisiológica y las características genéticas y epigenéticas de la planta que recibe el estrés (Calderón y col., 2018; Formentin y col., 2018; Locato, y col., 2018). Las membranas celulares pueden desorganizarse, las proteínas pueden perder actividad o desnaturalizarse, el equilibrio osmótico y de oxidación-reducción puede alterarse y la acumulación y/o producción de niveles elevados de especies

reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) pueden resultar en un importante daño oxidativo y/o nitrosativo (Krasensky y Jonak, 2012; Considine y col., 2015).

## 2. Estado redox y especies reactivas de oxígeno, de nitrógeno y de azufre

La vida es una reacción química y la aparición del metabolismo aeróbico supuso un gran salto en la evolución biológica. El oxígeno ( $O_2$ ) representa aproximadamente el 20,9% en volumen de la composición de la atmósfera terrestre. El uso del oxígeno facilitó la generación de una mayor cantidad de energía y con ello, el mantenimiento de estructuras biológicas cada vez más complejas. El núcleo de todos los procesos vitales es una reacción química liberadora de energía, una reacción de oxido-reducción (redox), en la que los electrones pasan de un donante a un aceptor. Las secuencias de reacción enzimática liberan energía lentamente y de tal manera, que la célula puede conservar una parte de ella en forma de ATP. El acoplamiento de la hidrólisis de ATP impulsa las reacciones metabólicas que a su vez están compartimentadas en los distintos orgánulos celulares. La mayoría de las reacciones metabólicas redox son reacciones de conversión en las que los cambios experimentados por los intermediarios metabólicos están acoplados a cambios complementarios de transportadores redox: NADH, NADPH y flavinas. La participación de estos transportadores redox que catalizan de forma segura la transferencia de dos electrones, evita que estos últimos se transfieran al  $O_2$ , lo que resultaría en la formación de radicales libres. En este contexto las reacciones de conversión no son las causantes de la generación de “desequilibrios redox”, que potencialmente afectarían de forma negativa la viabilidad celular.

En general, el establecimiento de un desequilibrio redox tiene lugar cuando la generación de especies moleculares reactivas ocurre en proporciones que exceden la capacidad celular de su eliminación, lo que resulta en la oxidación incontrolada de los diferentes constituyentes celulares. Las especies reactivas comprenden no solo a derivados del oxígeno “Especies Reactivas de Oxígeno” (ROS, Reactive Oxygen Species), sino también del nitrógeno (RNS, Reactive Nitrogen Species) del azufre (sulfuro) (RSS, Reactive Sulfur Species) y las derivadas de grupos carbonilos (RCS, Reactive Carbonyl Species) tal y como se muestra en la Figura 1.

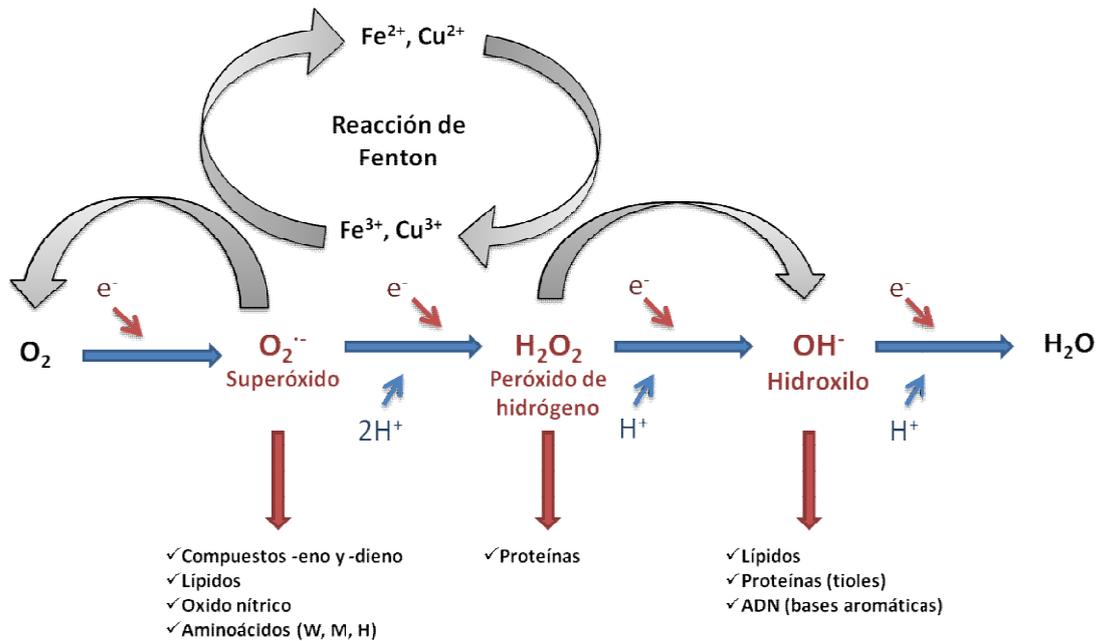


**Figura 1. Localización en la tabla periódica de los elementos responsables de las principales especies moleculares reactivas relevantes en biología celular.** La capacidad de los elementos C, O, N y S, para formas múltiples enlaces covalentes y presentar diferentes estados de oxidación-reducción, constituyen la base de las distintas especies reactivas que incluyen a las de carbonilo (RCS) de oxígeno (ROS), de nitrógeno (RNS) y de azufre (RSS), respectivamente. Modificado de Mock y Dietz (2016).

**2.1. Especies reactivas de oxígeno**

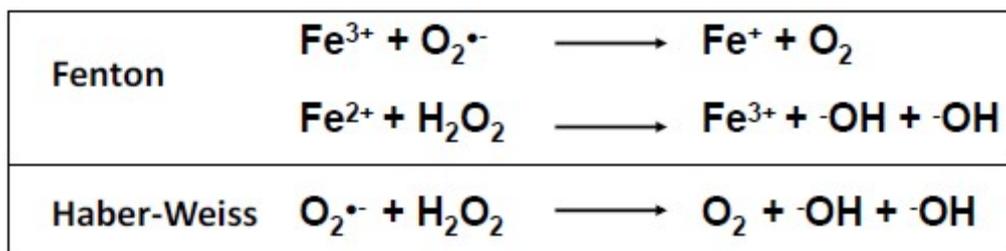
El proceso de transformación (reducción) de oxígeno molecular a agua proporciona la energía que permite, como se describe anteriormente, la impresionante complejidad de los organismos superiores; pero cuando su reducción no es completa, tiene lugar la

generación de ROS, que incluyen: radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) producidos durante la reducción monoivalente secuencial. Finalmente el radical hidroxilo se reduce de forma espontánea para formar una molécula estable como es el agua ( $H_2O$ ) (Figura 2).



**Figura 2. Producción de ROS a nivel celular durante la reducción del oxígeno a agua.** La reducción covalente y secuencial del oxígeno a  $H_2O$  da lugar a la generación de diferentes especies reactivas (ROS): radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Estas formas reactivas reaccionan con diferentes componentes orgánicos generando hidroperóxidos, peróxidos lipídicos o peroxinitrito. El oxígeno singlete constituye el primer estado de oxidación del oxígeno y no está relacionado con la transferencia de electrones al mismo representando una ROS inusual. Se genera fundamentalmente en cloroplastos en el proceso fotosintético (Gill y Tuteja, 2010).

El radical  $O_2^{\cdot-}$  es muy reactivo y presenta una vida media relativamente corta (2-4  $\mu s$ ). Puede reaccionar con metales de transición como el  $Fe^{2+}$  o el  $Cu^{1+}$  a través de reacciones de tipo Haber-Weiss o Fenton (Figura 3), para formar el radical hidroxilo considerado uno de los oxidantes más potentes conocidos, ya que la célula no posee mecanismos enzimáticos para su eliminación. El exceso de radicales ( $OH^{\cdot}$ ) suele conducir a la muerte celular.



*Figura 3. Reacción Fenton y Haber Weiss.*

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un estado activado de oxidación intermedia que a diferencia del resto de radicales, tiene una vida media superior (1ms) y puede difundir desde su lugar de producción, lo que hace que sea considerada una de la ROS fundamentales en las vías de señalización durante situaciones de estrés, como se describe posteriormente.

De forma alternativa, el  $\text{O}_2$  puede aceptar el exceso de energía de la fotooxidación suficiente para cambiar el espín de uno de los electrones desapareados presentes en sus orbitales pi parcialmente ocupados (Halliwell y col., 2015) y dar lugar a la producción de la forma excitada  $^1\text{O}_2$  (oxígeno singlete), un estado intermedio muy inestable generado mayoritariamente en el cloroplasto. Muchas de las formas reactivas oxidadas tienen el potencial de inactivar enzimas mediante la producción de cambios redox en los metales de sus centros activos o la oxidación de sus grupos tiólicos así como pueden crear rupturas y mutaciones en el ADN por reducción de sus compuestos aromáticos o también alterar la función de las membranas lipídicas reaccionando con sus lípidos y formando hidroperóxidos.

De acuerdo con los conocimientos actuales, los sistemas antioxidantes efectivos en los compartimentos simplásticos mantienen bajas las concentraciones de ROS incluso en condiciones en los que estos se están produciendo (Foyer y Noctor, 2016; Noctor y col., 2016). Por lo tanto, cualquier elevación en la concentración de ROS en los diferentes compartimentos subcelulares parece ser transitoria, lo que refleja la eficiencia de los sistemas de eliminación. Sin embargo, en situaciones en las que la tasas de producción de ROS son altas puede producirse un cambio en el equilibrio redox en los diferentes compartimentos celulares hacia un estado más oxidado, que puede ser detectado por

varios sistemas específicos presentes en ellos, para permitir regular la expresión génica en estas situaciones.

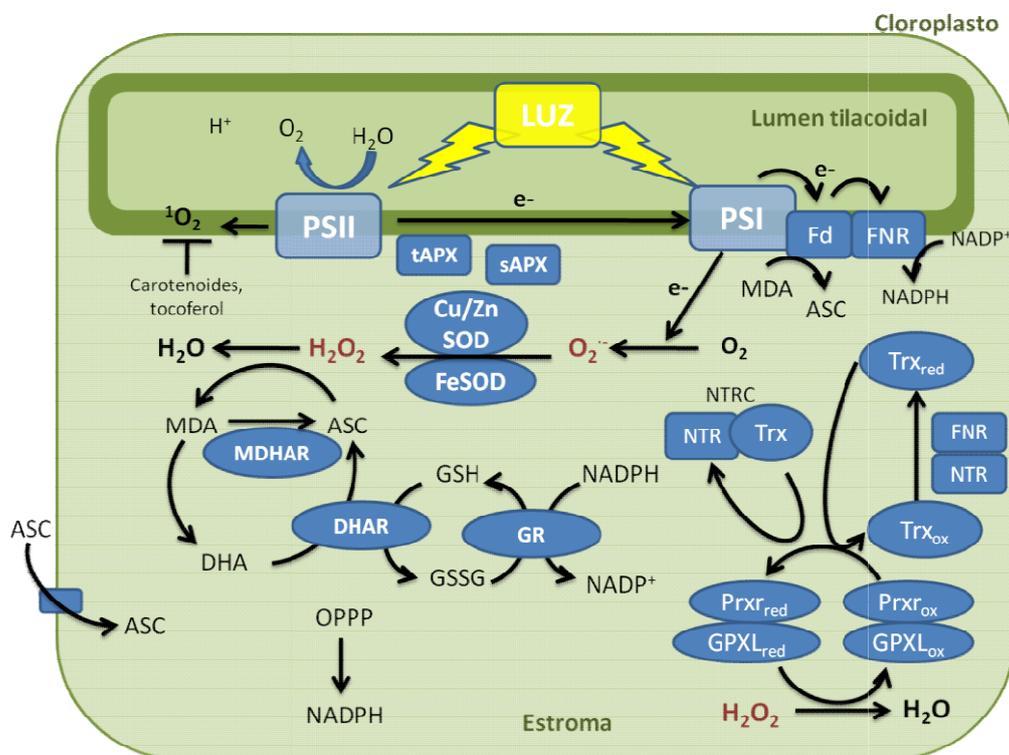
### **2.1.1. Producción de ROS en plantas**

En plantas en condiciones de crecimiento fisiológicas y óptimas las diferentes ROS como oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), se producen como consecuencia del metabolismo a niveles moderados y en los distintos compartimentos celulares incluyendo: cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas, núcleo y en el apoplasto (Hernández y col., 1993 y 2001; Mittler, 2017; Waszczak y col., 2018). Por otro lado se describe que la compartimentación de la producción de ROS es un factor que determina la función biológica de los mismos.

#### **2.1.1.1. Producción de ROS en cloroplastos**

Los cloroplastos constituyen una de las primeras fuentes de ROS descritas en plantas siendo importantes generadores de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Mehler, 1951). En ellos, se ha descrito la generación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a nivel de los fotosistemas I y II, de la ferredoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa y de la forma reducida de la monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR). En este sentido, ciertas condiciones medioambientales, como una alta intensidad lumínica y/o una baja concentración de  $\text{CO}_2$ , disminuyen la disponibilidad de NADP<sup>+</sup> en el cloroplasto, incrementándose el flujo electrónico hasta el  $\text{O}_2$  lo que conduce a una mayor producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . A su vez, el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  se puede protonar a  $\text{HO}^{\cdot}_2$  (radical perhidroxilo) en la superficie interna de la membrana tilacoidal (lumen) o bien dismutarse de forma espontánea o por la acción enzimática de las superóxido dismutasas (SODs), en la superficie externa de la membrana del tilacoide o en el estroma, dando lugar a la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Gomez y col., 2004; Asada, 2006; Pospíšil, 2012; Jiménez y col., 2018). Este  $\text{H}_2\text{O}_2$  es detoxificado fundamentalmente por la actividad antioxidante ascorbato peroxidasa (APX) presente al igual que las superóxido dismutasas (SODs) en tilacoides y estroma y/o mediante la actividad de diferentes peroxirredoxinas (PRXs) cloroplastídicas. Además, el flujo de electrones al oxígeno en lugar de al NADP<sup>+</sup> alivia la presión reductora dentro de la

cadena de transporte de electrones y equilibra las relaciones ATP: NADPH al permitir el bombeo de protones sin generación de poder reductor neto (Figura 4).



**Figura 4. Producción y depuración de ROS en cloroplastos.** Abreviaturas: APX (t: tilacoidal; s: estromática) ascorbato peroxidasa; ASC, ascorbato; CAT, catalasa; DHA, deshidroascorbato; DHAR, deshidroascorbato reductasa; Fd, ferredoxina; FNR, ferredoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa; FTR, tioredoxina reductasa dependiente de ferredoxina; GR, glutatión reductasa; GPXL, glutatión peroxidasa-like; MDA, monodeshidroascorbato; MDAR, monodeshidroascorbato reductasa; NTR, tioredoxina reductasa dependiente de NADPH; NTRC, tioredoxina reductasa C dependiente de NADPH; OPPP, vía oxidativa de pentosa fosfato; PRXr, peroxirredoxina; PSI /II, fotosistema I/II; ROS, especies reactivas del oxígeno; SOD, superóxido dismutasa; TRX, tioredoxina. Modificado de Waszczak y col., (2018).

Al igual que las ROS formadas en otras ubicaciones subcelulares, las ROS generadas en los tilacoides pueden desempeñar funciones cruciales como transductores de señales (Figura 4). Se considera que las ROS generadas durante la captura de luz y el transporte de electrones se encuentran en la interfaz entre el entorno y la maquinaria molecular de la fotosíntesis, lo que a su vez proporciona a la célula información crucial sobre el estado redox presente en la organela.

Resultados recientes sobre el transporte de ROS cloroplásticos y la transducción de señales al núcleo han permitido evidenciar que el  $H_2O_2$  podría ser transportado al núcleo a través de estrómulos y desde subpoblaciones de cloroplastos que lo rodean. La acumulación de ROS nuclear probablemente cambia la actividad de múltiples factores de transcripción sensibles a ROS y al estado redox (Figura 4) (Caplan y col., 2015).

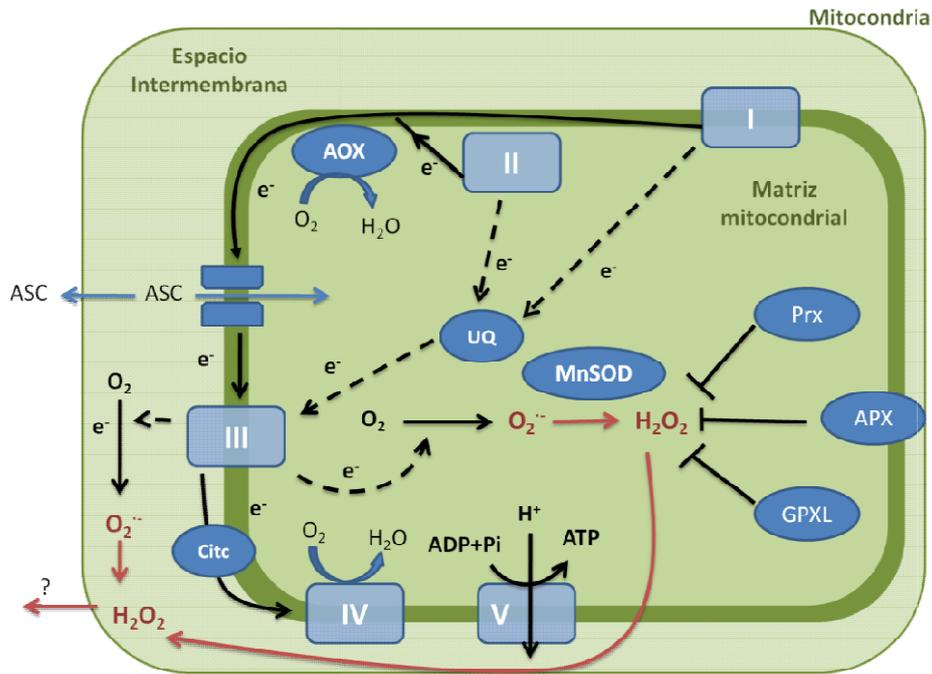
Por otro lado en los centros Fe-S donde el  $Fe^{2+}$  está disponible, el  $H_2O_2$  puede provocar la generación de radical  $OH\cdot$  a través de la reacción de Fenton (Halliwell y col., 2015). A su vez, la transferencia de energía dentro de los fotosistemas conduce a la generación de oxígeno singlete, una ROS que se forma por transferencia de energía de excitación de la clorofila en estado triplete al  $O_2$  (Triantaphylidès y Havaux, 2009; Fischer y col., 2013).

#### **2.1.1.2. Producción de ROS en mitocondrias**

Los cloroplastos y las mitocondrias dependen unos de otros para el intercambio de metabolitos y de energía. Las mitocondrias son orgánulos metabólicamente activos y dinámicos, que desempeñan un papel fundamental en el suministro de ATP requerido para diversos eventos celulares en todos los organismos eucariotas. Este proceso es posible gracias a la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y a que en la respiración mitocondrial, el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) genera NADH y  $FADH_2$  al metabolizar los ácidos orgánicos. Estos productos se utilizan para impulsar el transporte de electrones en la cadena respiratoria y la producción acoplada de ATP a partir de ADP+Pi por la actividad del complejo ATP sintasa (Dudkina y col., 2006). En plantas, la cadena de transporte de electrones mitocondrial (CTEm) se compone de cuatro complejos enzimáticos: los complejos I (NADH deshidrogenasa) y II (succinato deshidrogenasa) ceden los electrones a la ubiquinona o coenzima Q, por otro lado el complejo III (citocromo bc1) cede los electrones al citocromo c y finalmente el complejo IV (citocromo oxidasa) cede los electrones al oxígeno para producir dos moléculas de agua (Figura 5). Algunas de estas proteínas están organizadas en supracomplejos, por ejemplo: el 50% del complejo I está asociado con dos copias del complejo III (Lázaro y col., 2013; Nunes-Nesi y col., 2013; Sevilla y col., 2015).

Siendo los cloroplastos los principales productores de ROS en células vegetales fotosintéticas (Foyer y col., 2008), el metabolismo mitocondrias es también una fuente considerable en la generación total de ROS en forma de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  (Noctor y col., 2007).

La producción de ROS mitocondrial está estrechamente asociada con la cadena de transporte de electrones (CTEm), ubicada en la membrana interna mitocondrial, y depende fundamentalmente del potencial electroquímico de la misma, siendo el complejo I y el complejo III los principales lugares de producción en este orgánulo (Hernández y col., 1993; Noctor y col., 2007) (Figura 5) si bien, bajo condiciones específicas, pueden producirse también a nivel del complejo II, durante el transporte electrónico reverso (Turrens, 2003). En general una alta proporción de  $NADH/NAD^+$  y/o  $ADP/ATP$  pueden aumentar el transporte electrónico contribuyendo a un alto potencial de membrana, que está positivamente correlacionado con la alta reducción de los componentes de la CTEm, lo que aumenta la probabilidad de fuga de electrones al oxígeno y generación de  $O_2^{\cdot-}$ . Los complejos I y II producen  $O_2^{\cdot-}$  en el lado matricial de la membrana mitocondrial interna. Actualmente por analogía a lo descrito en mitocondrias animales está admitido que en plantas el complejo III produce  $O_2^{\cdot-}$  en ambos lados de la membrana mitocondrial interna (Figura 5). El  $O_2^{\cdot-}$  generado puede a su vez actuar como sustrato para la generación de ROS secundarios como  $H_2O_2$  y  $OH^{\cdot}$ . De este modo, se sugiere que las ROS en el espacio intermembrana mitocondrial (EIM) podrían tener una función de señalización en plantas, similar a la descrita en los sistemas animales (Huang y col., 2016).



**Figura 5. Producción y depuración de ROS en mitocondrias.** En mitocondrias la cadena de transporte de electrones se encuentra en la membrana interna mitocondrial, y está constituida por dos transportadores de electrones móviles (coenzima Q o ubiquinona y citocromo c) y cinco complejos representados por las cajas I a V, representando la V a la ATP sintasa; AOX, oxidasa alternativa; APX, ascorbato peroxidasa; ASC, ascorbato; GPXL, glutatión peroxidasa-like; PRX, peroxidasa; SOD, superóxido dismutasa; Modificado de Waszczak y col., (2018).

En este contexto uno de los componentes que podría actuar en la posible regulación de estas ROS en el espacio intermembrana sería el antioxidante ascorbato (ASC). Se ha comprobado que en mitocondrias vegetales el último paso en la biosíntesis de ASC tiene lugar en el espacio intermembrana mitocondrial (EIM). De este modo se ha sugerido que el  $O_2^{\cdot-}$  en él, puede eliminarse directamente mediante una reducción del ASC y así alterar el estado redox del mismo, lo que a su vez podría actuar como una señal en las vías de transducción de señales en mitocondrias. Considerando la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, se sugiere que la dismutación del radical  $O_2^{\cdot-}$  y la eliminación del  $H_2O_2$  generados en el espacio intermembrana, podría depender de los componentes citoplasmáticos.

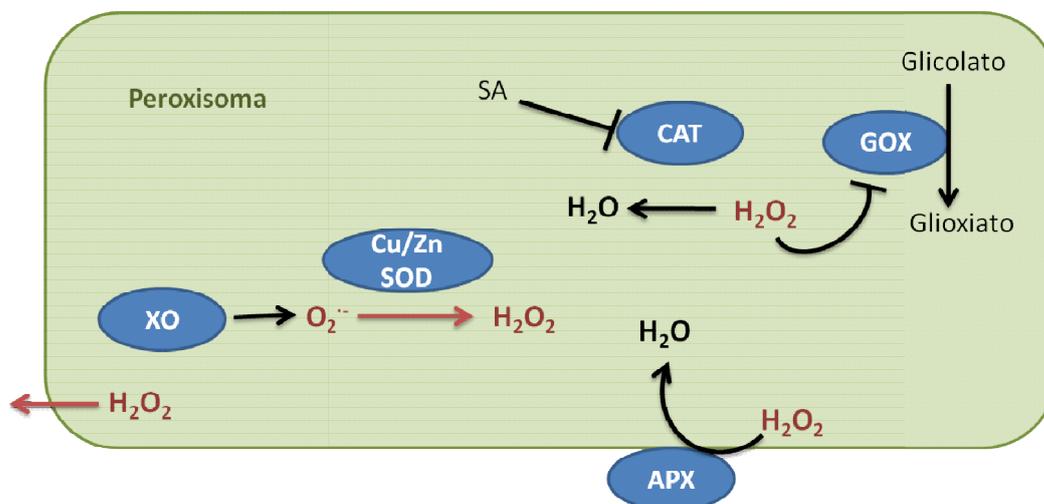
El  $O_2^{\cdot-}$  generado en la matriz mitocondrial, se dismuta en  $H_2O_2$  ya sea espontáneamente o a través de la actividad manganeso superóxido dismutasa (Mn-

SOD); posteriormente, el  $H_2O_2$  es eliminado por la actividad peroxirredoxina PRXIIIF (Barranco-Medina y col., 2007 y 2008) y/o por la actividad ascorbato peroxidasa (APX). Interesantemente en mitocondrias, la enzima ascorbato peroxidasa (APX) se localiza en la membrana mitocondrial, con al menos dos isoenzimas, una de ellas posiblemente orientada hacia la cara externa y la otra hacia el espacio intermembrana mitocondrial (Jiménez y col., 1997a y 1997b; Chew y col., 2003).

Junto a estos sistemas enzimáticos, en la CTE<sub>m</sub> de vegetales a diferencia de la de animales, existen enzimas complementarias que no contribuyen a la generación del gradiente de protones y por tanto no están asociadas a la producción de ATP. Estas vías suponen “válvulas de seguridad” que pueden limitar la producción de ROS manteniendo la CTE<sub>m</sub> en un nivel de oxidación adecuado (Rasmusson y Wallström, 2010; Millar y col., 2011). Así, las NADP(H) deshidrogenasas evitan la cesión de electrones desde los complejos I y II a la ubiquinona, mientras la oxidasa alternativa (AOX, Alternative Oxidase) acopla la oxidación del ubiquinol con la reducción de oxígeno a agua, así se disipa la energía en forma de calor y se reduce la proporción ADP/O<sub>2</sub>. Este desvío de electrones a través de la vía alternativa es importante en el metabolismo primario y secundario, como en la oxidación del exceso de hidratos de carbono (Rasmusson y Wallström, 2010; Del-Saz y col., 2017). La expresión incrementada y/o disminuida de AOX junto a la inhibición de su actividad, se ha venido considerando un factor importante en el establecimiento de la generación mitocondrial de ROS en las vías de transducción de señales (Maxwell y col., 2002) y realmente, la inducción de AOX se describe como modelo de señalización retrógrada mitocondrial (Lázaro y col., 2013). Junto a la AOX, la presencia de la enzima terminal de la biosíntesis de ascorbato, L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GLDH) acoplada a la vía citocrómica respiratoria, descrita anteriormente, puede permitir la síntesis de ascorbato, al acoplarse como un donador alternativo de electrones para la cadena respiratoria, permitiendo así su funcionalidad en condiciones de posible inhibición de componentes del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), como puede ocurrir bajo un estrés oxidativo (Noctor y col., 2007; Lázaro y col., 2013).

### 2.1.1.3. Producción de ROS en peroxisomas

Los peroxisomas constituyen otro de los orgánulos celulares en los que la producción de  $H_2O_2$  es más elevada, como resultado de un metabolismo esencialmente oxidativo (del Río y López-Huertas, 2016). En peroxisomas, los principales procesos responsables de la generación de  $H_2O_2$  son la enzima glicolato oxidasa (Figura 6) implicada en la fotorrespiración, la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos mediante la acil-CoA oxidasa, en la reacción de las diferentes flavín oxidasas y la dismutación del  $O_2^{\cdot-}$ . La enzima Xantina oxidasa en la matriz y la NADPH oxidasa, así como proteínas integrales, la cadena de transporte electrónico de membrana, junto a la enzima monodeshidroascórbico reductasa (MDHAR) son responsables de la generación de  $O_2^{\cdot-}$  en estos orgánulos (del Río y col., 1998; Kangasjärvi y col., 2012; Sandalio y Romero-Puertas, 2015; Rodríguez-Serrano y col., 2016). El proceso de la fotorrespiración es una fuente importante de señales derivadas de ROS en diferentes condiciones de estrés abiótico (Weber y Bauwe, 2013).



**Figura 6. Producción y depuración de ROS en peroxisomas.** Abreviaturas: APX, ascorbato peroxidasa; CAT, catalasa; GOX, glicolato oxidasa; SA, ácido salicílico; SOD, superóxido dismutasa; XO, xantina oxidasa. Modificado de Waszczak y col., (2018).

En estos orgánulos también se ha descrito recientemente la producción de  $^1O_2$  independiente de la luz, al igual que en mitocondrias, en núcleo y en tejidos no fotosintéticos de *Arabidopsis* como tejidos radiculares, en los que la generación de  $^1O_2$

incrementa en condiciones de estrés abiótico y biótico en la oscuridad. No se ha establecido el origen de este oxígeno singlete aunque se sugiere que podría derivar de una reacción tipo Haber-Weiss entre el  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  (Mor y col., 2014).

En peroxisomas la actividad catalasa derivada de distintas isoformas, está implicada en la protección de la homeostasis del  $H_2O_2$  en tejidos fotosintéticos (Willekens y col., 1997; Queval y col., 2007; Mhamdi y col., 2012; Sandalio y Romero-Puertas, 2015;). En los mutantes con pérdida de función, como el mutante *Arabidopsis catalase2 (cat2)*, se puede lograr una inducción condicional y no invasiva de los niveles de  $H_2O_2$  peroxisomal a través de cambios en las condiciones de crecimiento (Mhamdi, 2012). Las plantas deficientes en catalasa han demostrado ser sistemas modelos para estudiar la respuesta transcripcional provocada por el aumento de la producción y la acumulación de niveles de  $H_2O_2$  peroxisomal (Vandenabeele y col., 2004; Vanderauwera, 2005). Junto a la actividad catalasa, en los peroxisomas se encuentran localizados todos los componentes enzimáticos y no enzimáticos del ciclo ascorbato–glutación (ASC-GSH) similar a lo descrito anteriormente en mitocondrias (Jiménez y col., 1997a y 1997b; Sevilla y col., 2015), lo que representa una vía importante de regulación de los niveles de  $H_2O_2$ , que al igual que en mitocondrias, podría difundir al citosol y actuar como molécula señalizadora en condiciones fisiológicas normales y bajo estrés abiótico y/o biótico (Gómez y col., 2004; del Río 2006; del Río y López-Huertas, 2016).

#### **2.1.1.4. Producción de ROS en apoplasto**

Otra fuente importante de producción de ROS se localiza en la pared celular con peroxidasas que producen  $O_2^-$  a expensas de NADH y en la membrana plasmática donde NAD(P)H oxido-reductasas (RBOH) generan  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  (Grant, y Loake, 2000; Yun y col., 2011).

La producción de ROS apoplástica es importante no solo para el proceso de señalización extracelular a larga distancia, sino también para el inicio de varios eventos de señalización intracelular y cambios en la homeostasis redox celular (Mittler y col., 2011; Karpinska y col., 2018). Uno de los procesos descritos en los que las ROS extracelulares intervienen activando respuestas intracelulares, es la regulación

estomática (Sierla y col., 2016). La evidencia genética indica que las NADPH oxidasas RBOHD y RBOHF están involucradas en la regulación del cierre del estoma (Murata y col., 2001; Zhang y col., 2009). El cierre estomático inducido por ABA se altera en los mutantes *rboh*f y aún más en los mutantes dobles *rbohd rboh*f (Kwak y col., 2003). Además, la aplicación de inhibidores de la actividad NADPH oxidasa, produjo un efecto similar en el cierre del estoma inducido por ABA que el obtenido en los mutantes (Zhang, 2001). Por otro lado, el cierre estomático inducido por niveles elevados de CO<sub>2</sub> es deficiente en los mutantes dobles *rbohd rboh*f (Chater y col., 2015). A pesar de estas evidencias, aún se desconoce si las ROS apoplásticas son activas y se perciben fuera de la membrana plasmática, o si el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derivado del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> producido por la actividad RBOH se transporta al citoplasma a través de la membrana plasmática. En este sentido se ha indicado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apoplástico puede moverse a través de la membrana plasmática hacia el citoplasma mediante las acuaporinas (Bienert y Chaumont, 2014; Bienert y col., 2014), y de este modo alterar el estado redox y reaccionar con componentes simplásticos e inducir nuevas respuestas en el metabolismo celular y la expresión génica.

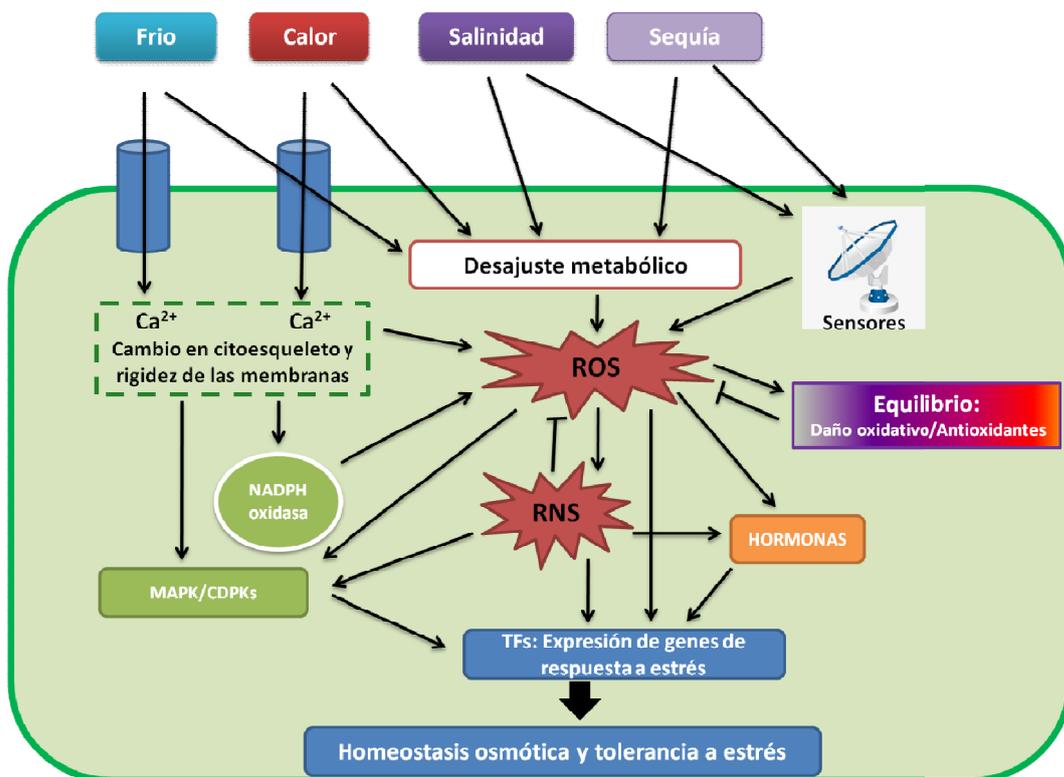
### **2.1.2. Estrés oxidativo y señalización: Efecto dual de las ROS**

Como se ha descrito en los apartados anteriores, en particular el radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se producen en prácticamente todos los compartimentos celulares, con el potencial de generar en ellos el radical OH<sup>•</sup> con gran capacidad de oxidación. En condiciones fisiológicas de crecimiento, la producción de ROS a nivel celular es baja, esto implica que en condiciones basales la célula tiene en general, un ambiente reductor que impide la oxidación de los diversos componentes celulares. Consecuentemente, y a excepción del apoplasto, que presenta una baja capacidad antioxidante, cada compartimento celular se encuentra equipado con una batería de sistemas antioxidantes eliminadores de ROS capaces de mantener el estado redox en él, como se ha descrito anteriormente (Foyer y Noctor, 2016; Noctor y col., 2016). De acuerdo con las evidencias actuales la efectividad de los diferentes sistemas antioxidantes a nivel organular permite que cualquier elevación de ROS causada bajo condiciones de elevadas tasas de reducción generadoras de ROS sea transitoria, reflejando la eficacia de los mismos. El aumento en los niveles de ROS causado por diferentes procesos fisiológicos o situaciones de estrés puede provocar

un cambio en el balance redox del compartimento celular hacia un estado más oxidado que podría causar daños a los diversos componentes celulares inactivando enzimas, provocando mutaciones y rupturas en el ADN o alterando la permeabilidad de las membranas, llevando a una situación de “estrés oxidativo”. Esta situación a nivel celular puede estar inducida en condiciones como salinidad, sequia, temperaturas extremas y/o toxicidad por metales entre otras (Figura7) (Rodríguez-Serrano y col., 2006; Foyer y Noctor, 2013; Sevilla y col., 2015; Calero-Muñoz y col., 2019). Sin embargo, actualmente ha quedado establecido que aunque esta producción aumentada de ROS supone una amenaza para la célula, también es capaz de activar “per se” ciertas rutas de defensa y/o sistemas específicos organulares participando en mecanismos de transducción de señales que utilizan las plantas para realizar ajustes capaces de regular la expresión génica y la estructura celular en respuesta a señales ambientales, del desarrollo y crecimiento (Rodríguez-Serrano y col., 2006; Sevilla y col., 2015). Todo ello ha llevado a un “cambio de paradigma” que implica a las ROS en vías específicas de señalización entre orgánulos y entre éstos y el núcleo (Sevilla y col., 2015; Waszczak y col., 2018) lo que les permite participar entre otros procesos en la regulación del movimiento estomático, en la prevención de la invasión por patógenos, en promover la muerte celular programada (PCD), responder al estrés ambiental y redirigir el crecimiento y desarrollo de la planta (Ortiz-Espín y col., 2015).

Se ha sugerido que la propagación de la señal por ROS se realiza mediante interactores específicos en cada compartimento (Sewelam y col., 2014). Por otro lado, la estabilidad del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en relación con la vida media del  $\text{O}_2^-$  y del oxígeno singlete, su capacidad de difusión y los valores detectados en los diferentes tejidos vegetales, (aproximadamente  $100\text{-}200 \text{ nmol.g}^{-1} \text{ FW}$ ) han llevado a considerar al  $\text{H}_2\text{O}_2$  como la molécula señalizadora por excelencia en la señalización por ROS (Mittler, 2017). Otro aspecto importante de las ROS es que se encuentran conectadas a distintas vías de señalización como la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$ , las redes hormonales, las protein-quinasas, redes metabólicas celulares y las propias respuestas redox celulares. Según el caso la acumulación de ROS promueve la activación de estas rutas/redes de señalización o bien es la señalización a través de estas rutas/redes las que provocan la acumulación de ROS. Las cascadas de protein-quinasas activadas por mitógenos (MAPK) son un buen ejemplo

de activación de vías de señalización mediada por ROS, estas cascadas interactúan con una red compleja de otras quinasas, con rutas hormonales y con el óxido nítrico (NO) (Mittler y col., 2011; Mittler y Blumwald, 2015; Niu y Liao, 2016). Con respecto a la interacción ROS-hormonas, además de vincularse con las hormonas del estrés como el etileno, el ácido salicílico, el ácido jasmónico y el ácido abscísico (ABA), las ROS también tienen interferencias con las hormonas del crecimiento incluyendo a las giberelinas, citoquininas y las auxinas (Foyer, 2018) (Figura 7).



**Figura 7. Rutas de señalización en respuesta a condiciones de estrés abiótico mediadas por especies reactivas de oxígeno, nitrógeno y calcio.** Estas moléculas pueden estar moduladas por estímulos percibidos por diferentes sensores y/o activar cascadas enzimáticas como las MAPKs o ciclinas dependientes de proteínas kinasas (CDPKs) o a diferentes hormonas, para regular la expresión de genes y conducir a respuestas en distintos procesos fisiológicos, de desarrollo o de tolerancia a estrés. Modificado de Calderón y col., (2018).

Por otro lado los incrementos transitorios de ROS en los diferentes orgánulos se considera que pueden afectar de forma espacio-temporal, positiva o negativamente, la progresión o bien la inhibición de una cascada específica de señalización. Esta compleja regulación de la comunicación interorganular mediada por ROS es un mecanismo

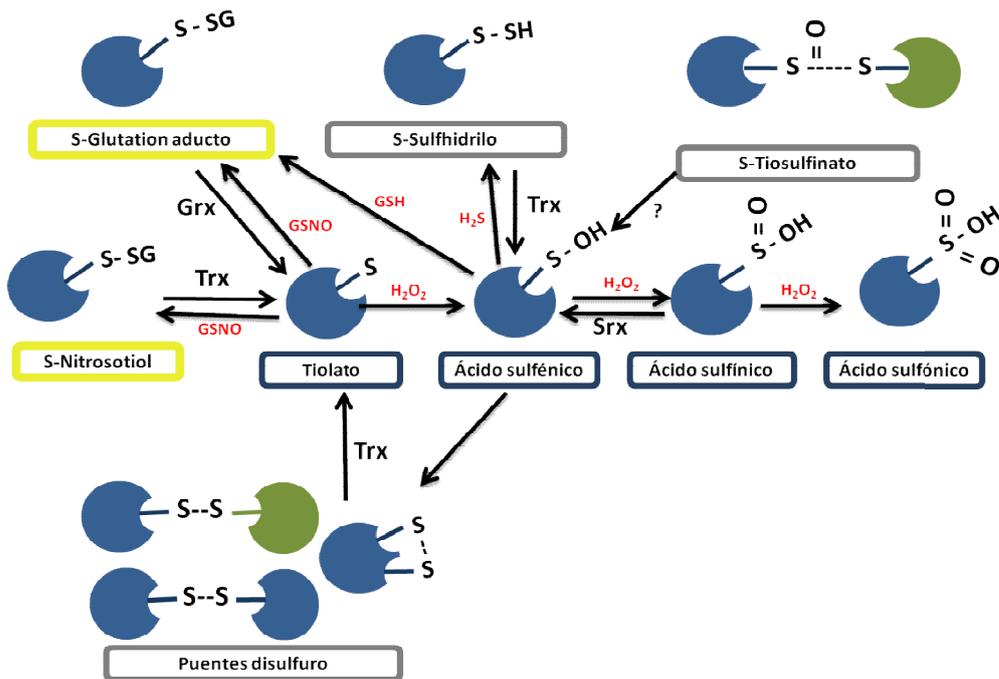
necesario que permite a las plantas captar un amplio espectro de estímulos ambientales, que influyen en la homeostasis celular, permitiéndoles de este modo adaptarse fisiológicamente a tales condiciones ambientales (Foyer, 2018; Mignolet-Spruyt y col., 2016).

Otra particularidad interesante, es la relación existente entre las ROS y el óxido nítrico NO ya que el aumento en ROS conlleva inevitablemente un incremento en el NO y viceversa, así la razón ROS/NO presente en un compartimento celular concreto resulta más trascendente que la cantidad de las ROS por si solas dado que estas moléculas interaccionan entre sí y regulan la expresión de genes y el destino celular (Foyer y col., 2017).

### **2.1.3. Modificaciones post-traduccionales producidas por ROS: Señalización redox**

Como se ha comentado con anterioridad, en plantas, las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel regulador en diversos procesos de señalización. Dicha señalización redox al igual que lo descrito para el NO puede regirse a nivel post-traduccionales, donde ROS como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pueden provocar modificaciones post-traduccionales oxidativas reversibles e irreversibles (Oxi-PTM) en residuos de cisteína (Cys) de proteínas, que actúan en diversos circuitos de señalización. El átomo de azufre de cisteína puede presentarse en diferentes estados de oxidación según los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> próximos a su entorno (Figura 9). La forma totalmente reducida del grupo tiol que forma la cisteína (RSH) representa el estado de oxidación (-2) del átomo de azufre. Este grupo RSH puede aumentar su grado de oxidación al reaccionar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formar inicialmente, un disulfuro (S-S), o bien ácido sulfénico (R-SOH), en el que la cisteína es altamente reactiva y en el que el estado de oxidación del átomo de azufre se eleva a (0). Este último estado, puede ser hiperoxidado por exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a ácido sulfínico (SO<sub>2</sub>H, +2) y sobreoxidado a ácido sulfónico (SO<sub>3</sub>H, +4). Cada una de estas modificaciones oxidativas de cisteína (Cys Oxi-PTM), presentan distintas propiedades químicas y reactividad biológica (Figura 8). La formación de disulfuro es un proceso reversible en las células en condiciones óptimas u oxidantes leves, protegiendo a la cisteína de

oxidaciones posteriores. La forma sulfénica R-SOH, funciona como un estado intermedio entre las otras modificaciones redox, como la sobreoxidación, la formación de disulfuros o la S-glutationilación, comentada anteriormente, y se considera que R-SOH puede actuar como un interruptor molecular que regula la función de la proteína. Los grupos sulfínico (R-SO<sub>2</sub>H) o sulfónico (R-SO<sub>3</sub>H) constituyen modificaciones en general, irreversibles y muy reactivas que producen cambios estructurales en las proteínas acompañados por alteraciones funcionales. Así, en condiciones altamente oxidantes, estas modificaciones conducen finalmente a la degradación de la proteína, aunque recientemente se ha descrito que los grupos sulfínicos en algunas proteínas pueden ser revertidos por la acción de enzimas como las sulfirredoxinas (SRXs, EC: 1.8.98.2) (Iglesias-Baena y col., 2010), y se ha descrito su participación en la regulación redox de la función proteica (Aker y col., 2015; Sevilla y col., 2015a y 2015b).



**Figura 8. Modificaciones postraduccionales oxidativas producidas sobre residuos de cisteína (Cys).** Se presenta un esquema de los diversos estados de oxidación del grupo tiol presente en el residuo de cisteína, junto a su modificación post-traducciona por glutatión (GSH) y las proteínas implicadas en la reversibilidad de dichas modificaciones: TRX (tioredoxina); SRX (sulfirredoxina); GRX (glutarredoxina).

Por otro lado, los cambios funcionales derivados de las modificaciones redox pueden afectar al proceso transcripcional, a la fosforilación y a otros eventos implicados en señalización o bien alterar los flujos metabólicos al modificar las propiedades enzimáticas (Reczek y Chandel, 2015).

Los principales sistemas basados en la regulación de grupos tiólicos-disulfuro están ligados a proteínas como tiorredoxinas (TRX, EC: 1.8.1.9) y glutarredoxinas (GRX, EC 1.20.4.1), que además de su papel en la regulación redox, pueden ser sustratos de enzimas reductoras entre ellas peroxidasas o ribonucleótido reductasas (RR) (Martí y col., 2009; Couturier y col., 2013). En base a ello, el estado redox de la célula dependerá en parte, de los grupos tioles y disulfuro de los antioxidantes, entre ellos el GSH y las proteínas TRX, PRX, SRX y GRX entre otros. Recientemente se ha indicado que el estado redox en los distintos compartimentos celulares depende en gran medida de los cocientes relativos entre grupos oxidados y reducidos del GSH y TRX (Go y Jones, 2010).

## **2.2. Especies reactivas de nitrógeno**

El óxido nítrico (NO) es una molécula radical libre lipofílica y gaseosa, de pequeño tamaño, considerada un metabolito de gran importancia en plantas en las que actúa como molécula implicada en el proceso de señalización intracelular e intercelular, por su capacidad de difundir a través de las membranas celulares (Yu y col., 2014; Sevilla y col., 2015; Jiménez y col., 2018). El NO existe en tres formas diferentes:  $\text{NO}^+$  (catión nitrosonio),  $\text{NO}^-$  (anión nitroxilo),  $\text{NO}^\cdot$  (radical de óxido nítrico). Como un radical libre,  $\text{NO}^\cdot$  y sus moléculas derivadas se designan como especies de nitrógeno reactivo (RNS), que incluyen al peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), S-nitrosotioles (SNO) y S-nitrosoglutatión (GSNO), derivados de su reacción de forma inmediata con el  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , con el grupo tiol de un residuo de cisteína o bien con el del glutatión reducido, respectivamente. El NO junto a su reacción con proteínas, también puede reaccionar con lípidos y ácidos nucleicos, si bien la vida media del NO *in vivo* es relativamente corta, del orden de 10 s (Yu y col., 2014).

Por otro lado, como metabolito endógeno, el NO y las RNS pueden interactuar a diferentes niveles, como parte de una compleja red de procesos de señalización, así como un mecanismo de respuesta frente a condiciones de estrés ambiental (Camejo y col., 2013; Turkan, 2018). La interacción de las RNS con ROS ocurre durante diferentes procesos fisiológicos de crecimiento y desarrollo, como la germinación de semillas, floración, maduración y senescencia, el cierre estomático (Shi y col., 2015), señalización hormonal (Liu y col., 2015), respuesta a estrés abiótico y defensa de la planta a patógenos (Wang y col., 2006; Asai y col., 2008; Romero-Puertas y col., 2008; Lin y col., 2012; Del Río, 2015; Zafra y col., 2016) entre otros.

### ***2.2.1. Modificaciones post-traduccionales producidas por RNS***

El estado redox celular, la concentración de metabolitos, como los azúcares y los residuos de aminoácidos (AA) presentes en proteínas, funcionan como motores para las modificaciones post-traduccionales (PTM. Post-Translational Modifications), modulando la actividad de las proteínas diana y/o la de factores de transcripción. En este contexto (Sevilla y col., 2015; Jiménez y col., 2018), otro concepto emergente es que todos los tipos de modificaciones oxidativas pueden estar involucradas en la señalización celular (Romero-Puertas y col., 2013; Camejo y col., 2015; Foyer y col., 2017). De hecho, las PTM inducidas por ROS/RNS se consideran parte de la red de señalización redox que induce (o no) la reparación, regulación o incluso la muerte celular deseable, como parte de la aclimatación o lucha contra la invasión externa (estrés biótico) o frente a cambios ambientales que resultan en condiciones de estrés abiótico. La especificidad de la señalización redox se logra mediante las ROS/RNS generadas en la vecindad de ciertas proteínas susceptibles presentes en los diferentes compartimentos celulares, en los que un ambiente apropiado permite dichas modificaciones redox (Oxi-PTM) (Umbreen y col., 2018). Curiosamente, la reversibilidad de ciertas modificaciones también es un factor importante de la especificidad, así como de las interacciones entre los diferentes ROS/RNS y las proteínas involucradas en esta reversibilidad (Calderón y col., 2017).

### **2.2.1.1. Nitración de tirosina**

En la interacción ROS/RNS, el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) resultante de la reacción del NO con el  $\text{O}_2^-$  se caracteriza por ser un potente oxidante capaz de oxidar grupos tiol y nitrar a proteínas mediante la adición de un grupo  $\text{NO}_2$  (dióxido de nitrógeno) en residuos de tirosina (Tyr), o bien aunque de forma menos frecuente, en residuos de triptófano (Trp), alterando su estructura y actividad. Estudios de nitroproteoma (nitro-Tyr) en Arabidopsis han revelado un abundante número de proteínas (aprox. 127) susceptibles de esta modificación, presentes en diferentes compartimentos celulares, incluidos cloroplastos y mitocondrias (Lozano-Juste y col., 2011; Tanou y col., 2012). La presencia de nitrotirosina se considera como un marcador de estrés nitrosativo producido por incremento en la generación celular de  $\text{ONOO}^-$  como resultado de condiciones de estrés biótico y/o abiótico, si bien la nitración de proteínas ocurre normalmente en condiciones fisiológicas (Camejo y col., 2010). Más aún, la nitración de Tyr es un proceso bastante específico ya que solo ciertos residuos de Tyr son preferencialmente nitrados en las proteínas diana (Corpas y Barroso, 2013).

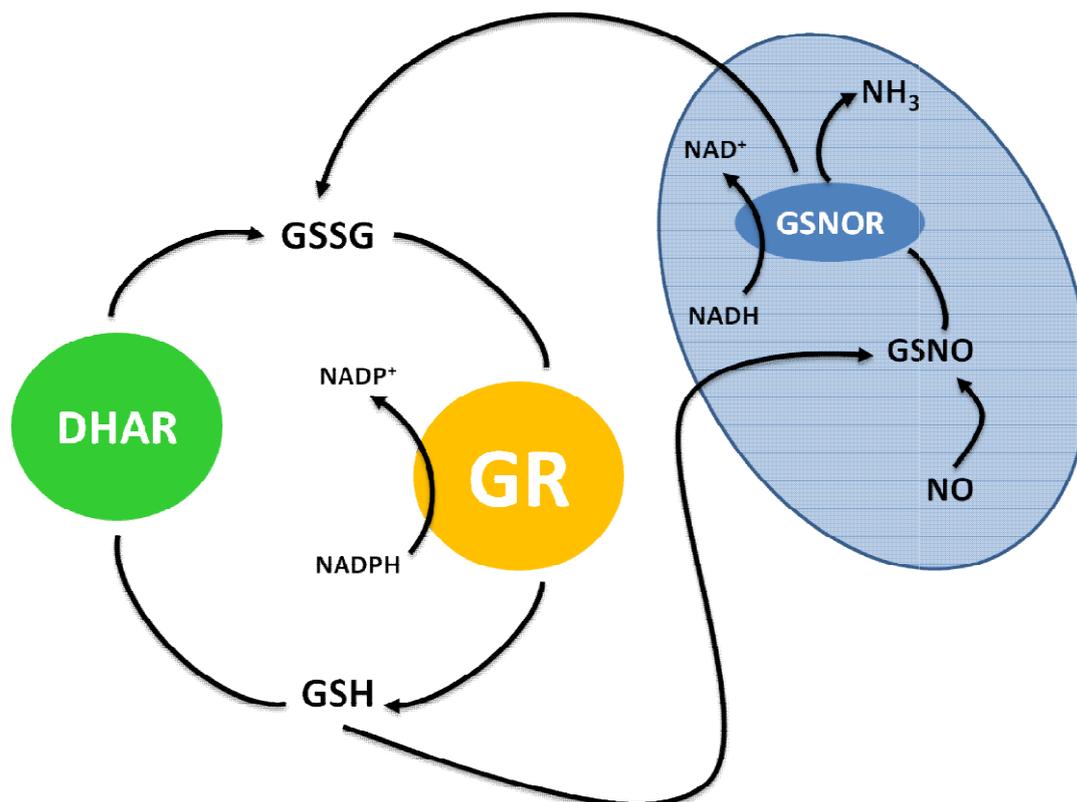
Junto a esta modificación post-traducciona, otros efectos inducidos por las RNS en las proteínas, incluyen la S-nitrosilación y S-glutationalización de las mismas.

### **2.2.1.2. S-nitrosilación**

La S-nitrosilación de proteínas está mediada por NO y por nitrosoglutación (GSNO) y consiste en la unión covalente de NO con el grupo tiol de un residuo de cisteína. La S-nitrosilación es reversible y afecta la actividad, estructura, localización y la interacción de las proteínas (Lozano-Juste y León, 2010; Camejo y col., 2015; Zaffagnini y col., 2016; Seth y col., 2018), por lo tanto, se considera adecuada para participar en procesos de señalización como se comenta anteriormente. La S-nitrosilación biológica puede tener lugar por transnitrosilación, lo que implica la transferencia de NO a un grupo tiol de una cisteína. Sin embargo los requisitos que hacen que un determinado residuo de cisteína sea sensible al NO aún no están completamente establecidos. La presencia de un motivo ácido-base flanqueando al residuo de cisteína se consideró esencial en algún

estudio (Stamler y col., 2001). Otros estudios han propuesto que no es la estructura primaria, sino el entorno tridimensional el que determina los residuos sensibles a la S-nitrosilación en la proteína (Taldone y col., 2005; Lázaro y col., 2013). Actualmente mediante análisis proteómicos de células, hojas y orgánulos celulares sometidos a condiciones de estrés biótico/abiótico o bien a tratamientos exógenos con NO, o donadores de NO, se ha establecido una larga lista de proteínas diana de S-nitrosilación y los procesos celulares afectados (Romero-Puertas y col., 2008; Astier y col., 2011; Camejo y col., 2015).

Los hallazgos recientes subrayan la importancia de la compartimentación subcelular para determinar cuándo y dónde las proteínas son S-nitrosiladas durante la transducción de señales. Generalmente este proceso depende de la formación de trióxido de dinitrógeno ( $N_2O_3$ ) que al reaccionar con el grupo tiol produce un S-nitrosotiol (RSNO). Así, los S-nitrosotioles (RSNOs) se consideran metabolitos biológicos derivados de NO, que también se producen en la reacción del óxido nítrico con componentes no proteicos que contienen grupos sulfidriilo. Estos nitrosotioles participan en reacciones biológicas importantes, incluyendo la S-tiolación, liberación de NO y transnitrosación. Uno de los S-nitrosotioles más significativos es el S-nitrosoglutatión (GSNO), formado mediante la S-nitrosilación del tripéptido glutatión (GSH) con NO en presencia de una molécula de oxígeno. También se puede formar por la reacción del glutatión reducido con peroxinitrito. A diferencia de otros S-nitrosotioles, el GSNO es estable en soluciones acuosas. Su estabilidad, y la elevada abundancia de GSH en las células hacen que el GSNO sea uno de los metabolitos endógenos de NO más abundante y un buen medio de transporte y almacenamiento del mismo (Gao, 2010; Romero-Puertas y col., 2013). En relación con el metabolismo de GSNO, es interesante señalar que la nitrosoglutatión reductasa (GSNOR) es la única enzima capaz de metabolizar GSNO, a GSSG (glutatión oxidado) y amoniaco, en una reacción dependiente de NADH (Figura 9). La regulación de la homeostasis celular de GSNO permite que éste controle el nivel de proteínas S-nitrosiladas (Lin y col. 2012; Romero-Puertas y col. 2013).



**Figura 9. Actividad de detoxificación de NO por nitrosoglutatión reductasa.** Un modelo simple de la conexión entre la actividad nitrosoglutatión reductasa (GSNOR) y las enzimas implicadas en la oxidación y regeneración de la forma reducida del glutatión: glutatión reductasa (GSR) y deshidroascorbato reductasa (DHAR), componentes del ciclo ascorbato-glutatión (ASC/GSH).

El cambio en el patrón de S-nitrosilación que ocurre en diversas condiciones de respuesta a estrés y en el desarrollo, puede afectar la funcionalidad del proceso fotosintético, la respiración y la fotorrespiración, entre otros. De hecho, en *Arabidopsis* las plantas *KO gsnor* presentaron niveles más altos de proteínas S-nitrosiladas que las plantas de genotipo silvestre, mientras que la sobre-expresión condujo a niveles disminuidos de S-nitrosilación (Ortega-Galisteo y col., 2012; Camejo y col., 2013; Zaffagnini y col., 2016).

### 2.2.1.3. *S*-glutathionilación

La *S*-glutathionilación de proteínas constituye otra modificación post-traduccional reversible y se produce por la adición de glutatión a un tiolato (Cys-S<sup>-</sup>) de un residuo de cisteína, a pH fisiológico. GSNO es el agente natural que actúa como glutathionilante además de nitrosilante. La glutathionilación al igual que la *S*-nitrosilación, está implicada en muchos procesos en condiciones fisiológicas normales, en las que se generan tiolatos. Se ha propuesto que ambas PTMs juegan un papel importante como mecanismos de protección de proteínas frente a la sobre-oxidación, que conlleva la pérdida de actividad en condiciones de estrés (Zaffagnini y col., 2013), aunque al igual que la *S*-nitrosilación, también puede resultar en la modulación de la actividad de proteínas específicas e influir en la localización celular de las mismas (Camejo y col., 2015; Chardonnet y col., 2015; Calderón y col., 2018). En condiciones reductoras, puede ocurrir la deglutathionilación de proteínas como resultado de la liberación del GSH de la proteína glutathionilada. Este proceso de forma general se encuentra regulado por las enzimas glutaredoxinas (GRXs) y también implica la intervención de GSH y de la enzima Glutatión Reductasa (GR) dependiente de NAD(P)H (Waszczak y col., 2015). El proceso de glutathionilación de proteínas se considera no sólo como un mecanismo de defensa antioxidante frente al estrés oxidativo/nitrosativo, sino también, como un mecanismo regulador en el proceso de señalización celular, de forma similar a lo descrito para la *S*-nitrosilación. Sin embargo, los mecanismos que median y regulan la glutathionilación de proteínas en plantas están aún por definir (Grek y col., 2013).

## 3. Sistemas antioxidantes

El papel aceptado de ROS/RNS como parte de los eventos de señalización está cambiando el concepto tradicional de sistemas antioxidantes a cargo de su control, al de "Sistemas de Procesamiento de ROS", sugerido recientemente por la Dra. C.H. Foyer (2018). De hecho, los componentes celulares que interactúan con ROS pueden transmitir señales oxidativas desde los diferentes compartimentos celulares, como se describe por ejemplo para las proteínas involucradas en modificaciones redox y las fitohormonas

involucradas en el crecimiento de las plantas y la respuesta al estrés (Bartoli, 2013; Xia, 2015; Foyer, 2017).

Normalmente, y como se ha comentado anteriormente cada compartimento celular presenta varios sistemas antioxidantes que eliminan ROS concretas, no obstante, se produce una aparente redundancia parcial de estos antioxidantes que junto con las diferentes fuentes productoras de ROS generan la complejidad existente en la regulación de la homeostasis redox que consigue ajustarse de forma muy precisa a situación ambiental y a las necesidades de la célula (Foyer, 2017).

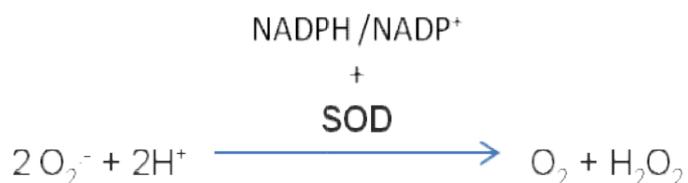
Los sistemas antioxidantes pueden clasificarse en enzimáticos y no enzimáticos según su capacidad de catálisis, de modo que los antioxidantes enzimáticos eliminan ROS mediante la regeneración de reductores, mientras los no enzimáticos amortiguan las ROS mediante la reducción directa de las mismas. Por ello los radicales libres  $^1\text{O}_2$  y  $\text{OH}^\cdot$  están controlados principalmente por sistemas no enzimáticos, mientras que los radicales  $\text{O}_2^\cdot$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  son fundamentalmente eliminados por vía enzimática.

A continuación se detallan los principales sistemas enzimáticos antioxidantes en plantas.

### **3.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos**

#### **3.1.1. Superoxido dismutasas (SODs, EC 1.15.1.1)**

Las SODs son proteínas que pertenecen a una familia de metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical  $\text{O}_2^\cdot$  a  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  según la reacción descrita por (McCord y Fridovich, 1969):



Estas enzimas son capaces de catalizar la reacción a una velocidad de  $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , unas 10.000 veces superior a la velocidad de dismutación espontánea del  $\text{O}_2^\cdot$  a pH

fisiológico (Fridovich, 1998). Al eliminar el  $O_2^{\cdot-}$ , estas enzimas previenen la formación del nocivo radical  $OH^{\cdot}$  que podría tener lugar mediante la reacción de (Haber-Weiss 1934) y por lo tanto, su ubicuidad en todos los organismos aerobios está más que justificada.

Las SODs presentan como diferencia fundamental el cofactor metálico de su centro activo, lo que da nombre a las mismas. Se han identificado tres tipos de SODs: las que contienen Cu (II) y Zn (II), denominadas Cu,Zn-SODs, aquellas que presentan Mn (III) denominadas Mn-SODs y un tercer tipo que contiene Fe (III), conocidas como Fe-SODs. (Salin y Bridges, 1980; Sevilla y col., 1982; Almansa y col., 1991). Posteriormente se han descrito algunas SODs atípicas que contienen distintas combinaciones de estos metales en sus moléculas (Barkley y Gregoryt, 1990).

La distribución de la mayoría de isoenzimas de SOD es multiorganular, de este modo, la enzima Mn-SOD, fue localizada inicialmente en mitocondrias de hojas de guisante (*Pisum sativum* L.) y caracterizada como una proteína tetramérica (Sevilla y col, 1982) que posteriormente se identificó también en peroxisomas y glioxisomas (del Rio y col., 1992; del Rio y col., 2003; Duchêne y Giegé, 2012). La enzima Cu,Zn-SOD se ha encontrado en cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas, citoplasma y apoplasto (Bueno y col., 1995) y algunos autores la han localizado asociada a las membranas tilacoidales (Ogawa y col., 1995; Meneguzzo y col., 1998; Gomez y col., 2004); y en el espacio extracelular (Streller y Wingsle, 1994; Fridovich, 1995; Ogaway col., 1996; Hernández y col., 2001; Karpinska y col. 2001). En cuanto a Fe-SOD, aunque es una enzima principalmente cloroplastídica, en algunas especies vegetales se ha localizado en citoplasma, mitocondrias y peroxisomas (Salin y Bridges, 1980; Becana y col., 1989; Droillard y col., 1989; Gómez y col., 2004).

Existe una considerable información sobre la importante participación de las diferentes isoformas de SOD en los mecanismos de adaptación y/o respuesta a estrés biótico y abiótico, incluido el estrés salino, como se describirá más detalladamente en el apartado de discusión.

### 3.1.2. Catalasas (CAT, EC 1.11.1.6)

La catalasas son enzimas que normalmente se encuentran formando tetrámeros. Son hemoproteínas que tienen como función principal la de proteger a la célula de los efectos deletéreos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> evitando su acumulación mediante la siguiente reacción:



Estas enzimas se localizan fundamentalmente en microcuerpos (peroxisomas y glioxisomas), cercanas a las enzimas productoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como la glicolato oxidasa. La eliminación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la realizan bien mediante la descomposición directa del mismo o bien mediante la oxidación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de sustratos tales como etanol, metanol formaldehído nitrito o mercurio (Willekens y col., 1995). Debido a la relativamente baja afinidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a concentraciones muy bajas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la actividad APX del ciclo ASC-GSH lo elimina de manera más eficiente que la actividad CAT (Mhamdi y col., 2010). Con todo, la actividad CAT es esencial para el mantenimiento del balance redox durante el estrés oxidativo.

### 3.1.3. Ciclo Ascorbato Glutati6n (ASC-GSH)

El ciclo ASC-GSH consiste en una serie de reacciones de 6xido-reducci6n acopladas en las que participan cuatro actividades enzimáticas: ascorbatoperoxidasa (APX), monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR), deshidroascorbato reductasa (DHAR) y glutati6n reductasa (GR) (Foyer, 1976; Hossain, 1984) (Figura 10). El objetivo principal es eliminar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y mantener los niveles redox de los dos metabolitos antioxidantes principales de las células que en él participan, esto es, ascorbato (ASC) y glutati6n (GSH). Por todo ello, este ciclo representa el principal tamp6n fisiol6gico que existe en las células.

Esta ruta enzimática se denomina de Foyer-Halliwell-Asada (Foyer, 1976; Nakano, 1981; Olafsdottir, 1988) y se describi6 por primera vez en cloroplastos, en los que las condiciones fuertemente reductoras asociadas al PSI, conducen a la producci6n de alteraciones importantes mediante la generaci6n de ROS como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y está implicada en la eliminaci6n de las mismas, evitando así la formaci6n de radicales OH<sup>•</sup>.

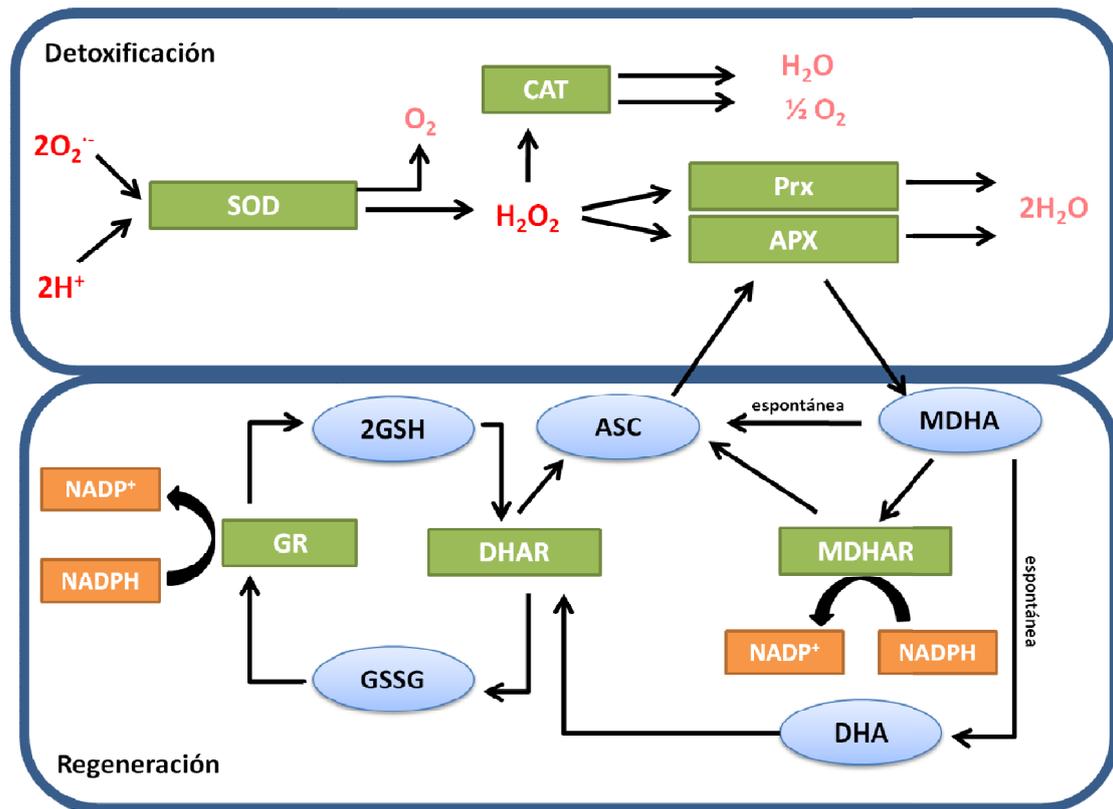
Junto a cloroplastos, citoplasma, mitocondrias y peroxisomas son los otros compartimentos celulares en los que se ha demostrado la presencia y actividad de este ciclo ASC-GSH (Jiménez y col., 1997; Chew y col., 2003; del Río, y López-Huertas, 2016).

En plantas, existe un elevado grado de complejidad en términos no solo de compartimentación subcelular de los componentes del ciclo, sino también de sus familias génicas y de la regulación de la expresión de estos genes (Jiménez y col., 1997; Jiménez y col., 2002; Foyer y Noctor, 2011; Caverzan y col., 2012).

La actividad APX elimina el  $H_2O_2$  utilizando los electrones cedidos por el ASC. El DHA formado por dismutación espontánea a partir del MDHA y el mismo MDHA son utilizados para reciclar el ASC. Para ello la actividad MDHAR utiliza los electrones donados por el NAD(P)H y la actividad DHAR regenera el ASC utilizando el poder reductor aportado por el GSH. Al aportar sus electrones el GSH se oxida a GSSG que debe ser reciclado de nuevo hasta GSH gracias a la actividad GR dependiente de NAD(P)H. Por otra parte, la regeneración del ASC también podría producirse por otros compuestos redox como sistemas tiorredoxina (TRX) y glutarredoxina (GRX) (Meyer y col., 2012). El glutatión oxidado (GSSG) se puede reducir también por la NADPH Tiorredoxina Reductasa (NTR), ambas dependientes de NADPH (Noctor, 1998; Barranco-Medina, 2007; Martí y col, 2009). Por lo dicho, el sistema antioxidante depende de un suministro suficiente de NAD(P)H que en el caso de las mitocondrias es mantenido por transhidrogenasas en la membrana mitocondrial, así como las enzimas isocitrato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa de la matriz mitocondrial constituyentes del ciclo de los ácidos tricarbónicos.

En este compartimento, la APX presenta dos isoenzimas que se encuentran localizadas la primera en la cara externa de la membrana externa mitocondrial y la segunda orientada hacia el espacio intermembrana. La MDHAR se encuentra anclada en la membrana externa mitocondrial y el resto de componentes en la matriz de la mitocondria (Jiménez y col., 1997 y 1998; Chew y col., 2003). Es destacable la presencia de APX en el espacio intermembrana pues ello favorece la estabilidad de la enzima L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GalLDH) que participa en la biosíntesis de ASC y se encuentra asociada físicamente al complejo I de la mitocondria y funcionalmente a los complejos III y IV pues usa al citocromo c oxidado como aceptor de electrones (Pineau y col., 2008); por tanto la capacidad de producción de ASC en las plantas está

ligada a la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Millar y col., 2003; Bartoli y col., 2005; Strzalka y Ziemienowicz, 2007). La biosíntesis del GSH se produce en citoplasma y plastos, sin embargo se ha sugerido que la CTEM podría afectar a su biosíntesis ya que los mutantes KO para el complejo I mitocondrial en *Arabidopsis* muestran unos altos niveles de GSH y son insensibles a un inhibidor de la biosíntesis de este antioxidante (Koprivova y col., 2010).



**Figura 10.** Algunas de las enzimas antioxidantes más representativas en la célula vegetal. La superóxido dismutasa descompone el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno resultante puede ser eliminado por la acción de catalasa, peroxirredoxina o por ascorbato peroxidasa, componente del ciclo ascorbato-glutatión. En esta ruta, la ascorbato peroxidasa utiliza el poder reductor del ascorbato (ASC) el cual se oxida a deshidroascorbato (DHA) y monodeshidroascorbato (MDHA). Este último se reduce de nuevo por la enzima monodeshidroascorbato reductasa empleando NADPH como reductor. El DHA es reducido por la enzima deshidroascorbato reductasa la cual oxida una molécula de glutatión (GSH) en el proceso. El glutatión oxidado (GSSG) se reduce por la enzima glutatión reductasa empleando NADPH como fuente de poder reductor. Modificado de Calderón y col. (2017).

### 3.1.4. Oxidasa Alternativa (AOX EC 1.10.3.11)

La proteína oxidasa alternativa (AOX), caracterizada por ser resistente al cianuro, es una quinol oxidasa componente de la cadena respiratoria de mitocondrias vegetales, que cataliza la reducción del oxígeno a agua captando electrones del reservorio de la ubiquinona (UQ), disipando la energía en forma de calor y disminuyendo la razón ADP/O (Figura4). AOX compite así por el poder reductor con la vía de conservación energética del citocromo (Cit), estando normalmente activa según han demostrado estudios *in vivo* (Ribas-Carbó y col., 2000), dotando a las mitocondrias vegetales de una vía alternativa de transporte de electrones, como se indicó anteriormente. El hecho de que ambas oxidasas Cit y AOX fraccionen de forma distinta el  $^{18}\text{O}$  ha llevado actualmente a admitir que el único método preciso para determinar la partición electrónica y la actividad de ambas vías respiratorias es el de la discriminación isotópica del oxígeno (Ribas-Carbó y col., 2005).

La AOX es una proteína diférrica codificada por el genoma nuclear que está asociada a la membrana interna mitocondrial como homodímero con los dos polipéptidos unidos por un puente disulfuro formado entre residuos de cisteína conservados en cada monómero, siendo la forma reducida más activa que la oxidada (Martí y col., 2009; Vanlerberghe, 2013). Así mismo, la proteína AOX tiene una activación metabólica, se activa por piruvato y otros intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) *in vitro* si bien esta activación en la planta aún no está bien caracterizada ni su regulación *in vivo* es aún bien conocida. Sin embargo, la proteína AOX puede activarse también mediante modificaciones post-traduccionales. Ensayos de caracterización bioquímica han mostrado que la AOX puede tener una regulación redox a través de un sistema tiol/disulfuro ya que puede reducirse y activarse mediante la tiorredoxina mitocondrial (TRXo1) a través de la acción del piruvato (Gelhaye y col., 2004; Rhoads y col., 2006). Del mismo modo, ensayos *in vitro* con mitocondrias aisladas demostraron que la TRXo1 mitocondrial puede producir la activación del consumo de oxígeno por esta vía alternativa de AOX empleando el sistema tiorredoxina reductasa dependiente de NADPH (NADPH/NTR) (Martí y col., 2009; Yoshida y col., 2013). Observaciones previas sugieren que un aumento en los niveles de NADPH en la matriz mitocondrial favorecería la

reducción de AOX a través de la actividad de este sistema NADPH/NTR/TRXo1 (Gray y col., 2004). Sin embargo mientras que la regulación redox se encuentra bien documentada *in vitro*, su impacto sobre la actividad *in vivo* de la vía alternativa no está aún bien establecido, al igual que ocurre con la activación metabólica (Sevilla y col., 2015).

La AOX se encuentra presente en todos los organismos excepto en archeobacterias (McDonald y Vanlerberghe, 2006). En angiosperma la proteína AOX está codificada por una familia multigénica. Estos genes han demostrado tener especificidad para el tejido y durante el desarrollo y se les han propuesto diversas funciones. En plantas la funcionalidad de la vía alternativa de transporte de electrones puede minimizar o regular la generación de ROS y el estrés oxidativo (como se comentó en el apartado de generación de ROS en mitocondrias, sección de introducción 3.1.2.) (Vanlerberghe, 2013; Ng y col., 2014).

Esta acción permite estabilizar el estado redox del reservorio de UQ mitocondrial, permitiendo que el ciclo TCA continúe funcional, lo que es importante cuando el suministro de NADH es alto o la vía citocrómica está contenida. Además AOX está también implicada en termogénesis, en la resistencia al cianuro y al NO, H<sub>2</sub>S, CO<sub>2</sub> y es importante para la respuesta de la planta a diversas situaciones de estrés entre otras, a bajas temperaturas, defensa frente a patógenos, estrés hídrico y salino (Martí y col., 2011; Vanlerberghe y col., 2016).

### **3.1.5. Tiorredoxinas**

Las tiorredoxinas (TRXs) son proteínas globulares ubicuas con actividad oxido-reductasa de baja masa molecular (12-14 kDa) implicadas en la reducción de puentes disulfuro de otras proteínas a través de un intercambio tiol-disulfuro, modulando de este modo la estabilidad y función de sus proteínas diana (Meyer y col., 2005; Sevilla y col., 2015). Sin embargo, como se ha demostrado para algunas TRXs peculiares, también pueden reducir proteínas S-nitrosiladas o S-glutationiladas (Kneeshaw y col., 2014; Kneeshaw y col., 2017). El sitio activo de estas enzimas es un motivo conservado de unos pocos aminoácidos y dos cisteínas  $-(WC(G/P)PC)-$ . Aunque estos aminoácidos varían entre los distintos grupos taxonómicos y miembros de la familia, es siempre común a

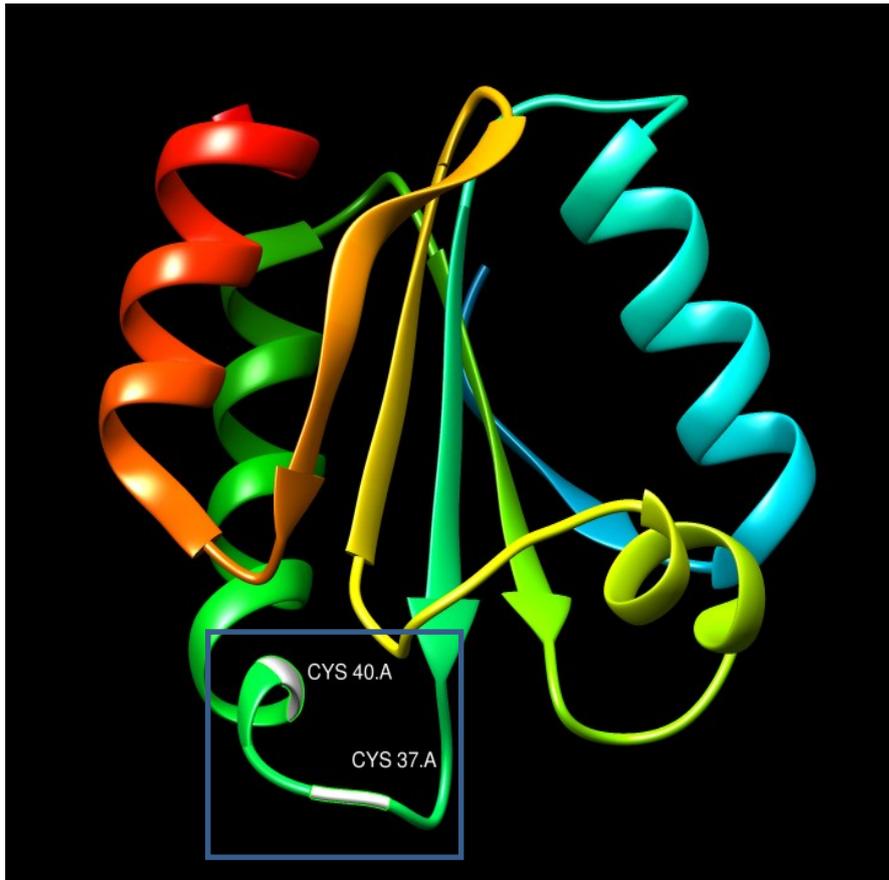
todos la presencia de las dos cisteínas que convierte a las tiorredoxinas en una superfamilia con algunos de los reductores más eficaces de la célula consiguiendo una eficacia en la reducción de puentes disulfuro 10.000 veces superior al DTT bajo el mismo pH (Holmgren, 1985).

Por otro lado, las TRXs atípicas tienen algunas características comunes con las TRXs típicas aunque se diferencian de aquellas en centros activos atípicos, múltiples dominios TRX o bien motivos TRX asociados.

Exceptuando a las archeobacterias y tripanosomas, las TRX se encuentran presentes en casi todos los seres vivos (Bult y col., 1996; Bhattacharyya y col., 2002) siendo en todos los casos de codificación nuclear (Sevilla y col., 2015). Se agrupan en una gran familia multigénica integrada por varias múltiples isoenzimas que se clasifican según su localización y estructura primara. A diferencia de procariontas, levaduras y mamíferos donde se han encontrado solamente tres clases de TRX (TRX 1, 2 y 3), en plantas se multiplica hasta 10 veces la diversidad.

Las TRXs tienen todas la misma conformación espacial consistente en una estructura globular compacta con un núcleo hidrofóbico compuesto por una lámina  $\beta$  de cinco hojas, tres paralelas y dos antiparalelas rodeado de cuatro hélices  $\alpha$ . Esto confiere propiedades redox similares a todas las TRXs.

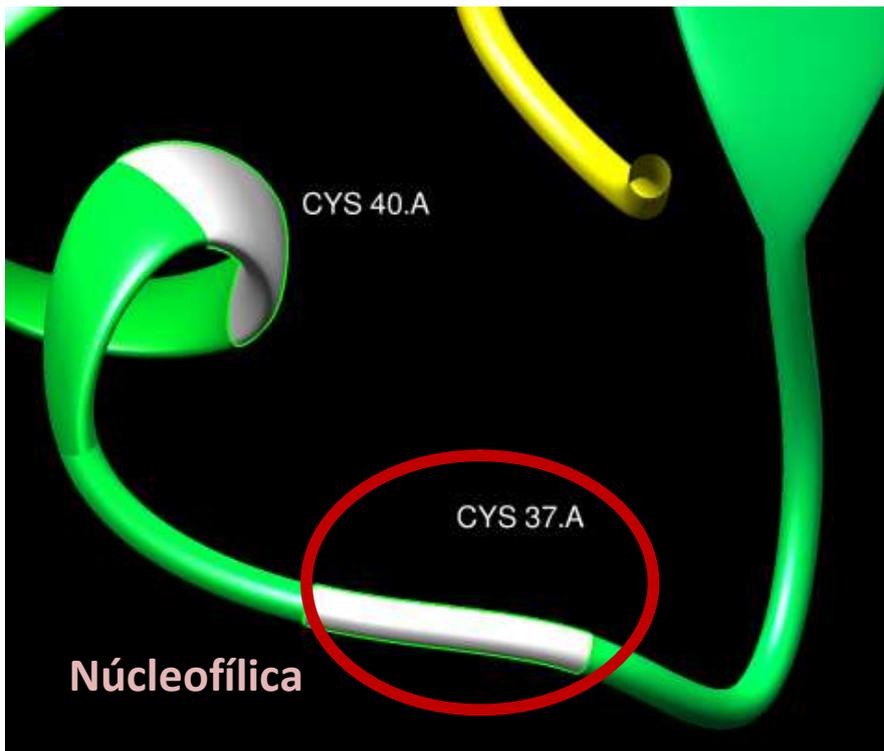
La estructura secundaria de todas las TRXs presenta la secuencia  $\beta 2$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$  y  $\alpha 4$  (Figura 11). De modo que el centro activo queda situado en una región protuberante relativamente hidrofóbica entre las estructuras  $\beta 2$  y  $\alpha 2$ , (Schürmann Jacquot, 2000), se encuentra muy expuesta al medio y presenta unas características superficiales que discriminan la interacción con las diferentes proteínas diana (Eklund y col., 1991; Wangenstein y col., 2001)(Figura 12). Este tipo de conformación conocida como “plegamiento tiorredoxina” puede encontrarse también en otros grupos de la superfamilia de las TRXs incluyendo a glutarredoxinas (GRX) y las proteínas con actividad disulfuroisomerasa (PDI), glutatión S-transferasas (Nishida y col., 1998), peroxidases dependientes de tioles (Choi y col., 1998) y canales de cloro intracelulares (Ashley, 2003).



**Figura 11. Estructura tridimensional de AtTRXo1.** En blanco se representan las dos cisteínas responsables de la actividad de la tiorredoxina.

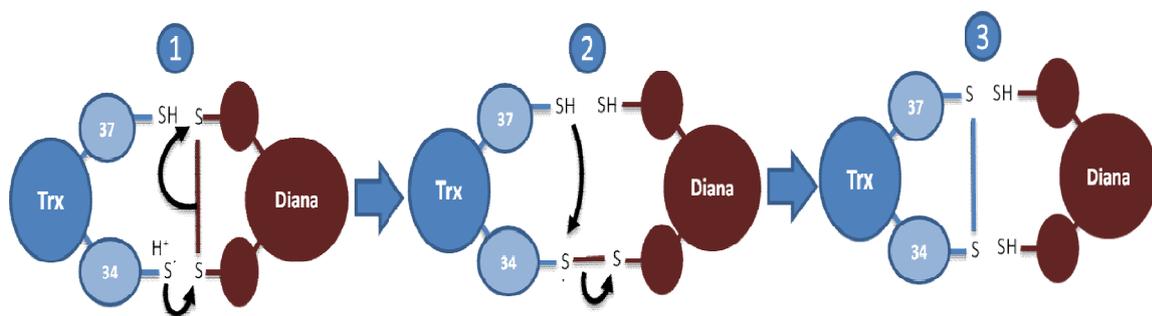
### 3.1.5.1. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de las TRXs que también emplean las GRXs y PDI es consecuencia de la disposición de las dos cisteínas de su centro activo que al encontrarse en distintos ambientes no actúan del mismo modo (Holmgren, 1985) y consiste en un ataque ditiol en dos etapas. Aunque el pK de los grupos tiólicos posee normalmente un valor de 8,0 - 9,0; una de las cisteínas del centro activo de las TRXs presenta un pK inferior, 6,75 en el caso de E.coli. Ésta es la cisteína N-terminal que está muy expuesta al medio y es desprotonada a pH fisiológico denominándose nucleofílica. La otra cisteína del centro activo se encuentra poco expuesta al medio y presenta un pK de 9,0 en E.coli por lo que normalmente está protonada y es denominada electrófila (Holmgren, 1995)(Figura 12).



**Figura 12.** Centro activo de la AtTRXo1 en el que están presentes dos residuos de cisteína. Se señala la cisteína nucleofílica más expuesta al medio.

Estas características estructurales permiten que la cisteína nucleofílica ataque al puente disulfuro de la proteína diana formando un complejo disulfuro mixto con ella, que se rompe inmediatamente por el ataque de la segunda cisteína de la TRX que ha perdido su protón probablemente por algún residuo de aspártico o glutámico. Este proceso resulta en la obtención de la proteína diana reducida y la TRX oxidada (Figura 13).



**Figura 13:** Mecanismo de acción de las TRXs mediante el ataque ditiol en dos etapas. (1) La cisteína electrófila de TRX ataca el puente disulfuro de la proteína diana formando un intermedio disulfuro con la misma. (2) La cisteína 37 produce un ataque electrófilo a fin de compensar el

*déficit electrónico. (3) Este proceso tiene como resultado la obtención de la proteína diana reducida y la TRX oxidada formando un puente disulfuro intramolecular.*

El mantenimiento en la célula del estado reducido de las tiorredoxinas va a depender de un sistema donador de electrones externo que varía en función de su localización celular, lo que deriva en la existencia de dos sistemas redox distintos. Uno de ellos es el sistema ferredoxina/tiorredoxina que se localiza en el cloroplasto y está formado por ferredoxina (Fd), tiorredoxina reductasa (NTR) y las diferentes TRXs cloroplastídicas (Cejudo y col., 2019). El segundo sistema se localiza en mitocondrias citoplasma y núcleo y en él, las TRXs se reducen a través de la NTR que emplea como donador de electrones al NADPH vía FAD (Balsera y col., 2014). Además de estos sistemas los cloroplastos y todo tipo de plastidios poseen una NTR modificada denominada NTRC, que se caracteriza por poseer un dominio TRX en la extensión C-terminal (Ojeda y col., 2017). En plantas NTRC está codificada por uno o dos genes y en cloroplastos tiene una localización estromática (Serrato y col., 2004; Nájera y col., 2017). Esta enzima, que está presente solo en los organismos fotosintéticos, se ha comprobado que es capaz de actuar por sí misma como un sistema TRX, transfiriendo poder reductor del NADPH a la 2-CysPRX, representando por tanto un sistema alternativo al dependiente de poder reductor en forma de Fd generado durante la fotosíntesis, ya que utiliza el del NADPH producido por el transporte electrónico fotosintético durante el día o en las primeras reacciones de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato durante la noche (Cejudo y col., 2019).

La presencia en los cloroplastos de este sistema redox dependiente de NADPH plantea la cuestión de la relación funcional entre NTRC y las vías Fd-NTR-TRX. Muy recientemente se ha descrito que esta relación funcional puede realizarse a través de la acción de la 2-CysPRX. El papel relevante de esta tiol-peroxidasa 2-CysPRXs en la homeostasis redox del cloroplasto sugiere que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede ejercer una función clave para controlar el estado redox de las enzimas estromáticas. De hecho los informes recientes han mostrado la participación de 2-CysPRXs en la oxidación de enzimas en la

oscuridad, lo que proporciona una explicación para el hecho de la desactivación de la fotosíntesis que tiene lugar durante la transición de luz-oscuridad (Cejudo y col., 2019).

### **3.1.5.2. Isoformas de Tiorredoxina en plantas.**

Como se acaba de describir, las TRXs constituyen una gran familia multigénica formada por distintas isoenzimas, y en plantas esta diversidad es muy elevada en relación a los sistemas animales ya que se presentan alrededor de 40 TRXs distintas clasificadas en siete subtipos: TRXf-, TRXm-, TRXh-, TRXo-, TRXx, TRXy, TRXz (Meyer y col., 2012; Lázaro y col., 2013). En *Arabidopsis thaliana* gracias a la secuenciación completa de su genoma se han identificado entre 20 -25 genes de TRX y de proteínas similares a TRX, mostrando todas ellas, en el caso de las TRXs, sorprendente homología (Bhattacharyya y col., 2002; Sevilla y col., 2015).

La diversidad y el número de isoformas de TRX en plantas (Figura 14) parecen sustentar el concepto del contenido en ellas de una mayor capacidad antioxidante en comparación con los sistemas animales y en ellas, la localización de las tiorredoxinas es fundamentalmente cloroplastídica y citoplasmática. En cloroplastos están ubicadas las TRXs: f, m, x, y, z junto con la atípica CDSP 32 (proteína cloroplastídica susceptible de inducción por sequía), y la proteína NTRC presente también en plastidios no fotosintéticos, caracterizadas por presentar un péptido señal que las dirige a este orgánulo (Cejudo y col., 2019).

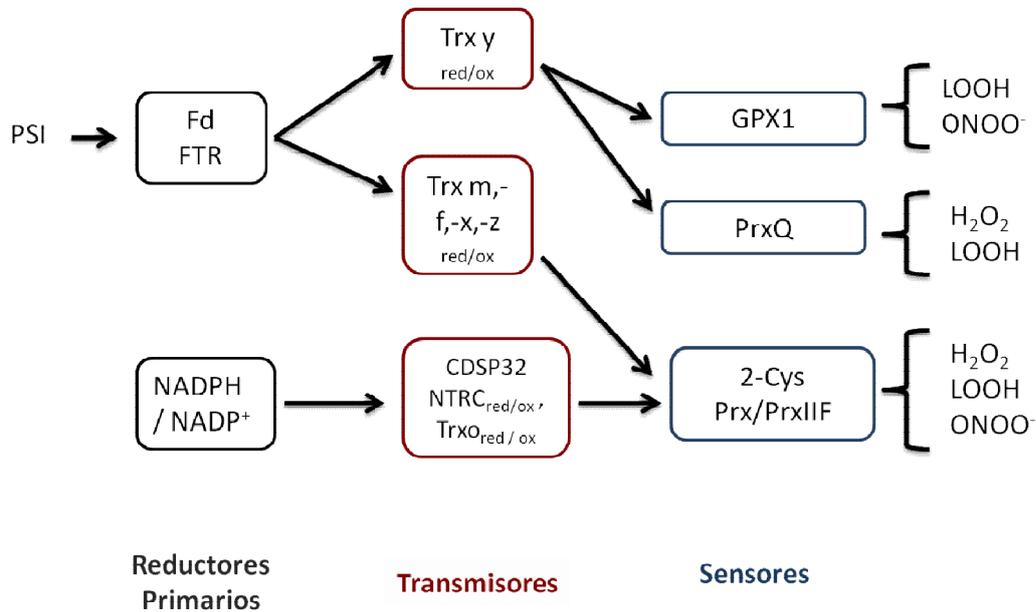
En citoplasma, la mayoría de las TRXs presentes pertenecen al tipo de las TRXs h que son el grupo de tiorredoxinas más numeroso y está formado por al menos 10 miembros. Datos recientes indican que la familia de TRX h se divide en tres subgrupos (I, II y III) considerando la similitud de secuencia y las propiedades bioquímicas, siendo únicamente las TRXs h del subgrupo I las que presentan la estructura clásica TRX, mientras que el resto de consideran TRXh atípicas (Tada y col., 2008; Lázaro y col., 2013). Se asume que la mayoría de TRXs h son proteínas citosólicas al carecer de péptido señal, si bien recientemente se ha descrito que alguna de estas TRXs presentan localización alternativa concretamente localización mitocondrial y/o nuclear. Por otro lado en soja las TRXs h1 y h2 poseen una extensión N-terminal hidrofóbica que las podría ligar a

membranas (Traverso y col., 2013; Cejudo y col., 2019). Se ha demostrado que determinadas TRXh pueden presentar modificaciones post-traduccionales en el extremo N-terminal, en función del grupo filogenético al que pertenecen. De hecho este estudio permitió identificar la localización en membrana del subgrupo II y III de las TRXs h de plantas concretamente en membrana plasmática, Golgi y retículo endoplásmico (Traverso y col., 2013).

En mitocondrias el sistema TRX es mucho más simple que el identificado en cloroplastos y plastidios, con solo dos tipos de TRXs distintas, las TRXo identificadas en *Arabidopsis* (AtTRXo1, AtTRXo2) y en guisantes (PsTRXo1), que poseen una extensión N-terminal que las conduce a mitocondrias y una TRXh2, un tipo de tiorredoxina citosólica localizada también en mitocondrias a pesar de carecer del péptido señal de localización mitocondrial (Gelhaye y col., 2004; Martí y col., 2009; Meng y col., 2010). La presencia de dos isoformas de TRXo en mitocondrias se ha establecido muy recientemente y solo está descrita en *Arabidopsis* (Zannini y col., 2018). Por otro lado, en guisante se ha descrito una doble localización para la PsTRXo1, no solo en la mitocondria sino también en el núcleo en condiciones estándar de crecimiento (Martí y col., 2009), al igual que ocurre en cultivos de células TBY-2 sobre-expresantes de PsTRXo1 (Ortiz-Espín y col., 2015).

En cuanto a la presencia de TRXs en núcleo, a diferencia del resto de los orgánulos, en este compartimento celular se encuentran más representadas las TRXs atípicas, como las nucleorredoxinas (NRX) que presentan dos o tres dominios TRX y la TDX (Marchal y col., 2014) si bien como se ha comentado también se han identificado TRXs típicas de localización nuclear, como la TRXo1, tanto en guisante como en células de tabaco (Martí y col., 2009; Ortiz-Espín y col., 2015; Calderón y col., 2017). Junto a estos tipos de TRXs la localización nuclear de TRXh se demostró bajo condiciones de estrés oxidativo durante la germinación (Pulido y col., 2009). Más recientemente se ha comprobado que la NRX1 de *Arabidopsis* se reduce en el núcleo por una tiorredoxina reductasa (NTR), concretamente por la isoforma NTRA, lo que podría constituir la presencia de un sistema completo TRX en este orgánulo (Cejudo y col. 2014).

La TDx es una proteína atípica formada por un dominio co-chaperona que favorece el plegamiento de otras proteínas y otro dominio TRX. Esta proteína está presente solo en plantas vasculares aunque los dominios co-chaperona homólogos también se encuentran en animales.



**Figura 14. Isoformas de tiorredoxina en plantas, y algunas proteínas diana representativas.** Las isoformas de TRX reducidas por ferredoxina tiorredoxina reductasa (FTR) dependientes de ferredoxina (Fd) son las isoformas cloroplastídicas m, TRXf, TRXz y TRXy, actuando sobre PRXIIF y 2-CysPRX excepto TRXy con diana glutatión peroxidasa (GPX1) y peroxirredoxina Q (PRXQ). Las isoformas reducidas por tiorredoxina reductasa dependiente de NADPH son NTRC, CDSP32 y TRXo que reducen principalmente a las Peroxirredoxinas PRXIIF y 2-CysPRX mitocondriales y cloroplastídicas.

### 3.1.5.3. Funcionalidad de las tiorredoxinas

La función molecular de las TRXs mitocondriales no está completamente establecida y actualmente la información que se tiene es la derivada de los estudios realizados con las TRXo1 y o2 de Arabidopsis y de guisante. Inicialmente, el desarrollo de métodos proteómicos, junto a la producción de proteína recombinante TRXo1 mutada en la

cisteína resolutive de su centro activo, ha permitido identificar en preparaciones de mitocondrias aisladas de diversas plantas (espinacas, arabidopsis, guisante y patata) mediante técnicas de cromatografía de afinidad, un número elevado y muy variable (entre 12-100) de posibles proteínas dianas a nivel mitocondrial. Estas dianas incluyen a las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), y otros muchos procesos entre ellos, la fotorrespiración, la respiración alternativa, la síntesis de precursores de hormonas, el transporte intermembrana, la síntesis de ATP, el plegamiento de proteínas, la traducción de proteínas mitocondriales y su participación en la respuesta antioxidante al estrés (Balmer y col., 2004; Martíy col., 2009; Yoshida y col., 2013). Solo algunas de estas posibles dianas han sido validadas por ensayos in vitro y/o in situ. Se comprobó que la PtTRXh2 es capaz de reducir los homodímeros de AOX y permitir su activación en presencia de su efector piruvato (Umbach y col., 2006). De forma similar, en mitocondrias aisladas de hojas de guisante y soja, en presencia del sistema NADPH/NTR/PsTRXo1 se comprobó la activación de AOX y el incremento del consumo de oxígeno por la vía respiratoria alternativa (Marti y col., 2009). AOX tiene un papel importante en la prevención o minimizando la formación de ROS en mitocondrias (Millar y col., 2011; Del-Saz y Ribas-Carbó, 2018) por lo que se ha sugerido que la PsTRXo1 podría participar en la regulación del metabolismo respiratorio y reacciones asociadas mediante el control de los niveles reducido de AOX, sin descartar la posible participación de ambas proteínas relacionando ROS y señalización redox en mitocondrias (Barranco-Medina y col., 2008; Martí y col., 2011). Por otro lado, TRXo1 puede actuar en la regeneración de la forma oxidada de PRXIIIF mitocondrial (Barranco-Medina y col., 2008), en la activación por reducción de citrato sintasa (Schmidtman y col., 2014) e isocitrato deshidrogenasa (Yoshida y col., 2013), mitocondriales, aunque de forma inversa también en la desactivación de succinato deshidrogenasa y fumarasa (Daloso y col., 2015). Estas evidencias junto al empleo de mutantes knockout de *TRXo1* (*Attrxo1*) para estudios funcionales, sugieren que el sistema TRX mitocondrial podría ser un regulador negativo del flujo metabólico del ciclo TCA bajo condiciones de luz, lo que apoyaría la idea de que bajo estas condiciones, el ciclo TCA y la respiración mitocondrial se inhiben in vivo (Tcherkez y col., 2005). Esto a su vez sugiere que cloroplastos y mitocondrias se encuentran de hecho interconectados a través de una regulación redox mediada por TRX en luz, posiblemente por vía de la transferencia de equivalentes de

reducción entre ambas organelas mediante la lanzadera malato-oxalacetato (Geigenberger y col., 2017). Junto a estas potenciales funciones en ensayos de germinación bajo estrés salino se ha comprobado que semillas de *Arabidopsis* procedentes de mutantes *KOAttrxo1* adelantaron germinación con respecto a las del genotipo silvestre a la vez que incrementaban  $H_2O_2$  disminuían catalasa y los niveles de PRXIIIF diana de TRXo1. Todo ello llevó a proponer la participación de AtTRXo1 mitocondrial en la homeostasis redox de semillas durante la germinación en estas condiciones de estrés (Ortiz-Espín y col., 2017). En *Arabidopsis* el análisis de estructura y función de ambas isoformas AtTRXo1 y AtTRXo2 mitocondriales indicó marcadas diferencias en la distribución de la carga superficial entre ambas proteínas, con 28 residuos de aminoácidos variables y no conservados que están expuestos a solventes y alejados del área altamente conservada, que comprende el motivo del sitio activo – WCGPC– y los residuos que lo rodean. Sin embargo, la mitad de estos residuos no conservados está potencialmente involucrada en las interacciones proteína-proteína. Paralelamente se observó que ambas proteínas se unen a un grupo de Fe-S cuando se expresan como proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. Sin embargo la relevancia fisiológica de esta observación aún no se ha clarificado (Zannini y col., 2018).

#### **3.1.5.4. Tiorredoxinas nucleares**

Como se ha comentado en el núcleo se localizan en mayor proporción TRXs atípicas, si bien también se encuentran presentes TRXs clásicas como la TRXo1 en núcleos de guisante y la traslocación a núcleo de TRXs h en semillas de maíz durante el proceso de germinación (Martí y col., 2009; Pulido y col., 2009). Las funciones de las TRXs en el núcleo se han asociado entre otros procesos, con la modulación del ciclo celular, apoptosis y muerte celular programada, señalización nuclear, y activación de genes relacionados con el estrés abiótico. Los mecanismos empleados por las TRXs en estas funciones son diversos y abarcan la regulación del estado redox de potenciales proteínas dianas: desde la activación de factores de transcripción específicos, proteínas implicadas en defensa y/o metabolismo celular, proteínas antioxidantes como 1-Cys PRX, a la

integración como elemento estructural de complejos de replicación del ADN o activando quinasas o ciclinas dependientes de quinasas (CDK) (Go y Jones, 2010; Marchal y col., 2014; Ortiz-Espín y col., 2015; Delorme-Hinoux y col., 2016; Calderón y col., 2017).

A continuación se detallan algunas de estas funciones:

#### **3.1.5.4.1. Modulación de factores de transcripción**

Hasta finales de la década de 1980, no se había descrito que los ácidos sulfénicos, además de su papel en la catálisis y la protección frente a las ROS, pueden actuar directamente como moléculas de señalización que desencadenan la respuesta celular al estrés oxidativo, a través de factores de transcripción (TF) (Zheng y col., 2016). Estas modificaciones redox de los TF al influir en la actividad de los mismos tienen impacto en los eventos posteriores regulados por cada TF específico y se cree que constituyen uno de los mecanismos más importantes que permiten la respuesta y aclimatación a condiciones específicas de estrés (De Gara y col., 2010; Locato y col., 2018).

Sin embargo la información sobre este aspecto en plantas es muy reducida en comparación a la existente en células animales (Waszczak y col., 2015).

Algunos ejemplos de TF regulados por TRX incluyen a aquellos de la clase bZIP en *Arabidopsis*, o los miembros de la familia teosintaramificadacicloidea (TCP) en plantas espermatófitas, algunos otros de la familia R2R3 con dominio MYB en maíz, los de la familia NAC en la caña de azúcar (*Saccharum spp.*) (SsNAC23). En estas plantas, la TRXh1 interactúa con TF SsNAC23 (Ditt y col., 2011). Este factor pertenece a la familia NAC de factores de transcripción específicos de plantas, con funciones en el desarrollo y respuesta al estrés por frío (Jensen y col., 2010). La regulación parece afectar a los puentes disulfuro entre algunos de los tres residuos de cisteína presentes en el TF. Por lo tanto, TRXh1 podría actuar cambiando la estructura de SsNAC23, con implicaciones para sus interacciones con otras proteínas (Jensen y col., 2010). Sin embargo, el mecanismo molecular exacto no está claramente descrito.

Otros TFs en vegetales son los TGA, capaces de interactuar con NPR1 (Non-expressor of Pathogenesis Related gene 1) y por tanto implicados en regulación de genes

relacionados con patogénesis, llamados así por su lugar de unión al ADN (TGACG). Entre otras TRXs, laTRXh5 y la TRXh3 intervienen en la reducción de NPR, lo que favorece su agregación en un estado multimérico y activo (Mou y col., 2003). En estas condiciones es capaz de dirigirse al núcleo y activar al factor de transcripción TGA. Otras moléculas como el glutatión podrían también regular la actividad de TGA de forma directa mediante la modulación de su estado redox (Tada y col., 2008) y de esta forma participar junto a las TRXs en las rutas de señalización de la respuesta sistémica adquirida (Kneeshaw y col., 2014; Zannini y col., 2018).

El factor de respuesta a etileno (ERF) AP2/etileno constituye otra familia de factores de transcripción sometidos a regulación redox (Vogel y col. 2014; Sevilla y col. 2015a).

Como ejemplo, la proteína Rap2.4a, es un TF de tipo AP2, y fue identificado como el primer componente de transducción de señales involucrado en la regulación redox del promotor del gen 2CPA del cloroplasto. En situaciones de desequilibrios redox moderados, la proteína Rap2.4a se dimeriza y se une a la región promotora activando la transcripción de 2CPA. Bajo estrés oxidativo severo, este TF oligomeriza, pierde su afinidad por el ADN, y por lo tanto disminuye los niveles de transcripción del gen. Por otro lado, Rap2.4 también organiza la activación de otros genes que codifican enzimas antioxidantes del cloroplasto, como la ascorbato peroxidasa estromática (SAPX) y la Cu, Zn-SOD (Shaikhali y col., 2008). El TF RCD1 (RADICAL-INDUCED CELL DEATH 1) potencia su efecto en la activación transcripcional de genes que codifican enzimas antioxidantes del cloroplasto (Hiltscher y col., 2014). RCD1 también interactúa con el factor de transcripción DREB2A en respuestas a la sequía (Vainonen y col., 2011; Zannini y col., 2018). Otro de los ejemplos más llamativos se describió en la regulación dependiente de Rap2.12 de los genes de respuesta a hipoxia. En condiciones aeróbicas, Rap2.12 se une a la membrana plasmática a través de su interacción con el complejo de proteínas de unión acil-CoA 1o 2 (ACBP1 / 2) anclado a la membrana. En condiciones de niveles bajos de oxígeno, Rap2.12 se libera de la membrana plasmática por un mecanismo que involucra un residuo Cys2 N-terminal, y se transloca a núcleo donde activa los genes de respuesta a la hipoxia (Gibbs y col., 2011; Licausi y col., 2013; Gibbs y col., 2014).

En plantas espermatófitas el factor TCP (Teosinte branched1-Cycloidea-Proliferating cell factor1) parece funcionar regulando el desarrollo morfológico vegetal (Martín-Trillo y Cubas, 2010; Uberti-Manassero y col., 2012) lo que requiere su activación redox por parte de GSH y TRX. De hecho, estudios en Arabidopsis muestran que la unión de TCP al ADN se inhibe por el tratamiento con agentes oxidantes, mientras que la inhibición puede revertirse por tratamiento con agentes reductores incluyendo el sistema NTR/TRX. Además, la mutación de la Cys-20 en el factor TCP-15 hace que no responda a las variaciones redox celulares. De hecho, en condiciones oxidantes, esta cisteína forma un puente disulfuro con la cisteína de otro TCP-15 inactivando la unión de ambos factores de transcripción al ADN (Viola y col., 2013).

Los factores de transcripción MYB (del virus de mieloblastosis aviar) tipo R2R3 del maíz requieren condiciones reductoras para la unión al ADN. En condiciones no reductoras, Cys49 y Cys53 forman un enlace disulfuro que impide que el dominio MYB R2R3 se una al ADN (Williams y Grotewold, 1997; Heine y col., 2004). Más recientemente, se demostró que la estructura y la actividad de unión al ADN de un factor de transcripción AtMYB30 están influenciadas por la S-nitrosilación (Tavares y col., 2014).

#### **3.1.5.4.2. Regulación de funciones metabólicas y de señalización nuclear**

La identificación de posibles proteínas dianas nucleares empleando diferentes aproximaciones experimentales ha llevado a sugerir la participación de la TRX nuclear en diversas actividades metabólicas y/o en procesos de señalización (Martins y col., 2018) (Figura 15). En este contexto se ha descrito a la ciclofilina, como una posible proteína diana de TRXh. La forma cloroplastídica de ciclofilina (Cyp20.3), puede activarse mediante la reducción de un puente disulfuro en su estructura. Esta activación conduce a la acumulación de tioles no proteicos y a la activación de la expresión de genes de defensa y se ha sugerido que puede constituir una vía de señalización retrógrada cloroplasto-núcleo (Park y col., 2013). En Arabidopsis, se han identificado varias isoformas posiblemente localizadas en citoplasma y núcleo, si bien la función que

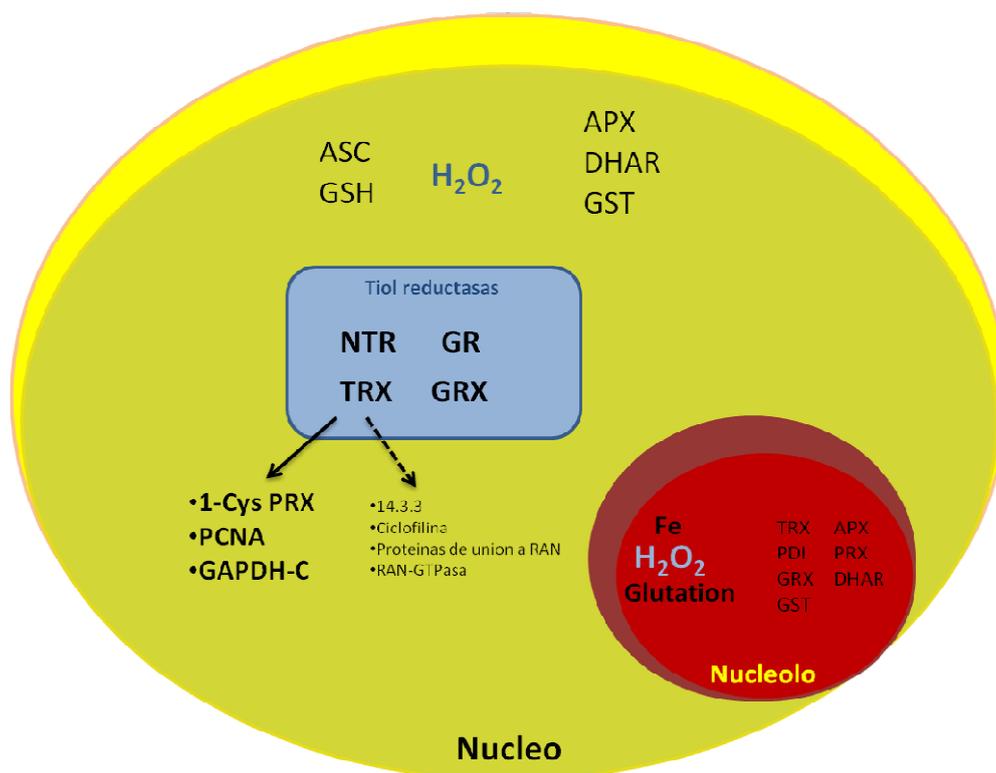
pueden desempeñar estas proteínas en núcleo no está aún establecida, aunque se ha implicado a la CYP71 (histona H3 implicada en el silenciamiento génico en la cromatina) en la represión de genes homeóticos implicados en la actividad meristemática y en organogénesis en *Arabidopsis*. Sin embargo, la regulación redox de ciclofilinas en núcleo no está demostrada y por ende su funcionalidad biológica (Romano y col., 2004). La enzima Gliceraldehído3-fosfato deshidrogenasa (GAPdH), es otra de las proteínas que interaccionan con TRX. A través de esta interacción se ha vinculado a la TRX en las diferentes vías celulares en las que GAPdH participa, incluyendo la actividad secundaria “uracilglicosilasa” importante para el mantenimiento de la integridad del ADN, tras la incorporación de GAPdH a núcleo en condiciones de estrés por cadmio (Vescovi y col., 2013).

En *Chlamydomonas* y en semillas de *Medicago*, la proteína Ran-GTPasa fue la primera proteína diana de TRX identificada en núcleo. Esta proteína localizada en citoplasma y núcleo es similar a las proteínas de la familia Ran y está implicada en la regulación unidireccional de transporte a través de los poros de la membrana nuclear. En plantas, las proteínas Ran tienen dos residuos adicionales de cisteína en todas las isoformas, ausentes en organismos eucariotas no fotosintéticos, lo que lleva a sugerir la existencia de interacciones específicas entre RAN y TRX sólo en los eucariotas fotosintéticos (Lemaire y col., 2004). Otras posibles proteínas diana de TRXh en núcleo, son las proteínas de la familia 14.3.3, que constituyen unas proteínas altamente conservadas en eucariotas con función reguladora, implicadas en las interacciones proteína-proteína y en la transducción de la señalización. Estas proteínas son un componente esencial en la regulación del ciclo celular y en el control de la integridad del ADN, mediante la regulación de quinasas nucleares y de factores de transcripción. Aunque en las diferentes isoformas de las proteínas 14.3.3 se conservan residuos de cisteína, al igual que lo descrito para otras posibles dianas nucleares, no se tienen evidencias de una potencial regulación redox de las mismas (Brandes y col., 2011).

Junto a las proteínas anteriores, el empleo de la tecnología ICAT en semillas de cebada permitió describir la posible interacción de la proteína antígeno nuclear de proliferación celular PCNA (Proliferating Cellular Nuclear Antigen) con TRXh (Vescovi y col., 2013) sin embargo esta interacción no se demostró fehacientemente. Esta proteína

PCNA es un componente principal de la maquinaria de replicación de ADN en el núcleo en células en división, donde además juega un papel central conectando diferentes vías ligadas al metabolismo del ADN (Strzalka y Ziemienowicz, 2011).

Posteriormente en plantas de guisante, estudios de funcionalidad de PsTRXo1 llevaron a analizar sus posibles proteínas diana en preparaciones de núcleo, mediante ensayos de cromatografía de afinidad, junto a ensayos *in vitro* (dot-blot) y de complementación bimolecular fluorescente. Se demostró por vez primera que ambas proteínas (PCNA/TRXo1) interactúan en el núcleo, lo que lleva a validar a PCNA como una de las escasas proteínas hasta ahora identificadas como diana nuclear de TRXo1 en plantas (Calderón y col., 2017) y paralelamente se describió la capacidad del sistema NADPH/NTRA/PsTRXo1 de reducir de forma efectiva al PCNA oxidado previamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta capacidad llevó a considerar una regulación redox de PCNA *in vitro* a través de los residuos de cisteína presentes en su estructura (Calderón y col., 2017).



**Figura 15. Tiolreductasas en núcleo y dianas de TRX nuclear.** Se muestran algunos de los componentes que mantienen la homeostasis redox en el núcleo. Resaltadas en negrita las dianas nucleares confirmadas de TRX, en menor tamaño las dianas no confirmadas.

### **3.1.5.4.3. Participación en ciclo celular: TRX y PCNA**

El conjunto de eventos que constituyen el ciclo celular tienen como finalidad la división o duplicación celular generando dos células hijas. Estos procesos necesitan de una homeostasis finamente regulada que mantiene un equilibrio entre proliferación y muerte celular. El desarrollo vegetal está regulado por este control de la división celular cuyos mecanismos básicos se encuentran bien estudiados en levaduras y animales y que están conservados en todos los eucariotas.

En células eucariotas el ciclo celular se divide en tres fases: interfase, mitosis y citocinesis. Durante la interfase la célula crece y acumula los nutrientes necesarios para la división celular y duplicación de su ADN. Esta fase se divide a su vez en tres subfases: fase G1, S y G2, aunque existe otra fase, dentro de G1, llamada G0 donde las células permanecen en estado quiescente y no proliferan.

La progresión del ciclo depende de puntos de control específicos regulados por las proteínas ciclinas y ciclinas dependientes de quinasas, entre otros elementos, que fosforilan a sus proteínas diana y con ello regulan su actividad. Además, se ha descrito el papel central que el mantenimiento de un equilibrio redox tiene en el destino celular, tanto en plantas como en mamíferos, así como la influencia que un ciclo interno de fases de reducción y de fases oxidativas ejerce en la progresión del ciclo celular (Chiu y Dawes, 2012).

La participación de TRX en ciclo celular se ha descrito en varias etapas. La replicación del ADN depende de forma importante de la actividad ribonucleotidoreductasa (RNR) implicada en la síntesis de los precursores. Esta enzima cataliza la conversión de los ribonucleosidosdifosfatos en desoxiribonucleosidosdifosfatos mediante una reacción en la que se requiere la intervención de un sistema donador de electrones. Inicialmente en *E. coli* se estableció que tanto la TRX como GRX dependiente de GSH, podían actuar como donadores terminales de electrones para la RNR, y que ambas vías podían sustentar la replicación del genoma bacteriano (Lu y Holmgren, 2009; Zahedi-Avval y Holmgren, 2009). De forma similar ambas vías (TRX y GRX) participan también durante la fase S del ciclo celular en levaduras y plantas, si bien específicamente la carencia de TRX

y no la de GSH, resulta en una parada del ciclo celular en la transición de la fase G1 a S, dando fenotipos de crecimiento lento. Este hecho ha llevado a describir a la vía dependiente de TRX como la principalmente activa y eficaz en mantener una adecuada actividad RNR en ambos organismos (Zahedi Avval y Holmgren, 2009). En plantas se ha descrito que ambas vías intervienen en el control del desarrollo post-embriionario en los meristemas apicales de los tallos, mientras que en sistemas animales, la TRX actúa aumentando el crecimiento celular (Wakasugi y col., 2006; Reichheld y col., 2007).

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína que se encuentra implicada en diversos eventos celulares relacionados con el metabolismo del ADN (Strzalka y Ziemienowicz, 2011). Los genes que codifican PCNA y/o sus productos han sido identificados en una amplia variedad de organismos incluyendo animales, levaduras y plantas superiores. Las plantas en las que estos genes se han descrito incluyen *Arabidopsis*, habichuela (Strzalka y Ziemienowicz, 2007); zanahoria (Hata y col., 1992), maíz (López y col., 1995), guisante (Shimizuy Mori, 1998), *Vinca peruviana* (Kodama y col., 1991), colza (Markley y col., 1993), arroz (Suzuka y col., 1989), soja (Daidoji y col., 1992) y tabaco (Park y col., 1999), entre otras.

La replicación del ADN es un proceso esencial para la copia de información genómica en organismos vivos. La regulación de la sincronización de la replicación del ADN es necesaria para los procesos de desarrollo y diferenciación (Bass y col., 2015). En general, la eucromatina se replica predominantemente en la fase S temprana, mientras que la heterocromatina se replica en la fase S tardía (Rhind y Gilbert, 2013). El PCNA interviene como coordinador clave de los procesos relacionados con la replicación del ADN, mediante interacciones estrictamente reguladas y altamente coordinadas con numerosas proteínas asociadas (Yokoyama y col., 2016). Ejerciendo una función central en la organización de la replicación del ADN así como en procesos asociados como son la remodelación de la cromatina, la reparación del ADN y el establecimiento de la cohesión entre cromátidas hermanas o el ciclo celular papel central en la organización de la replicación del ADN, y en una serie de procesos asociados como la reparación del ADN, la remodelación de la cromatina, el establecimiento de la cohesión de cromátidas hermanas o el ciclo celular.

En este contexto PCNA está reconocido como un marcador molecular de proliferación celular debido a su papel en replicación. Como se ha comentado anteriormente TRXo1 interacciona con PCNA en núcleo (Calderón y col., 2017). Estudios funcionales de PsTRXo1 en células TBY-2, describieron que el patrón de expresión de PCNA en ellas se producía principalmente en la fase S del ciclo celular, evidenciando su directa correlación con la proliferación celular y la replicación del ADN. Además, el análisis del efecto que la sobreexpresión de *PsTRXo1* en células TBY-2 ejercía sobre el crecimiento celular, los contenidos de PCNA y glutatión y su localización celular, permitió describir la implicación de PsTRXo1 en la progresión del ciclo celular, posiblemente proporcionando un entorno nuclear reductor e interactuando con PCNA. A su vez, los resultados permitieron vincular la influencia de PsTRXo1 sobre los contenidos celulares y nucleares de GSH y PCNA, con los cambios observados en la progresión del ciclo celular en las células TBY-2 transformadas con *PsTRXo1* (Calderón y col., 2017).

### 3.1.6. Peroxirredoxinas

Las peroxirredoxinas (PRXs) constituyen una familia de tiol-peroxidasa de bajo peso molecular (17-24 kDa) con actividad antioxidante, que catalizan la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o alquil-hidroperóxidos (ROOH) a agua o los correspondientes alcoholes (ROH) respectivamente, para ello utilizan preferentemente tiorredoxinas como dador de electrones, aunque también pueden utilizar a glutarredoxinas (GRXs) (Hall y col., 2009; Rouhier, 2010), el GSH (Pedrajas y col., 2016) y a la ciclofilina (Bernier-Villamor y col., 2004).



Todas las PRXs se presentan como homodímeros y contienen un residuo de cisteína en la región NH<sub>2</sub>-terminal que es esencial para la actividad catalítica. Son proteínas ubicuas que se localizan en diferentes compartimentos celulares en los que se expresan distintas isoformas. Las PRXs comparten un mecanismo catalítico similar y en vegetales, según la posición y el número de los residuos conservados de cisteína las PRXs se clasifican en cuatro subclases: las PRXs de 1-Cys, PRXs de 2-Cys, PRXs asociadas a la

bacterioferritina (PRX Q) y PRXs atípicas relacionadas con la proteína YLR109 (PRXs de tipo II). De este último grupo se han encontrado miembros en *Arabidopsis*, arroz, álamo y guisante con localización citoplasmática (PRXII B, C y D), plastidial (PRXIIE) y mitocondrial (PRXIIF) (Barranco-Medina y col., 2007; König y col., 2013; Lázaro y col., 2013). Al igual que ocurre con la PRXIIF atípica, el resto de PRXs también se presentan en diferentes compartimentos celulares incluyendo citoplasma, cloroplastos, mitocondria y núcleo (Rouhier, 2010; Dietz, 2011). La PRXs tipo II junto a su localización subcelular variable también presentan diferente masa molecular y punto isoelectrico y se han propuesto como sensores iniciales (primarios) del  $H_2O_2$  (Horling y col., 2002; Barranco-Medina y col., 2007; Lázaro y col., 2013).

La mitocondria vegetal, a diferencia de la de mamíferos, tiene solo un tipo de PRX, la PRXIIF atípica, que contiene dos residuos de cisteína en las posiciones 59 (Cys peroxidática) y 84 (Cys resolutive) y se caracteriza por formar un disulfuro intramolecular como forma intermedia en su mecanismo catalítico. Esta PRXIIF está altamente conservada entre diferentes especies (Barranco-Medina y col., 2007). Ambos residuos de cisteína son esenciales para una catálisis eficiente y, después de la reducción del hidropéroxido, el disulfuro intramolecular se reduce por la actividad de la TRXo mitocondrial. Esta PRXIIF tiene una eficiencia catalítica significativamente mayor que la presentada por la 2-Cys-PRX cloroplastídica que se caracteriza por formar un disulfuro intermolecular durante el ciclo catalítico (Lázaro y col., 2013; Pedrajas y Bárcena, 2018). Otra diferencia entre ambos tipos de PRXs reside en los estados oligoméricos que pueden tener ya que mientras que las 2-Cys-PRXs forman decámeros en su estado reducido o sobreoxidado, la PRXIIF solo forma hexámeros en su estado oxidado (Barranco-Medina y col., 2009; Lázaro y col., 2013).

Durante el transcurso normal del ciclo catalítico, las PRXs son oxidadas selectivamente por el  $H_2O_2$  a ácido sulfénico (CpSOH) en su Cys peroxidática (Cp) y seguidamente esta cisteína peroxidática reacciona con la cisteína resolutive (Cr) con la liberación de  $H_2O$  y formación del puente disulfuro. El disulfuro y/o la forma sulfénica de estas PRXs posteriormente y de forma específica, se reducen por la acción de reductores tiólicos celulares, como la TRXo en mitocondrias u otras TRXs en los diferentes orgánulos

celulares, o bien con la intervención del sistema GSH/GRX (Gama y col., 2007; Barranco-Medina y col., 2008). Se ha comprobado que la unión de TRXo y PRXIIF formando el heterocomplejo aumenta la actividad peroxidasa de la PRXIIF (Barranco-Medina y col., 2008). Así mismo, en condiciones determinadas de estrés oxidativo la forma sulfénica puede ser sobre-oxidada por  $H_2O_2$ , dando lugar a una forma más estable, forma sulfínica de la cisteína (Cys-SO<sub>2</sub>H) (Figura 16). Actualmente está aceptado que esta sobre-oxidación conlleva una inactivación transitoria de la actividad peroxidasa, permitiendo una acumulación local de  $H_2O_2$  que puede actuar promoviendo vías apropiadas de señalización (D'Autréaux y Toledano, 2007; Sevilla y col., 2015). Se ha comprobado que la unión de TRXo y PRXIIF formando el heterocomplejo aumenta la actividad peroxidasa de la PRXIIF (Barranco-Medina y col., 2008).

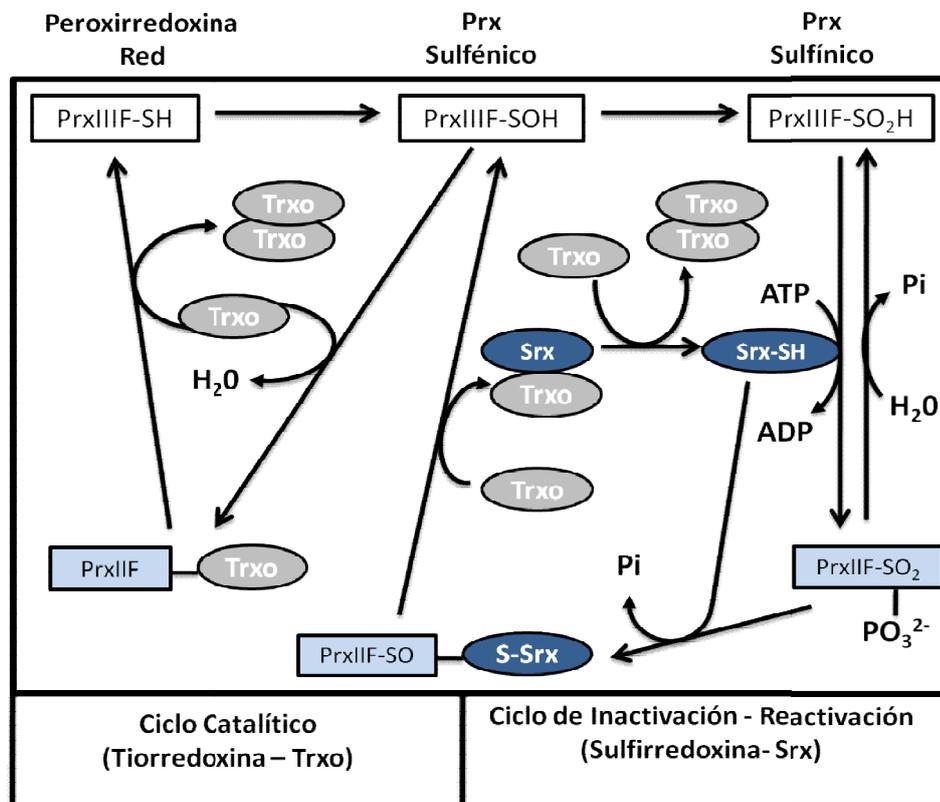
El mecanismo de acción de la PRX no se reduce simplemente al de su actividad peroxidasa sino que como consecuencia de la sobre-oxidación de sus grupos tiólicos y/o de su S-nitrosilación, puede adquirir una función chaperona, protegiendo a las estructuras celulares del daño oxidativo (Barranco-Medina y col., 2008; Barranco-Medina y col., 2009; Camejo y col., 2015). Se ha descrito que S-nitrosilación y la S-glutationalización pueden representar un mecanismo de protección frente a la sobreoxidación (Roos y Messens, 2011; Sevilla y col., 2015). Recientemente se ha descrito que la glutationalización de las peroxirredoxinas de guisante, 2Cys-PRX cloroplastídica y PRXIIF mitocondrial, afecta disminuyendo de forma similar la actividad peroxidasa de ambas proteínas, si bien la sulfirredoxina (SRX) de guisante al igual que la SRX humana, solo cataliza la deglutationalización de la peroxirredoxina cloroplastídica y no la de la peroxirredoxina atípica PRXIIF mitocondrial (Calderón y col., 2017).

Por otra parte, la forma sobre-oxidada de la PRXIIF puede funcionar como un marcador no-transcripcional del ritmo circadiano al ser un oscilador endógeno de 24 horas que regula numerosos procesos biológicos, críticos en plantas (Martí y col., 2018).

### **3.1.7. Sulfirredoxinas**

Las sulfirredoxinas (SRXs) son pequeñas reductasas dependientes de ATP presentes en eucariotas. Las SRX de los distintos organismos presentan un 30% de homología en su

estructura primaria y un centro activo -GCHR- cuyo residuo cisteína está particularmente conservado y es crítico para su función antioxidante (Jönsson y Lowther, 2007; Jönsson y col., 2008) además, poseen una región altamente variable en su extremo N-terminal que determina su localización. En Arabidopsis y guisante este extremo N-terminal posee un péptido señal de localización cloroplastídica (Liu y col., 2006) y también mitocondrial (Iglesias-Baena y col., 2010; Iglesias-Baena y col., 2011). En mitocondrias la SRX retroreduce la forma sulfínica inactiva de la PRXIIIF atípica, mientras que en cloroplastos la 2-CysPRX es su proteína diana. La reducción la realiza mediante un mecanismo similar al propuesto para otras SRXs(levaduras y/o mamíferos) (Jönsson y col., 2008), descrito en (Figura 16).



**Figura 16. Ciclo catalítico de la sobreoxidación de PRX y reducción mediada por sulfirredoxina.** Bajo condiciones fisiológicas, la PRX se oxida a su forma sulfénica actuando como peroxidasa. A niveles elevados de  $H_2O_2$ PRX puede ser sobre-oxidada a la forma sulfínica inactiva (PRX-SO<sub>2</sub>H) que reacciona con SRX formando un grupo tiosulfinato (PRX-SO-S-SRX). TRXo-SRX se unen reduciendo el heterocomplejo para liberar PRX-SOH. SRX se reduce a SRX-SH por la acción de otra TRXo reducida. La forma sulfénica de PRX es reducida por TRXo, formando un complejo PRX-TRXo, que es reducido por otra TRXo liberando a PRX-SH. Modificado de Sevilla y col. (2015).

La función biológica de las SRXs está relacionada con el mantenimiento del balance redox celular. En este sentido, se ha comprobado que el tratamiento con  $H_2O_2$ , incrementó la expresión del gen *AtSRX* en *Arabidopsis* y que los mutantes KO *AtsrX* presentaron un mayor estrés oxidativo que las plantas de genotipo silvestre. Además, el tratamiento con paraquat provocó un aumento en los niveles de ROS en cloroplastos de los mutantes KO, mientras que esta hipersensibilidad se invertía al restaurar la expresión de *AtSRX* mediante transformación genética. Esta información indica que la expresión y la función de *AtSRX* en los cloroplastos es esencial para una respuesta adecuada de la planta a las condiciones de estrés (Liu y col., 2006). Este papel de SRX en el mantenimiento del balance redox celular, unido a la especificidad de SRX para la PRX y a la necesidad de un reductor, como TRX, para realizar su actividad, junto a la interacción demostrada entre ambas proteínas TRX-PRX, son evidencias que han contribuido a describir la existencia en la célula de un sistema de regulación redox, denominado sistema TRX/PRX/SRX, tal y como hemos indicado anteriormente. Estas proteínas participan en la red de señalización para percibir y transmitir principalmente a los sensores de ROS y redox (Sevilla y col. 2015a, b).

### **3.1.8. Glutarredoxina.**

Las glutarredoxinas (GRXs) unas tiol-oxidoreductasas pequeñas y ubicuas generalmente reducidas por glutatión (GSH) (Holmgren, 1979), aunque se ha descrito la capacidad de tiorredoxina reductasas de reciclar estas GRXs (Zaffagnini y col., 2008; Couturier y col., 2009); o su oxidación por parte de la actividad glutatión reductasa (GR).

Pese a presentar estructuras tridimensionales muy similares a las de las TRXs, las GRXs podrían tener funciones distintas según indica su caracterización bioquímica, de modo que las GRXs son más eficaces reduciendo puentes disulfuros intramoleculares mientras que las TRXs resultan más eficientes reduciendo puentes disulfuro intermoleculares. Por otra parte las GRXs tienen una función importante en la modulación redox de la actividad de proteínas y la señalización redox en plantas dada su capacidad de intervenir sobre una modificación post-traducciona de proteínas como es la glutationalización la cual pueden revertir reciclando los grupos GSH de sus proteínas diana. Al igual que otras familias enzimáticas, las isoformas de GRX se distribuyen en diferentes orgánulos, existiendo isoformas mitocondriales como GRXs-15 y GRXs-10 implicadas en respuesta a estrés oxidativo mediante regeneración de enzimas antioxidantes como PRXII (Couturier y col., 2009; Meyer y col., 2012), o GRXs citosólicas como la GRX17 que se traslada al núcleo en plantas de tomate en condiciones de estrés térmico (Wu y col., 2012).

### **3.2. Sistemas antioxidantes no enzimáticos**

Los sistemas antioxidantes no enzimáticos, se denominan también antioxidantes estequiométricos por su capacidad de neutralizar un radical libre o especie reactiva, por molécula. Estos sistemas se clasifican en tres grupos: reductores hidrosolubles, reductores liposolubles y quelantes de metales. El ascorbato y el glutati6n constituyen cuantitativamente los antioxidantes solubles y tampones redox mayoritarios de la célula (Foyer y Noctor, 2013). Además de diversas y numerosas funciones celulares, ambos antioxidantes funcionan como sustratos en el ciclo ascorbato-glutati6n como se ha descrito anteriormente. Se caracterizan por presentar concentraciones celulares en el rango de milimolar, con considerables variaciones entre tejidos, y estados fisiológicos de las plantas (Smirnoff, 2018).

#### **3.2.1. Ascorbato**

La vitamina C (ácido ascórbico) es un metabolito hidrosoluble ubicuo y abundante en plantas. Su concentración es de 5-25 mM en hojas y 25-50 mM en cloroplastos (Foyer y

Noctor, 2009). El ascorbato es un potente antioxidante que reacciona no sólo con el peróxido de hidrógeno, sino también con el anión superóxido, el oxígeno singlete y el radical hidroxilo. Regenera el tocoferol oxidado y actúa como donador de electrones en la depoxidación de violaxantina (Smirnoff y Wheeler, 2000). Las funciones del ascorbato van más allá de su intervención en el metabolismo celular, actuando como un regulador clave en el crecimiento y desarrollo de las plantas. La presencia de ASC en las plantas parece ser indispensable para la supervivencia y, de hecho, las plantas sin ascorbato son inviables (Dowdle y col., 2007; Ortiz-Espín y col., 2017). En diferentes tejidos vegetales se ha descrito una correlación entre ASC y la capacidad de crecimiento (Liso y col., 1988; Córdoba-Pedregosa y col., 2003). También actúa como un cofactor de las dioxigenasas en la biosíntesis de varias fitohormonas como etileno (ET), giberelinas (GA), auxinas (IAA) y ácido abscísico (ABA). El ASC endógeno influye no solo en la biosíntesis de las fitohormonas, sino también en su vía de transducción de señales. Algunos hallazgos apoyan la idea de que tanto ABA como la señalización dependiente de ABA participan en el control de crecimiento dependiente de ascorbato. Los mutantes de *Arabidopsis* que muestran niveles bajos de ASC inducen niveles altos de ABA y, por lo tanto, un crecimiento moderado (Pastori y col., 2003; Kerchev y col., 2011; Ortiz-Espín y col., 2017).

La concentración basal de ascorbato está muy regulada a diversos niveles (síntesis, degradación, transporte, regeneración y compartimentalización), afecta a la progresión del ciclo celular y es crítica para la percepción de condiciones de estrés en el apoplasto (Munne-Bosch y col., 2013). El paso final de la biosíntesis de ASC se produce en la membrana mitocondrial interna, gracias a la enzima L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GalLDH).

### **3.2.2. Glutación**

El glutati6n (GSH,  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cisteinil-glicina), es uno de los principales antioxidantes en las c6lulas de plantas donde participa en el ciclo de ascorbato-glutati6n (Foyer y Noctor, 2001), cuya forma reducida (GSH) coexiste con su forma oxidada (GSSG). Ambas formas constituyen el principal tamp6n redox "tiol-disulfuro" de la c6lula

como parte de las parejas redox enlazadas con ascorbato y NADPH. La abundancia celular de ascorbato y glutatión, su reactividad directa o mediante reacciones de peroxidasa con ROS como oxígeno singlete, superóxido, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno, conforman el denominado "núcleo redox" celular (Foyer y Noctor, 2011). Todos los componentes del mismo son ubicuos en el citosol, el cloroplasto, las mitocondrias y los peroxisomas (Jiménez y col., 1998; Rahantaniaina y col., 2013). El glutatión es abundante en todos los compartimentos celulares, donde se han encontrado concentraciones de 0.7-6 mM en la vacuola, plastos, Cit y Mit de *Arabidopsis* y guisante (Jiménez y col., 1997; Fernández-García y col., 2009; Krueger y col., 2009).

En las células la biosíntesis de GSH ocurre fundamentalmente en el citoplasma y en plastidios, a través de dos reacciones dependientes de ATP catalizadas secuencialmente por la glutamincisteínasintetasa (o cisteína glutamato ligasa) estromática y la glutatión sintasa localizada en el estroma y en el citoplasma. Una vez sintetizado, el glutatión se transporta entre otros compartimentos a mitocondrias mediante transportadores cuya naturaleza y regulación aún no están fehacientemente establecidas (Ravilious y Jez, 2012; Bachhawat y col., 2013). No se tienen evidencias de la síntesis de GSH en mitocondria, si bien se ha sugerido que la cadena de transporte de electrones mitocondrial podría tener cierto efecto sobre la biosíntesis de GSH ya que se ha demostrado que en *Arabidopsis*, mutantes KO para el complejo I (CI) mitocondrial tiene niveles elevados de GSH y son insensibles a un inhibidor de su biosíntesis (Koprivova y col., 2010). En células de mamíferos y en las de plantas, el GSH se concentra en el núcleo durante las primeras fases del crecimiento celular, localización en la que desempeña importantes funciones (Diaz-Vivancos y col., 2010). Estudios recientes han mostrado la importancia que concretamente la distribución del GSH entre el núcleo y el citoplasma tiene en el proceso de proliferación celular (Markovic y col., 2007). En células vegetales de forma similar a lo que ocurre en las de mamíferos, el nivel de GSH es muy bajo en la fase G1 del ciclo celular. Más aún la transición de fase G1 a fase S en la progresión del ciclo celular, necesita un incremento en los niveles totales de glutatión, como se ha observado en meristemo apical de raíces, aunque en tallos se ha descrito redundancia funcional entre GSH y TRX durante el desarrollo meristemático (Reichheld y col., 2007). Por otro lado, niveles elevados de GSSG tienen un efecto contrario al ejercido por la

forma reducida, deteniendo el ciclo celular en la fase G1 (Markovic y col., 2007). Interesantemente estudios de inmunolocalización de la proteína GR1::GFP, en células de raíz y de hojas de Arabidopsis, han identificado la localización núcleo-citoplasmática de esta isoforma de GR, indicando la presencia en núcleo de una vía dependiente de NADPH y GR para llevar a cabo la reducción del GSSG en estas células (Marchal y col., 2014). Más recientemente se ha comprobado que la sobreexpresión de la tiorredoxina mitocondrial/nuclear de guisante (PsTRXo1) en cultivos celulares TBY-2 incrementa proliferación celular afectando a los contenidos y localización de GSH en el núcleo, concretamente en las fases avanzadas del crecimiento del cultivo (Calderón y col., 2017).

## **4. El ácido abscísico (ABA)**

### ***4.1. La molécula de ABA: consideraciones generales y biosíntesis***

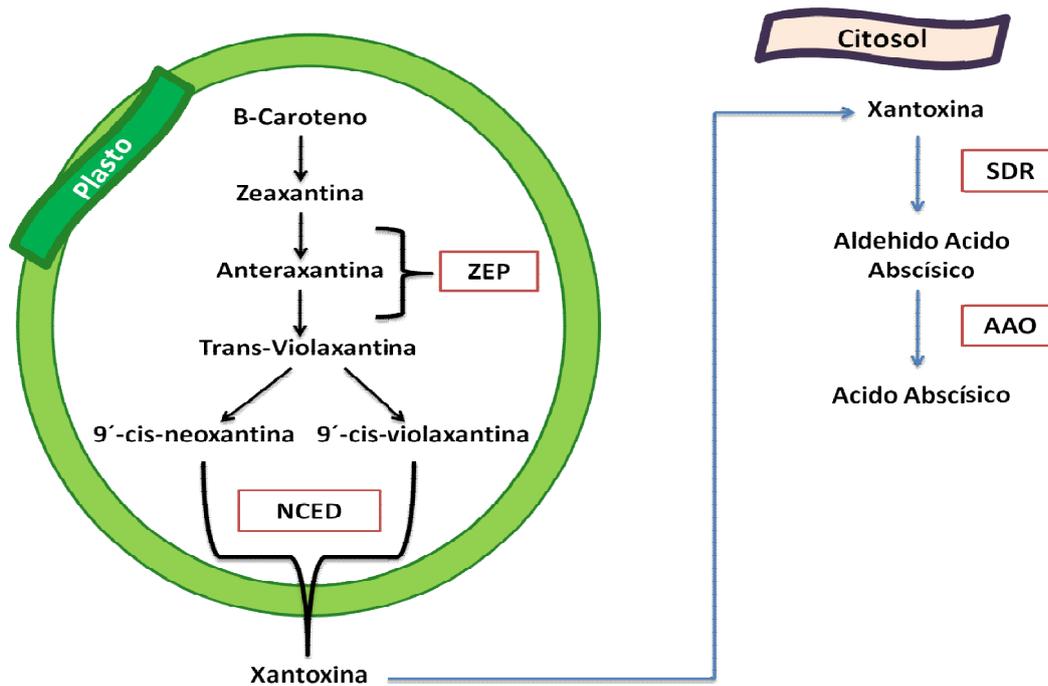
En plantas el proceso de crecimiento y los diferentes estados de desarrollo junto a las respuestas a condiciones ambientales variables, se encuentran bajo una estricta regulación en la que participan diferentes tipos de hormonas. Las fitohormonas son moléculas presentes en una concentración baja en las plantas y que ejercen su función bien en el lugar en el que se sintetizan o en las diferentes localizaciones o tejidos a los que pueden ser transportadas (Li y col., 2016). En estas últimas dos décadas se ha producido un rápido e importante progreso en la información sobre las vías de biosíntesis, transporte, señalización y modo de acción de varias hormonas vegetales. Concretamente los estudios relacionados con la señalización hormonal han permitido establecer el hecho de que junto a la acción individual, determinadas hormonas ejercen su función interactuando de una manera altamente compleja (Verma y col., 2016; Ravindran y col., 2017).

Entre las diferentes fitohormonas, el Ácido Abscísico (ABA) denominado de forma generalizada como la “hormona del estrés” debido a su rápida acumulación en los tejidos vegetativos tras la exposición al mismo, se considera un regulador central de la resistencia al estrés abiótico coordinando toda una serie de funciones que permiten a la planta responder a tales condiciones. Desde el punto de vista químico, el ABA es una

pequeña molécula de 15 átomos de carbono, concretamente un metabolito perteneciente a los isoprenoides o terpenoides, clasificada como sesquiterpeno, identificada en los inicios de la década de los sesenta (1960) como un inhibidor del crecimiento en frutos jóvenes de algodón y en hojas de sicómoro (Cutler y col., 2010). Sin embargo a pesar de su nombre, el ABA no parece controlar directamente la abscisión sino que su presencia en los órganos abscísicos parece reflejar su papel en promover senescencia y/o las respuestas a estrés, procesos que preceden a la abscisión (Finkelstein, 2013).

La molécula de ABA presenta una configuración no-plana y múltiples motivos funcionales. El ABA es un ácido débil ( $pK_a \sim 4.7$ ), que en su forma protonada es permeable a las membranas, lo que le permite difundir pasivamente a través de las mismas (Wilkinson y Davies, 2010; Sah y col., 2016;). Adicionalmente, se han identificado distintos transportadores de ABA que regulan la acumulación y translocación de la forma activa de la hormona. Este transporte de ABA entre las células, tejidos y órganos juega un importante papel en germinación y en la respuesta de la planta frente a condiciones de estrés (Kang y col., 2015).

En plantas a diferencia de otros organismos la biosíntesis de ABA tiene lugar fundamentalmente en cloroplastos a través de la denominada vía indirecta específica, aunque las etapas finales transcurren en el citosol. La ruta involucra una serie de intermediarios y reacciones enzimáticas que tienen como precursor clave, la zeaxantina, sintetizada a través de la ruta del  $\beta$ -caroteno que involucra al piruvato, mientras que la vía del alfa-caroteno conduce a la síntesis de luteína (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). Sin embargo en tejidos fotosintéticos el pool de beta-caroteno está altamente regulado de forma que solo una pequeña proporción del mismo se metaboliza a zeaxantina.



**Figura 17. Componentes principales de la ruta de biosíntesis del ácido abscísico (ABA) en plantas.** En plastos la zeaxantina procedente de la ruta del beta-caroteno se considera un componente clave de la biosíntesis de la hormona. Las últimas etapas del proceso biosintético tienen lugar en el citosol a partir de xantoxina. Modificado de Sah y col., (2016)

Tal y como se recoge en la Figura 17 en el proceso de la biosíntesis de novo la conversión de B-caroteno a ABA implica la participación de enzimas incluyendo a zeaxantina epoxidasa, cuyo gen (ZEP) se clonó por primera vez en *Nicotiana plumbaginifolia* y codifica para una proteína con secuencia similar a las FAD-monooxigenasas dependientes de ferredoxina (Nambara y Marion-Poll, 2005). La formación de los isómeros en *cis*, de violaxantina y neoxantina constituye el siguiente paso de la vía biosintética y podría implicar dos enzimas, una neoxantinasintetasa (NSY) y una isomerasa. La escisión de las *cis*-xantofilas para generar el precursor de 15 átomos de carbono (C15), la xantoxina, se cataliza mediante una familia de 9-*cis*-epoxicarotenoidesdioxigenasas (NCED) (Bouvier y col., 1996), y constituye la etapa limitante en la biosíntesis de ABA (Chan, 2012; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). Una vez sintetizada, la xantoxina se transfiere del cloroplasto al citosol, compartimento celular en el que se convierte en aldehído abscísico, mediante la actividad de una

alcohol deshidrogenasa de cadena corta (SDR/ABA2 en *Arabidopsis*). La oxidación del aldehído abscísico en el ácido carboxílico, es la última etapa en la ruta de biosíntesis, y depende de la enzima aldehído oxidasa abscísica (AAO3). La proteína AAO3 contiene un cofactor de molibdeno (Mo) que se activa a través de una MoCo- sulfurasa. Hasta la fecha los genes que sintetizan estas dos últimas enzimas se han clasificado solo en *Arabidopsis* (Chen y col., 2002; González-Guzmán y col., 2002; Nambara y Marion-Poll, 2005).

#### **4.2. Catabolismo del ABA**

Los estudios con mutantes carentes de ABA han tenido un papel crucial en el establecimiento de las vías de su biosíntesis y catabolismo. Así, el nivel de ABA en tejidos específicos se estima tanto por la tasa de biosíntesis como por la actividad de la hormona sobre su catabolismo. Sin embargo la información relativa a la autorregulación por ABA de la ruta biosintética es muy limitada. Se ha descrito que la expresión del gen NCED, que regula la etapa limitante de su biosíntesis, no se encontraba afectada por ABA exógeno en plantas de tomate y caupí, lo que ha llevado a concluir que el ABA no puede estimular su producción aunque tiene el potencial de su degradación (Iuchi y col., 2000; Thompson y col., 2000).

Con respecto al catabolismo, el ABA se metaboliza en un producto inactivo y este proceso ocurre entre otras condiciones, cuando la señal de estrés disminuye. El catabolismo se lleva a cabo por dos vías diferentes conocidas como las vías de hidroxilación y conjugación (Nambara y Marion-Poll, 2005).

En la hidroxilación, la molécula de ABA se hidroxila a través de la oxidación de tres grupos metilo (C-7', C-8' y C-9') de la estructura del anillo. Entre estos, la hidroxilación del C-8' se describe como la ruta catalítica dominante (Okamoto y col., 2011; Nambara y Marion-Poll, 2005). Se conoce que ABA regula negativamente su acumulación a través de la activación de sus enzimas catabólicas (Cutler y col., 2010), entre las que se encuentran la actividad enzimática de tipo citocromo P 450 (subfamilia CYP707A) concretamente la actividad ABA 8'-hidroxilasa, crucial para el metabolismo de la

hormona, que intervienen en la degradación catabólica regulada por la acumulación por tratamiento de ABA exógeno y por deshidratación. En *Arabidopsis* se encuentran presentes 4 miembros de la subfamilia CYP707A cuyos transcritos se inducen por ambas condiciones. La enzima CYP707A (Kushiro y col., 2004; Saito y col., 2004) cataliza la oxidación para formar 8'-hydroxi ABA un intermediario inestable que posteriormente se isomeriza espontáneamente a ácido faséico (PA), el cual puede reducirse a ácido dehidrofaséico (DPA) por una reductasa aún no identificada. Se ha comprobado que la expresión del gen CYP707A1 controla el metabolismo de ABA en los estomas y los tejidos vasculares de las hojas rehidratadas (Nambara y Marion-Poll, 2005; Okamoto y col., 2011). Por otro lado, CYP707A1 cataboliza el pool de ABA local en las células guarda en respuesta a condiciones de humedad elevada.

La segunda vía para inactivar ABA es la conjugación. Este proceso tiene un papel significativo en la regulación de los contenidos de ABA en condiciones normales y durante el proceso de deshidratación (Xu y col., 2012). Tanto ABA como sus catabolitos hidroxilados pueden conjugarse con glucosa. La síntesis del éster glucosilado (ABA-GE) tiene lugar en el citosol por la actividad glucosiltransferasa. Esta forma glucosilada es una de las formas predominantes de ABA-conjugado, se almacena en vacuolas y podría considerarse como una forma de almacenaje de ABA para su posterior liberación (Boursiac y col., 2013). Bajo condiciones de estrés abiótico, el ABA glucosilado podría convertirse en ABA mediante hidrólisis, catalizada por la enzima B glucosidasa descrita por vez primera en cebada y posteriormente en *Arabidopsis*, en la que se identificaron dos enzimas homologas BG1 y BG2 (homologo 1 y 2 beta-glucosidasa) (Xu y col., 2012; Dietz y col., 2016), localizadas en el retículo endoplásmico y en la vacuola, respectivamente. Estudios con el mutante con pérdida de función de *Atbg1* y *Atbg2* llevan a considerar que el ABA liberado de ABA-GE puede no ser necesario para respuestas estomáticas rápidas, ya que el mutante *bg1bg2*, tiene respuestas estomáticas similares a las del genotipo silvestre, bajo condiciones de humedad reducida, CO<sub>2</sub> elevado y tratamientos con ABA (Merilo y col., 2015).

### **4.3. Papel del ABA en la señalización durante el estrés**

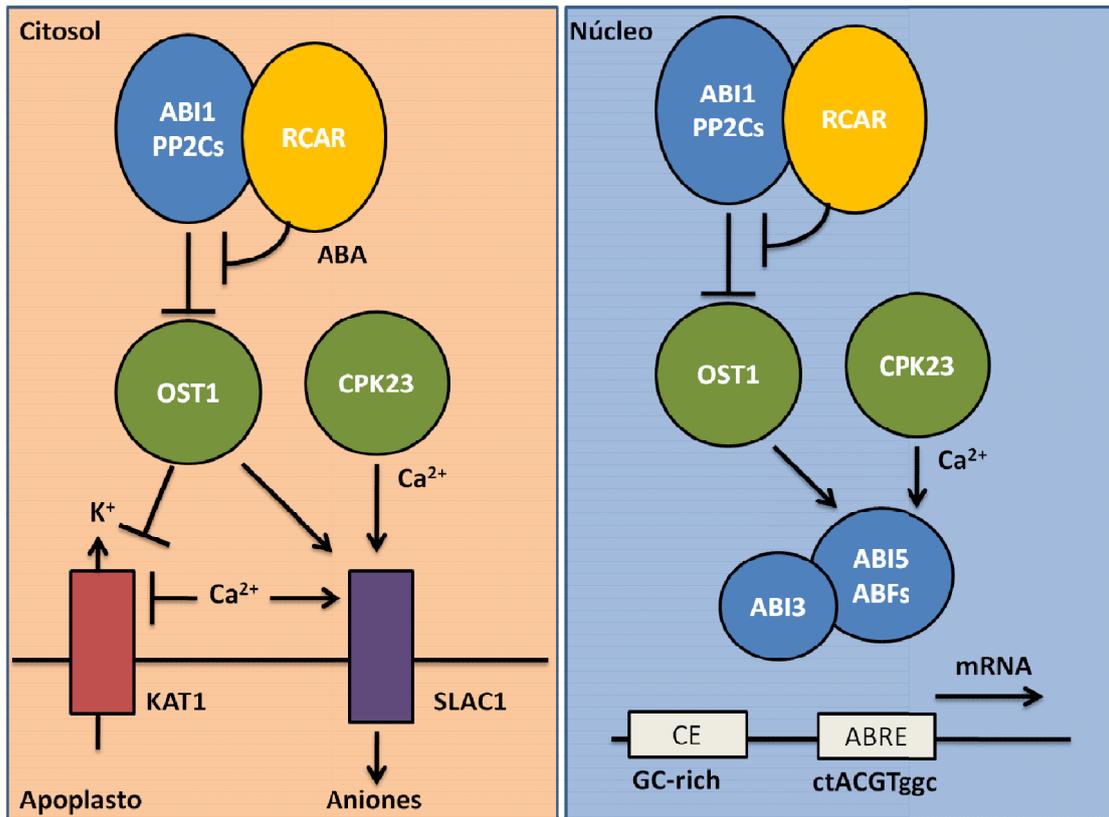
El ácido abscísico (ABA), además de regular la maduración y latencia de las semillas, división y elongación celular, el cierre de estomas, y la inducción floral entre otros procesos de desarrollo, juega un papel crítico en la respuesta a condiciones ambientales de estrés como sequía y salinidad, bajo las que se acumula en las células. En estas situaciones el ABA actúa a través de la modificación de la expresión de genes y de su interacción con otras moléculas implicadas en las vías de señalización responsables de la respuesta de la planta a la situación determinada de estrés y/o en el proceso de desarrollo implicado (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Sah y col., 2016).

Se han descrito un elevado número de factores de transcripción participando en la regulación de la expresión de los genes de respuesta a ABA, si bien en la respuesta a estrés abiótico también participan de forma importante vías de señalización independientes de la hormona como se indicó anteriormente.

En este contexto, el ABA sintetizado o transportado interviene en diversas rutas de transducción, por lo que es percibido por un sistema de sensores y transductores que finalmente producen una respuesta dirigida a tolerar el estrés o sobre un determinado proceso.

Los componentes del complejo receptor–transductor de ABA (Figura 18), forman parte de una familia de proteínas llamadas *AbelV* y caracterizadas por presentar un dominio conservado de unión a ABA de tipo START que consiste en los componentes agrupados en tres tipos fundamentales: PYR (PYRABACTIN RESISTANCE 1) / PYL (PYR1-LIKE) / RCAR (Regulatory Component of ABA receptor). Los transductores de la respuesta inducida por ABA son unas proteínas fosfatasas PP2C (proteína fosfatasa específica tipo 2C) y una familia de quinasas del tipo SnRK2 (quinasa 2 similar a las proteínas no fermentadoras de glucosa) (Cutler y col., 2010; Raghavendra y col., 2010; Umezawa y col., 2010; Weiner y col., 2010). Un conjunto de estudios ha permitido aclarar los cambios estructurales que se producen durante la percepción de ABA y en la cascada de señalización (Cutler y col., 2010; Raghavendra y col., 2010; Umezawa y col., 2010; Weiner y col., 2010; Miyakawa y col., 2013). En ausencia de ABA, las fosfatasas PP2C libres, reprimen la vía de señalización de ABA ya que actúan como reguladores negativos

constitutivos de la familia de quinasas SnRK2 cuya autofosforilación es necesaria para su actividad quinasas, inactivándose por una desfosforilación crítica de un residuo de serina, por la acción de las PP2C. En presencia de ABA, su unión a las PYL/ PYR/RCAR produce un cambio conformacional que las capacita para que reconozcan, se unan y repriman a las PP2Cs, liberando SnRK2s de la regulación negativa dependiente de PP2C. Las quinasas SnRK autoactivadas fosforilan a las proteínas diana aguas abajo, entre las que se incluyen los factores de transcripción AREB/ABF (proteína de unión al elemento cis sensible a ABA /factor de unión al elemento cis sensible a ABA). Los factores de transcripción AREB/ABF tienen un dominio bZIP y cuatro dominios conservados que contienen sitios de fosforilación de SnRK2. Los AREB/ABF fosforilados se activan y se unen al elemento cis sensible al ABA (ABRE; PyACGTGG/TC), que está enriquecido en regiones promotoras de genes inducibles por sequía. AREB/ABFs funcionan como activadores transcripcionales maestros que regulan la expresión de genes dependientes de ABRE en la señalización por ABA en condiciones de estrés abiótico, o durante el desarrollo, permitiendo en última instancia respuestas como el cierre estomático ante la deshidratación, el mantenimiento de la dormancia en semilla seca o el retraso de la germinación en condiciones de salinidad (Todaka y col., 2015).



**Figura 18. La señalización de ABA.** El receptor de ABA está formado por el complejo heteromérico de una PP2C como ABI1 y una proteína de unión a ABA, RCAR. El complejo receptor controla la señalización de ABA tanto en el citosol como en el núcleo. La actividad fosfatasa de las PP2C inhibe la acción de la quinasa citosólica, OST1, y la nuclear, SnRKs y posiblemente de las CPKs quinasas dependientes de Ca<sup>2+</sup> como la CPK23. En presencia de ABA, la actividad fosfatasa del receptor está bloqueada. Como consecuencia, las quinasas se liberan de la inhibición y quedan activas para regular a las dianas clave de la ruta de señalización de ABA. En las células guarda, las proteínas dianas son los canales iónicos SLAC1 y KAT1, los cuales son activados e inhibidos, respectivamente, por la acción de OST1. En el núcleo, las dianas son ABI5 y ABFs, factores de transcripción tipo cremallera de leucina básica. Modificado de Raghavendra y col., (2010).

#### 4.4. Señalización independiente de ABA.

En la respuesta a situaciones de estrés abiótico la señalización independiente de ABA juega también un papel importante. En este contexto uno de los ejemplos lo constituyen en Arabidopsis las proteínas DREB2, miembros de la familia de los factores de transcripción AP2/ERF, que se encuentran involucrados en la activación

transcripcional durante la señalización independiente de ABA. Concretamente de los ocho genes de esta familia DREB2 presentes en Arabidopsis, DREB2A y DREB2B se inducen en plantas en respuesta a sequía, elevada salinidad y estrés por elevada temperatura y juegan un papel central en la expresión de genes independientes de ABA en estas condiciones. Se ha demostrado que algunos otros factores de transcripción, como MYB/MYC y WRKY y algunos de la familia NAC, también intervienen en la señalización independiente de ABA, participando en la regulación de la respuesta al estrés por sequía (Liu y col., 2018).

Estudios recientes han revelado que las relaciones entre las vías de señalización dependientes de ABA y las independientes de ABA son mucho más complejas que lo considerado anteriormente, planteándose la posibilidad de interferencias entre ambas (Yoshida y col., 2014). Se ha sugerido que como componentes centrales en la señalización de ABA, las tres proteínas quinasas 2 relacionadas con SNF1 de la subclase III (SnRK2) probablemente participen en la convergencia de vías dependientes de ABA e independientes de ABA, regulando la expresión de AREB/ABF y DREB bajo estrés por sequía (Fujita y col., 2013).

## 5. Estrés salino

La salinización del suelo afecta a casi todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que concentraciones salinas elevadas causan serias alteraciones a nivel fisiológico, bioquímico y genético, lo que conduce a enormes pérdidas de producción agrícola en todo el mundo (Hasegawa y col., 2000; Zhu, 2002;2016). La salinidad elevada no solo conduce a la pérdida continua de tierras cultivables, sino que se traduce en una disminución importante (65-85%) en el rendimiento de los cultivos, afectando prácticamente a un tercio de las tierras agrícolas globales, especialmente en áreas irrigadas. Todo ello lleva a pérdidas de unos 10 millones de hectáreas de tierras agrícolas por año (Munns y Tester, 2008; Deinlein y col., 2014) debido a un incremento paulatino en la concentración de iones salinos, sodio ( $\text{Na}^+$ ) y cloro ( $\text{Cl}^-$ ) en la fracción soluble del suelo, que afecta a la capacidad de las plantas para la toma de agua y nutrientes. Por lo tanto, es un objetivo prioritario y vital entender cómo las plantas perciben y responden

al estrés por sal, con el fin de evitar la escasez de alimentos a gran escala y asegurar su suministro en las próximas décadas.

Las plantas, por otro lado, han adquirido distintos mecanismos adaptativos para controlar el impacto negativo de la salinidad y se han clasificado en base a su respuesta a la salinidad en tres grandes grupos: halófitas, halófitas-glicófitas y glicófitas. Las primeras son capaces de habitar en terrenos con elevadas concentraciones salinas en el suelo (200-500 mM de NaCl). Gracias a la presencia de mecanismos adaptativos muy bien integrados en su metabolismo, y son capaces de completar su ciclo de vida en estas condiciones. El grupo de las halófitas-glicófitas, lo forman plantas halófitas menos tolerantes que las descritas anteriormente (100-200 mM de NaCl) y glicófitas tolerantes, capaces de desarrollar su ciclo de vida en suelos con concentraciones salinas cercanas a 100 mM de NaCl, mientras que las clasificadas como glicófitas presentan una menor adaptación a la salinidad y su crecimiento está muy limitado en estas condiciones de estrés (Tuteja, 2007). La mayoría de las especies de plantas cultivadas para cosecha son glicófitas, por lo que deben desarrollar diferentes mecanismos fisiológicos y bioquímicos a fin de sobrevivir y tolerar distintas concentraciones salinas en el suelo (Rozemay Flowers, 2008).

Las plantas presentan dos tipos o fases de respuesta a la salinidad, una respuesta rápida que tiene lugar en el intervalo de unas horas y una respuesta a largo plazo que se manifiesta a lo largo de días y semanas (Maathuis y col., 2014). En la primera fase también llamada "fase osmótica" que se inicia inmediatamente después de que la concentración de iones salinos en el entorno radicular aumente hasta un nivel umbral, la alta concentración de sales altera el potencial osmótico del suelo afectando a la capacidad de las raíces para absorber agua. Esta disminución en la absorción de agua produce un estrés osmótico en la planta que desencadena alteraciones fisiológicas como deficiencia nutricional, desorganización de membranas, disminución de la actividad respiratoria y fotosintética, apertura estomática, cambios en los niveles de ROS y RNS y sistemas antioxidantes. Todo ello, conlleva la producción de un estrés oxidativo y nitrosativo, así como una disminución en la división celular (Gupta y Huang, 2014; Bose y col., 2015; Sevilla y col., 2015).

Tras un tiempo de exposición al estrés salino se produce un efecto denominado “efecto iónico” que genera la acumulación de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en los tejidos vegetales que desencadena por tanto un desequilibrio iónico y la consecuente toxicidad. Los daños celulares en esta fase se deben a la acumulación de sal, alcanzando niveles por encima de la capacidad celular para secuestrar sales en la vacuola (Munns y Tester, 2008; Gupta y Huang, 2014). Ante este efecto las plantas han desarrollado algunas respuestas adaptativas para eliminar el excedente salino como son: 1) homeostasis y compartimentalización iónica, 2) transporte y exclusión iónica, 3) biosíntesis de osmoprotectores y solutos compatibles, 4) activación y síntesis de sistemas redox y antioxidantes, 5) síntesis de poliaminas, 6) generación de ROS y óxido nítrico (NO) y 7) modulación hormonal (Gómez y col., 2004; Miller y col., 2010; Kosová y col., 2013; Lázaro y col., 2013; Gilroy y col., 2014; Zhu, 2016).

Un análisis completo de la información existente en los últimos años para explorar la compleja red de mecanismos envueltos en la respuestas adaptativas lleva a concluir que la mayoría de las proteínas identificadas mediante técnicas de proteómica y transcriptómica, se corresponden a aquellas involucradas en el metabolismo de aminoácidos, regulación energética, detoxificación y regulación redox. En esta Tesis Doctoral nos centraremos en éstas últimas, concretamente en la tiorredoxina y algunas de sus dianas, así como en los sistemas de defensa antioxidantes.

Destacar que la implicación de TRX en la respuesta a condiciones de estrés abiótico incluyendo el estrés salino y su correlación con la tolerancia de las plantas en esta situación si bien está descrita, no está del todo dilucidada ya que la información existente es bastante limitada y en ocasiones contradictoria (Barranco-Medina y col., 2007; Tripathi y col., 2009), si bien se sugirió que las TRXs podrían actuar como sensores redox y como componentes de vías de transducción de señales (Dos Santos y col., 2007; Sevilla y col., 2015).

La descripción del análisis transcriptómico en variedades de álamo sensibles y tolerantes a salinidad revela que las TRXs cloroplastídicas y citoplasmáticas presentan distintos patrones en respuesta a sal en las hojas. La mayoría de genes no presentan cambios en su expresión mientras que otros aumentan o disminuyen su expresión bajo

las condiciones salinas (Ding y col., 2010). Otros autores describen que cepas de levadura carentes de TRX citosólica que se complementaron con *PsTRXf* y *m1* vegetales, presentaban capacidad para crecer en medios salinos en concentraciones muy elevadas de NaCl (650 mM). En plántulas de guisante, una situación de estrés salino produjo un aumento específico dependiente de cada tejido, en transcritos de las *TRXm, f* y FNR (Fernández-Trijueque y col., 2012). Por otro lado, en nuestro laboratorio hemos descrito la implicación de la TRXo1 de guisante en la respuesta a salinidad. Esta PsTRXo1 presenta un incremento de expresión a tiempos cortos de estrés y un aumento de su actividad en tratamientos prolongados de NaCl (Martí y col., 2011), por lo que se le atribuyó un papel como componente del sistema de defensa inducido por NaCl en mitocondrias de guisante, protegiendo a este orgánulo del estrés oxidativo inducido por la salinidad junto con Mn-SOD, AOX y PRXIIIF. Esta potencial función descrita para TRXo1 se analiza más detalladamente en esta Tesis Doctoral.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material vegetal

El material vegetal utilizado en el desarrollo del trabajo de esta Tesis doctoral ha sido: plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*), guisante (*Pisum sativum* L. cv. Lincoln), *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (col-0) y epidermis de cebolla (*Allium cepa* L. cv. *cepa*).

#### 1.1. *Nicotiana benthamiana* L.

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* fueron cultivadas por el servicio de invernadero del IBMCP (CSIC-UPV).

Para el cultivo de las plantas de tabaco las semillas se estratificaron durante 3-4 días a 4º C. Posteriormente se sembraron en un sustrato compuesto por turba, vermiculita y perlita en proporciones 2:1:1. Las plantas crecieron bajo condiciones controladas en cámara de crecimiento en fotoperiodo de ciclo largo (16 h luz: 8 h oscuridad), intensidad lumínica de  $250 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$  (PAR), temperatura de 22 ºC día-19 ºC noche y humedad relativa entre 50-60%.

#### 1.2. *Pisum sativum* L.

Las plantas de *Pisum sativum* fueron cultivadas en las cámaras de cultivo del CEBAS-CSIC destinadas al cultivo en fotoperiodo largo. La cámara de cultivo tenía una temperatura diurna de 23ºC y nocturna de 18ºC, un fotoperiodo de ciclo largo (16 h luz: 8 h oscuridad), una iluminación de  $130 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$  (PAR) aportada por lámparas fluorescentes de 36W Sylvania GroLux® y una humedad relativa de 65% constante.

Las semillas de guisante fueron esterilizadas superficialmente embebiéndolas durante 3 minutos en una solución de lejía comercial al 10% (v/v) diluida en agua. Posteriormente, las semillas fueron lavadas con agua destilada estéril y se dejaron

germinando durante tres días en cámara de cultivo bajo oscuridad y sobre vermiculita previamente humedecida y tratada con fungicida Redomix™. Una vez germinadas, las semillas se mantuvieron durante 12 días más en las condiciones descritas para fotoperiodo largo en la sección de materiales y métodos 1.3.2. Durante la primera semana, las plantas se regaron con agua destilada y una vez transcurrido dicho tiempo, con solución nutritiva completa Hoagland (en meq/l:  $\text{NO}_3^-$  22,5;  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  1,29;  $\text{SO}_4^{2-}$  3,13;  $\text{K}^+$  4,62;  $\text{Ca}^{2+}$  6,0;  $\text{Mg}^{2+}$  3,29; y en ppm, Fe 5,0; Mn 0,5; Cu 0,05; Zn 0,05; B 0,5; Mo 0,005), con un pH de 5,5.

### 1.3. *Arabidopsis thaliana* L.

#### 1.3.1. Cepas usadas

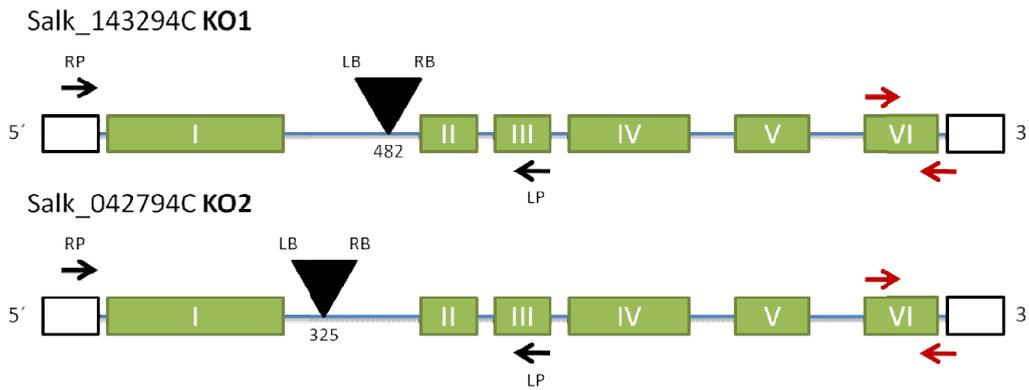
En este trabajo además de las semillas de plantas silvestres (WT), se han utilizado dos mutantes KO por inserción de T-ADN del gen At2g35010 (*AtTRXo1*) identificadas con los códigos SALK\_143294C (tabla 1), línea 590 (llamada en esta Tesis KO1) y SALK\_042792 línea 374 (llamada KO2) que fueron obtenidos del European Stock Centre de Arabidopsis (NASC; <http://arabidopsis.info/>; Nottingham University, Reino Unido).

**Tabla 1. Líneas de *A. thaliana* utilizadas en esta Tesis.**

Nombre	Mutante	Inserción	Gen <sup>a</sup>	Línea SALK	Línea NASC
<b>AtWT Col-0</b>	Cepa salvaje				
<b>KO1 <i>Attrxo1</i></b>	Tiorredoxina o1	T-ADN	AT2G35010	SALK_143294	N659590
<b>KO2 <i>Attrxo1</i></b>	Tiorredoxina o1	T-ADN	AT2G35010	SALK_042792c	N659374
<b>OEX <i>Attrxo1</i></b>	Tiorredoxina o1		AT2G3501		

<sup>a</sup> Número de acceso del gen en la web TAIR (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>)

El mapa genético de ambos mutantes se presenta en la Figura19 Las plantas homocigotas se seleccionaron como se describe en Ortiz-Espín y col. (2017) donde se mostró la falta total de expresión de *AtTRXo1* en el KO1 y una expresión residual en plantas KO2.



**Figura 19. Mapa genético de los mutantes de tiorredoxina o1 de *A. thaliana*.** Las cajas verdes representan los exones, las cajas blancas en los extremos corresponden a las UTR, las flechas negras representan los oligos específicos del gen que junto con los oligos LB y RB propios del T-DNA permitieron identificar la presencia de la inserción de T-DNA y la consecuente interrupción del gen.

Por otra parte se utilizaron semillas de un genotipo sobre-expresante *Attrxo1* generado en nuestro laboratorio que sería genotipado y caracterizado en el desarrollo de esta Tesis.

### 1.3.2. Condiciones de cultivo

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* fueron cultivadas en las cámaras de crecimiento controlado del CEBAS-CSIC. Para los estudios de mitocondrias se establecieron condiciones de fotoperiodo largo (16 h luz: 8 h oscuridad) con una temperatura diurna de 23°C y nocturna de 18°C, una iluminación de  $130 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$  (PAR) aportada por lámparas fluorescentes de 36W Sylvania GroLux® y una humedad relativa de 65% constante. Para los estudios de fotosíntesis las plantas se cultivaron en cámaras de fotoperiodo corto (8 h luz: 16 h oscuridad) con una temperatura de 23°C durante el día y 18 °C durante la noche con una intensidad lumínica de  $300 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$  (PAR), 65% de humedad relativa constante.

Para los estudios en mitocondrias aisladas, se realizó el cultivo *in vitro* de *A. thaliana* en placa debido al menor desarrollo de los tricomas en estas condiciones que permiten

un mejor aislamiento de los orgánulos. Se cultivaron plantas (alrededor de 120 semillas por placa) según lo descrito por Wallström y col. (2014) con algunas modificaciones. Las semillas se esterilizaron en superficie embebiéndolas en 70% etanol/agua (v/v) durante 10 minutos en agitación por inversión y posteriormente se embebieron en 20% de lejía comercial/agua (v/v) para finalmente lavarlas con agua milliQ estéril hasta 5 veces. Todo el proceso se llevó a cabo en campana de flujo laminar. Tras la esterilización se almacenaron a 4°C durante un mínimo de 48 horas en oscuridad para romper la dormancia y sincronizar la germinación. Finalmente se sembraron en placas preparadas con 2,5 g/l de medio "MS including vitamins" (Murashige y Skoog, 1962), 18 g/l de sacarosa, se ajustó el pH 5.7 con KOH y se añadieron 8 g/l de plant agar, en ausencia y presencia de 100 mM NaCl. El medio fue autoclavado a 121 °C durante 20 min para su esterilización antes de ser dispensado en las placas. Una vez sembradas se mantuvieron durante 21 días bajo las condiciones controladas de la cámara de cultivo de fotoperiodo de día largo.

Para los estudios de fotosíntesis se utilizaron condiciones de cultivo de día corto que permitiera un mayor desarrollo foliar para la óptima medida con el aparato LI-COR y alta luminosidad necesaria para la medida de la conductancia de mesófilo. Así, se realizaron cultivos en una mezcla de turba, perlita y vermiculita (2: 1: 1 v / v) estéril contenida en alveolos de cultivo (5x5x5 cm = 125 ml). Estos alveolos se dispusieron sobre bandejas (48 plantas/bandeja) que se mantenían con una capa de agua de 1 cm de grosor permitiendo su absorción. Una vez la tierra quedó hidratada se sembraron en su superficie las semillas que previamente habían sido embebidas en agua milliQ y almacenadas a 4°C durante 48 horas en oscuridad para romper la dormancia y sincronizar la germinación. Una vez germinadas se regó con agua durante la primera semana y a partir del séptimo día con solución nutritiva Hoagland cada 3 días durante 21 días. En el caso de las plantas sometidas a estrés salino, fueron regadas de la misma forma con agua hasta el séptimo día y a partir de entonces con una solución nutritiva Hoagland con 100 mM de NaCl con la misma frecuencia y duración que los cultivos control.

### 1.3.3. Manipulación de las semillas

Las semillas se recolectaron a partir de plantas genotipadas y cultivadas hasta el final de su ciclo (8-9 semanas desde su siembra) momento en el que se detuvo el riego y la inflorescencia se cubrió con un paquete hecho de papel de filtro. Cuando las plantas estuvieron secas se recogieron los paquetes con la infrutescencia en su interior, las silicuas ya secas liberaron las semillas en el interior del paquete que fue etiquetado y separado de los restos del cultivo. El contenido del paquete se pasó por un tamiz que permitió separar los restos de hojas secas, silicuas, pétalos etc. De las semillas.

Posteriormente fueron almacenadas en una cámara de cultivo a una temperatura constante de 22°C, un 30% humedad relativa y en oscuridad durante un mes permitiendo que rompiesen naturalmente la dormición primaria, proceso denominado *after-ripening*.

Para el cultivo en placa, las semillas se esterilizaron superficialmente embebiéndola en 70% etanol (v/v) y agitándolas por inversión durante 4 minutos. Posteriormente se retiró el etanol y se embebieron las semillas en 20% lejía comercial durante 4 minutos en agitación por inversión. Finalmente se lavaron con agua destilada estéril 5 veces en campana de flujo laminar. Y quedaron embebidas en agua para ser almacenadas a 4°C durante 72 horas con el objetivo de estratificarlas asegurando la ruptura de la dormancia y sincronizando la germinación de todas las semillas una vez fueran sembradas en placas.

Para el cultivo en tierra, no fue necesaria la esterilización y únicamente se expusieron las semillas al proceso de estratificación.

Para los estudios de germinación en placa sobre papel de filtro se esterilizaron pero no estratificaron para no influir en el proceso de germinación.

### **1.3.4. Caracterización fisiológica**

#### **1.3.4.1. Parámetros de desarrollo**

Todas las medidas se realizaron en plantas *A. thaliana in vivo* e *in situ* durante distintos momentos del desarrollo de la planta en condiciones control y de estrés salino.

En el estudio de fotosíntesis, las variables fisiológicas medidas fueron el número total de hojas verdaderas, el diámetro máximo de la roseta, el peso fresco de la parte aérea y el área foliar total de la planta.

Para el estudio en mitocondrias, el crecimiento de las líneas WT y KO en ausencia y presencia de la sal, se evaluó midiendo el peso fresco de la parte aérea, el diámetro de la roseta, el número de hojas y la longitud de la raíz en plantas de 21 días. Para el peso fresco, se pesaron grupos de 10 plantas realizando un mínimo de 5 réplicas por genotipo y tratamiento y el peso total del grupo se dividió entre el número de plantas pesadas. Para el resto de parámetros se realizaron fotografías de las placas y posteriormente se analizaron utilizando la herramienta informática ImageJ.

#### **1.3.4.2. Ensayo de deshidratación**

Con el fin de analizar las diferencias entre genotipos cultivados en placa en condiciones control, referidas a sus posibles capacidades diferentes, dependiendo de dinámicas de cierre estomático, resistencia periféricas de las cutículas, paredes celulares, ceras, etc., se realizaron ensayos de deshidratación modificando ligeramente el método detallado por Ding y col. (2012).

Utilizando como material vegetal plantas cultivadas *in vitro* como se indica en la sección de materiales y métodos 1.3.2., tras 21 días de crecimiento se recogieron de la placa grupos de 5 plantas que se pesaron inmediatamente para analizar su peso inicial y sucesivamente cada 5 minutos hasta los 40 minutos. A partir de esto, se tomó otra medida del peso a los 60, 90 y 135 minutos. Los ensayos de deshidratación se realizaron en las condiciones de laboratorio con una humedad relativa del 55% y cada medida se replicó hasta 4 veces en grupos de cinco plantas para cada tratamiento y genotipo. Los

resultados se expresaron como una medida de pérdida de peso fresco (%) equivalente a la pérdida de agua.

#### **1.3.4.3. Ensayos de germinación en presencia de sal**

Los ensayos de germinación se realizaron en placas Petri de 90 mm de diámetro, depositando sobre dos papeles de filtro tipo Whatman™ de 70 mm de diámetro estériles y humedecidos en 2 ml de solución control o salina (0 o 100 mM NaCl respectivamente), unas 100 semillas de los distintos genotipos previamente esterilizadas como se describe en la sección de materiales y métodos 1.3.3. Las semillas sin estratificar y embebidas en agua se mantuvieron en estas placas en las condiciones descritas en la sección de materiales y métodos 1.3.2. para cultivo in vitro.

Por observación a la lupa se registraron los porcentajes de germinación respecto al total de semillas a distintos tiempos: 0, 12, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 72 y 86 horas. Se consideraron germinadas aquellas semillas que presentaron una obvia emergencia radicular. Los datos presentados son promedio de 6 experimentos independientes con 50 semillas de cada genotipo y tratamiento en cada caso.

## **2. Bacterias**

### **2.1. *Escherichia coli***

#### **2.1.1. Cepas empleadas**

En este trabajo se han utilizado diferentes cepas bacterianas *E. coli* para las distintas clonaciones realizadas.

- **JM109** (Genotipo: *endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk-, mk+), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, laqIqZΔM15]*) utilizada como subclonaje, facilita la transformación con pGEM;
- **DH5α** (Genotipo: *F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1*) para clonaciones generales;

- **BL21 (DE3) (Novagen) (Genotipo: F<sup>-</sup> ompT hsdSB(rB<sup>-</sup>, mB<sup>-</sup>) gal dcm (DE3))** para producción de proteínas recombinantes clonadas previamente en vectores pET e inducibles por IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido).

Las cepas se mantuvieron en el laboratorio refrescando su cultivo a partir de stocks congelados en glicerol (-80°C) e induciendo su competencia justo antes de los clonajes. También se almacenaron congeladas en glicerol aquellas cepas transformadas con los distintos plásmidos y clonaciones pudiendo reactivar su cultivo posteriormente (ver sección de materiales y métodos 3.9.).

### 2.1.2. Condiciones de cultivo

Las bacterias *E. coli* se incubaron en medio Luria-Bertani (LB) estéril en condiciones óptimas para su crecimiento a 37°C y en oscuridad, y en el caso de medios líquidos también se aplicó agitación orbital de 130 rpm. Los clones fueron seleccionados con el antibiótico indicado según la cepa o la resistencia incorporada por transformación (tabla 2).

**Tabla 2. Antibióticos utilizados para la selección de clones en *E. coli*.**

Antibiótico	Nomenclatura	Concentración de aplicación (µg/ml)	Plásmido/Cepa con resistencia
Kanamicina	Km	50	pDONR201
Ampicilina/Carbencilina	Amp/Cb	75	pET3d;pET15b
Espectinomicina	Spto	75	pXC, pXN, pCX, pNX
Gentamicina	Gm	40	pMP90
Rifampicina	Rif	50	Agro C58CI GV3101

### 2.1.3. Preparación de células termocompetentes

Para la obtención de células termocompetentes *E. coli* DH5 se partió de un stock glicerolado del cual se aisló una única colonia por triple estría en placa con 3 ml de LB-

Agar estéril que se incubó durante 24 h a 37 °C en agitación (200 rpm). Se utilizó 1 ml de este precultivo saturado para inocular 250 ml de medio LB estéril en un matraz Erlenmeyer de 1 litro y se incubó a 18 °C en agitación (200 rpm) toda la noche. Cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial temprana de crecimiento correspondiente a una  $DO_{600nm} = 0,45$ , se enfrió en hielo durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 2500 xg durante 10 minutos a 4°C. El sedimento bacteriano se resuspendió en 80 ml de solución Inoue (10 mM PIPES (piperazina-1,2-bis [ácido 2-ethanosulfónico]; 10,9 g/l  $MnCl_2$ ; 2,2 g/l  $CaCl_2$  y 18,7 g/l KCl) previamente enfriada a 4°C. Se centrifugó la suspensión a 2.500 xg durante 10 minutos a 4°C, y el sedimento se resuspendió en 20 ml de solución Inoue enfriada a 4°C. A esos 20 ml se añadieron 750 µl de DMSO a temperatura ambiente y se incubaron durante 2 minutos. Posteriormente se añadieron otros 750 µl de DMSO y se hicieron alícuotas de 200 µl en tubos eppendorfs (1,5 ml) para congelarlas en nitrógeno líquido y almacenarlas a -80 °C. En cada tanda se evaluaron la eficiencia de transformación de las competentes creadas y la ausencia de contaminaciones, validándolas para su uso posterior en transformaciones.

Las bacterias *E. coli* JM109 competentes fueron adquiridas comercialmente y no fue necesario inducir su competencia. Además, no se usaron bacterias *E. coli* BL21 competentes pues no se hicieron transformaciones en esta cepa.

#### **2.1.4. Transformación por choque térmico.**

La transformación mediante choque térmico de células competentes *E. coli* DH5α y JM109 se llevó a cabo según se describe en el manual de clonación de Sambrook y col. (1989). En primer lugar, se descongelaron en hielo las alícuotas de células competentes (100-200 µl) manteniéndolas 20 minutos antes de añadir entre 0,1-1 µg de ADN del plásmido o el producto de ligación de interés diluido previamente en un volumen de 50 µl. La mezcla se incubó durante 30 min en hielo. Entonces las bacterias se sometieron a choque térmico exponiéndolas a 42 °C durante 30 segundos antes de devolverlas rápidamente al hielo. Tras 5 minutos en hielo se añadieron con cuidado unos 0,5 ml de medio LB suplementado con 2% (v/v) de 1 M glucosa y 1% (v/v) de 1 M  $MgCl_2$  todo estéril. Se incubaron durante 1 hora a 37 °C en agitación (250 rpm). Posteriormente, se

centrifugó a bajas rpm (2000-5000) durante 3-5 min y el sedimento bacteriano resuspendido en 100 µl de medio remanente, se sembró en una placa Petri con medio LB y los antibióticos adecuados según el tipo de plásmido utilizado (tabla 2). Si el vector empleado lo permitía se seleccionaron las células transformadas por  $\alpha$ -complementación, se añadieron al medio 0,8 mg por placa del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido (X-Gal) (Duchefa) y 0,8 mg por placa del inductor IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) (Sigma-Aldrich). Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C.

Las cepas *E. coli* BL21 usadas para este trabajo ya se encontraban transformadas por los plásmidos de interés en trabajos previos realizados en el laboratorio.

## **2.2. *Agrobacterium tumefaciens***

### **2.2.1. Cepas empleadas**

La estirpe usada para la transformación de las plantas de *N. benthamiana* fue la cepa GV3101 C58C1 (Rif<sup>R</sup>), conteniendo los factores de virulencia en el vector pMP90 (Gm<sup>R</sup>). Tanto la cepa como el vector fueron descritos por Koncz y Schell (1986).

### **2.2.2. Condiciones de cultivo**

Las células de *A. tumefaciens* no transformadas crecieron en medio líquido LB con los antibióticos Rif y Gm (tabla 2). Los medios empleados para las células transformadas estuvieron además suplementados con Spto. Las condiciones de cultivo fueron 220 rpm en agitador orbital durante 24-48 h y 28 °C en oscuridad. El crecimiento en placa se hizo en medio LB-agar conteniendo los antibióticos de resistencia especificados (tabla 2).

### **2.2.3. Preparación de electro-competentes**

Las competentes *A. tumefaciens* utilizadas en este trabajo fueron obtenidas en el laboratorio de la Dra. Isabel Díaz (ETSIA, Madrid). Para inducir su competencia se diluyó un cultivo de 10 ml saturado de bacterias en 500 ml de LB y se incubó a 28°C con una

agitación a 250 rpm hasta que la  $DO_{600nm}$  fue de 0,8-1. Las células fueron entonces recogidas mediante centrifugación a 6.000  $\times g$  durante 10 min y se lavaron en dos etapas sucesivas de centrifugaciones con los mismos parámetros con agua estéril disminuyendo a la mitad el volumen final de agua en la segunda centrifugación. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 1 ml de 10% glicerol y se fraccionó en alícuotas de 40  $\mu l$ , que se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a  $-80^{\circ}C$ .

#### **2.2.4. Transformación por electroporación.**

Para transformar *A. tumefaciens* se recurrió a la electroporación para ello se descongelaron las alícuotas de bacterias necesarias sacándolas de su almacén a  $-80^{\circ}C$  e incubándolas en hielo durante 20 minutos. Se añadieron entre 0,1-1  $\mu g$  de ADN y se incubó durante 30 minutos en hielo. Las mezclas de bacterias y ADN se dispusieron, sin generar burbujas, en cubetas de electroporación estériles y previamente enfriadas en hielo. Se llevó a cabo la electroporación utilizando las siguientes condiciones: capacitancia 50  $\mu F$ , voltaje 1,8 KV, resistencia 150  $\Omega$ , tiempo 5 ms. Una vez realizada la descarga eléctrica se añadieron a la cubeta de electroporación unos 500  $\mu l$  de medio LB suplementado con 2% (v/v) de 1 M glucosa y 1% (v/v) de 1 M  $MgCl_2$ , todo estéril, con este medio se repipeteó para recuperar las bacterias transformadas. Se incubaron las bacterias recuperadas durante 2-3 h a  $28^{\circ}C$  en agitación orbital a 220 rpm. Finalmente, se centrifugó a bajas rpm (2.000-5.000 rpm) durante 3-5 min y el sedimento bacteriano resuspendido en 100  $\mu l$  de medio remanente se sembró en una placa Petri conteniendo medio LB y los antibióticos adecuados según el tipo de plásmido utilizado (tabla 2).

### **3. Genética molecular**

#### **3.1. Diseño de oligonucleótidos**

El diseño de primers u oligonucleótidos para la amplificación de secuencias de ADN específicas ha permitido en esta Tesis la obtención de ORFs completas de genes de interés para posterior clonación en distintos plásmidos, la obtención y secuenciación del gen PsPYR1 no secuenciado hasta la fecha, el genotipado de los mutantes por inserción

de ADN-T, PCR de colonias, incorporación de colas adaptadoras a productos de PCR para su posterior incorporación a distintos vectores de clonación, etc. Los primers usados para este trabajo se encuentran especificados en el Anexo 1.

Para el diseño de primers se han seguido los siguientes requisitos de calidad generales: longitud 18-23 pb, 45-50% GC y Tm similares de entre 55-60 °C, no deben hibridar con otras secuencias de ADN pertenecientes a otros genes de la misma o de distinta especie y no deben hibridar entre sí. Para cumplir con estos requisitos se han utilizado varias herramientas informáticas, entre ellas, las siguientes:

- **T-DNA Primer Design:** <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html> permite el diseño de primers para genotipar líneas SALK.
- **Primer3PLUS:** <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/> genera varias parejas de primers para amplificar un fragmento de ADN, indicando su capacidad de hibridación y formación de estructuras secundarias, además permite hacer un BLAST desde la misma página.
- **Oligocalc:** <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html> permite identificar las características de unos primers previamente seleccionados, aparte de los valores de %GC y Tm, indica la presencia de estructuras secundarias y los valores de energía libre de Gibbs (valores <-5 pueden generar estructuras secundarias).
- **Inespecificidad con otras secuencias de ADN:** los primers diseñados se sometieron a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) según distintas bases de datos:
  - a. *Núcleotide* *Blast* *NCBI:*  
[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)
  - b. *Phytozome:*  
<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!search?show=BLAST>
  - c. *Tair:* <https://www.arabidopsis.org/Blast/>
- **Autohibridación:** los primers no deben formar ni homodímeros, ni heterodímeros, ni estructuras secundarias; esta herramienta analiza la tendencia de los primers a formar estas estructuras inespecíficas. **DiNAMelt web server:**  
<http://unafold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt>

En algunos casos los primers diseñados han incluido “colas” que no hibridaban con el fragmento a amplificar pero que añadían al amplicón las secuencias necesarias para la

clonación en un vector (dianas de restricción para clonación convencional en pGEM y colas attB1 y attB2 para clonación en vectores de sistema Gateway).

### **3.2. ADN**

#### **3.2.1. Extracción de ADN genómico**

La extracción de ADN genómico (ADNg) ha sido necesaria para realizar el genotipado de los mutantes *Attrxo1*. Se ha utilizado un protocolo simplificado que permite la rápida obtención de este ADN con la suficiente calidad como para ser amplificado por PCR. El ADNg fue extraído de plantas de *A. thaliana* siguiendo el método de Edwards y col. (1991) basado en la precipitación con isopropanol, partiendo de 100 mg de hojas congeladas en nitrógeno líquido en un eppendorf que fueron pulverizados con la ayuda de un politrón. Al material vegetal pulverizado se añadieron 400 µl de tampón de extracción autoclavado (200 mM Tris-HCl; pH 7,5; 25 mM EDTA; 250 mM NaCl; 0,5% SDS) y se mezcló con vórtex durante 5 segundos. Los extractos se centrifugaron a 13.000 rpm durante 1 minuto y se transfirieron 300 µl del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf. Se añadieron 300 µl de isopropanol y se dejó incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente para posteriormente añadir 100 µl de TE 1x donde el ADNg se disolvió incubándolo a 4°C durante una noche sin necesidad de resuspender el pellet. Para las PCR de genotipado bastó con añadir 2 µl de esta preparación a una reacción de 20 µl de PCR.

#### **3.2.2. Extracción de ADN plasmídico.**

Partiendo de cultivos bacterianos líquidos de 5-8 ml incubados en condiciones óptimas (ver en materiales y métodos las secciones 2.1.2. para *E.coli* y 2.2.2. para *A. tumefaciens*) durante 24 h en un medio LB con todos los antibióticos adecuados para la selección de clones en cada caso, se llevó a cabo la extracción de ADN plasmídico a pequeña escala mediante el uso del kit comercial: "Plasmid DNA Purification" (Machery-Nagel) En el caso de requerir grandes cantidades de plásmido bacteriano se llevaron a

cabo extracciones a gran escala partiendo de cultivos bacterianos de 250 ml usando el kit comercial PureYield™ Plasmid Maxiprep System (Promega). Ambos métodos están basados en un procedimiento de lisis alcalina y retención de ADN plasmídico en una columna formada por una matriz de sílice, donde es lavado con etanol y eluido con agua libre de nucleasas. Se siguieron las instrucciones recomendadas por los fabricantes.

### **3.2.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

Para el análisis, la identificación y purificación de fragmentos de ADN se llevaron a cabo electroforesis horizontales en geles de agarosa. Esta técnica permite separar fragmentos de ADN de una mezcla al migrar éstos de forma inversamente proporcional a su tamaño al ser sometidos a un campo eléctrico dado que a pH básico o próximo a la neutralidad la relación carga/masa de una molécula de ADN es constante. Esta técnica también permite identificar distintos grados de enrollamiento de moléculas circulares como los plásmidos, migrando una mayor distancia en el gel los fragmentos que tienen un menor enrollamiento.

La agarosa se pesó y fue disuelta en su cantidad precisa, según el tamaño del fragmento de ADN a separar (tabla 3), en un tampón TAE 1x (40 mM Tris-Acetato pH 8; 1 mM EDTA), y fue calentada en microondas hasta ebullición para ser posteriormente vertida en la cubeta horizontal. Una vez el gel solidificó se cargaron en cada pocillo las distintas muestras de ADN diluido en tampón de carga 5x (30% (v/v) glicerol; 0,3% (v/v) azul de bromofenol; 60 mM EDTA; pH 8; en agua milliQ autoclavada). Para la visualización del ADN en los geles en los que se requería una alta resolución se utilizó bromuro de etidio disuelto en el gel en un 0,3% como fluoróforo que se intercala en las moléculas de ADN y lo hace visible bajo luz UV. Sin embargo, en la mayoría de los casos se sustituyó este fluoróforo por Gel Red (Biotium™) disuelto en un tampón de carga adecuado (580 mM sacarosa; 1 mg/l Orange G (Thermo Scientific™); Gel Red 250x; en agua milliQ autoclavada).

**Tabla 3. Porcentajes de agarosa utilizados según el tamaño de la molécula de ácido nucleico a separar.**

Agarosa (%)	Fragmento (pb)	Tipo de molécula
0,8	1.000-15.000	Plásmidos completos, ADN genómico
1	200-1.000pb	Fragmentos intermedios, ARN
1,5	50-200pb	Fragmentos pequeños

En general, se emplearon las siguientes condiciones para la electroforesis: voltaje constante de entre 80-100 V y un tiempo de 30-45 minutos. Tras el desarrollo electroforético se observaron las bandas de ADN en un transiluminador (Syngene) con luz ultravioleta.

En este trabajo los marcadores de tamaño molecular empleados fueron:

- 1 Kb Plus DNA Ladder (0,1 - 12 kpb) de Invitrogen.
- 2-Log DNA Ladder (0.1–10.0 kpb) de New England Biolabs.
- DNA Molecular Weight Marker IV (0.07 - 19.3 kpb) de Sigma Aldrich.
- DNA Molecular Weight Marker VI (0.15 - 2.1kpb) de Sigma Aldrich.
- DNA Molecular Weight Marker VIII (19 - 1,114 pb) de Sigma Aldrich.
- GeneRuler DNA Ladder (0,1 kpb – 10 kpb) de Thermo Scientific.

#### **3.2.4. Extracción de ADN de geles de agarosa**

Para purificar fragmentos de ADN a partir de un gel de agarosa se usó el kit comercial: “NúcleoSpin® Gel and PCR Clean-up” de Macherey-Nagel que ofrece variaciones para mejorar el rendimiento de purificación según el tamaño del fragmento de ADN a purificar. En todo caso se siguieron las instrucciones recomendadas por la casa comercial.

#### **3.2.5. Cuantificación de ADN en solución**

Para medir la concentración de ADN y su pureza se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop ND-100 (Agilent Technologies) con el que se mide la absorbancia de UV a 260 nm, 280 nm y 230 nm. La concentración se calcula respecto al valor estándar  $DO_{260nm} = 1$  para soluciones de 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de ADN de cadena doble. La absorbancia a 280 nm indica contaminación con proteínas y compuestos aromáticos, mientras que a 230 nm indica

contaminación por sales, fenoles e hidratos de carbono (tabla 4). Por ese motivo se procuró cumplir con el estándar de calidad por el que la relación de Absorbancia a 260/280 y 260/230 de las muestras esté entre 1,8 y 2,0.

**Tabla 4. Estándares de calidad para ADN según los ratios  $DO_{260nm}/DO_{280nm}$  y  $DO_{260nm}/DO_{230nm}$ .**

Ratio	Intervalo	Pureza
<b>260/280</b>	1,8 - 2	Óptima
	1,6 - 1,8	Aceptable
	<1,6	Contaminación por proteínas y compuestos aromáticos.
	>2,1	Contaminación por ARN
<b>260/230</b>	< 1,5	Contaminación por sales, carbohidratos y fenoles

### 3.3. PCR

#### 3.3.1. PCR convencional

La reacción en cadena de la polimerasa, o PCR (Polymerase Chain Reaction), permite la replicación *in vitro* de secuencias específicas de ADN por acción de la enzima polimerasa, mediante ciclos de temperatura que duplican el número de moléculas de ADN. De esta forma, se puede partir de una sola molécula de ADN y obtener el final de la reacción hasta 100.000 millones de moléculas.

Esta reacción enzimática requiere de una serie de componentes como son una mezcla de cuatro dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) a una concentración final de 5  $\mu$ M, los oligonucleótidos sentido y anti-sentido de la secuencia a amplificar a una concentración final de 10 nM (stock 20  $\mu$ M), el tampón de reacción que contenía sales de amonio y magnesio según la enzima y la casa comercial, la ADN polimerasa a la concentración recomendada por el fabricante, ADN molde (5-10 ng de cADN o ADN plasmídico, o 50-100 ng de ADN genómico) y agua ultra pura estéril a un volumen final de 20-50  $\mu$ l. En todos los casos se incluyó siempre un control negativo (sin ADN) y cuando fue posible, uno positivo.

Las ADN polimerasas termoestables utilizadas, se seleccionaron según el objetivo final y fueron las siguientes:

- BIOTOOLS DNA POLYMERASE: usada para PCR semicuantitativa, PCR en colonia, genotipado y TA-cloning debido a su capacidad para incorporar dATPs a los extremos 3' del fragmento amplificado haciéndolos compatibles con vectores con extremos "T" como el caso de *pGEM-Teasy*. Tiene actividad exonucleasa 5' → 3' que permite la degradación de los primers o secuencias iniciadoras, pero no 3' → 5' (correctora de errores).
- Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher): para replicación e incorporación de colas a fragmentos clonados en pGEM para su posterior clonación en otros plásmidos.
- *Platinum Pfx* (Thermo Fisher): para amplificar fragmentos de DNA con alta fidelidad. Se proporciona una alta fidelidad. Con actividad exonucleasa 3' → 5' correctora de errores. La solución PCRx Enhancer permite una mayor especificidad de los cebadores, mayores márgenes de concentración de magnesio, parámetros de temperatura de annealing más amplios y mayor termoestabilidad la polimerasa, además mejora la amplificación de moldes de ADN ricos en GC.

Las condiciones de amplificación fueron las recomendadas por el fabricante variando en el tiempo de extensión, según el tamaño de los fragmentos a amplificar y la velocidad de la amplificación de cada enzima (1 min/1 kbp a 72°C), y la temperatura de anillamiento ( $T_a$ ) de la pareja de oligonucleótidos calculada según la herramienta informática de  $T_m$  calculator de thermofisher (<https://www.thermofisher.com/es/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>) y  $T_m$  calculator de Biotoools (<http://biotoools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). En algunos casos se calculó también empíricamente en función de la temperatura de desnaturalización o melting ( $T_m$ ), ( $T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$ ), que viene determinada por la longitud y la composición de los

oligonucleótidos. El termociclador utilizado fue el SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems).

### **3.3.2. PCR de colonia**

Tras un proceso de transformación con un plásmido concreto, las células competentes (*E. coli* o *A. tumefaciens*) se incuban en un medio de cultivo selectivo (con el antibiótico indicado, ver tabla 2) en condiciones óptimas (ver secciones de materiales y métodos 2.1.2. y 2.2.2.). Las múltiples colonias crecidas pueden haber incorporado el vector con el gen de interés previamente insertado y para comprobar dicha inserción se realizan PCRs con primers específicos del gen o del vector (ver Anexo 1). En este tipo de PCR se utiliza como molde el ADN liberado tras incorporar a la solución de reacción parte de las colonias bacterianas utilizando una punta de pipeta estéril. En ocasiones, para evitar posibles inhibiciones de la polimerasa por impurezas, la fracción de la colonia era disuelta en 100  $\mu$ l de agua milliQ estéril, y 2  $\mu$ l de esta disolución se utilizaron para la reacción de PCR. Esta técnica nos permite una mayor optimización del tiempo al no tener que recurrir a mini-preparaciones de cada una de las colonias para comprobar la incorporación del plásmido y el gen de interés a su genoma. Las colonias se conservaron para su posterior uso en caso de resultar positivas tras la PCR replicando mediante estría en medio selectivo o bien inoculando una gota (2  $\mu$ l) del agua donde quedó disuelta la fracción de colonia utilizada para la PCR. Las condiciones de la PCR fueron las convencionales (ver sección de materiales y métodos 3.3.1.).

### **3.3.3. PCR anidada**

Utilizando como molde el amplicón generado en una PCR anterior, la PCR anidada permite añadir nuevos nucleótidos al primer amplicón, y para ello se usan cebadores diseñados para hibridar con la primera secuencia amplificada e incorporar los nuevos nucleótidos. Así, se utilizaron dos parejas de primers en el proceso completo: en la primera PCR se utilizó una concentración de primers 2  $\mu$ M mientras que en la segunda, se usó una concentración de 20  $\mu$ M, para asegurar una completa y selectiva amplificación. Este tipo de PCR se utilizó para añadir las colas de recombinación en el

sistema tipo GATEWAY (ver sección de materiales y métodos 3.8.3.), debido a que los oligonucleótidos con las colas attb1 y attb2 completas son demasiado largos y tienen poca capacidad para hibridar en toda su longitud durante el proceso.

La PCR anidada también es una forma de aumentar la especificidad de las PCR al usar primers más cortos y seleccionar los amplicones definitivos dentro de una población de amplicones iniciales ya seleccionados por la primera pareja de primers. Por ello esta técnica se usó también para la técnica RACE (ver sección de materiales y métodos 3.7.2).

### **3.4. Manipulación enzimática del ADN**

La digestión del ADN se realizó bien con fines analíticos, o con la intención de proveer a los insertos y al vector de extremos cohesivos para una clonación convencional, para ello se utilizaron enzimas de restricción (tabla 5) en las condiciones óptimas indicadas por el fabricante para cada una de ellas (<https://www.promega.es/resources/tools/retool/>). El volumen total de reacción usado fue de 20-30  $\mu$ l que contenían 0,5-1  $\mu$ g ADN y 1 unidad de la enzima de restricción correspondiente, en el tampón indicado por el fabricante. La digestión requería de una incubación de 1-2 h a 37°C, en función de la cantidad de ADN y la enzima empleada.

En el caso de la clonación convencional se utilizaron enzimas de restricción distintas para cada extremo con la intención de que la inserción en el vector fuera dirigida o polarizada, es decir, en un solo sentido. En el caso de que las condiciones o el tampón óptimos no fueran comunes entre las dos enzimas usadas en la digestión se realizaron digestiones secuenciales de modo que en primer lugar se digería con una enzima y posteriormente se purificaba el ADN antes de digerir con la siguiente enzima. Estas purificaciones se realizaron mediante el uso de un Kit comercial NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up de Macherey-Nagel, o mediante un protocolo de fenolización y precipitación del ADN: la reacción de digestión (20  $\mu$ l) se llevó a un volumen final de 100  $\mu$ l con agua milliQ estéril. A esta dilución se añadieron 100  $\mu$ l de fenol:cloroformo:isoamyl alcohol 25:24:1 saturado con 10 mM Tris, pH 8.0, conteniendo 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich). La mezcla se agitó con vórtex durante 1 minuto y se centrifugó a 14.000 xg durante 2 minutos. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo

y se repitió el proceso desde la adición del fenol:cloroformo:isoamyl Alcohol. Al sobrenadante final se le añadió 0,1 volumen de 3 M acetato sódico pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol absoluto, y se guardó entonces a -20 °C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 14.000 xg durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de 70% etanol diluido con agua milliQ estéril, y finalmente se dejó secar el pellet y se resuspendió en un tampón adecuado para su posterior uso o en agua estéril libre de nucleasas.

**Tabla 5. Enzimas de restricción utilizadas para la clonación de fragmentos en los vectores CD-3 para biobalística.**

Enzima	Tampón	Fabricante
<i>XbaI</i>	E*	Promega
<i>BamHI</i>	E*	Promega

\*Tampón E: 6 mM Tris-HCl, pH 7,5; 6 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM NaCl; 1 mM DTT.

### 3.5. Secuenciación

La secuenciación de los distintos fragmentos de ADN se realizó en los servicios de SECUGEN S.L. (CIB, Madrid, España) <https://www.secugen.es> y el Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia (CAID) <https://www.um.es/web/acti/>. En algunos casos se enviaron muestras de ADN como productos de PCR purificados o bandas extraídas y purificadas desde geles de agarosa con el kit comercial NúcleoSpin® Gel and PCR Clean-up de Macherey-Nagel. Sin embargo fue más común y efectivo enviar los fragmentos clonados en vectores plasmídicos.

Cuando fue posible, para la secuenciación se usaron cebadores que hibridaban con el vector antes y después de la inserción. Esto permitió la secuenciación del gen completo y la comprobación de su inserción correcta y completa en el vector. Cuando el fragmento a secuenciar no iba clonado en un vector o no se disponía de los primers adecuados para el vector, se secuenció con primers específicos que hibridaban en los bordes del gen de interés.

### 3.6. ARN

#### 3.6.1. Tratamiento del material

Para evitar la degradación del ARN por la presencia ubicua de las RNAsas, todo el material utilizado para su extracción y manejo fue lavado previamente con una solución “ZapRNAsa” (10% NaOH; 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 10% SDS y 6 mM EDTA). Con el mismo motivo el agua utilizada se trató con DEPC (DiEtilPiroCarbonato) (1 ml/l), se mantuvo 12 horas en agitación en campana de extracción para eliminar el vinilo y fue autoclavada 2 veces a 120°C durante 20 minutos para eliminar la toxicidad producida por el DEPC.

#### 3.6.2. Métodos de extracción

El ARN procedente de tejido foliar de *A. thaliana* y *P. sativum* (0,1 g hojas) de 28 (Ortiz-Espín y col., 2017) y 5 días (Martí y col., 2011) de crecimiento respectivamente, se aisló con una mezcla de fenol saturado en agua y cloroformo. Posteriormente fue precipitado con 3 M LiCl (Lagrimini y col., 1987). Para ello, las hojas fueron congeladas en nitrógeno líquido y pulverizadas sin descongelar con ayuda de un mortero o pistilo previamente tratados con la solución anti-RNAsas, autoclavados y enfriados con nitrógeno líquido. El homogenado resultante se resuspendió en 550 µl de cloroformo y 550 µl de tampón de lisis (200 mM Tris-HCl, pH 8; 400 mM LiCl; 25 mM EDTA; 1% SDS y agua estéril). Se procuró una mezcla homogénea de dichos componentes mediante el uso del vórtex durante unos treinta segundos y se centrifugó a 13.000 ×g, 5 min a temperatura ambiente, para eliminar lípidos y proteínas que se habían disuelto en la fase orgánica, mientras que los ácidos nucleicos, sales y polisacáridos permanecieron en la fase fenólica acuosa. Posteriormente, el sobrenadante se lavó con un volumen de fenol y después con otro de cloroformo a 13.000 ×g, 3 min. Se hicieron precipitar los ácidos nucleicos al añadir 1/3 del volumen obtenido de 8 M LiCl durante toda la noche a 4°C y aplicando una centrifugación de 13.000 ×g, durante 30 min a la misma temperatura. El ADN se eliminó incubando el precipitado con ADNAsas (ARNase-free ADNase, Roche AppliedScience™) en una relación de una unidad de enzima por cada µg de ARN, durante 1 h 30 min a 37°C.

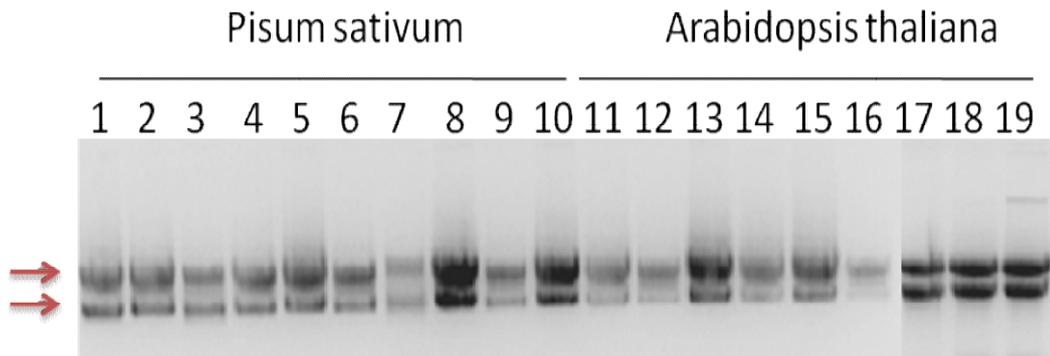
A continuación, el precipitado se lavó dos veces; la primera con 3 M acetato de sodio, pH 5,2 (7 µl) en 470 µl de agua DEPC y 250 µl de 70% etanol, que se mezcló bien y se centrifugó 13.000 ×g, 10 min, 4°C, y la segunda con 6 veces menos de acetato de sodio 3 M y tres veces más de 70% etanol, incubándose 1-2 h a -20°C.

El ARN se volvió a precipitar centrifugando a 13.000 ×g, durante 20 min, a 4°C y el precipitado se lavó dos veces con 70% etanol frío. El ARN se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 10-30 µl de agua DEPC.

El estado y calidad del ARN extraído se comprobó mediante electroforesis en geles de 1% agarosa (Figura 20) y la ausencia de contaminación por ADN genómico se comprobó mediante PCR con oligonucleótidos específicos de Actina8 (AT1G49240.1) (9 y 10 en Anexo 1) que hibridan en dos exones contiguos separados por un intrón de modo que en caso de contaminación por genómico amplificarían dos bandas: una de 403 pb y otra de 296 pb. La concentración e integridad de ARN se determinó como se detalla en los apartados siguientes.

### **3.6.3. Electroforesis ARN**

Para evaluar la integridad del ARN extraído se cargaron 150 ng de ARN en cada pocillo de geles de agarosa (1% p/v) con tampón TAE 1x estéril, las muestras se prepararon igual que las muestras de ADN (sección de materiales y métodos 3.2.3.). Previamente la cubeta se descontaminó con 3% peróxido de hidrógeno durante toda la noche. Se aplicó un voltaje constante de 60 V durante 40 min. La presencia de dos bandas nítidas a 2.000 y 5.000 pb correspondientes al ARN ribosómico 18S y 28S indicaron una integridad del ARN suficiente para su completa retrotranscripción posterior.



**Figura 20. Electroforesis de ARN para control de integridad.** Obsérvanse las dos bandas de cada calle correspondientes al ARN ribosómico 18s y 28s.

### 3.6.4. Cuantificación de ARN en solución

La determinación de la concentración de ARN en las muestras así como su pureza, se determinó mediante la utilización del equipo ND-1000 (Nanodrop) donde se midió la absorbancia a 260, 280 y 230 nm frente a un blanco de agua ultrapura. La concentración de la muestra se calculó en relación al valor estándar  $DO_{260nm}=1$  para soluciones de 40  $\mu\text{g/ml}$  de ARN. Las relaciones entre las absorbancias  $DO_{260nm}/DO_{280nm}$  y  $DO_{260nm}/DO_{230nm}$  indican si existe contaminación por proteínas y compuestos aromáticos o por sales, fenoles y carbohidratos respectivamente. Como estándar de calidad, estos cocientes deben presentar un valor cercano a 2,0 y valores inferiores a 1,7, indican la presencia de contaminación por estos sustratos (tabla 6).

**Tabla 6: Estándares de calidad para ARN según los ratios  $DO_{260nm}/DO_{280nm}$  y  $DO_{260nm}/DO_{230nm}$**

Ratio	Intervalo	Pureza
260/280	2 - 2,2	Óptima
	2 - 1,7	Aceptable
	<1,7	Contaminación por proteínas, y compuestos aromáticos.
260/230	< 1,5	Contaminación por sales, carbohidratos y fenoles

### 3.6.5. Retrotranscripción

A partir del ARN aislado se sintetizó ADNc con el kit comercial “High-Capacity cADN Reverse Transcription Kit” (Applied-Biosystems™) utilizando moléculas de hexámeros degenerados como cebadores y siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se partió de 2 µg de ARN de alta calidad en un volumen final de 10 µl diluyendo con agua libre de ARNasas. Finalmente se compuso la solución de retrotranscripción añadiendo a estos 10 µl de ARN diluido los 10 µl de máster mix concentrada 2x (tabla 7) preparada en hielo con los componentes y volúmenes detallados a continuación:

**Tabla 7. Máster mix para la retrotranscripción.**

Reactivo	2x para 1 muestra (10 µl)
10x Tampón RT	2 µl
25x mezcla de dNTP	0,8 µl
10x RT Hexámeros degenerados	2 µl
Transcriptasa inversa	1 µl
Inhibidor de ARNasa	1 µl
H <sub>2</sub> O DEPC	3,2 µl

Finalmente las soluciones de retrotranscripción se sometieron a un programa de temperatura (tabla 8) adecuado para la Transcriptasa Reversa según las indicaciones del fabricante:

**Tabla 8. Programa de temperatura para la retrotranscripción.**

Fases	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Fase 1	25	10´
Fase 2	37	120´
Fase 3	85	5´
Fase 4	4	-

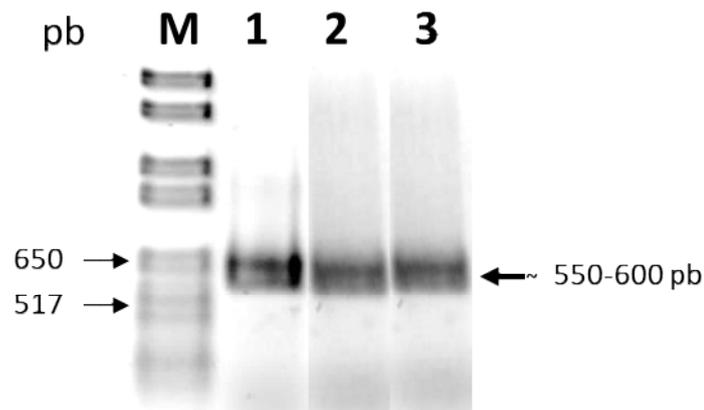
El ADNc obtenido se almacenó a -20 °C hasta su uso.

### 3.7. Obtención de insertos AtTRXo1, AtPYR1, PsTRXo1 y PsPYR1.

#### 3.7.1. Secuencias conocidas: AtTRXo1, AtPYR1, PsTRXo1

Para la obtención de la secuencia de los genes *AtTRXo1*, *AtPYR1* y *PsTRXo1* se utilizaron las bases de datos de acceso público EMBL ([www.ebi.ac.uk/ena](http://www.ebi.ac.uk/ena)) y TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>).

A partir del ARN extraído de plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Pisum sativum* se obtuvo el ADNc (ver secciones de materiales y métodos 3.6.2, 3.6.5) y se amplificaron los genes correspondientes por PCR con la polimerasa *Platinum Pfx* y primers específicos (ver Anexo 1 nº123, 124, 151, 152, 153, 154, 155, 156 y 157). El fragmento de ADN fue aislado por electroforesis en gel de agarosa (Figura 21) y purificado tal y como se indica en la sección de materiales y métodos 3.2.4. Posteriormente los ORFs fueron clonados en el vector de subclonaje pGEMT-easy (ver sección 3.8.2) y enviados a secuenciar (ver sección 3.5) para confirmar su correcta amplificación y clonaje.



**Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones de los genes. 1) *AtTRXo1* (TAIR: AT2G354010, 565 pb), 2) *PsTRXo1* (EMBL: AM235208, 546pb) y 3) *AtPYR1* (TAIR: AT4G17870, 575 pb) obtenidos de sus respectivos clones en pGEM T-easy con primers universales M13.**

### 3.7.2. Secuencias desconocidas: PsPYR1

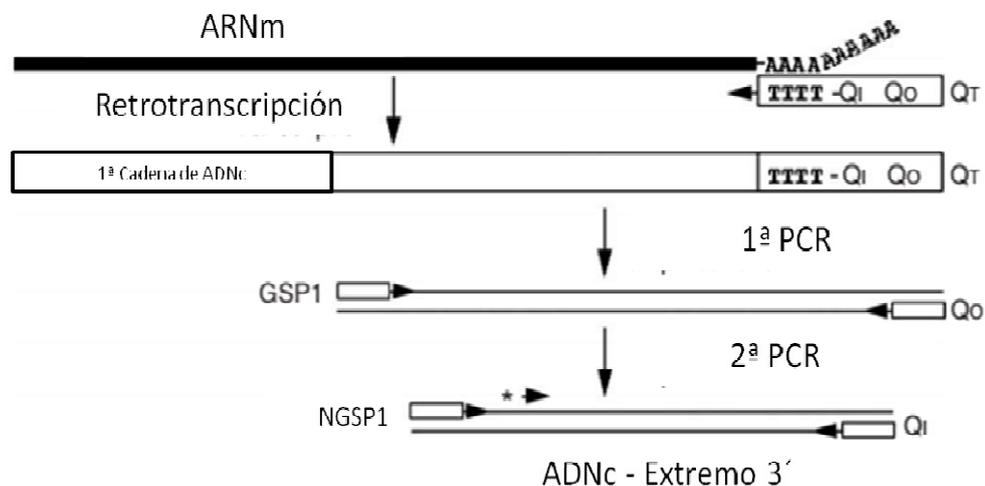
La incompleta secuenciación del genoma de *Pisum sativum*, incluida la de los receptores de ABA tipo PYR, nos condujo a evaluar una estrategia distinta a la utilizada en el apartado anterior. Para la obtención del ORF *PsPYR1* utilizamos una aproximación *in silico* con la que predijimos la secuencia más probable para este gen en guisante. Para ello, realizamos un alineamiento global de secuencias con la aplicación TBLASTn (*Basic Local Alignment Search tool searching translated nucleotide database using a protein query*) en la base de datos *Pisum sativum* unigene Franssen (<https://www.coolseasonfoodlegume.org>). Las secuencias utilizadas como cebo fueron péptidos procedentes de extractos nucleares de guisante. Estos péptidos fueron aislados por cromatografía de afinidad frente a PsTrxo1 en el trabajo de Ortiz Espín y col. (2015) e identificados como posibles péptidos de PYR1 (LNLQKLATVAEAMAR; VGCTRDVIVISGLPANTSTER) en diversas especies de leguminosas (*Medicago truncatula*, *Phaseolus vulgaris* y *Glycine maxima*).

Como resultado del alineamiento múltiple encontramos dos contigs en la base de datos de guisante con más de un 50% de homología con la secuencia cebo. La realización de un árbol filogenético con las secuencias nucleotídicas de PYR1 en leguminosas nos acercó a los posibles ortólogos de PYR1 con los contigs encontrados en guisante (ver anexo 2), indicándonos la mayor cercanía filogenética de la secuencia de *Medicago truncatula* con uno de los contigs (30592) y la poca similitud del contig 17923 con el resto de ortólogos. Este hecho nos condujo al alineamiento del contig 30592 con el resto de ortólogos. Con el programa mVISTA pudimos acotar las zonas más conservadas de la secuencia y el alineamiento con el programa Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) nos permitió discriminar la extensión aproximada y la secuencia más probable del ORF *PsPYR1* (ver anexo 2).

A fin de amplificar la secuencia completa de *PsPYR1* diseñamos primers específicos dentro de las regiones conservadas anteriormente analizadas (ver anexo 2) y realizamos una amplificación rápida de los extremos 3'-5' mediante la técnica denominada rapid amplification of cDNA ends (RACE) desarrollada por Frohman y col. (1988) y modificada posteriormente por Scotto-Lavino y col. (2007). Esta técnica permite la amplificación

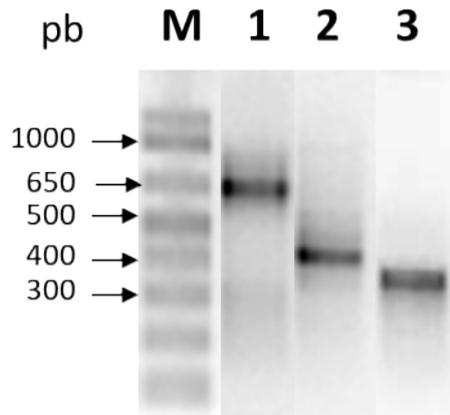
rápida y eficiente de extremos 5'-3' de genes cuya secuencia está incompleta. El método consiste en utilizar la PCR para seleccionar entre una mezcla de ARN mensajeros, las regiones comprendidas entre secuencias conocidas de nuestro gen problema y colas no específicas añadidas a los extremos del ADNc.

Para la obtención del **extremo 3'** (Figura 22) se utilizó un primer adaptador universal Qt (nº 120 en Anexo 1) formado por una secuencia de tres regiones: Q<sub>0</sub> (5'-ccagtgagcagagtgcgc-3') Q<sub>1</sub> (5'-gaggactcgagctcaagc-3') y una cola Poli-T (17 Ts) que hibridará con la cola Poli-A propia del extremo 3' de los ARN mensajeros. Se llevó a cabo la retrotranscripción a partir de ARN de guisante (ver secciones de materiales y métodos 3.6.2 y 3.6.5.) generando una población de distintos ADNc con colas Poli-T y regiones Q<sub>0</sub> y Q<sub>1</sub>. Con este ADNc como molde se realizaron dos PCR anidadas. En la primera PCR se amplificó la región comprendida entre una secuencia conservada del gen y la región Q<sub>0</sub>, incluida al final del extremo 3' (primers GSP1, nº 139 y Q<sub>0</sub>, nº 121). Las dos siguientes PCRs anidadas (ver Anexo 1) se realizaron a fin de aumentar la especificidad de los amplicones obtenidos desde el extremo 3' del ORF<sub>PsPYR1</sub> (Figura 23).



**Figura 22. Esquema del proceso de obtención del extremo 3' de un fragmento de ADN de secuencia desconocida mediante la técnica RACE. Modificado de (Scotto-Lavino, y col., 2007a).**

Los distintos amplicones obtenidos se aislaron, purificaron, clonaron en pGEM-Teasy y secuenciaron (sección de materiales y métodos 3.2.4, 3.8.2, 3.5)

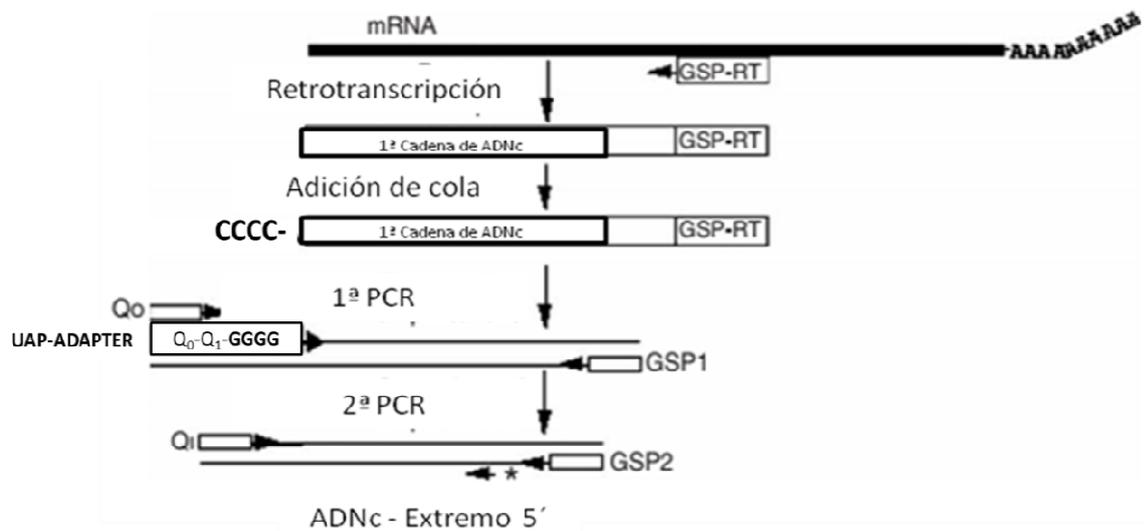


**Figura 23. Electroforesis de los amplicones del extremo 3' del ORFPsPYR1.** Los amplicones se obtuvieron mediante PCR anillada con primers específicos de la secuencia de PsPYR1 y primers adaptadores del extremo 3'. **1)** Amplicón 1ª PCR (600pb), **2)** Amplicón 2ª PCR (350 pb) y **3)** Amplicón 3ª PCR (330pb).

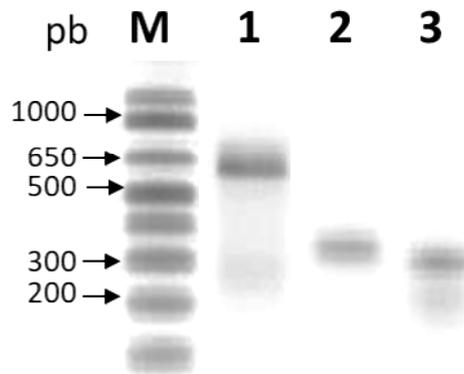
La obtención del **extremo 5'** (Figura 24) se realizó añadiendo a la reacción de retrotranscripción un oligonucleótido antisentido diseñado frente a una región conservada del gen, el RT-GSP 5`RACE (nº 147 en Anexo 1). Tras la síntesis de ADNc específicos, el ARN residual se eliminó con ARNasa A (RNase A Solution; Promega) y se purificó. A continuación, se añadieron colas homopoliméricas desoxiCTPs a los extremos 5' del ADNc con la enzima TdT (terminal deoxinucleotidiltransferasa) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta cola poli-C se utilizó como molde para el primer complementario UAP-ADAPTER (nº96 en Anexo 1). A continuación, se realizó una primera PCR utilizando los primers Qo y GSP2 (nº 144 Anexo 1), una segunda PCR anidada con los primers Qi y NGSP2 (nº 142, Anexo 1) y una tercera con el Qi y el NNGSP2 (Figura 25).

Los distintos amplicones obtenidos se aislaron, purificaron, clonaron en pGEMT- easy y se secuenciaron (sección de materiales y métodos 3.2.4, 3.8.2, 3.5)

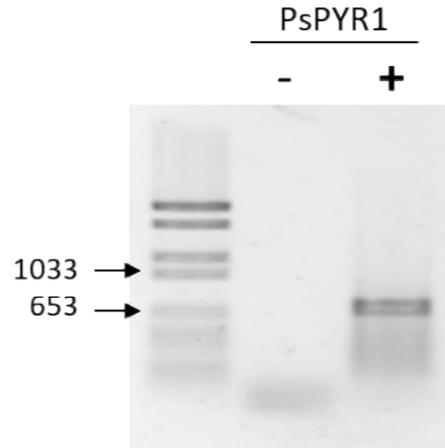
Una vez obtenidas las secuencias específicas de los extremos del ORF PsPYR1 se realizó la amplificación del gen completo (ver Anexo 1) y su posterior clonación en pGEM T-easy. El amplicón obtenido fue aislado y purificado por electroforesis a una altura de 657pb (Figura 26).



**Figura 24.** Esquema del proceso de obtención del extremo 5' de un fragmento de ADN de secuencia desconocida mediante técnica RACE. Modificado de Scotto-Lavino y col. (2007b).



**Figura 25.** Electroforesis de los amplicones del extremo 5' del ORF PsPYR1. Los amplicones se obtuvieron mediante sucesivas PCRs anidadas con primers específicos de la secuencia de PsPYR1 y primers adaptadores del extremo 5'. **1)** Amplicón 1ª PCR (550pb), **2)** Amplicón 2ª PCR (350 pb), **3)** Amplicón 3ª PCR (330pb)



**Figura 26.** Electroforesis en gel de agarosa del fragmento *PsPYR1* completo tras su amplificación con los primers diseñados en los extremos del gen (Anexo 1). La calle de la izquierda es el control negativo.

### **3.8. Estrategias de clonación**

#### **3.8.1. Clonación convencional**

La clonación convencional hace uso de las enzimas de restricción para crear extremos cohesivos compatibles entre el fragmento de ADN amplificado por PCR y el vector (Anexo 3) donde queremos clonarlo.

Para que una enzima pueda cortar un fragmento de ADN en su borde es necesaria la incorporación de secuencias específicas de reconocimiento para las enzimas de restricción, a estas secuencias se las denomina dianas de restricción y pueden ser incorporadas al fragmento de ADN mediante su amplificación por PCR usando primers que reconozcan los bordes del fragmento y además incorporen la diana de restricción deseada. Para optimizar las condiciones de corte de la enzima de restricción, se añadieron a los primers, al final de las dianas de restricción, un par de nucleótido extra: AT-5' y CG-3'.

Para decidir qué enzimas de restricción debemos usar y por tanto qué dianas de restricción debemos incorporar al producto de PCR, deben tenerse en cuenta los lugares de multiclonaje que ofrece el vector (Anexo 3) de destino donde se concentran las

dianas de restricción en lugares estratégicos del vector (Anexo 3). Una vez elegido el lugar de clonación y por tanto las enzimas de restricción a usar, el vector fue digerido con estas enzimas y posteriormente desfosforilado en los extremo 5'-P con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Promega™). La desfosforilación es necesaria si los extremos han sido cortados con la misma enzima y recomendable si han sido cortados con enzimas distintas para evitar su autoligación.

Los eventos de ligación entre fragmentos de ADN previamente digeridos y purificados con el kit comercial NúcleoSpin® Gel and PCR Clean-up de Macherey-Nagel, se desarrollaron en volúmenes pequeños (20 µl) de tampón de ligación con la enzima ligasa (*Life Technologies*™). La reacción de ligación se llevó a cabo utilizando los tampones y el tiempo de incubación recomendado por el fabricante y en relaciones molares inserto vector 3:1 o superiores.

Una vez transcurrido el tiempo para la ligación con la solución de ligación se transformaron bacterias de *E. coli* DH5α tal y como se describe en la sección de materiales y métodos 2.1.4., para obtener un clon con la construcción creada.

### **3.8.2. Clonación en pGEM®-T easy**

El vector pGEM®-T easy (Figura27) es un vector linealizado con extremos cohesivos de timinas y adeninas y ofrece facilidades en el subclonaje, ya que sólo exige la ligación del inserto mediante la enzima T4 ligasa y no requiere la presencia de enzimas de restricción. Además permite la identificación de colonias positivas gracias a la presencia en el sitio de clonación múltiple, del operón LacZ que se encuentra interrumpido por unas timinas desapareadas. El sistema regula la expresión de la β-galactosidasa, una enzima capaz de hidrolizar la galactosa. Utilizando una galactosa unida a un sustrato fenólico, la hidrólisis por la enzima aporta un color azul a la colonia. De esta forma, en las colonias blancas el inserto habrá interrumpido el operón y no podrá degradarse el reactivo fenólico.

Los eventos de ligación con este vector se desarrollaron en volúmenes de 10 µl de tampón de ligación con la enzima T4 ligasa (*Promega*) en las proporciones especificadas

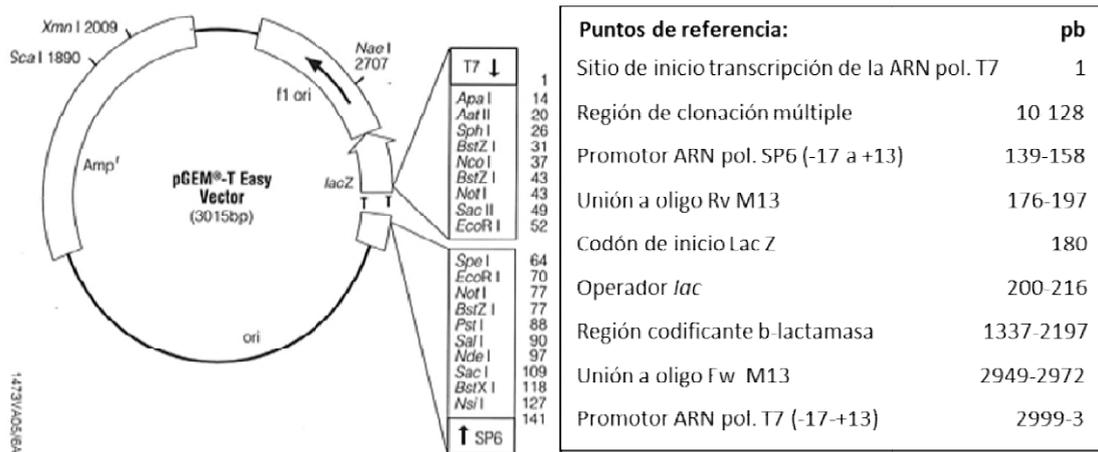
por el fabricante (tabla 9), en relaciones molares inserto:vector 3:1 o superiores y en tiempos de incubación de 12 h a 4°C.

**Tabla 9. Proporciones para la ligación en pGEM<sup>®</sup>-T easy con T4 ligasa (Promega).**

Paso	Componente	Volumen (μl)
1	Tampón ligación 2x	5
2	Vector pGEM (3kb, 50 ng/μl)	1
3	Producto PCR	3
4	T4 ADN ligasa	1

Tras la ligación se utilizó parte de la reacción para transformar por choque térmico, tal como se indica en la sección de materiales y métodos 2.1.4., bacterias *E. coli* de la cepa *JM109* especialmente indicada para ser transformada con este vector.

En condiciones de esterilidad se prepararon placas de LB-agar (50 ml) suplementada con 75 μg/ml ampicilina, a las que se añadieron 33 μl de 100 mM IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) y 40 μl de 20 mg/ml X-Gal. Estos reactivos fueron absorbidos por el medio con la ayuda de un asa de siembra y repetidos pases hasta su agotamiento. Una vez preparadas las placas se sembraron por agotamiento 50 y 100 μl de la mezcla bacteriana. Posteriormente se centrifugó y se sembró el pellet bacteriano, a fin de seleccionar colonias individuales. Las colonias blancas fueron testadas mediante PCR en colonia como se indica en la sección de materiales y métodos 3.3.2. y las colonias positivas fueron cultivadas en medio LB líquido para obtener su ADN plasmídico como se indica en la sección de materiales y métodos 3.2.2, analizarlo mediante digestión como se indica en la sección de materiales y métodos 3.4. y enviarlo a secuenciar como se indica en la sección de materiales y métodos 3.5. En el caso de confirmar por secuenciación la correcta clonación del gen se realizaron stock glicerolados de la colonia positiva tal como se indica en la sección de materiales y métodos 3.9.



**Figura 27: Esquema del vector pGEM-T Easy.** El gen LacZ queda interrumpido por dos timinas desapareadas que constituyen el lugar de clonación múltiple. Se muestran los sitios de restricción que flanquean ambas timinas y que permitirán una posterior obtención del fragmento clonado mediante el uso de enzimas de restricción. En la tabla de la derecha se representa la localización de los principales elementos de este vector. Abreviaturas: pol, polimerasa; Rv, reverse; Fw, forward.

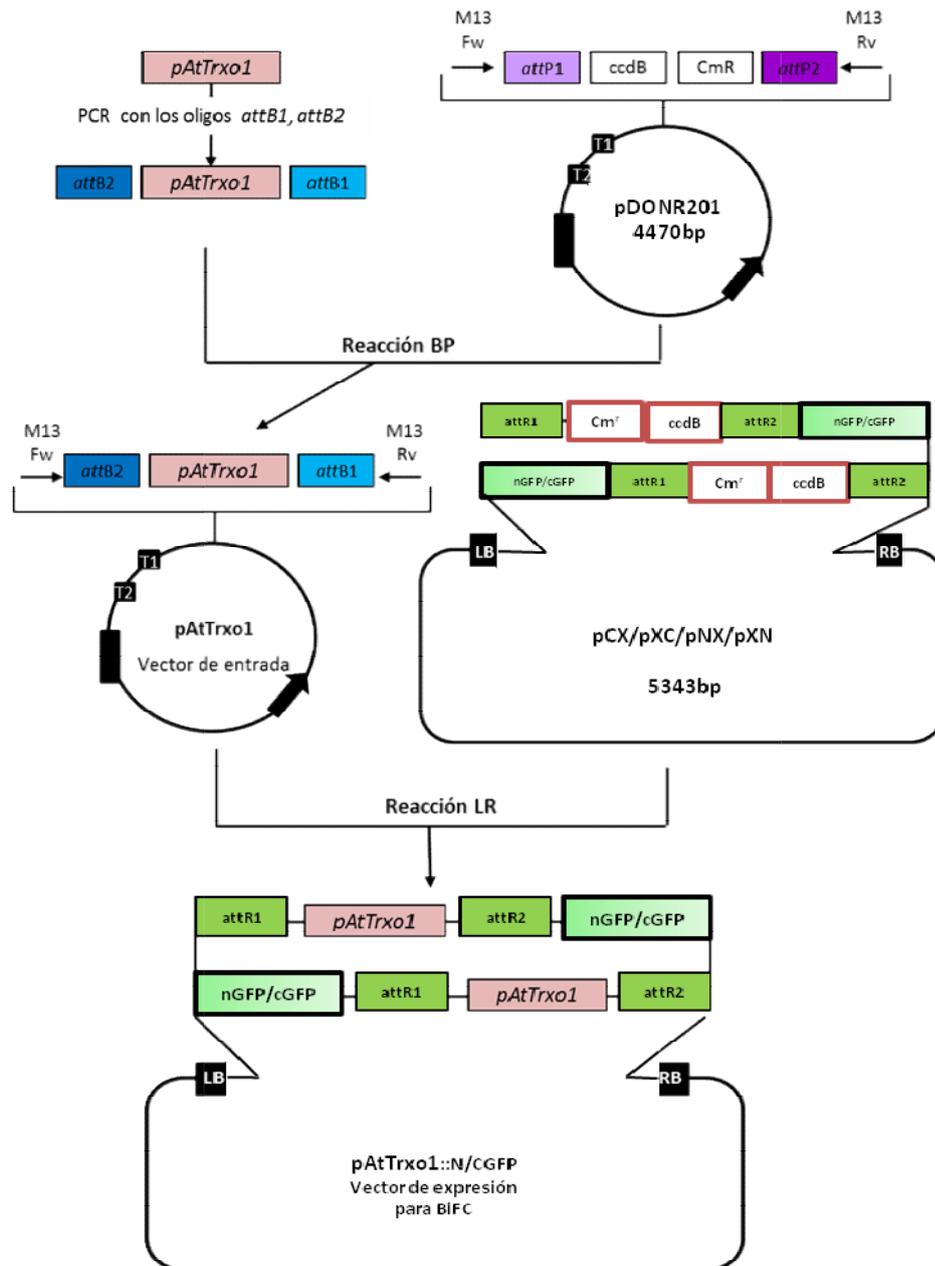
### 3.8.3. Sistema de clonación GATEWAY

Para las clonaciones llevadas a cabo para los experimentos de BiFC en *Nicotiana benthamiana* (sección de materiales y métodos 4.4.) utilizamos la tecnología Gateway (Invitrogen) que permite trasladar insertos de unos vectores a otros por medio de recombinaciones basadas en el sistema del bacteriófago  $\lambda$ .

En primer lugar el fragmento de ADN de interés fue amplificado por PCR (ver sección de materiales y métodos 3.3.1.) mediante el uso de primers que hibridaban con los extremos de los genes e incorporaban parte de las secuencias de recombinación gateway attB1 y attB2 (187-192 de Anexo 1), posteriormente se realizó una PCR anidada (ver sección de materiales y métodos 3.3.3.) con los primers con las secuencias completas de recombinación gateway attB1 y attB2 (36 y 37 del Anexo 1) y se clonó en un vector de entrada (*pDONR201*) que contiene los sitios de recombinación attP1 y attP2. A través de una reacción de recombinación (reacción BP) mediada por la enzima BP Clonasa (Invitrogen) entre los sitios attB1-attP1 y attB2-attP2 se generaron los sitios de recombinación attB1 y attB2 flanqueando al fragmento una vez insertado en el vector de entrada. En una segunda reacción (reacción LR), la enzima LR Clonasa (Invitrogen)

que reconoce los sitios *attB1* y *attB2* del vector de entrada y los sitios *attR1* y *attR2* del vector de destino llevó a cabo la recombinación específica entre ellos formándose el vector de expresión con el gen de interés (Figura 28). Esta tecnología permite una selección de los transformantes al producirse una sustitución del gen letal *ccdB*, presente en los vectores, por el fragmento de ADN que se le incorpora. La reacción BP se llevó a cabo en volúmenes de 5 y 10  $\mu$ l, en ratios molares vector:inserto 1:1. La reacción LR se llevó a cabo en volúmenes de 10  $\mu$ l, con ratios molares donador: receptor 5:1. Todas las reacciones de clonación se incubaron 12 h a 25 °C siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Tal como se describe en la sección de materiales y métodos 2.2.4. se usó parte de la reacción BP (0,1-1  $\mu$ g de ADN) para transformar por electroporación células competentes de la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 C58C1, que luego servirían para transformar transitoriamente plantas *N. benthamiana*.



**Figura 28: Construcción del vector de expresión pAtTrxo1::N/CGFP utilizando la tecnología de clonación Gateway®.** Abreviaturas: attB1, attB2, attP1, attP2, attR1, attR2, sitios de recombinación; ccdB, gen letal; CmR, gen de resistencia a cloranfenicol; LB, borde izquierdo; RB, borde derecho; nGFP/cGFP: mitades N-terminal/C-terminal de la GFP. Modificado de Thanh y col. (2012).

#### **3.8.4. Clonación de *AtTRXo1*, *AtPYR1*, *PsTRXo1* y *PsPYR1* en pGEM.**

Los insertos obtenidos de los cuatro genes tal y como se indicó en la sección de materiales y métodos 3.7 se clonaron en el vector pGEM<sup>®</sup>-T easy como se indicó en la sección de materiales y métodos 3.8.2. Esta clonación se realizó como un paso de subclonaje por la facilidad y eficiencia que ofrece este sistema. Los insertos clonados llevaban en sus extremos secuencias flanqueantes al gen de interés que incluían dianas de restricción que permitieran el posterior clonaje en vectores de expresión.

#### **3.8.5. Clonación de *AtTRXo1*, *AtPYR1*, *PsTRXo1* y *PsPYR1* en CD3-N/CGFP.**

A partir de las construcciones generadas en pGEM<sup>®</sup>-T easy se obtuvieron los insertos de los cuatro genes digiriendo con enzimas de restricción (ver sección de materiales y métodos 3.4.) las minipreps de estos clones. Al haber sido clonados los insertos con dianas de restricción en sus flancos, se permitió el corte de estas dianas para posteriormente separar el inserto del resto del vector mediante electroforesis en gel de agarosa (ver sección de materiales y métodos 3.2.3). Tras la electroforesis se realizó la extracción del inserto del gel de agarosa (ver sección de materiales y métodos 3.2.4) quedando purificado y preparado para ser clonado en un vector de expresión. Al ser digeridos los extremos del inserto por enzimas diferentes, el vector también fue digerido por las mismas enzimas, creando extremos cohesivos y complementarios para cada uno de los extremos del inserto permitiéndonos controlar la dirección con la que el inserto se incluía en el vector.

Para asegurar que el vector no re-circularizase sin incluir al inserto se realizó la desfosforilación de los extremos del vector con la Calf Intestinal alkaline phosphatase (CIAP) (Invitrogen) que es una fosfomonoesterasa purificada a partir de mucosa intestinal de ternera que hidroliza los grupos 5'-fosfato de ADN, ARN y nucleótidos. Siguiendo las instrucciones del fabricante se añadió 1 unidad de la enzima CIAP a la reacción de digestión y se incubó a 37°C durante 5-10 minutos. Finalmente se inactivó la CIAP por calor, siguiendo las indicaciones del fabricante añadiendo la concentración de EDTA (pH 8.0) igual a la concentración de MgCl<sub>2</sub> que contenía el tampón en el que se

produjo la digestión del vector. Se incubó entonces la reacción a 65°C durante 15 minutos.

La ligación se realizó con la T4 ADN ligasa que cataliza la unión de ADN bicatenario de extremos cohesivos o romos entre los grupos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo de nucleótidos adyacentes. El kit de *Promega* incluye el tampón de reacción (10X: 300 mM Tris-HCl (pH 7,8 a 25 ° C); 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM DTT y 10 mM ATP). Se siguieron las indicaciones del fabricante. Se usaron ratios molares de 1:1 y 3:1 inserto:vector y para el cálculo de las cantidades de inserto se utilizó la fórmula:

$$[\text{ratio molar del inserto} \times (\text{ng de vector} \times \text{tamaño del inserto (kb)})] / \text{tamaño del vector (kb)} = \text{ng de inserto}$$

o la herramienta informática:

<https://www.promega.es/resources/tools/biomath/>

Añadidos los componentes a la reacción de ligación se incubó a temperatura ambiente (22°C) durante 3 horas o 4–8°C durante la noche según el caso, buscando la mayor eficiencia en la ligación.

Finalmente se usó la reacción de ligación para transformar por choque térmico bacterias *E. coli* JM109 según lo descrito en la sección de materiales y métodos 2.1.4.

### **3.8.6. Clonación de *AtTRXo1*, *AtPYR1*, *PsTRXo1* y *PsPYR1* en los vectores *pCX*, *pXC*, *pNX* y *pXN*.**

En estos vectores utilizados previamente y cedidos por el grupo del Dr. Luis Oñate (Rombolá-Caldentey y col. 2014; Sánchez-Montesino y col. 2019) nuestros genes de interés se expresan de forma constitutiva y fusionados traduccionalmente a una mitad de la proteína GFP (tabla 10).

**Tabla 10. Vectores usados para el ensayo de BiFC.**

Vector	Mitad de la GFP fusionada	Posición respecto a la proteína de interés
<b>pCX</b>	C-terminal GFP	N-terminal TRXo1/PYR1

<b>pXC</b>	C-terminal GFP	C-terminal TRXo1/PYR1
<b>pNX</b>	N-terminal GFP	N-terminal TRXo1/PYR1
<b>pXN</b>	N-terminal GFP	C-terminal TRXo1/PYR1

Las secuencias de los genes *AtTRXo1*, *PsTRXo1*, *AtPYR1* y *PsPYR1* fueron amplificadas a partir de ADN plasmídico extraído de los clones de pGEM-Teasy (minipreps) como se describe en la sección de materiales y métodos 3.2.2. y mediante PCR anidada (ver sección de materiales y métodos 3.3.3.) y sucesivas clonaciones por tecnología Gateway tal como se describe en la sección de materiales y métodos 3.8.3, hasta llegar a las 16 construcciones (*pAtTRXo1-CGFP*; *pAtTRXo1-NGFP*; *pCGFP-AtTRXo1*; *pNGFP-AtTRXo1*; *pPsTRXo1-CGFP*; *pPsTRXo1-NGFP*; *pCGFP-PsTRXo1*; *pNGFP-PsTRXo1*; *pAtPYR1-CGFP*; *pAtPYR1-NGFP*; *pCGFP-AtPYR1*; *pNGFP-AtPYR1*; *pPsPYR1-CGFP*; *pPsPYR1-NGFP*; *pCGFP-PsPYR1*; *pNGFP-PsPYR1*) con las que se transformaron por choque térmico *E.coli* DH5 $\alpha$  como se indica en la sección de materiales y métodos 2.1.4. Con minipreps de estas bacterias se transformó por electroporación *A. tumefaciens* GV3101 C58C1 tal y como se indica en la sección de materiales y métodos 2.2.4.

Con las líneas de *A. tumefaciens* transformadas se infectaron y transformaron por agroinfiltración como se indica en la sección de materiales y métodos 4.4.1. las plantas de *N. benthamiana* con las que se realizó el ensayo de BiFC.

### **3.9. Criopreservación de clones**

Tras el envío de las preparaciones de ADN plasmídico procedente de colonias bacterianas transformadas a los servicios de secuenciación (ver sección de materiales y métodos 3.5.), se pudo confirmar por alineamiento múltiple de secuencias (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) la correcta clonación de las distintas construcciones empleadas para esta Tesis.

Se seleccionaron entonces varias de las colonias confirmadas como correctamente transformadas y fueron inoculadas en 5 ml de LB durante 24 h con agitación 130 rpm y 37 °C en el caso de *E. Coli* y 28 °C en el caso de *A. tumefaciens*.

Para criopreservar su viabilidad, se almacenaron diluyendo el cultivo celular con una disolución acuosa de glicerol al 50 %, en una relación 1:1 (v/v), congelándose inmediatamente en nitrógeno líquido para ser almacenadas a -80 °C.

#### **4. Estudio de interacción At/PsPYR1 como diana nuclear de At/PsTRXo1**

En trabajos previos se identificaron una serie de posibles proteínas diana nucleares de PsTRXo1 utilizando la proteína recombinante PsTRXo1-His purificada en nuestro laboratorio, y extractos de proteínas nucleares de guisante tras cromatografía de afinidad, tal y como se describe en Martí y col. (2009). Tras electroforesis bidimensional se secuenciaron por espectrometría de masas las diferentes posibles proteínas nucleares dianas de PsTRXo1 y entre ellas se encontró a PsPYR1 (Ortiz-Espín y col, 2015). En esta Tesis se ha realizado el estudio que corrobora que PYR1 es efectivamente diana de PsTRXo1 y para ello se han utilizado diferentes técnicas que se describen a continuación.

##### **4.1. Dot-Blot trampa**

Se prepararon dos tiras de membrana de nitrocelulosa (A y B) (Hybond, Amersham Pharmacia, Reino Unido) y en cada una de ellas se depositaron 5 gotas de igual volumen (10 µl): una con 1 µg y otra con 0,5 µg de sendas proteínas recombinantes PsTRXo1 y PsTRXo1CAM (Centro activo mutado en una Cys, Martí y col., 2009), y una gota con 10 µg de BSA (albúmina de suero bovino, Sigma-Aldrich, como control negativo). Una vez adsorbidas las proteínas a la nitrocelulosa, se realizó un lavado de 5 minutos con TBS (25 mM Tris-HCl; pH 7,5) y se bloqueó la membrana A mediante incubación en tampón TBSTL (25 mM Tris-HCl; pH 7,5 que contiene 5% (p/v) de leche en polvo (Hero baby nutrasense) y 0,1% (v/v) Tween-20); y la membrana B en tampón TBSTA (25 mM Tris-HCl; pH 7,5 que contiene 1% (p/v) (BSA,) y 0,1% (v/v) Tween-20) durante una hora a

temperatura ambiente. Luego, las membranas se cubrieron con 10 µg/ml de proteína recombinante AtPYR1 disuelto en TBS y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. La membrana A se reveló con el anticuerpo policlonal anti-PYR1 (ver sección de materiales y métodos 10) diluido en TBSTL y la membrana B se incubó con anti-PsTRXo1 policlonal (Martí y col., 2009) (ver sección de materiales y métodos 10), diluido en TBSTA. Después de un lavado exhaustivo con TBS que contiene Tween 20, se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo para el anticuerpo primario monoclonal o policlonal, respectivamente, acoplado a la peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare) a diluciones de 1:5000 y 1:10,000, respectivamente. El kit ECL (Pierce) se utilizó para la visualización de proteínas.

#### **4.2. Co-Inmunoprecipitación PsTRXo1-AtPYR1-His**

La co-inmunoprecipitación de las proteínas PsTRXo1 y AtPYR1 se realizó mediante el uso del kit comercial µMACS Anti-His MicroBeads (MACS Miltenyi Biotec). Para ello se dispusieron en distintos tubos eppendorfs las combinaciones de proteínas (His-AtPYR1-PsTRXo1; His-AtPYR1-PsTRXo1CAM) susceptibles de interaccionar (4 µg de cada proteína) y se diluyeron en 500 µl de “tampón de lisis” aportado por el kit (50 mM Tris-HCl; pH8; 150 mM CaCl<sub>2</sub>). De esta dilución se separó una fracción de 50 µl que serviría como control de carga en la columna. Se añadieron 50 µl de µbeads Anti-His y se incubó la mezcla de proteínas durante 2 horas a 4°C en agitación por inversión.

Se colocaron las columnas magnéticas que ofrece el kit según las indicaciones del fabricante en el soporte diseñado para ello y se prepararon las columnas haciendo pasar 200 µL de tampón de lisis a su través. Una vez terminó el tiempo de incubación entre las proteínas y las µbeads Anti-His, se pasó la solución a través de las columnas recogiendo el líquido eluido en un tubo eppendorf nuevo. La columna fue lavada 4 veces con 200 µl de tampón de lavado 1 (150 mM NaCl; 1% Igepal CA-630; 0,5% deoxicolato de sodio; 0,1% SDS; 50 mM Tris-HCl; pH 8,0) y enjuagada después con 100 µl de tampón de lavado 2 (20 mM Tris-HCl; pH 7,5). Se añadieron entonces 20 µL de tampón de elución precalentado a 95°C a la columna y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 50 µL de tampón de elución precalentado a 95°C a la columna y se recogió el eluido donde se encuentran las proteínas AtPYR1-His inmunoprecipitadas y

aquellas proteínas que hayan podido interactuar con ella. El eluido se analizó mediante SDS-PAGE (ver sección de materiales y métodos 5.5.1.).

### **4.3. Complementación bimolecular fluorescente (BiFC) por biobalística**

El fundamento de la técnica de complementación por BiFC se basa en la fusión traduccional de sendas mitades de la proteína fluorescente verde GFP a dos proteínas de interés, las cuales en caso de interactuar aproximarían lo suficiente las dos mitades de la GFP complementándolas y emitiendo entonces fluorescencia al ser excitada con un luz de longitud de onda adecuada.

Para llevar a cabo la fusión de las proteínas de interés a las mitades de la GFP se usaron las construcciones descritas en la sección de materiales y métodos 3.8.5. Además se usó un vector pCD-3 con la proteína RFP como marcador de membrana que se incluyó en todas las combinaciones probadas y otro vector con la versión completa de la GFP que se usó como control positivo. Con estas construcciones se realizó la expresión transitoria en epidermis de cebolla transformada mediante bombardeo biolístico, utilizando una pistola de genes, según la siguiente metodología:

#### **4.3.1. Preparación de los microproyectiles**

Para la preparación de los microproyectiles se usaron partículas de oro de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro (Bio-Rad) como describen en Taylor y Vasil (1991). Se pesaron 30 mg de partículas y se resuspendieron en 1 ml de etanol absoluto agitándolas con vórtex durante un minuto. Posteriormente se aplicó un spin hasta llegar a 13.000 xg y se descartó el etanol sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 500  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril, y se repitió hasta dos veces el lavado de etanol con agua. Finalmente se resuspendieron la partículas de oro en 500  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril a una concentración final de 60 mg/ml. De este stock de partículas de oro se utilizaron 18  $\mu\text{l}$  para cada combinación de plásmidos. Las partículas de oro, justo después de sonicarse para mantenerlas en solución, se depositaron en el fondo de un tubo eppendorf (1,5 ml) y se fueron añadiendo, en forma de gotas adheridas a la pared del tubo, el resto de componentes: 50  $\mu\text{l}$  de 2,5 M  $\text{CaCl}_2$ , 20  $\mu\text{l}$  de 100 mM espermidina y 2,5  $\mu\text{l}$  de ADN

plasmídico a una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de cada construcción. La forma de añadir sin mezclar los distintos componentes se debe a que el  $\text{CaCl}_2$  precipita el DNA e impediría una unión homogénea del DNA a los microproyectiles. Una vez añadidos todos los elementos se aplicó vórtex durante 30 segundos para asegurar su mezcla homogénea. Después de aplicar un spin hasta 13.000 xg, se retiró el sobrenadante y se sustituyó por 50  $\mu\text{l}$  de 100% (v/v) etanol. Este paso se repitió dos veces. La muestra se dejó en hielo y justo antes de usarla se sonicó durante 30 segundos para evitar la formación de agregados entre los proyectiles.

#### **4.3.2. Preparación del material vegetal**

La transformación se realizó sobre tejido epidérmico de bulbo de cebolla (*Allium cepa*) que fue separado del resto del bulbo en condiciones de esterilidad y dispuesto extendido sobre placas Petri de 45 mm que contenía medio MS/2 (Murashige y Skoog 1962), 15 g/l sacarosa y 3,8 g/l fitogel.

#### **4.3.3. Condiciones de bombardeo**

El tejido epidérmico fue bombardeado con la pistola DuPont (PDS-1000 Helium Biolistic Delivery System), siguiendo las condiciones descritas por Diaz y col. (2005). Se dejaron secar unos 7  $\mu\text{l}$  de las partículas de oro recubiertas con el ADN recién sonicadas sobre discos de ruptura de 1100 psi y se dispararon a una distancia de 7 cm del tejido. La presión de helio se ajustó a 12,5 MPa y la pistola se disparó tras alcanzar una presión de vacío de 27 mm Hg. Tras el bombardeo cada placa se mantuvo a 26°C en oscuridad hasta seis días.

#### **4.3.4. Microscopía confocal**

Entre las 24 y las 96 h después del bombardeo se observaron las muestras en busca de señal fluorescente de la GFP con el uso de un microscopio confocal (Leica TCS-SP8) usando una longitud de onda de excitación de 492 nm para la GFP y de 581 para la RFP, y unas longitudes de onda de emisión de 552 nm para la GFP y 665 nm para la RFP. Las

imágenes fueron analizadas con un objetivo invertido 40× y procesadas usando el software Leica SP8.

#### **4.4. Complementación bimolecular fluorescente BiFC por agroinfiltración**

Con la intención de confirmar los resultados obtenidos por biolística se recurrió a la transformación de plantas de *N. benthamiana* por medio de la infección con *A. tumefaciens* previamente transformados con las construcciones descritas en la sección de materiales y métodos 3.8.6.

##### **4.4.1. Preparación de *Nicotiana benthamiana***

Las plantas de *N. benthamiana* fueron germinadas y cultivadas por el servicio de invernaderos del IBMCP, (ver sección de materiales y métodos 1.1.). Dos días antes de ser infiltradas las plantas se pasaron a una cámara de cultivo o fitotrón Sanyo (modelo MLR-351 en fotoperiodo de día largo: 16 horas de luz: 8 horas de oscuridad, 22°C y 20°C, respectivamente con una intensidad lumínica de 150  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  con lámparas fluorescentes blancas frías y un 60% de humedad relativa), para su aclimatación. La mañana previa a la infiltración las plantas fueron pulverizadas con agua milliQ varias veces para aumentar la humedad relativa y provocar un aumento de la apertura estomática que favoreciera la infiltración de las soluciones bacterianas.

##### **4.4.2. Preparación de *Agrobacterium tumefaciens***

Las distintas líneas de *A. tumefaciens* previamente transformadas con los pDestiny (pCX, pXC, pNX, pXN) incluyendo los genes PSTRXo1 y AtPYR1, así como una línea que contenía el plásmido p19 que inhibe el silenciamiento génico que podría darse por parte de la planta hospedadora, fueron inoculadas en precultivos de 3 ml de LB adecuadamente suplementado con los antibióticos necesarios para la selección de clones. Como controles positivos de interacción se utilizaron bacterias transformadas con los mismos plásmidos y los genes ATML1 y PDF2 cuyas proteínas interaccionan según demostraron por BiFC (Rombolá-Caldentey y col., 2014).

Tras dos días creciendo a 28°C en agitación 220 rpm en oscuridad, los precultivos se encontraban saturados, y se usaron 70 µl de estos precultivos para inocular un cultivo de 5 ml al que se dejó crecer toda la noche en las condiciones óptimas anteriormente mencionadas. A la mañana siguiente se midió la densidad óptica de diluciones 1/10 de los cultivos y éstos se centrifugaron a 3000 xg durante 15 minutos. El sedimento bacteriano se resuspendió en un volumen de solución de inducción (10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MES; 100 µM acetosiringona) diluyéndolo de modo que la DO<sub>600</sub> final fuera 3. Las bacterias se incubaron durante 3 horas en esta solución para activar sus genes vir (necesarios para la transferencia e incorporación del fragmento de ADN en el genoma de la planta) (Stachel y col. 1985), tras lo cual se mezclaron en tubos nuevos las diferentes líneas bacteriana en una proporción 1:1:1 según las distintas combinaciones de construcciones a ensayar. En todas las combinaciones se incluyó la línea de bacterias portadoras del vector p19 para la inhibición del silenciamiento génico. El volumen añadido de cada línea bacteriana a la mezcla de infiltración fue tal que su DO<sub>600</sub> final en de la mezcla fue de 0,3 para lo cual hubo que diluir con solución de inducción. Una vez hechas las combinaciones se infiltraron en las plantas con la ayuda de una jeringuilla de 1 ml aplicando una suave presión entre la salida de la jeringuilla por el envés y la yema de un dedo por el haz de la hoja, introduciendo con cuidado el cultivo bacteriano en el mesófilo de la hoja.

#### **4.4.3. Microscopía confocal**

Pasadas 72 horas desde la agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* se realizaron discos foliares mediante el uso de un sacabocados. La fluorescencia presente en estos discos foliares fue analizada con el uso de un microscopio confocal LSM 780 de Zeiss usando un objetivo Apochromat 40X/1.2W. Se aplicó un zoom de 0,6 y 1,2 a las imágenes generales, y un 2,4 cuando se mostró en detalle algún núcleo. Para la detección de la fluorescencia se usó una excitación en la línea 488 al 2% de transmisión (MBS; dicroico 488) y la emisión fue detectada en el rango de 495-536 nm (ganancia del PMT a 900) para la GFP y en el rango 684-758 nm (ganancia del PMT a 708) para la clorofila. El software utilizado para la captación de imágenes fue Zen 2011.

#### **4.5. Caracterización fisiológica de respuesta a ABA.**

##### **4.5.1. Respuesta estomática a ABA.**

Para examinar el movimiento estomático, se siguió el método descrito por Eisele y col (2016) levemente modificado. A primera hora del periodo de luz (con la mayoría de los estomas abiertos), se separaron 2 hojas por planta completamente expandidas cortando la base del peciolo con un bisturí. Se retiró la epidermis del haz de las hojas con ayuda de cinta adhesiva. El peeling obtenido se cortó en tres de modo que una parte se observó a tiempo cero para conocer la apertura de partida que presentaban los estomas. Otra parte del peeling se incubó a 23 °C durante 2,5 horas en luz  $100 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$  (PAR)) flotando en un tampón MES-KOH compuesto por 10 mM MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico); 10 mM KCl; pH: 6,15 ajustado con KOH. Otra parte se incubó en las mismas condiciones en ese tampón pero conteniendo 10  $\mu\text{M}$  ABA disueltos en MES-KOH. Terminado el tiempo de incubación se realizó una tinción con 0,5  $\mu\text{M}$  Rodamina 6G durante 5 minutos en oscuridad. Tras lavar el peeling con tampón MES-KOH para quitar el exceso de tinción se observó la epifluorescencia que permitió dar contraste a la células guarda y analizar la apertura estomática en un microscopio Leica CTR6 (objetivo 40x, con luz de excitación a 541 nm y 565 nm de luz de emisión). El análisis de la imagen se realizó con el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). El índice de apertura estomática se calculó por división del ancho de la abertura estomática por la longitud. Se analizaron al menos 25 estomas por hoja y se usaron cuatro hojas por cada genotipo y tratamiento para el análisis estadístico.

##### **4.5.2. Germinación en presencia de ABA.**

Se dispusieron varias placas con agar 8 g/l en agua milliQ estéril que tras ser autoclavado se dejó enfriar hasta unos 50°C y se añadieron las cantidades de ABA racémico necesarias para obtener unas concentraciones finales en el medio de 0 (control), 0,3  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ . Tras agitar el medio se dispuso en placas cuadradas de 10x10 cm. Para analizar la respuesta de las plantas mutantes KO1 y sobre-expresantes OEX a ABA durante la germinación se dispusieron unas 20 semillas por placa de cada

genotipo junto con el silvestre (WT), y dos genotipos control cedidos por el laboratorio del Dr. José León Ramos del IBMCP (Valencia): el triple mutante *PP2C* (*hab1abi1pp2ca*) como genotipo de hipersensibilidad a ABA y el cuádruple mutante *PYR/PYL* (*pyr1pyl1pyl2pyl4*) como genotipo de hiposensibilidad a ABA.

Las semillas fueron esterilizadas y estratificadas como se indica en la sección de materiales y métodos 1.3.3. Tras la estratificación de las semillas se dejaron germinar en las placas en una cámara de cultivo con las condiciones de fotoperiodo largo descritas en la sección de materiales y métodos 1.3.2 de materiales y métodos.

Por observación a la lupa se registraron los porcentajes de germinación respecto al total de semillas a distintos tiempos: 0, 14, 18, 24, 34 y 48 horas.

Los resultados presentados son promedio de 3 experimentos independientes llevados a cabo con 20 semillas de cada genotipo y tratamiento.

## 5. Proteómica

### 5.1. Extracción de proteínas totales

Para la obtención de muestras proteicas foliares procedentes de plantas de *A. thaliana*, se emplearon entre 0,1-1 g de hojas las cuales se homogeneizaron mediante el uso de un mortero con nitrógeno líquido. El tejido pulverizado se disolvió en un tampón de extracción con una composición ligeramente distinta según el objetivo final del ensayo. Para extraer proteínas desnaturalizadas se usó un tampón compuesto por 50 mM fosfato potásico; pH 7,8; 0,1 mM EDTA; 0,2 % Tritón X-100; 1% PVP y una mezcla de inhibidores de proteasas 25x (Roche™). Cuando se quisieron extraer proteínas para medir ciertas actividades enzimáticas o trabajar con proteínas nativas, el tampón contenía BSA y cisteína como agente reductor para impedir la oxidación y pérdida de actividad: 50 mM Tris-HCl pH 7,8; 0,05% (p/v) Cys y 0,1% (p/v) BSA. Una vez homogeneizado el tejido se centrifugó a 13.000 ×g durante 20 min a 4°C, y se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf. En este sobrenadante se midió la concentración de proteínas y se usó para realizar los ensayos pertinentes. En el caso de

que la concentración de proteínas de la muestra fuese menor de 0,5 µg/µl se procedió a concentrarlas usando filtros Amicon™ Ultra-0.5ml 3K (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante (ver sección de materiales y métodos 5.7.).

### **5.2. Extracto enriquecido en mitocondrias (EEM)**

Los extractos enriquecidos en proteínas mitocondriales se obtuvieron en fresco a partir de 1-2 gramos de hojas de roseta de plantas de *Arabidopsis* cultivadas en placa (ver sección de materiales y métodos 1.3.2). Utilizando un mortero enfriado a 4°C, las hojas se maceraron durante 30 minutos en tampón escarchado (0,25 M sacarosa; 1,5 mM EDTA; 15 mM MOPS; pH 7,4; 0,6% PVP; 0,4% BSA; 0,1 mM PMSF) en una proporción 1/3 (p/v), evitando turbulencias. El extracto se filtró por una entretela de 50 µm de poro y se mantuvo en hielo. El material vegetal retenido en la entretela se volvió a homogeneizar con el mismo volumen de tampón de extracción usado anteriormente para de nuevo ser filtrado y completar el volumen de extracto con una proporción material vegetal/tampón de 1/6. Este extracto bruto filtrado se centrifugó a 2.200xg durante 5 minutos a 4°C, el sobrenadante se pasó a un nuevo tubo y se repitió la centrifugación. De nuevo se descartó el sedimento y el sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo donde se expuso a una centrifugación de 18.000xg durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en un tampón adecuado para su posterior uso. Esta suspensión final es la denominada como extracto enriquecido en mitocondrias (EEM). Cuando se quiso obtener el EEM para un posterior aislamiento de mitocondrias, el buffer usado para la resuspensión fue el tampón de gradiente (0,3 M sacarosa; 10 mM MOP-KOH; pH 7,2). Sin embargo cuando el EEM se obtuvo para ensayos posteriores de actividad SOD o contenido de proteína AOX se usó un tampón de resuspensión de 0,25M Sacarosa; 1,5 mM EDTA; 15 mM MOPS; pH7,4; 0,6% PVP; 0,1mM PMSF; 0,1% Triton-X100. El extracto entonces se incubó en agitación 30 min a 4°C y se centrifugó a 14.000xg durante 10 minutos. Posteriormente se usó el sobrenadante para la medida de proteínas y la electroforesis en condiciones nativas para la actividad SOD o en condiciones desnaturizantes para la AOX (ver sección de materiales y métodos 5.5.1). En el caso de los ensayos para la detección por western blot de la AOX, todos los tampones contenían 50 mM NEM.

### **5.3. Aislamiento de mitocondrias**

Para la obtención de preparaciones de mitocondrias purificadas, se partió de 10-15 g de hojas de roseta de *Arabidopsis* cultivadas en placas y se obtuvo un extracto enriquecido en mitocondrias como se describe en el apartado anterior. Posteriormente se usó un gradiente de densidad de percoll tal como describen Keech y col. (2005) con las siguientes modificaciones: el medio de extracción contenía 0,25 M sacarosa; 1,5 mM EDTA; 4 mM cisteína; 15 mM MOPs-KOH; pH 7,4; 0,4% BSA; 0,6% PVP-40; el medio de lavado contenía 0,3M sacarosa; 1 mM EGTA; 0,2 mM PMSF; 10 mM MOPs-KOH pH 7,2 y el gradiente de percoll del 27/45% en un tampón que contenía 0,3 M sacarosa; 10 mM MOP-KOH; pH 7,2. Para la extracción de APX, se incluyó 20 mM ácido ascórbico en el tampón de extracción y 2 mM en el de lavado, y además se omitió el EDTA y EGTA.

### **5.4. Expresión y purificación de proteínas recombinantes**

#### **5.4.1. Expresión de proteínas en *E. coli***

A partir de un stock glicerolado o bien de bacterias recién transformadas BL21, se sembraron por triple estría en placas con LB-agar suplementado con el antibiótico adecuado para seleccionar los clones positivos. Se dejaron entonces crecer durante toda la noche a 37°C en oscuridad y a la mañana siguiente se usó una única colonia de cada línea para inocular precultivos de 5 ml de LB líquido suplementado con el antibiótico adecuado en tubos falcon de 50 ml. Paralelamente la colonia seleccionada se replicó en otra placa con el mismo medio sólido. El precultivo fue incubado toda la noche a 37°C en oscuridad y agitación a 220 rpm. Al día siguiente se usó 1,5 ml de este precultivo para inocular 50 ml de LB suplementado con el antibiótico adecuado en matraces Erlenmeyer de 250 ml y se dejaron crecer a 37°C en agitación a 220 rpm hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica ( $DO_{600nm}$ ) = 0,5 – 0,7; de este cultivo se separó una alícuota de 500 µl del cultivo para su posterior análisis por SDS-PAGE como control del cultivo sin inducir. Se añadió IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) como inductor del promotor del gen de interés a una concentración final en el cultivo de 1 mM. Se mantuvo el cultivo durante 3h a 37°C en agitación a 220 rpm y se separó una alícuota

del cultivo para su posterior análisis por SDS-PAGE como control del cultivo inducido. El resto del cultivo inducido se enfrió en hielo durante 5 minutos y se centrifugó durante 12 minutos a 4.500 xg a 16°C, se descartó el sobrenadante y se congeló el pellet almacenándolo a -80°C hasta su uso posterior.

Las alícuotas separadas para el control del proceso de inducción fueron centrifugadas durante 3 min a 15.000xg, se descartó el sobrenadantes y el precipitado se resuspendió en buffer Laemmli 1x (375 mM Tris-HCl; pH 6,8; 0,3% (v/v) glicerol; 0,15% (p/v) azul de bromofenol). Posteriormente se aplicó vórtex durante 1 minuto y se sometieron a 95°C durante 10 minutos para posteriormente ser analizadas por SDS-PAGE. Tras la electroforesis y la tinción con “Thermo Scientific Imperial” (con tinte Coomassie R-250) se pudieron diferenciar las inducciones de las proteínas como un aumento de la intensidad de las bandas en los pesos moleculares esperados.

#### ***5.4.2. Purificación de las proteínas recombinantes AtPYP1 y PsTRXo1CAM con tag de Histidina.***

Confirmada la inducción se procedió a la purificación de las proteínas recombinantes con colas de histidina (-His) mediante el uso de columnas con resina de Ni-NTA Agarose (Quiagen). El sedimento bacteriano congelado a -80°C (ver sección de materiales y métodos 5.4.1) se resuspendió en 2 ml de tampón de sonicación (50 mM Tris-HCl; pH 7,6; 250 mM KCl; 10% glicerol, autoclavado a 120°C durante 20 minutos; añadiendo justo antes de su uso 0,1% Tween-20 y 10 mM  $\beta$ -Mercaptoetanol) y se almacenó a 4°C. Una vez resuspendido y manteniéndolo en hielo, se realizó la sonicación aplicando las siguientes condiciones: a 4 °C se aplicaron pulsos de 15 segundos con un 80% de amplitud, durante 2 minutos con pausas de 20 segundos.

El extracto bacteriano se centrifugó a 15.000 xg durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue diluido con tampón de sonicación hasta los 6 ml y se cargaron poco a poco en la columna de 0,5 ml de resina Ni-NTA. Se lavaron las columnas con 10 ml de tampón de lavado (50 mM Tris-HCl; pH 7,6; 250mM KCl; 20% glicerol; 30 mM imidazol; 0,1% Tween-20; 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol añadido justo antes de su uso) y se almacenaron a 4°C. Se eluyeron las proteínas adheridas a la columna mediante el paso

de tampón de elución (50 mM Tris-HCl; pH 7,6; 250 mM KCl; 20% glicerol; 250 mM imidazol; 0,1% Tween-20; 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol añadido justo antes de su uso) recogiendo las distintas fracciones eluidas de 0,2 ml cada una que se almacenaron a -20 °C. En las fracciones 3, 4, 5 y 6 se recogieron proteínas con concentraciones de entre 2,6-6,6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Según el método descrito se purificaron las proteínas AtPYR1-His y PsTRXo1CAM-His utilizadas en esta Tesis. Estas proteínas fueron analizadas por SDS-PAGE permitiendo confirmar su correcto peso molecular, integridad y estado de oligomerización.

#### **5.4.3. Eliminación del tag de Histidina en PsTRXo1CAM.**

En el caso de ser necesaria la eliminación de la etiqueta His de las proteínas recombinantes, se utilizó el “Thrombin CleanCleave™ Kit” de Sigma-Aldrich siguiendo las instrucciones del fabricante según se detalla a continuación:

##### **5.4.3.1. Preparación de la muestra.**

Se realizó un cambio de tampón de una de las alícuotas en las que se eluyó la proteína purificada por cromatografía de afinidad con las resinas Ni-NTA. Para ello se usaron los filtros de Amicon (ver sección de materiales y métodos 5.7.) sustituyendo el tampón de elución por el tampón de escisión (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, con 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ).

##### **5.4.3.2. Preparación de la columna**

Se resuspendió la resina de trombina-agarosa (50% en glicerol, 50% en 20 mM Tris-HCl, pH 8,2) obteniendo una suspensión homogénea y se separó una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  en un tubo eppendorf, centrifugándose a 2.500 rpm para sedimentar la resina y retirar el sobrenadante. Se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de tampón de escisión para resuspender la resina por inversión. Se volvió a centrifugar a 2.500 rpm y a eliminar el sobrenadante. Esto se repitió dos veces y la columna quedó preparada para su uso.

#### **5.4.3.3. Escisión de etiqueta de histidina en PsTRXo1CAM**

Se resuspendió la resina en tampón de escisión 10x, se añadieron 400 µg de proteína PsTrox1CAM-His (125,5 µl de una de las fracciones eluidas de la columna de Ni-NTA, en la sección de materiales y métodos 5.4.2.) y se diluyó la mezcla en agua milliQ estéril hasta un volumen final de 1 ml. Esta mezcla se incubó durante 8 horas a 25°C en agitación. Se centrifugó la mezcla a 2.500 rpm durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante donde se encontraba la proteína sin histidina. Este sobrenadante fue analizado por SDS-PAGE y se pudo comprobar el cambio de movilidad electroforética entre la proteína con la etiqueta de histidina y la proteína sin histidina tratada con la trombina.

### **5.5. Electroforesis de proteínas**

#### **5.5.1. Electroforesis nativas y desnaturalizantes: PAGE y SDS-PAGE**

La electroforesis permite separar moléculas en función de su carga eléctrica debido a su distinta movilidad a través de un gel de acrilamida/bisacrilamida sometido a un campo eléctrico. Cuando las electroforesis se realizan sin desnaturalizar las proteínas, se denominan electroforesis nativas y la velocidad de migración en estos casos es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. El desplazamiento de las proteínas a través del gel es más rápida cuanto mayor es la carga por unidad de masa. En estos casos la electroforesis se realizó a 4°C y en ausencia de SDS tanto en el gel como en el tampón de carga (Laemmli 1x: 375 mM Tris-HCl; pH 6,8; 0,3% (v/v) glicerol; 0,15% (p/v) azul de bromofenol) (Laemmli, 1970).

Sin embargo en condiciones desnaturalizantes, las proteínas se separan en base a su masa ya que el SDS es un detergente aniónico que desnaturaliza y confiere una carga negativa a las proteínas proporcionalmente a su masa; de esta manera la separación depende sólo de los tamaños moleculares. Para estos casos el extracto proteico se calentó en presencia del tampón de carga Laemmli 1x con 1,5% SDS a 95°C durante 5-10 minutos antes de ser cargados en los pocillos del gel de electroforesis (0,1% SDS).

Cuando se han requerido condiciones reductoras para reducir puentes disulfuro y romper subunidades oligoméricas, el calentamiento se realizó en presencia de un agente reductor como el DTT o el 2-mercaptoetanol disuelto en el tampón de carga (Laemmli 1x).

Para analizar los extractos proteicos se siguió el método descrito por Laemmli (1970). En este trabajo se han usado geles discontinuos compuestos de un gel concentrador de acrilamida:bisacrilamida (38:1) al 6% (p/v) y de un gel separador al 15% (p/v) en el sistema MiniProtean II (Bio-Rad). Los geles tenían un tamaño 8,6 x 6,8 cm y un grosor de 0,75 a 1,5 mm. La polimerización de los geles se llevó a cabo con persulfato amónico a una concentración final del 0,1% (p/v) y TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) como catalizador a una concentración final del 0,01% (v/v). Como tampón de desarrollo electroforético se usó un tampón Tris-Glicina formado por 25 mM Tris-HCl pH 8,3; 192 mM Glicina y en condiciones desnaturizantes 0,1% (p/v) SDS. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 100 V durante 2 h. La cantidad de proteínas por calle osciló entre 25 y 80 µg por muestra, excepto para proteínas recombinantes, donde el rango oscilaba entre 1 y 15 µg. El tratamiento de las muestras en condiciones desnaturizantes se hizo de la siguiente manera: adición del tampón de carga en una proporción 2:1 (muestra:tampón), 375 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,3% (v/v) glicerol; 10 mM DTT; 0,15% (p/v) azul de bromofenol y en condiciones desnaturizantes 1,5% (p/v) SDS, e incubación a 98°C durante 5 min. Como marcadores de masa molecular se emplearon múltiples estándares comerciales como los standards de Bio-Rad: Prestained SDS-PAGE y Kaleidoscope Prestained, cuyo rango abarca desde aproximadamente 7 a 200 kDa.

Las proporciones relativas de poliacrilamida y bis-acrilamida determinan la porosidad del gel, siendo menor cuanto menor es la relación acrilamida/bis-acrilamida (tabla 11), en cada caso se optimizó esta proporción según el rango de peso molecular que se quisiera separar.

**Tabla 11. Porcentajes de poliacrilamida/bis-acrilamida aplicado en electroforesis SDS-PAGE según la proteína de estudio.**

<b>Proteína objetivo</b>	<b>% poliacrilamida/bis-acrilamida</b>
<b>TRXo1</b>	<b>15</b>
<b>AOX</b>	<b>15</b>
<b>Mn-SOD</b>	<b>12</b>

## **5.6. Tinción de proteínas**

### **5.6.1. Tinción con Coomassie**

Para la tinción de proteína con azul de Coomassie, el gel se sumergió tras la electroforesis en una solución de 0,25% (p/v) azul brillante Coomassie R-250 diluido en 50% (v/v) metanol, y se agitó suavemente durante 45-60 min (Garfin, 1990). Transcurrido ese tiempo, se eliminó dicha solución de tinción y se sustituyó por la solución decolorante compuesta por 50% (v/v) metanol y 10% (v/v) acético, donde el gel se mantuvo en agitación y con frecuentes cambios de dicha solución para eliminar el colorante extraído. La decoloración se realizó durante el tiempo necesario para que las bandas de proteína se hicieran patentes y el fondo del gel quedase claro. Con esta técnica se detectaron cantidades de proteína del orden de 0,1–1 µg.

### **5.6.2. Tinción con PageBlue™**

La tinción con PageBlue™ (Fermentas) es una tinción que está basada en el protocolo de tinción con azul de Coomassie pero presenta entre otras, la ventaja de que permite detectar cantidades de proteína del orden de los 5 ng. Para llevarla a cabo, el gel tras la electroforesis se lavó con agua bidestilada (3 x 10 min) para eliminar el SDS y las proteínas de menor tamaño se fijaron durante 15 min con una solución de 25% (v/v) isopropanol al y 10% (v/v) acético. Posteriormente, el gel se lavó de nuevo con agua bidestilada pero más suavemente, para eliminar los restos de fijador y se cubrió con solución PageBlue™ donde se mantuvo en agitación suave durante 60 min, tras lo cual se lavó de nuevo durante 5 min para su almacenaje.

### 5.6.3. Tinción con Imperial™

La tinción de proteínas con Thermo Scientific™ Imperial es una tinción que utiliza el tinte Coomassie R-250 para detectar cantidades de proteínas del orden de 3 ng. Es compatible con la secuenciación de proteínas y el análisis de espectrometría de masas posteriores. No requiere el uso de soluciones fijadoras ni decolorantes, solo lavados con agua. Para llevarla a cabo el gel se lavó tres veces durante 5 minutos con 50-100 ml de agua ultrapura, se añadió suficiente volumen del tinte, previamente agitado, para cubrir el gel y se siguieron las recomendaciones de tiempos de incubación y lavados con agua ultrapura indicadas por el fabricante (ver tabla 12).

**Tabla 12. Tiempos de incubación y lavado según la sensibilidad requerida para la detección de proteínas en un gel de electroforesis.**

Sensibilidad (ng)	Tiempo de incubación	Tiempo de lavado
≤ 3	2 horas	12 horas
de 3 a 6	1 hora	1-2 horas
de 6 a 12	5-10 minutos	3x 5 minutos

### 5.7. Concentración de proteínas

Para la concentración de soluciones de proteínas se utilizaron filtros Amicon™ Ultra-0,5mM 3K indicados para proteínas con tamaño molecular superior a 3.000 Dalton y con volúmenes inferiores a 1 ml. Además de concentrar rápidamente las proteínas, estos filtros permitieron la desalinización del homogenado o el intercambio de un tampón donde se encuentra una proteína por un tampón diferente, lo que en determinadas situaciones fue crucial para eliminar interferentes en posteriores pasos experimentales. En los casos en los que las muestras fueron tratadas con algún agente reductor u oxidante, también se usaron estos filtros siempre y cuando las concentraciones de dichos agentes no sobrepasaran las recomendaciones de compatibilidad indicadas por el fabricante. En los caso en los que no se cumplían dichas condiciones el compuesto fue eliminado de las muestras mediante cromatografía de exclusión molecular usando columnas específicas Micro Bio-Spin™ 6 Columns (Bio-Rad). En todo caso se siguieron las recomendaciones descritas por el fabricante.

### 5.8. Medida de concentración de proteínas

La cuantificación de la concentración de proteínas en solución se realizó mediante una adaptación del método de Bradford (1976), el cual es adecuado para soluciones de proteína con concentraciones menores a 20 mg/ml y está basado en el cambio de absorbancia a 595 nm que provoca el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 en la solución en presencia de los aminoácidos básicos y aromáticos existentes en las proteínas. Mediante interpolación del valor de absorbancia en la longitud de onda indicada sobre una recta estándar de BSA calibrada en un rango entre 0,156 y 5 mg/ml, se calculó la concentración proteica de la muestra problema.

El reactivo Bradford fue preparado en el laboratorio siguiendo la siguiente composición: 100 mg/l azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R; Sigma-Aldrich); 50ml/l de 96% etanol; 100 ml/l de 85% ácido ortofosfórico; agua milliQ hasta volumen final. Para su correcta preparación el azul de Coomassie fue previamente disuelto en etanol y protegido de la luz, una vez disuelto se mezcló con el ácido ortofosfórico y se enrasó con agua hasta el volumen final. Tras ser correctamente mezclado se filtró con papel de filtro a 4 °C y se almacenó en un recipiente de vidrio opaco a 4 °C. En ningún caso se usó después de 30 días de almacenamiento.

## 6. Actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas, expresadas en  $\text{nmoles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ , se calcularon a partir de la velocidad inicial de reacción ( $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ ) y del coeficiente de extinción molar correspondiente a los distintos sustratos de las respectivas enzimas (tabla 13).

**Tabla 13. Coeficientes de extinción molar de los sustratos de las distintas enzimas a las longitudes de onda detalladas.**

Enzima	Sustrato	Coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ )	$\lambda$ (nm)	$\Delta\text{Absorbancia}$
APX	ASC	$2,7 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	290	negativa

<b>DHAR</b>	DHA	$13,5 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	265	positiva
<b>MDHAR</b>	NADH	$6,2 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	340	negativa
<b>GR</b>	NADPH	$6,2 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	340	negativa
<b>CAT</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$39,58 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	240	negativa
<b>LDH</b>	NADH	$6,2 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	340	negativa
<b>G3PDH</b>	NADPH	$6,2 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	340	negativa
<b>CCO</b>	Cit. C	$21 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	550	negativa

### 6.1. Marcadores organulares

En este trabajo se han medido actividades enzimáticas en extractos proteicos de mitocondrias purificadas (ver sección.5.3.) procedentes de *Arabidopsis thaliana* cultivadas durante 21 días en cultivo in vitro (ver sección 1.3.2.). Para ello los extractos mitocondriales se trataron previamente con tampón fosfato 50 mM, pH 7,8, que contenía 0,1% (v/v) de Tritón X-100 durante 5 min a 4°C. El rendimiento de las mitocondrias purificadas se estimó a partir de la actividad de la citocromo c oxidasa (CCO), mientras que la integridad de la membrana externa de la mitocondria se determinó según la actividad de la succinato : citocromo c oxidoreductasa, según lo descrito por Jiménez y col. (1997). Las enzimas marcadoras como lactato deshidrogenasa (LDH), NADP-gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (G3PDH) y catalasa (CAT) se utilizaron para evaluar la pureza de las mitocondrias aisladas y la ausencia de contaminación por citoplasma, cloroplastos y peroxisomas, respectivamente según Jiménez y col. (1997).

Para la actividad Citocromo C oxidasa (EC 1.9.3.1) se empleó el método descrito por (Smith, 1955; Tolbert y col., 1968) basado en la disminución de la absorbancia a 550 nm debido a la oxidación del citocromo c con un coeficiente molar de  $21 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ . La mezcla de reacción en un volumen de 1,5 ml contenía 1,25 ml de tampón 100 mM fosfato potásico pH 7 con 0,4 mM ditionito sódico y 24  $\mu\text{M}$  citocromo C; 200  $\mu\text{l}$  de 0,5% Tritón X100 y 50  $\mu\text{l}$  de muestra con unos 10-30  $\mu\text{g}$  de proteína. La reacción se inició por adición de la muestra.

Para la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) (EC.1.1.1.27.) se empleó el método espectrofotométrico descrito por Bergmeyer, (1965) basado en la medida de la caída de absorbancia a 340 nm debida a la desaparición de NADH con un coeficiente molar de  $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . La mezcla de reacción en un volumen de 1 ml, contenía tampón 33,75 mM fosfato sódico; pH 7,5; 100  $\mu\text{l}$  de 100 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 50  $\mu\text{l}$  de 1 M KCl; 50  $\mu\text{l}$  de 100 mM glutatión reducido (GSH); 50  $\mu\text{l}$  de 2,8 mM NADH; 50  $\mu\text{l}$  de 10 mM  $\beta$ -OH-ácido pirúvico y 10-30  $\mu\text{g}$  de proteína. La reacción se inició por adición de  $\beta$ -OH-ácido pirúvico. El registro se realizó midiendo frente a un blanco de tampón fosfato sódico.

Para la actividad NADP-gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (G3PDH) se empleó el método espectrofotométrico descrito por Holtum y Winter (1982) basado en la medida del descenso de absorbancia a 340 nm por desaparición del NADPH con un coeficiente molar de  $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . La mezcla de reacción en un volumen de 1 ml, contenía tampón Bicina-Hepes-  $\text{MgCl}_2$  compuesto por 25 mM HEPES; 25 mM Bicina; 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ; pH 9 ajustado con 1 N NaOH; 2 mM DTT; 16  $\mu\text{l}$  de 5 mM NADPH; 3 IU Fosfoglicerato kinasa (PGK); 50  $\mu\text{l}$  de 60 mM Ácido fosfoglicérico; 50  $\mu\text{l}$  de 20 mM ATP y 10-30  $\mu\text{g}$  de proteína. La reacción se inició por adición de ATP. El registro se realizó midiendo frente a un blanco de tampón Bicina-Hepes- $\text{MgCl}_2$  con 2 mM DTT.

Para la determinación de la actividad CAT (EC 1.11.1.6) se empleó el método espectrofotométrico descrito por Aebi (1984) que está basado en la medida de la disminución de la absorbancia a 240 nm motivada por la desaparición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  con un coeficiente de extinción molar de  $39,58 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . La mezcla de reacción en un volumen de 1 ml, contenía tampón 0,1 M fosfato potásico; pH 7,2; 5  $\mu\text{l}$  de 3,8 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 10-30  $\mu\text{g}$  proteína. La reacción se inició por la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El registro se efectuó midiendo frente a un blanco de tampón fosfato.

Para determinar la integridad de las mitocondrias aisladas se siguió el método de Douce y col. (1973). Que cuantifica espectrofotométricamente la reducción del citocromo c a 550 nm catalizada por la succinato:citocromo c oxidorreductasa (EC 1.3.99.1) localizada en la cara exterior de la membrana interna de las mitocondrias. Los valores de actividad obtenidos en este método son indicativos de la integridad de la membrana externa que es permeable a moléculas menores a 104 Daltons por lo que el

succinato puede atravesar la membrana externa pero el citocromo c exógeno no puede entrar a su través. La reacción se llevó a cabo a 25 °C en un espectrofotómetro Jasco V-630, en cubetas de 3 ml tanto en condiciones hipotónicas (tampón 5 mM fosfato potásico; pH 7,2; 0,05 mM citocromo c; 1mM KCN; 200 μM azida sódica y 50 μl de la suspensión de mitocondrias) como en condiciones isotónicas (misma composición en presencia de 0,3 M sacarosa). La reacción comenzó con la adición de 10 mM succinato sódico, y se siguió el incremento de la absorbancia durante 3 minutos. La integridad de las mitocondrias se expresó en forma de porcentaje utilizando la siguiente expresión:

$$\% \text{ Integridad} = 100 - (\text{Actividad de intactas} \times 100 / \text{Actividad de rotas})$$

## **6.2. Actividades antioxidantes**

### **6.2.1. Isoenzimas de SODs**

La actividad SOD (EC 1.15.1.1) se determinó según Weisiger y Fridovich (1973) mediante la localización en un gel de poliacrilamida-bis acrilamida usando un método fotoquímico basado en la reducción del NBT (nitroazul de tetrazolio) producida por radicales superóxidos generados por la luz en una solución de TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina) y riboflavina. En estas condiciones, los geles se colorean debido al azul de formazano producto de la reducción del NBT, excepto en las zonas donde está presente la SOD que inhibe la acumulación de radical superóxido.

Las isozimas de SOD se separaron mediante PAGE en geles al 12% según Hernández y col. (1999), en ellos se cargaron muestras de extractos enriquecido en mitocondrias que permitieran una mayor visualización de la Mn-SOD que se encuentra exclusivamente en éste orgánulo. Tras la electroforesis se incubaron los geles en una solución de 2,45 mM NBT durante 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente en otra solución de 280 mM TEMED y 28 μM riboflavina durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se expusieron los geles a la luz de tubos fluorescentes provocando la tinción del gel y permitiendo observar las bandas sin color donde se registró la actividad SOD. En el caso de querer observar exclusivamente la isozima Mn-SOD se incubaron los geles con 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 45 minutos antes de la incubación con el NBT y la solución de

TEMED y riboflavina; de éste modo quedaban inhibidas las actividades de las Cu,Zn-SOD y Fe-SOD.

### **6.2.2. Ciclo ASC-GSH**

Las actividades del ciclo ascorbato-glutati3n (ASC-GSH) se ensayaron de acuerdo con Jim3nez y col. (1997): ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11) utilizando su inhibidor pCMS (3cido cloromercurifenilsulf3nico), monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR; EC 1.1.5.4), deshidroascorbato reductasa (DHAR; EC 1.8.5.1) y glutati3n reductasa (GR; EC 1.6.4.2).

### **6.2.3. Ascorbato peroxidasa**

La actividad APX en disoluci3n se midi3 seg3n el m3todo de Hossain y Asada (1984) basado en la medida a 290 nm de la oxidaci3n del 3cido asc3rbico. La mezcla de reacci3n, en un volumen final de 1 ml, contenía tamp3n 0,1 M Tris-Acetato pH 6,4, 6  $\mu$ l de 50 mM ASC, 10  $\mu$ l de 17 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 5-40  $\mu$ g de prote3na. La reacci3n a 25  $^{\circ}$ C, se inici3 a3nadiendo el ASC y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sigui3ndose la oxidaci3n durante 1 min, en intervalos de 2 segundos tras la adici3n de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Para diferenciar entre la actividad APX total (oxidaci3n inespec3fica del 3cido asc3rbico) y la actividad APX mitocondrial se utiliz3 el inhibidor pCMS (3cido p-cloromercurifenilsulf3nico monos3dico) espec3fico de la actividad APX mitocondrial que fue incluido en la soluci3n de reacci3n en una concentraci3n final de 0,5 mM y se incub3 durante 10 minutos a 25  $^{\circ}$ C. Se midi3 la actividad restante que representa la actividad no atribuible a la APX mitocondrial, esta actividad inespec3fica registrada para cada muestra se rest3 a la actividad total de cada muestra representando finalmente en los resultados la actividad APX espec3ficamente mitocondrial.

### **6.2.4. Monodeshidroascorbato reductasa**

La medida de actividad de MDHAR se determin3 siguiendo el m3todo de Hossain y Asada (1984), basado en la disminuci3n de la absorbancia a 340 nm por la oxidaci3n del

NADH a  $\text{NAD}^+$ , con algunas modificaciones. El ensayo se llevó a cabo a 25 °C y la mezcla de reacción en un volumen final de 1 ml que contenía 50 mM Tris-HCl pH 8 y 10  $\mu\text{l}$  de 0,1 M ASC, 20  $\mu\text{l}$  de 0,01 M NADH, 10  $\mu\text{l}$  de 250 U/ml ASC oxidasa (AO) y 10-30  $\mu\text{g}$  de proteína. Como sistema generador del radical MDHA, se empleó la mezcla de ácido ascórbico 1 mM y 0,5 unidades de AO, necesaria para conseguir un descenso de la absorbancia a 265 nm comprendido entre 0,01 y 0,02 unidades por minuto. La reacción se inició por la adición de NADH y AO. La oxidación espontánea del NADH se midió en ausencia del extracto enzimático y fue restado a la oxidación total registrada para corregir la actividad.

#### **6.2.5. Deshidroascorbato reductasa**

Para medir la actividad DHAR se utilizó el método descrito por Dalton y col. (1993), con ligeras modificaciones, basado en la medida a 265 nm y a 25°C, de la formación de ascorbato a partir de deshidroascorbato (DHA). La mezcla de reacción en un volumen final de 1 ml que contenía 0,1 M tampón fosfato; pH 6,4; 20  $\mu\text{l}$  de 0,1 M GSH; 10  $\mu\text{l}$  de 0,1 M DHA y 10-30  $\mu\text{g}$  de proteína. La reacción se inició por la adición de GSH y DHA, midiéndose el incremento de absorbancia durante 2 min cada dos segundos, frente a un blanco de muestra conteniendo el tampón de reacción. El valor final de absorbancia se corrigió restando el valor obtenido en ausencia del extracto enzimático.

#### **6.2.6. Glutación reductasa**

La medida de la actividad GR se hizo usando el método de Edwards y col. (1990), que está basado en la medida del descenso de absorbancia a 340 nm, debido a la oxidación del NADPH producto de la reducción del glutatión por la enzima. La mezcla de reacción en un volumen final de 1 ml contenía 0,1M tampón fosfato; pH 7,2; 10  $\mu\text{l}$  de 0,01 M NADPH, 10  $\mu\text{l}$  de 0,1 M glutatión oxidado (GSSG) y 10-80  $\mu\text{g}$  de proteína. La reacción se inició por la adición de NADPH y GSSG, siguiéndose la oxidación de NADPH durante dos minutos en intervalos de dos segundos.

## 7. Medidas de respiración y fraccionamiento isotópico de oxígeno.

Para los estudios de mitocondrias las plantas de 21 días de edad se colocaron durante 30 minutos en oscuridad para evitar la respiración en oscuridad potenciada por la luz (LEDR. light-enhanced leaf dark respiration). Las plántulas se recogieron cuidadosamente de placas de petri y se colocaron inmediatamente en una cubeta cerrada de acero inoxidable de 3 ml mantenida a una temperatura constante de 25 ° C. Se extrajeron muestras de aire de 250 µl secuencialmente de la cubeta y se introdujeron en el espectrómetro de masas (DeltaXPlus, Thermo LCC, Bremen, Alemania). Los cambios en las relaciones de 18O/16O y la concentración de oxígeno se midieron para calcular el fraccionamiento isotópico del oxígeno como se describe en Del-Saz y col. (2017). Los valores del punto final de fraccionamiento tanto de COP ( $\Delta c = 30,4$ ) como de AOP ( $\Delta a = 19,8$ ) se tomaron de Florez-Sarasa y col. (2012). Estos son necesarios para el cálculo de la partición electrónica a la vía alternativa ( $\tau a$ ) y las actividades individuales de la COP ( $V_{cit}$ ) y AOP ( $V_{alt}$ ) como se describe en Del-Saz y col. (2017). Los valores presentados son la media  $\pm$  SE de ocho réplicas biológicas.

## 8. Medidas de fotosíntesis

### 8.1. Conductancia estomática

La conductancia estomática ( $g_s$ ) se midió con un sistema analizador de intercambio de gases por infrarrojo abierto (Li-6400; Li-Cor Inc., Lincoln, NE) tal como se describen León-Sánchez y col. (2016). Se realizaron seis mediciones en cada hoja completamente expandida de seis plantas de 33 días de edad de los diferentes genotipos y tratamientos (cultivadas en condiciones control o tratadas con sal durante 21 días) a las 6–8 h del período de luz bajo una densidad de flujo de fotones de luz saturada de  $1000 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (proporcionado por la fuente de luz del Li-6400 con un 10% de luz azul).

### 8.2. Medición y análisis de la densidad estomática y el índice de apertura.

Para medir la densidad estomática de las plantas crecidas en condiciones de día corto para la medida del proceso fotosintético, se tomaron huellas de la superficie abaxial de

las hojas completamente desarrolladas de plantas WT y mutantes KO- *Attrxo1* como lo describen Schlüter y col. (2003) utilizando esmalte transparente de uñas. Las densidades estomáticas se determinaron mediante microscopía óptica a partir de las impresiones de las hojas de cinco plantas individuales y se realizaron cuatro recuentos independientes en cada hoja (n > 400 por genotipo y tratamiento).

El índice de apertura estomática se calculó por división del ancho de la abertura estomática por la longitud. Se analizaron al menos 25 estomas por hoja y se usaron cuatro hojas por cada genotipo y tratamiento para el análisis estadístico. A primera hora del periodo de luz (con la mayoría de los estomas abiertos), se separaron 2 hojas por planta completamente expandidas cortando la base del peciolo con un bisturí. Se retiró la epidermis del haz de las hojas con ayuda de cinta adhesiva. El peeling obtenido se tiñó con 0,5  $\mu$ M Rodamina 6G durante 5 minutos en oscuridad. Tras lavar el peeling con tampón MES-KOH para quitar el exceso de tinción se observó la epifluorescencia que permitió dar contraste a la células guarda y analizar la apertura estomática en un microscopio Leica CTR6 (objetivo 40x, con luz de excitación a 541 nm y 565 nm de luz de emisión). El análisis de la imagen se realizó con el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

### **8.3. Pigmentos**

Para la medida de las clorofilas en este estudio se ha utilizado el medidor SPAD-502, un dispositivo de mano que es usado ampliamente para la medición rápida, precisa y no destructiva de las concentraciones de clorofila en la hoja. Este aparato se usa tanto en investigación como en aplicaciones agrícolas. La medición con el SPAD-502 produce valores relativos que son proporcionales a la cantidad de clorofila presente en la hoja. Para la conversión de estos valores relativos a nmoles de Clorofila /  $\text{cm}^2$  se utilizó la fórmula de conversión:  $y = 0,0419x^2 + 1,6475x + 1,5239$  propuesta por Ling y col. (2011), que presenta una correlación de  $R^2 = 0,996$ .

#### 8.4. Parámetros fotosintéticos.

Todas las mediciones se realizaron en las plantas descritas en la sección de materiales y métodos 1.3. cultivadas para medidas fotosintéticas. Siguiendo el método descrito por Flexas y col. (2007) a 25 ° C se realizaron las mediciones de intercambio gaseoso instantáneo con luz de saturación (densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activa (PPFD) de 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y 400  $\mu\text{mol}$  de  $\text{CO}_2$   $\text{mol}^{-1}$  de aire. Los experimentos incluyeron curvas de  $A_N$  (asimilación fotosintética neta) –  $C_i$  (concentración de  $\text{CO}_2$  subestomática) y determinaciones de la respiración en luz (RI) y el punto de fotocompensación de  $\text{CO}_2$  aparente ( $C_i^*$ ). Se midieron las curvas  $A_N - C_i$ , utilizando un sistema abierto de intercambio de gases Li-6400. Los parámetros de intercambio gaseoso de la hoja se determinaron simultáneamente con las mediciones de fluorescencia de clorofila utilizando el mismo sistema Li-6400 con una cámara de fluorescencia integrada (Li-6400-40). La eficiencia fotoquímica real del fotosistema II ( $\phi\text{PSII}$ ) se determinó midiendo la fluorescencia en estado estacionario ( $F_s$ ) y la fluorescencia máxima durante un pulso de saturación de luz de c. 8000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $F_m'$ ) siguiendo los procedimientos de Genty y col.,(1989):

$$\phi\text{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$$

La tasa de transporte de electrones ( $J_{\text{flu}}$ ) se calculó entonces como:

$$J_{\text{flu}} = \phi\text{PSII} \times \text{PPFD} \times \alpha$$

Siendo  $\alpha$  un término que incluye el producto de la absorción de la hoja y la división de los cuantos absorbidos entre los fotosistemas II y I.  $\alpha$  se determinó a partir de la relación entre el  $\phi\text{PSII}$  y el  $\phi\text{CO}_2$  obtenido al variar la intensidad de la luz en condiciones no fotorrespiratorias en una atmósfera con < 1% de  $\text{O}_2$  (Warren y Dreyer, 2006). La fotosíntesis se inició con una concentración de  $\text{CO}_2$  alrededor de la hoja ( $C_a$ ) de 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ , y una PPFD de 1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . La cantidad de luz azul se estableció en 10% de PPFD para maximizar la apertura del estoma. La temperatura de la hoja se mantuvo a 25 °C y el déficit de presión de vapor hoja-aire se mantuvo entre 1,2 y 1,8 kPa durante todas las mediciones. Una vez que se alcanzó el estado de equilibrio (generalmente 30 minutos después de sujetar la hoja), se determinó una curva de

respuesta de  $\text{CO}_2$ . El intercambio de gases y la fluorescencia de la clorofila se midieron primero a  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ , y luego el Ca se redujo gradualmente hasta  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Una vez completadas las mediciones a bajo Ca, se devolvió a  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  para restaurar el  $A_N$  original. Luego, el Ca se incrementó gradualmente a  $1800 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ . De acuerdo con Long y Bernacchi (2003), se calcularon la velocidad de carboxilación máxima ( $V_{\text{cmax\_Ci}}$ ) y la capacidad máxima para la tasa de transporte de electrones ( $J_{\text{max\_Ci}}$ ). La dependencia por la temperatura de los parámetros cinéticos de RuBisCo se tomó de Bernacchi y col.(2001).

## 9. Recuperación de actividad de AtPYR1 oxidado mediada por PsTRXo1

### 9.1. Tratamientos previos de las proteínas recombinantes

Para los ensayos con proteínas reducidas, oxidadas o S-nitrosiladas se realizaron tratamientos previos que permitieron generar dichas modificaciones.

Modificando levemente el método seguido por Calderón y col. (2017), entre 100-120  $\mu\text{g}$  de proteína fueron disueltos en un volumen final de 500  $\mu\text{l}$  de tampón 20 mM Tris-HCl; pH 7,9; 50 mM NaCl, 5% glicerol (v/v) y 1 mM PMSF. En el caso de las proteínas reducidas se añadió a la dilución 20 mM de DTT y se mantuvo en agitación por inversión a  $4^\circ\text{C}$  durante 1 hora, mientras que para las proteínas oxidadas se añadió 4 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. En el caso de las proteínas S-nitrosiladas se procedió como describen Castillo y col. (2015), disueltas en un volumen final de 500  $\mu\text{l}$  de buffer HEN (100 mM HEPES; pH 7,8; 1 mM EDTA; 0,1 mM Neocuproina) se incubaron en oscuridad con 0,25 mM de GSNO (Merck) durante 1 hora a temperatura ambiente.

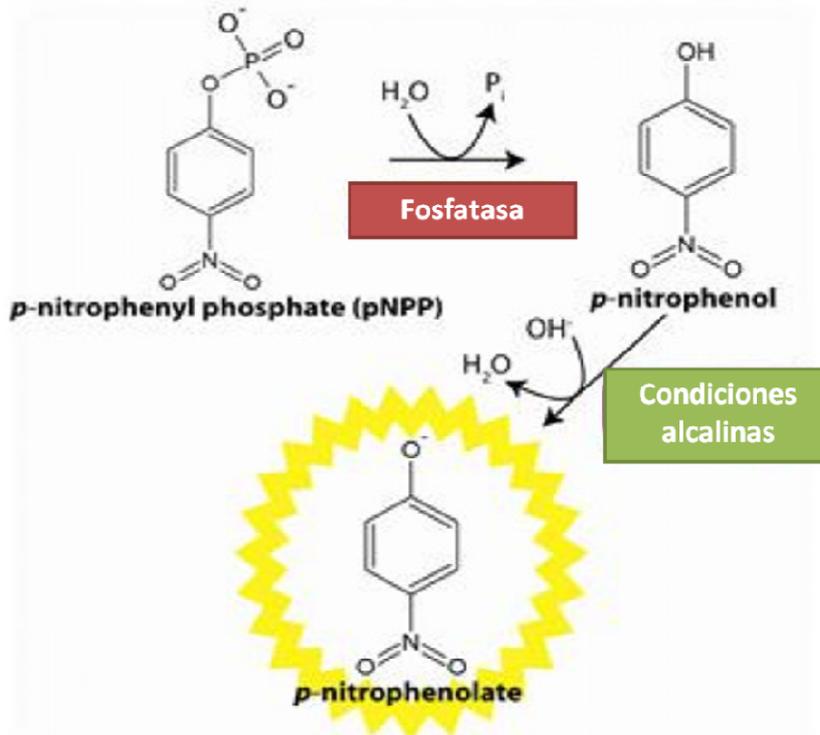
Tras los tratamientos de reducción, oxidación y S-nitrosilación los 500  $\mu\text{l}$  se pasaron por filtros de Amicon™ Ultra-0,5mM 3K (ver sección de materiales y métodos 5.7.) que permitieron la eliminación del DTT. Para ello se centrifugó concentrando las proteínas mientras el tampón con DTT eluía a través del filtro, y se cargaron 400  $\mu\text{l}$  de tampón nuevo sin DTT diluyendo las proteínas para volver a centrifugar y concentrarlas mientras

los restos de DTT eluían nuevamente a través del filtro. Este proceso se repitió hasta dos veces para finalmente recoger las proteínas concentradas sin DTT.

### **9.2. Actividad fosfatasa**

La señalización de ABA en la célula a través de sus receptores PYR/PYL se produce por medio de la inhibición de la actividad de fosfatasas de la familia de las PP2C por parte de estos receptores. Para que esta inhibición se produzca, los receptores deben ser activos para lo cual es necesaria la presencia de ABA (Sheard y Zheng, 2009).

Para poder medir la actividad del PYR1 se recurrió a una medida indirecta a través de un método colorimétrico acoplado a la actividad fosfatasa PP2C (Park y col., 2010) para lo cual se usó un volumen de solución de reacción de 100  $\mu$ l que contenía 25 mM Tris-HCl (pH 7,5); 2 mM  $MnCl_2$  y 10 mM p-nitrofenil fosfato (pNPP) (Sigma-Aldrich), esta solución de reacción fue dispensada en una placa de 96 pocillos donde previamente habían sido depositados los componente descritos en la Figura 48 de la sección de resultados 2.5. Según el fundamento de la técnica el pNPP es usado como sustrato de la fosfatasa alcalina y al poseer un resto orgánico con un grupo fosfato unido puede ser reconocido por la enzima y al ser hidrolizado origina p-nitrofenol, un compuesto coloreado que en solución alcalina absorbe a una longitud de onda de 405 nm. Así, la actividad fosfatasa puede seguirse colorimétricamente siguiendo la aparición de este producto en el transcurso de la reacción (Figura 29).



**Figura 29. Fundamento de la técnica empleada para la medida de actividad fosfatasa.** El pNPP es desfosforilado por la fosfatasa generando *p*-nitrofenol que en condiciones alcalinas se forma *p*-nitrofenolato, un compuesto coloreado que absorbe a una longitud de onda de 405 nm. Así, la actividad fosfatasa puede seguirse colorimétricamente.

Para inhibir la actividad fosfatasa se necesitó al menos un ratio molar  $\frac{1}{2}$  fosfatasa/receptor de ABA (PYR1). Se realizaron distintas combinaciones donde siempre se mantuvo esta proporción entre las concentraciones molares de las proteínas recombinantes siendo estas: 1  $\mu$ M PP2C fosfatasa DHAB1, 2  $\mu$ M PYR1 y 2  $\mu$ M TRX $\alpha$ 1 que se incubaron durante 10 minutos en ausencia o presencia de 10 mM (+) - ABA.

Las mediciones de la absorbancia a 405 nm se realizaron cada 30 s durante 30 minutos con un espectrofotómetro de microplacas Multiskan GO (termo-científico) (Castillo y col., 2015).

En primer lugar realizamos este ensayo en ausencia de fosfatasa comprobando que apenas había cambio en la absorbancia a 405 nm como consecuencia de la ausencia de actividad fosfatasa, esta medida sirvió como control negativo del método. En segundo lugar realizamos un control positivo donde se midió la actividad fosfatasa en ausencia de PYR1 y en presencia de ABA, la fosfatasa funcionó sin verse inhibida. También se evaluó

la actividad fosfatasa en presencia de  $H_2O_2$  y PsTRXo1 mostrando el efecto de la oxidación y la reducción respectivamente sobre la actividad fosfatasa.

Para comprobar si el estado redox del PYR1 afectaba a su actividad se realizaron las medidas de actividad fosfatasa en reacciones donde el PYR1 estuvo presente tras haber sido tratado como se indica en la sección de materiales y métodos 9.1 de materiales y métodos. Cada reacción con el PYR1 tratado fue medida en presencia y ausencia de ABA para evaluar el cambio en la actividad fosfatasa producido únicamente debido a la actividad PYR1.

Finalmente para analizar la posible funcionalidad de la interacción entre PYR1 y TRXo1 se analizó la actividad fosfatasa en reacciones realizadas en presencia de los distintos PYR1 tratados tal como se describe en el párrafo anterior, pero en este caso en presencia de PsTRXo1 recombinante y activa por su reducción previa con DTT como se detalla en la sección de materiales y métodos 9.1 de materiales y métodos. Cada reacción con el PYR1 tratado y la PsTRXo1 fue medida en presencia y ausencia de ABA para evaluar el cambio en la actividad fosfatasa producido únicamente debido a la actividad PYR1.

Finalmente se compararon los cambios producidos en la actividad fosfatasa en presencia y ausencia de los distintos componentes expresándolos como porcentajes respecto a la actividad fosfatasa total registrada en el control + que supuso el valor 100% de actividad fosfatasa. Posteriormente se compararon los ratios entre las medidas realizadas en presencia de ABA y sus controles internos respectivos en ausencia de la fitohormona. Así pudieron observarse los distintos efectos de los tratamientos y los componentes añadidos sobre la actividad PYR1 inhibiendo la actividad fosfatasa con mayor o menor eficacia en cada caso.

## **10. Técnicas inmunológicas: Western-blot, Dot-blot y Dot-blot trampa**

Estas técnicas inmunológicas permiten detectar y cuantificar una proteína concreta presente en una muestra mediante el uso de anticuerpos específicos.

En el caso del Western-blot, tras una electroforesis SDS-PAGE, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa con las mismas dimensiones que el gel de acrilamida. Para ello tanto el gel como la membrana de nitrocelulosa y papeles de filtro, se equilibraron durante 15 min en un tampón de transferencia (48 mM Tris-HCl; pH 8,9; 39 mM Glicina; 0,03% SDS (p/v) y 20% metanol (v/v)). La transferencia de las proteínas a la membrana se realizó aplicando un campo eléctrico con un voltaje constante de 25 V y 2,5 mA durante 10-15 min usando un equipo de transferencia de tipo semi-seco (Trans Blot Turbo®, Bio-Rad™). La comprobación de la transferencia de las proteínas se hizo mediante la incubación de la membrana en una solución de rojo Ponceau al 0,2% (p/v) en ácido tricloroacético 3% (p/v) y ácido 5-sulfosalicílico 3% (p/v) durante 5 min, donde se podían distinguir las bandas de proteínas teñidas de rojo. Tras esta comprobación la membrana se destiñó con agua destilada y TBS (25 mM Tris-HCl; pH 7,5; 150 mM NaCl).

En el caso del Dot-blot las proteínas se cargan directamente sobre la membrana de nitrocelulosa en forma de gotas (ver sección de materiales y métodos 4.1.).

A fin de evitar uniones inespecíficas del anticuerpo u otras proteínas a la membrana, ésta se bloqueó mediante incubación durante 1 h a temperatura ambiente con 1% (p/v) BSA en TBS o con 5% leche en polvo en TBS según el anticuerpo 1º que posteriormente se usase (tabla 14).

En el caso de Dot-blot trampa las membranas se incubaron con una solución de proteína recombinante (ver sección de materiales y métodos 4.1.). Posteriormente la membrana se lavó en TBST (5 x 6 min) (Amoroso y col., 2011).

Tras esta etapa se incubó la membrana con el anticuerpo primario específico (tabla 14) frente a la proteína de estudio o frente a la proteína de incubación en el caso de dot-blot trampa, diluido con 1% (p/v) BSA o 5% (p/v) leche en polvo en TBST (25 mM Tris-HCl; pH 7,5; 150 mM NaCl y 0,1% (v/v) Tween-20), según el anticuerpo primario que se usase. Después de una noche de incubación a 4°C con el anticuerpo primario, la membrana se lavó en TBST (5 x 6 min) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario diluido con 1% (p/v) BSA o 5% (p/v) leche en polvo en TBST (tabla 15). Los anticuerpos secundarios fueron desarrollados frente a la especie en

la que se produjo el primario correspondiente y fueron conjugados con HRP (horse radish peroxidase) o fosfatasa alcalina. Tras repetir los lavados con TBST (5 x 6 min), la membrana se mantuvo en TBS. El revelado con el método quimioluminiscente se llevó a cabo incubando la membrana en oscuridad durante cinco minutos con el reactivo (Western ECL Bio-Rad®) y la señal se detectó utilizando el sistema de detección de transferencia Western ECL Plus (GE Healthcare, Hertfordshire U.K.). Para cuantificar las bandas utilizamos el programa Quantity One software-based analysis (BioRad).

Los anticuerpos primarios y secundarios empleados, aparecen recogidos en las tablas 14 y 15, respectivamente. El anticuerpo policlonal frente PsTRXo1 fue obtenido en conejos blancos de Nueva Zelanda por la empresa Sigma-Genosys (UK), contra el péptido sintético ARLNHTEKLFKGD. Este péptido comprende 14 aminoácidos de la región C-terminal de la proteína y presenta una alta antigenicidad. Por otro lado el anticuerpo monoclonal de ratón  $\alpha$ -AOX (Elthon y col., 1989) se obtuvo por cortesía del Dr. Miquel Ribas Carbo; el anticuerpo policlonal de conejo  $\alpha$ -PYR1 fue generado y cedido por el Dr. José León Ramos del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP. Valencia). Finalmente el anticuerpo monoclonal de ratón utilizado para la detección del tag de histidina fue el Anti-His6 de Roche (Cat. No. 11922416001).

**Tabla 14. Anticuerpos primarios empleados en los ensayos de western blot.**

Anticuerpo	Especie productora	Tipo	Dilución usada	Solución de Bloqueo
$\alpha$ -PsTRXo1	Conejo	Policlonal	1:2.000	TBST+1% BSA
$\alpha$ -AtPYR1	Conejo	Policlonal	1:10.000	TBST + 5% Leche
$\alpha$ -AOX	Ratón	Monoclonal	1:50	TBST+1% BSA
$\alpha$ -His	Ratón	Monoclonal	1:5.000	TBS + 1% BSA

**Tabla 15. Anticuerpos secundarios empleados en los ensayos de western-blot.**

Anticuerpo	Dilución usada	Proveedor
$\alpha$ -IgG de conejo	1:7.500	Boheringer Mannheim
$\alpha$ -IgG de ratón	1:30.000	Sigma

### **10.1. Mild Stripping**

Cuando fue necesario se llevó a cabo el “stripping”, término usado para describir la eliminación de anticuerpos primarios y secundarios de una membrana de transferencia Western. Ésta técnica resulta útil cuando se quieren analizar más de una proteína en la misma transferencia. Evita el gasto extra de muestras, materiales y tiempo. Si bien es desaconsejable realizar comparaciones cuantitativas entre lo obtenido antes y después del stripping ya que el procedimiento elimina algunas proteínas transferidas a la membrana.

En este trabajo se llevó a cabo una variante denominada “mild stripping” que permite eliminar los anticuerpos utilizados en el primer análisis de la membrana intentando minimizar la pérdida de las proteínas transferidas a la membrana, antes de volver a analizar otras proteínas mediante el uso de un nuevo juego de anticuerpos. Para la realización de este mild stripping se utilizó un tampón con la composición 15 g/L Glicina; 1 g/L SDS; 1% (v/v) Tween-20; pH 2,2 ajustado con HCl; en agua milliQ. En este tampón se incubó la membrana a 42 °C durante 10 minutos agitando cada 2 minutos, se descartó el tampón y se repitió la incubación con tampón fresco. Se descartó de nuevo el tampón y se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno con TBS a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron dos lavados de 5 minutos cada uno con TBST a temperatura ambiente.

Tras este procedimiento de “mild stripping” se realizaba el bloqueo de la membrana con BSA o leche en polvo según los requerimientos para el siguiente anticuerpo primario que se usase.

## **11. Metabolitos**

### **11.1. Análisis de hormonas**

El contenido en hormonas del material vegetal fue analizado por el servicio de Cuantificación de hormonas vegetales del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP-CSIC-UPV) mediante el uso del equipo de UHPLC-espectrometría de

masas (Q-Exactive, ThermoFisher Scientific) capaz de cuantificar hormonas vegetales en muestras de solo 50 mg de materia fresca y concentraciones por debajo de 0,1 ng/g. Se midieron las hormonas ABA, IAA, y GA4.

Las muestras se enviaron trituradas en nitrógeno líquido y posteriormente liofilizadas (18-30 mg de material liofilizado), almacenadas en criotubos y transportadas en cajas protegidas de la humedad por bolsas herméticas y silica gel.

### **11.2. Metabolitos generales**

Las medidas de metabolómica se llevaron a cabo enviando muestras de material vegetal al laboratorio del Profesor Alisdair Fernie del Max Planck Institute for Molecular Plant Physiology (Alemania).

Se tomaron muestras de partes aéreas de las plantas cultivadas en presencia o ausencia de 100 mM NaCl, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis. Las muestras se trituraron en nitrógeno líquido y las extracciones de metabolitos se realizaron como describieron Lisec y col. (2006) utilizando aproximadamente 50 mg de tejido en forma de polvo congelado. Los metabolitos se identificaron en comparación con las entradas en la base de datos de estándares auténticos (Kopka y col., 2005; Schauer y col., 2005). Los cromatogramas y los espectros de masas se evaluaron utilizando el software Chroma TOF 1.0 (Leco, <http://www.leco.com/>) y TAGFINDER 4.0 (Luedemann y col., 2008). El contenido relativo de los metabolitos se calculó mediante la normalización de la intensidad de la señal a la del ribitol, que se agregó como un estándar interno. Después de eso, los datos se normalizaron al valor medio de las plantas WT bajo condiciones control (sin sal agregada) (es decir, el valor de todos los metabolitos para las condiciones de control de WT se estableció en 1).

La representación de los resultados derivados de la cuantificación y análisis estadístico de los metabolitos presentes en las muestras de los estudios de mitocondrias y fotosíntesis, se llevó a cabo mediante el uso del software libre MeV (<https://sourceforge.net/projects/mev-tm4/>), un visor de multiarray que permite la

creación de HeatMaps donde se representan, mediante un gradiente de colores, las diferencias relativas de cada metabolito entre los distintos genotipos y tratamientos.

### **11.3. Determinación de peróxidos lipídicos**

La peroxidación de lípidos se estimó determinando la concentración de sustancias que reaccionan con ácido tiobarbitúrico (TBARS) según Buege y Aust (1978) con modificaciones menores. Las muestras se incubaron con una reacción de mezcla que contenía ácido tricloroacético al 15% (p/v), ácido tiobarbitúrico al 0,37% (p/v), butilhidroxitolueno al 0,37% (p v), a 15°C durante 15 min y luego se centrifugaron a 2000xg durante 5 min. Se recogieron los sobrenadantes y se midió el cambio de absorbancia a 535 nm. Los valores de absorbancia se relativizaron a una recta patrón de malondialdehído dimetil acetal, partiendo de una solución madre 20  $\mu$ M y en un rango de concentraciones de 0,05 a 10  $\mu$ M. Finalmente, se extrapoló la concentración de peróxidos lipídicos como nmol MDA por gramo de peso fresco.

En el caso de determinaciones realizadas en mitocondrias se usaron los extractos mitocondriales purificados por gradiente descritos en la sección de materiales y métodos 5.3. el resultado final se relativizó a la cantidad de proteínas presente en el volumen del extracto utilizado mediante su determinación previa por el método Bradford como se indica en la sección de materiales y métodos 5.8.

### **11.4. Determinación de proteínas oxidadas**

El contenido de grupos carbonilo en proteínas oxidadas se analizó como una variable directa del daño oxidativo de acuerdo con Levine y col. (1990) utilizando 2, 4-dinitrofenilhidracina, como lo describen Ortiz-Espín y col. (2015). El contenido total de proteína soluble se cuantificó utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976).

En resumen, se pulverizó entre 1-2 g de tejido vegetal con nitrógeno líquido y se resuspendieron en un tampón que contenía 0,1 M de tampón fosfato de potasio, pH 7, más 0,1% (p/v) de inhibidores de proteasa (cOmplete) y 0,005% (p/v) cisteína. El homogenado se centrifugó a 15.000 xg durante 15 min a 4 °C y se recuperaron 400  $\mu$ l de

sobrenadante. Debido a que el ADN puede causar interferencia con la medida, lo precipitamos con sulfato de estreptomicina 1:10 (v/v) y lo eliminamos mediante centrifugación a 12.000 xg durante 10 min. Se incubaron 200 µl del sobrenadante de cada muestra con 20 mM 2,4 m-dinitrofenilhidracina (DNPH) disuelto en 2 M HCl (1:2, v/v), que reacciona con los grupos carbonilo. Se usó una incubación paralela con HCl sin DNPH como blanco para cada muestra. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las carbonil-proteínas precipitaron con 20% (p/v) de TCA y se enjuagaron tres veces con etanol: acetato de etilo (1: 1, v/v). El sedimento final se resuspendió en clorhidrato de guanidina 6 M y se incubó durante 15 minutos a 37 °C. La absorbancia se midió a 360 nm ( $\epsilon = 22\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ).

En el caso de determinaciones realizadas en mitocondrias se usaron los extractos mitocondriales purificados por gradiente descritos en la sección de materiales y métodos 5.3. el resultado final se relativizó a la cantidad de proteínas presente en el volumen del extracto utilizado mediante su determinación previa por el método Bradford como se indica en la sección de materiales y métodos 5.8.

### **11.5. Determinación de peróxido de hidrógeno**

El contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se midió mediante el método de oxidación ferrosa con etanol y naranja de xilenol de acuerdo con Cheeseman (2006) (método eFOX). El tejido fresco (0,1 g de hoja) se sumergió inmediatamente en 1 ml de acetona acidificada con 25 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y se congeló en nitrógeno líquido. Las muestras fueron procesadas tal como describen Camejo y col. (2011). El método se basa en la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  mediada por peróxido, el seguimiento de la reacción se da por la reacción del  $\text{Fe}^{3+}$  con el naranja de xilenol (3,3'-Bis[N,N-bis(carboximetil)aminometil]-o-cresolsulfoneftaleína] sal de tetrasodio, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), que se detectó después de 45 min. La cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se determinó en función de la diferencia en la absorbancia a 550 y 850 nm utilizando una curva estándar (0–200 µM).

### **11.6. Determinación de óxido nítrico**

El contenido de óxido nítrico (NO) se analizó mediante fluorimetría usando 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) como lo describió Camejo y col. (2013), midiendo en un espectrofluorímetro ShimadzuRF-5301PC (Tokio, Japón) calibrado para la excitación a 495 nm y una emisión de 515 nm.

## **12. Tratamiento estadístico**

Los experimentos se realizaron en un diseño completamente al azar. Cada experimento se repitió al menos tres veces con tres repeticiones de tratamiento por cada genotipo y al menos cuatro plantas por réplica. Los datos se sometieron a dos análisis estadísticos diferentes: uno para las diferencias entre los genotipos en cada condición (letras mayúsculas para el control y letras minúsculas para las condiciones salinas) con un análisis de la varianza (ANOVA, un factor) mediante la prueba de Tukey-b ( $P < 0,05$ ), y otra prueba para el efecto de la sal en cada genotipo (asterisco cuando se observan diferencias significativas en la salinidad en comparación con la condición de control) utilizando la prueba de la t de Student ( $P < 0,05$ ). Los programas IBM SPSS Statistics 20 (Paquete estadístico para ciencias sociales, 2011) y JMP®, Versión 12.1.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU., 1989–2007) se utilizaron para el análisis de datos.

# RESULTADOS



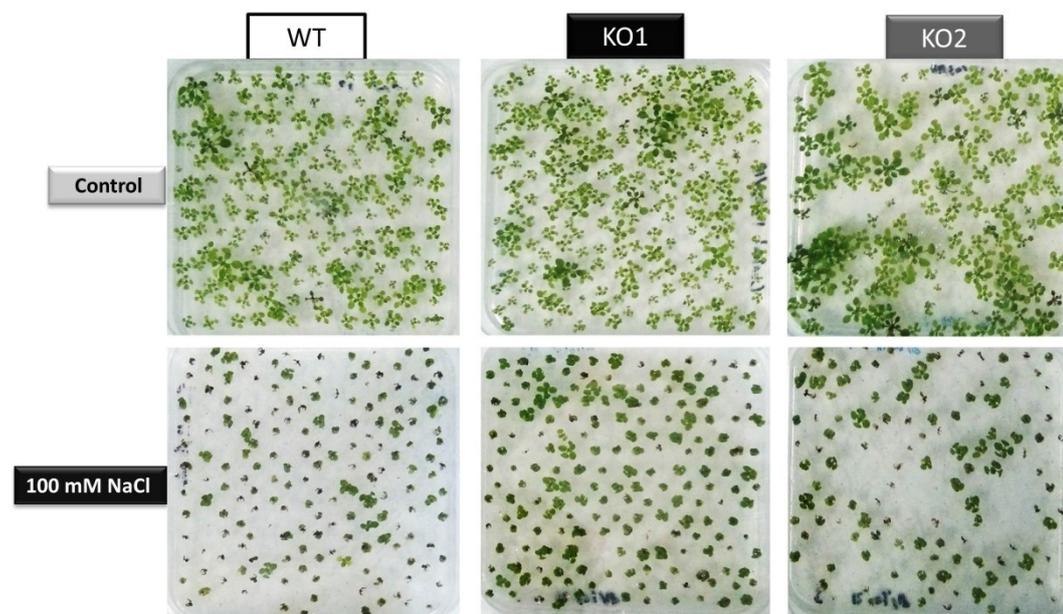
## RESULTADOS

### 1. Estudio funcional de AtTRXo1 en mitocondrias

Con el objetivo de realizar un análisis de la función de AtTRXo1 en el metabolismo mitocondrial de plantas crecidas en una situación de estrés salino, se han estudiado plantas de *Arabidopsis silvestres* (WT) y dos líneas mutantes KO homocigotas *Attrxo1* crecidas en ausencia y presencia de 100 mM NaCl.

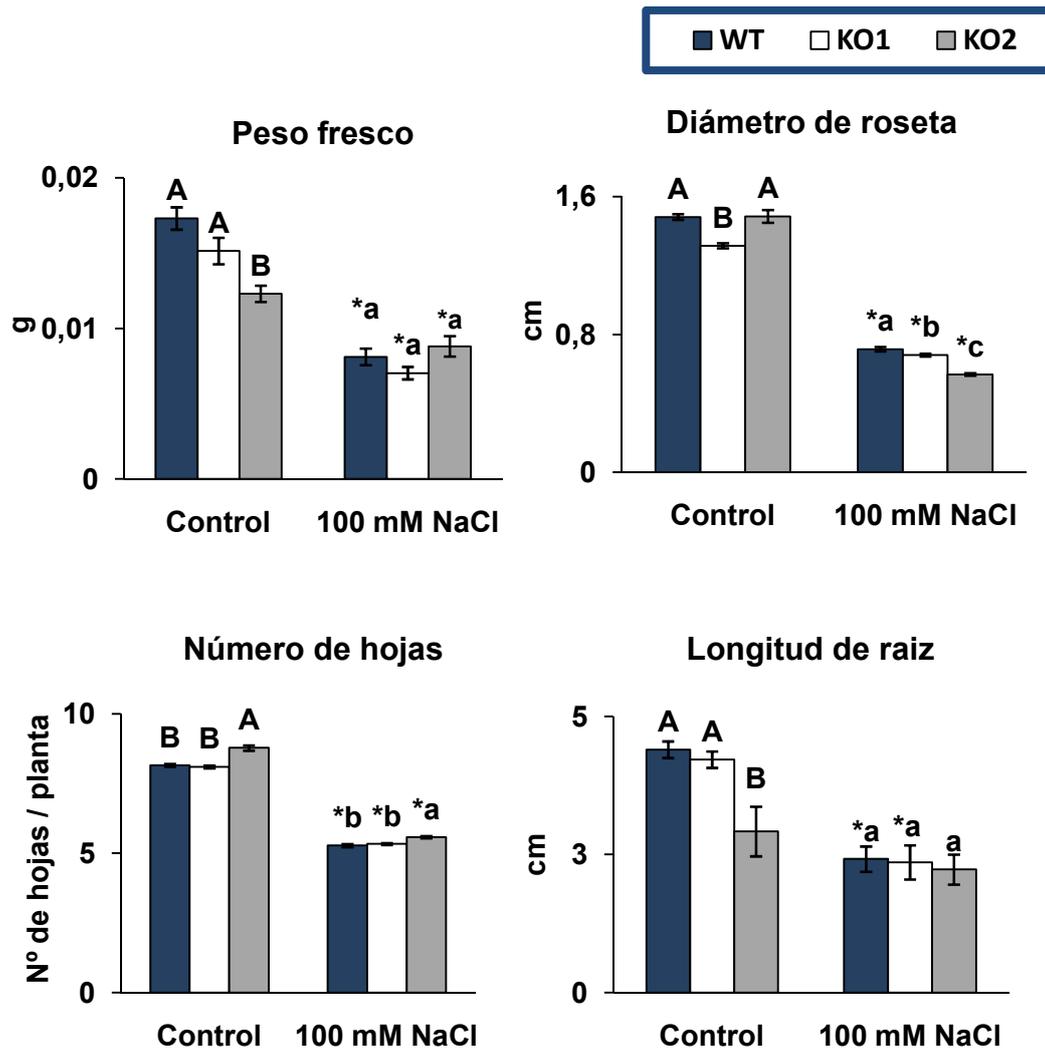
#### 1.1. Parámetros de crecimiento

El análisis del crecimiento de plantas WT y dos mutantes KO *Attrxo1* crecidas en placa durante 21 días en ausencia y presencia de 100 mM NaCl reveló la ausencia de fenotipo visiblemente apreciable, si bien la salinidad provocó en todos los genotipos una disminución del crecimiento (Figura 30).



**Figura 30. Plantas de *Arabidopsis thaliana* de 21 días de edad representativas los genotipos silvestre (WT) y dos mutantes KO *Attrxo1* crecidos en ausencia (control) y en presencia de 100 mM de NaCl.**

Sin embargo, el análisis de ciertos parámetros de crecimiento en los mutantes sí reveló algunas diferencias con las plantas WT. Bajo condiciones control, el peso fresco de las hojas de la roseta y la longitud de la raíz disminuyeron significativamente en el KO2 en comparación con las plantas WT, mientras que el diámetro de la roseta fue menor en el mutante KO1 (Figura 31). Además, el mutante KO2 presentó un mayor número de hojas por roseta. En la condición salina, el diámetro de la roseta era menor en ambos mutantes y el número de hojas fue mayor en las plantas KO2. Éstas y otras diferencias entre los dos mutantes podrían deberse en parte a cierta expresión residual del gen *AtTRXo1* que presentan las plantas KO2 y no las KO1, que fueron descritas en nuestro laboratorio en el trabajo de Ortiz-Espín y col. (2017).

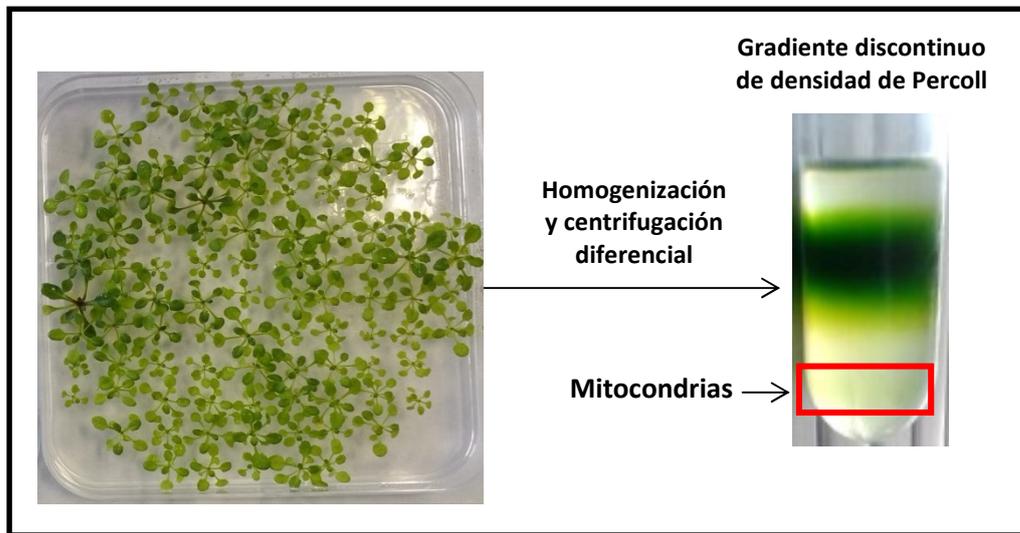


**Figura 31.** Medida de peso fresco, diámetro de la roseta, número de hojas y longitud de raíz de plantas de *A. thaliana* genotipos silvestre (WT), y dos mutantes KO *Attrxo1* crecidos en ausencia (control) y en presencia de 100 mM de NaCl. Los datos son media  $\pm$  error estándar de al menos cuatro experimentos independientes. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre genotipos en cada condición de acuerdo al test de Tukey, y los asteriscos diferencias significativas de cada genotipo en salinidad comparado con la condición control usando el test t-Student ( $P < 0,05$ ).

### 1.2. Aislamiento de las mitocondrias

La detección de proteínas específicas de un orgánulo requiere el aislamiento de una gran cantidad de los mismos altamente purificados, por lo que para estas experiencias y

otras recogidas en este trabajo, se obtuvieron mitocondrias funcionales intactas de hoja de *Arabidopsis* siguiendo el método de aislamiento de gradiente de Percoll descrito en Material y Métodos. La población de mitocondrias intactas se localizaba en el fondo del tubo quedando claramente separada de la banda de tilacoides y orgánulos rotos que se localizaban en la parte media del mismo (figura 32).



**Figura 32.** Purificación de mitocondrias de hojas de *A. thaliana* WT crecidas en ausencia de NaCl utilizando un gradiente de densidad de Percoll. Se indica en rojo la tenue banda en la que las mitocondrias se encuentran sobre la fase de mayor densidad del gradiente separadas del resto de componentes celulares tras la centrifugación, esta fase inferior de mayor densidad impide a las mitocondrias descender más en el tubo durante la centrifugación mientras los demás componentes del extracto enriquecido en mitocondrias quedan retenidos en las fases superiores de menor densidad.

Las mitocondrias purificadas de las hojas de los diferentes genotipos de plantas crecidas en condición control y salina fueron analizadas inicialmente tanto en el rendimiento organular obtenido como en su pureza, relativa a la presencia de otros compartimentos celulares y orgánulos en las preparaciones finales, analizando también la integridad que presentaban.

El rendimiento en mitocondrias en ambas condiciones fue de alrededor del 10% y se estimó midiendo la actividad de la enzima marcador mitocondrial citocromo c oxidasa (CCO) en el homogenado de partida de las hojas (100%) y en los orgánulos aislados finalmente tras el gradiente de purificación (tablas 16 y 17). Además, las fracciones

mitocondriales presentaron tasas de contaminación bajas, según lo indicado por la actividad de las enzimas marcadoras citoplasmática lactato deshidrogenasa (0,7-0,6% en control y condiciones salinas, respectivamente), cloroplástica NADP-gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (0,01-0,0%) y peroxisomal catalasa (1,5–3%). Por otro lado, la integridad de las mitocondrias aisladas determinada como la integridad de la membrana externa medida por la actividad de la succinato-citocromo c oxidoreductasa, fue de alrededor de 90%-85% para los orgánulos aislados de plantas cultivadas bajo condiciones control y salina, respectivamente.

**Tabla 16. Distribución de marcadores enzimáticos en diferentes fracciones subcelulares de hojas de plantas de 21 días de Arabidopsis WT crecidas en condiciones control.**

	CCO	LDH	G3PDH	CAT
<b>Extracto crudo</b>	100	100	100	100
<b>Precipitado de 12.000xg</b>	16	11	0,3	29
<b>Mitocondrias aisladas</b>	10,5	0,7	0,01	1,5

**Tabla 17. Distribución de marcadores enzimáticos en diferentes fracciones subcelulares de hojas de plantas de 21 días de Arabidopsis WT crecidas en condiciones salinas (100 mM NaCl).**

	CCO	LDH	G3PDH	CAT
<b>Extracto crudo</b>	100	100	100	100
<b>Precipitado de 12.000xg</b>	24	14.3	1,1	48
<b>Mitocondrias aisladas</b>	9,5	0,6	0,3	3

### **1.3. Medida de estrés oxidativo mitocondrial**

El análisis de los parámetros indicativos de estrés oxidativo en mitocondrias aisladas reveló que la peroxidación lipídica fue significativamente mayor en el mutante KO2 que en plantas WT solo en la condición control (letras diferentes en cada condición), mientras que la salinidad no modificó este parámetro en ningún genotipo (Figura 33). Por otro lado, el contenido foliar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentó un patrón similar en las plantas, pero en este caso, fueron las plantas KO1 las que mostraron una disminución significativa por efecto de la salinidad. Además, se encontraron niveles similares en el contenido de carbonil-proteínas (CO) entre los genotipos en ambas condiciones, si bien la salinidad los disminuyó sólo en el mutante KO2 (asterisco en Figura 33).

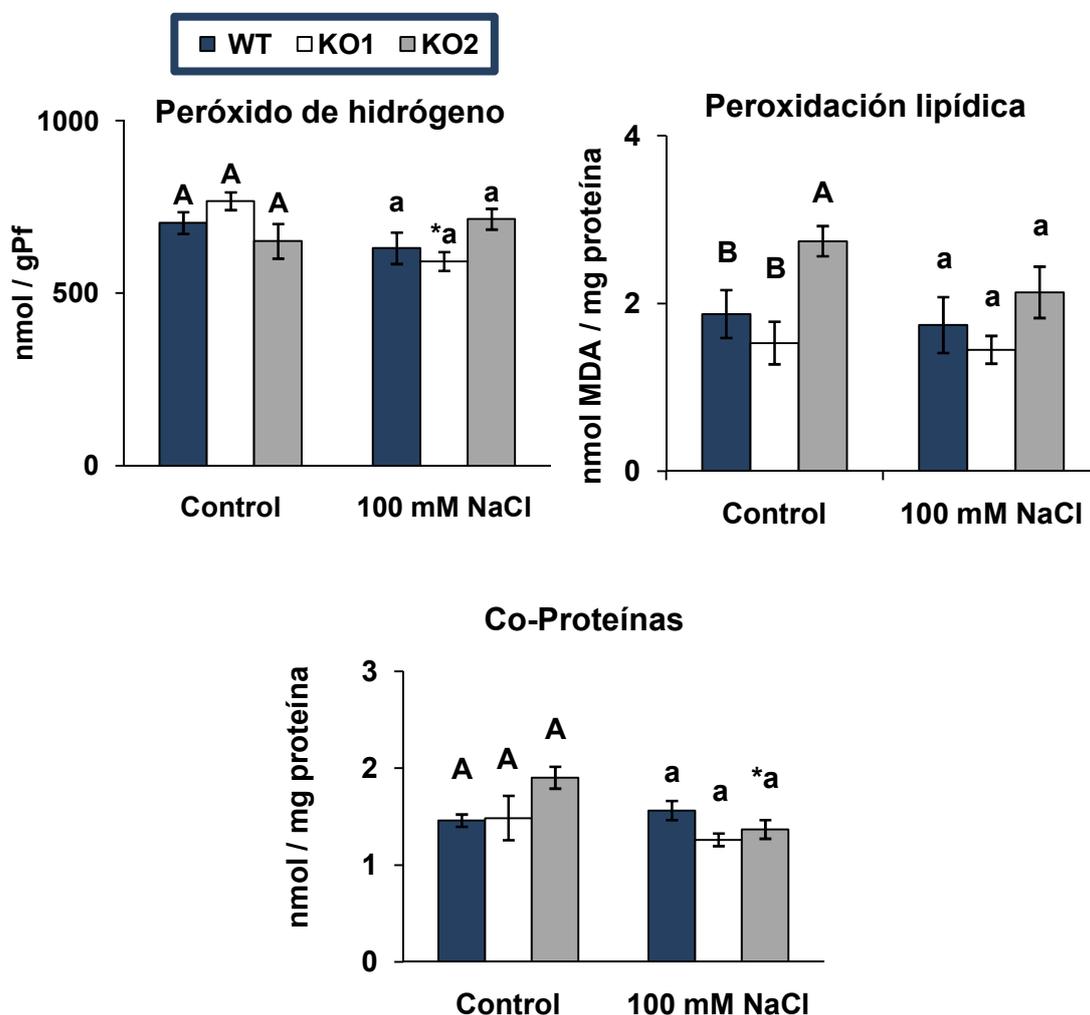


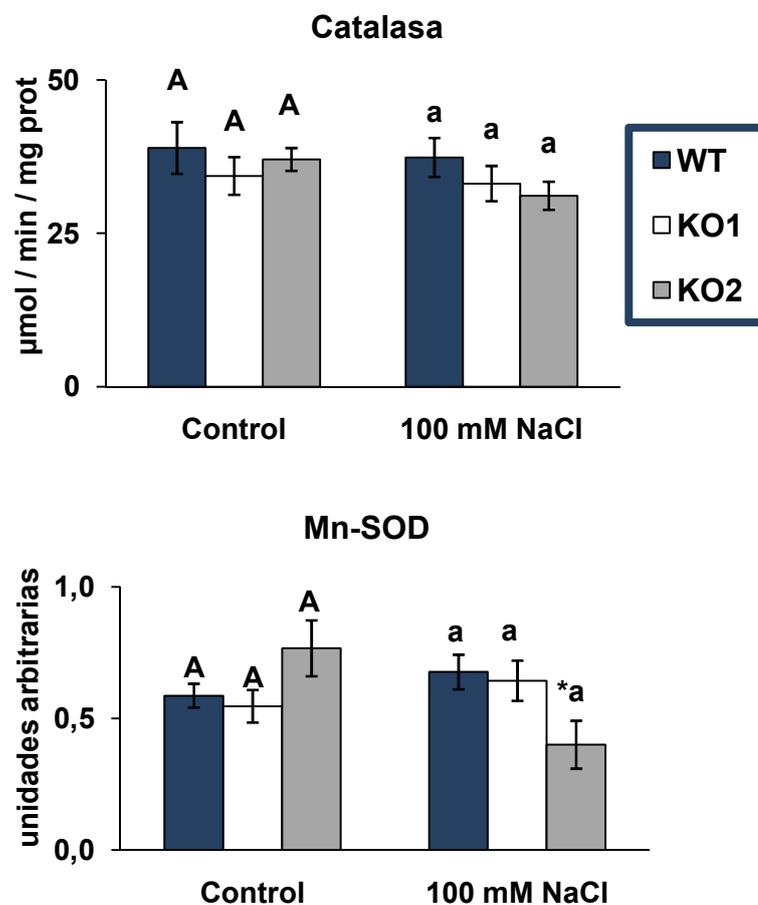
Figura 33. Medida de peróxido de hidrógeno foliar y peroxidación lipídica y carbonil (CO) proteínas de mitocondrias aisladas de plantas de *A. thaliana* genotipos silvestre (WT) y dos mutantes KO *Attrxo1* crecidos en ausencia (control) y en presencia de 100 mM de NaCl. Los datos son media ± error estándar de al menos tres experimentos independientes. Las letras

distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre genotipos en cada condición de acuerdo al test de Tukey, y los asteriscos diferencias significativas de cada genotipo en salinidad comparado con la condición control usando el test t-Student ( $P < 0,05$ ).

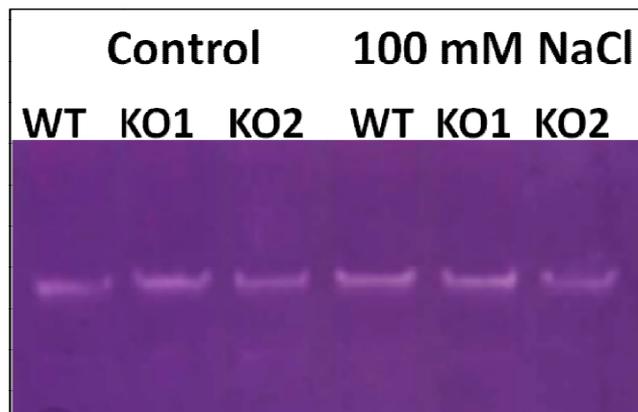
**1.4. Medida de enzimas antioxidantes**

La actividad catalasa se midió en extractos foliares de los tres genotipos en condiciones control y salinas y no se encontraron diferencias entre ellos en ninguna de las condiciones (Figura 34).

La actividad de la isoenzima Mn-SOD se midió después de la electroforesis PAGE nativa en fracciones mitocondriales enriquecidas de las hojas. No se encontraron cambios significativos en esta actividad entre los genotipos ni en la condición control ni salina, y solo se observó una disminución en la línea KO2 con la salinidad (Figura 34).

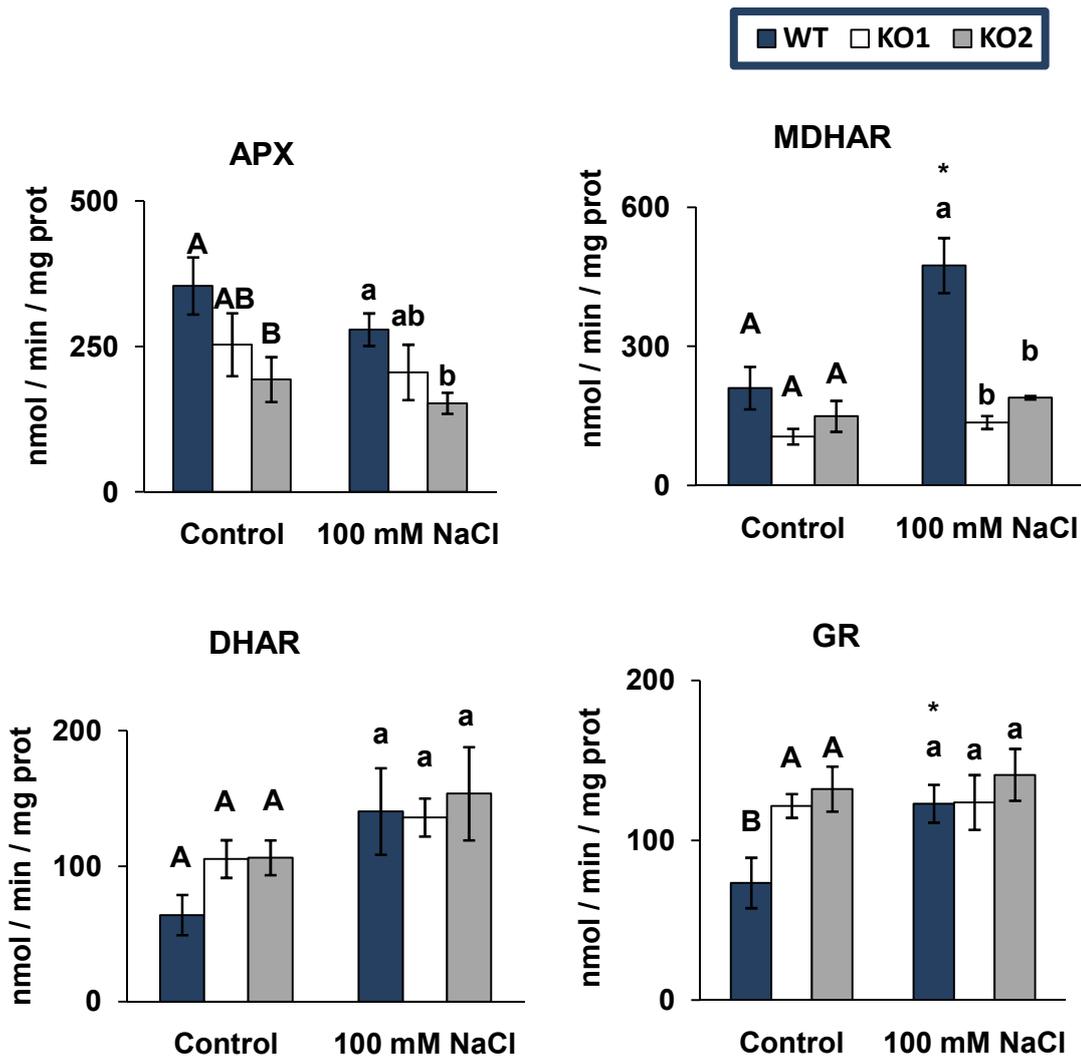


## Mn-SOD



**Figura 34. Medida de actividad catalasa foliar y Mn-SOD medida tras electroforesis PAGE de extractos enriquecidos en mitocondrias de plantas de *A. thaliana* genotipos silvestre (WT) y dos mutantes KO *Attrxo1* crecidos en ausencia (control) y en presencia de 100 mM de NaCl. Los datos son media  $\pm$  error estándar de al menos tres experimentos independientes. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre genotipos en cada condición de acuerdo al test de Tukey, y los asteriscos diferencias significativas de cada genotipo en salinidad comparado con la condición control usando el test t-Student ( $P < 0,05$ ).**

La medida de la actividad de las enzimas del ciclo ASC-GSH en las mitocondrias aisladas (Figura 35) reveló que la actividad APX que era inhibida por el compuesto específico PCMS, fue significativamente menor en la línea KO2 que en las plantas WT, tanto en condición control como salina (alrededor del 45%). La salinidad además no causó un cambio significativo de esta actividad en ninguna de las líneas.



**Figura 35. Medida de actividades ascorbatoperoxidasa (APX), monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR), deshidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR) en mitocondrias aisladas de plantas de *A. thaliana* genotipos silvestre (WT) y dos mutantes KO *Attrxo1* crecidos en ausencia (control) y en presencia de 100 mM de NaCl. Los datos son media  $\pm$  error estándar de al menos tres experimentos independientes. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre genotipos en cada condición de acuerdo al test de Tukey, y los asteriscos diferencias significativas de cada genotipo en salinidad comparado con la condición control usando el test t-Student ( $P < 0,05$ ).**

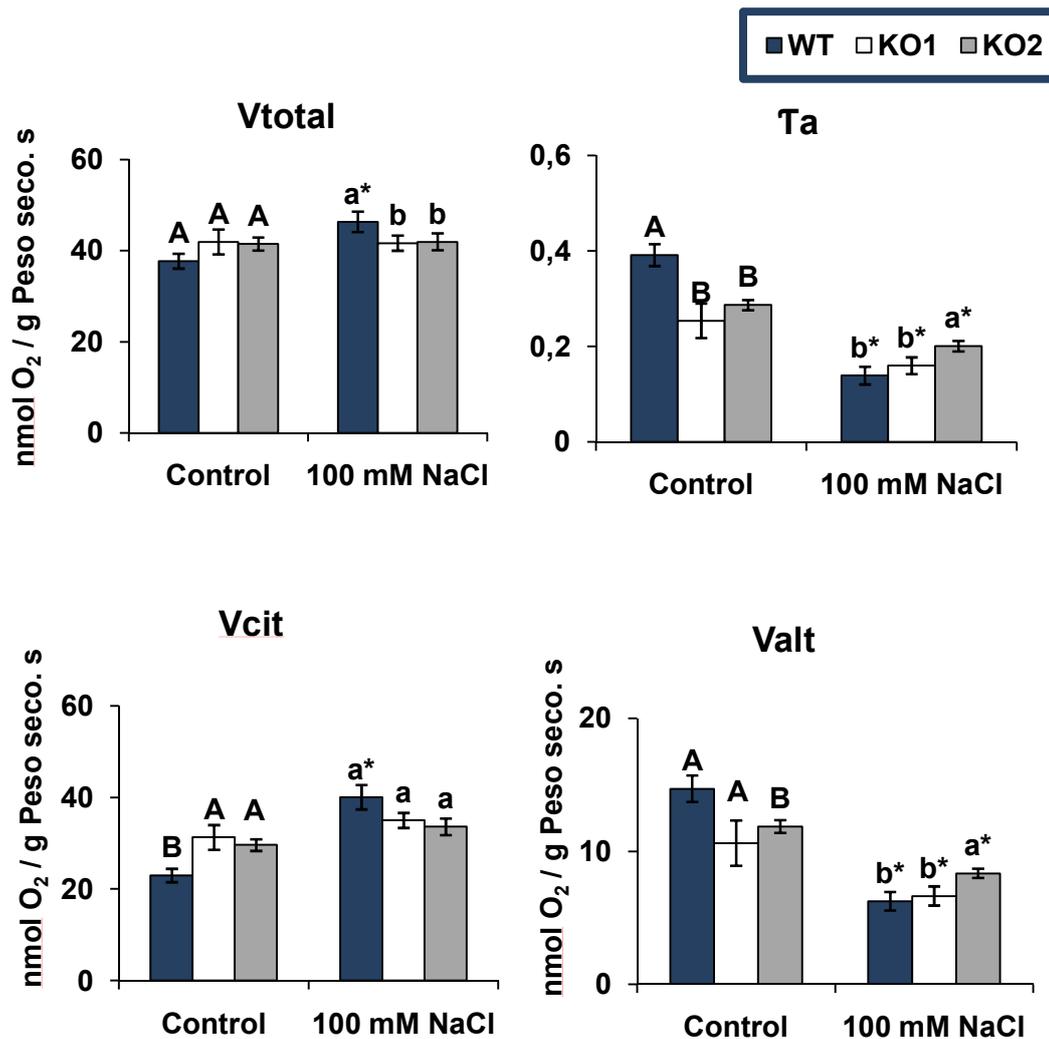
Las formas oxidadas de ASC son regeneradas por dos enzimas del ciclo ASC-GSH, MDHAR y DHAR. En las mitocondrias aisladas, la actividad MDHAR fue similar en todos los genotipos bajo condición control y se encontró más alta en las plantas WT que en las líneas KO bajo salinidad, siendo el aumento significativo por la condición de estrés

únicamente en este genotipo silvestre. Por otro lado, la actividad DHAR fue similar en todos los genotipos en ambas condiciones de crecimiento sin cambios significativos provocados por la salinidad (Figura 35).

La actividad GR, el último componente del ciclo ASC-GSH involucrada en la regeneración de GSH a partir de GSSG fue mayor en las plantas KO que en las WT en condición control, mientras que la salinidad indujo significativamente esta actividad solo en el genotipo WT (Figura 35).

### **1.5. Medida de respiración y partición electrónica**

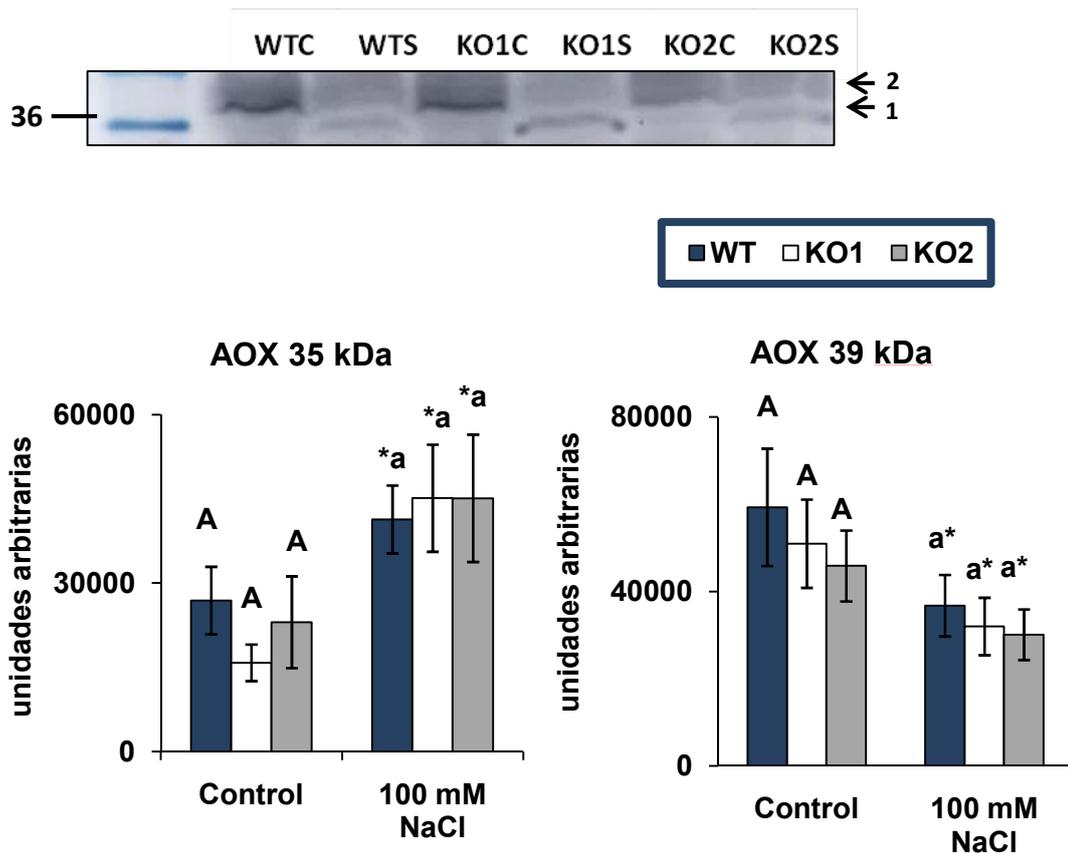
Las tasas respiratorias y el fraccionamiento de isótopos de oxígeno se determinaron *in vivo* en plantas cultivadas en condiciones control y salinas por la técnica de discriminación isotópica. El consumo total de oxígeno ( $V_t$ ), medido como el consumo por las dos vías respiratorias de la citocromo c oxidasa (COX) ( $v_{cit}$ ) y la alternativa por la oxidasa AOX ( $v_{alt}$ ), no fue significativamente diferente entre las líneas expuestas a condiciones ni control ni salinas (Figura 36). Sin embargo, la salinidad aumentó significativamente  $V_t$  (en un 23%) solo en las plantas WT. En plantas tratadas con sal, la partición electrónica hacia la vía alternativa ( $\tau_a$ ) se redujo en un 64%, 37% y 30% en las plantas WT, KO1 y KO2, respectivamente, con respecto a las plantas en situación control, y se mantuvo significativamente más alta en la línea KO2 en relación con las plantas WT. De manera similar, la respiración por la vía alternativa ( $v_{alt}$ ) disminuyó significativamente en las plantas WT, KO1 y KO2 en salinidad en un 57%, 37% y 30% respectivamente, en relación con las plantas control. Por otro lado, la respiración por la vía citocrómica ( $v_{cit}$ ) solo se incrementó en plantas WT (en un 74%), en relación con las condiciones de control. Cabe destacar que la partición de electrones a la vía alternativa ( $\tau_a$ ) fue significativamente menor en las líneas KO1 (35%) y KO2 (27%) que en las plantas WT en la condición control (Figura 36). Esto se debió principalmente a una actividad significativamente mayor de la ruta citocrómica ( $v_{cit}$ ) mostrada por KO1 (36%) y KO2 (29%) (Figura 36).



**Figura 36. Medida de actividades respiratorias total (Vt), discriminación por la vía alternativa (Ta), respiración por la vía citocrómica (Vcit) y por la vía alternativa (Valt) de plantas de *A. thaliana* genotipos silvestre (WT) y dos mutantes KO *Attrxo1* crecidos en ausencia (control) y en presencia de 100 mM de NaCl. Los datos son media ± error estándar de 8 réplicas biológicas. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre genotipos en cada condición de acuerdo al test de Tukey, y los asteriscos diferencias significativas de cada genotipo en salinidad comparado con la condición control usando el test t-Student ( $P < 0,05$ ).**

### 1.6. Inmunodetección y estado redox de AOX

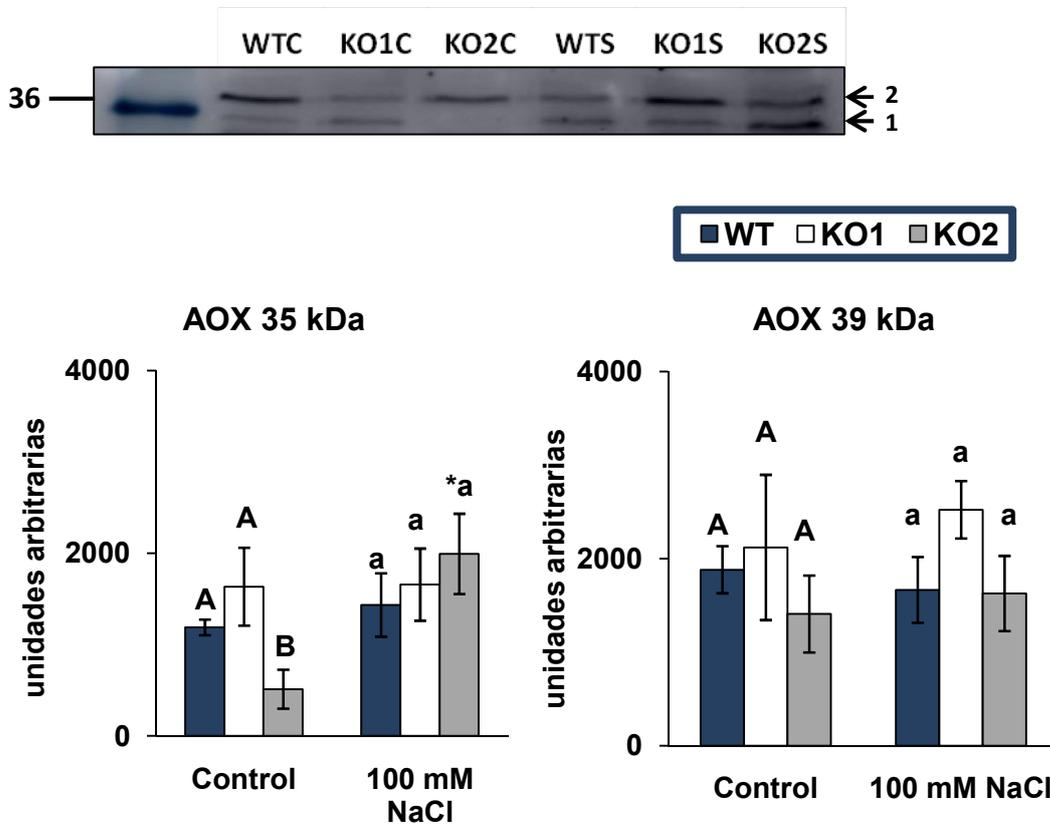
El estudio de la cantidad de proteína y el estado redox de la oxidasa alternativa AOX se realizó tanto en preparaciones enriquecidas en mitocondrias y debido a que se ha descrito en la literatura que durante el proceso de aislamiento de orgánulos se produce una oxidación que afecta el estado de esta proteína, se realizó también un estudio en extractos foliares totales. A fin de intentar minimizar dicha oxidación, se utilizó en los medios de extracción y preparación de las muestras, un compuesto bloqueante de grupos SH de Cys, N-etilmaleimida (NEM) que evita dicha oxidación. Así, el tratamiento con NEM evita la formación de disulfuro entre las Cys de los monómeros de AOX que provoca su dimerización, y puede evitar así la oxidación de la proteína durante el procedimiento de enriquecimiento mitocondrial. Tras la inmunodetección de las bandas AOX reconocidas por el anticuerpo específico, la relación entre la forma dimérica (oxidada, aprox. 70 kDa) y la monomérica (reducida, aprox. 35 kDa) se puede interpretar como el estado redox de la proteína AOX. No se detectó ninguna banda visible correspondiente a la forma dimérica/oxidada, mientras que se detectaron dos bandas principales correspondientes a formas monoméricas de aproximadamente 35 y 39 kDa, que podrían corresponder a diferentes isoformas que se han descrito de la forma reducida de AOX (Figura 37). La densitometría de la intensidad de señal de las dos bandas fue similar entre los genotipos en cada una de las condiciones analizadas. Esto denota que los mutantes *Attrxo1* no presentan cambios significativos en la cantidad de proteína AOX en mitocondrias en comparación con las plantas WT. Sin embargo el comportamiento con la salinidad de las dos bandas fue diferente, ya que la cantidad de proteína de la banda de 35 kDa aumentó con el estrés mientras que la de 39 kDa disminuyó, ambas en un nivel aproximadamente similar en todos los genotipos.



**Figura 37. Densitometría de la cantidad de proteína AOX detectada por western blot en extractos enriquecidos mitocondriales purificados de hojas de plantas de *A. thaliana* genotipos silvestre (WT) y dos mutantes KO *Attrxo1* crecidos en ausencia (control) y en presencia de 100 mM de NaCl. Los datos son media  $\pm$  error estándar de al menos tres experimentos independientes. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre genotipos en cada condición de acuerdo al test de Tukey, y los asteriscos diferencias significativas de cada genotipo en salinidad comparado con la condición control usando el test t-Student ( $P < 0,05$ ).**

Para analizar los cambios en la proteína AOX a nivel foliar se utilizaron extractos de hojas totales. Como se observa en la Figura 38, al igual que en las fracciones enriquecidas en mitocondrias, se detectaron dos bandas de aproximadamente 35 y 39 kDa. En este caso, las hojas del genotipo KO2 mostraron una cantidad menor de la banda de 35 kDa en condiciones control en comparación con los otros genotipos. Las intensidades de las bandas de 39 kDa fueron similares en todos los genotipos tanto en condiciones control como salina. Estos resultados sugieren que las plantas de KO2 pueden estar limitadas en su capacidad AOX para la respiración al nivel de la hoja bajo condiciones de control. Finalmente, la intensidad de la señal de la banda de 35 kDa

aumentó solo en el KO2 después del tratamiento de salinidad, mientras que no se detectaron cambios en los otros genotipos.



**Figura 38.** Densitometría de la cantidad de proteína AOX detectada por western blot en extractos foliares de plantas de *A. thaliana* genotipos silvestre (WT) y dos mutantes KO *Attrxo1* crecidos en ausencia (control) y en presencia de 100 mM de NaCl. Los datos son media  $\pm$  error estándar de al menos tres experimentos independientes. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre genotipos en cada condición de acuerdo al test de Tukey, y los asteriscos diferencias significativas de cada genotipo en salinidad comparado con la condición control usando el test t-Student ( $P < 0,05$ ).

**1.7. Perfil de metabolitos**

Con el fin de obtener una caracterización más detallada de los cambios metabólicos que se han podido producir como consecuencia de la falta de TRXo1, se realizó un análisis del perfil de metabolitos por GC-TOF-MS en los mutantes y las plantas WT bajo

condiciones control y salinas. Se detectaron un total de 46 metabolitos (tabla 18) y sus niveles relativos se normalizaron a los niveles medios de las plantas WT en condiciones control. A partir de estos datos se ha preparado un mapa de calor (heatmap) que se presenta como Figura 39. El tratamiento con la sal disminuyó significativamente ( $P < 0,05$ ) los niveles de 10 metabolitos en plantas WT, incluidos los ácidos orgánicos como deshidroascorbato (6 veces), fumarato (5,9 veces), malato (3,8 veces), ácido fosfórico (2,3 veces) y succinato (1,8 veces), los azúcares tales como glucosa (9,4 veces) y fructosa (8,3 veces), y los aminoácidos como glicina (4,0 veces), treonina (1,7 veces) y aspartato (1,3 veces) (Figura 39 y tabla 18). Por el contrario, seis metabolitos fueron significativamente más altos en las plantas WT tratadas con sal, incluidas la trehalosa (7,0 veces), rafinosa (2,7 veces), prolina (2,6 veces), serina (2,0 veces), histidina (1,7 veces) y glicerol (1,3 veces) (Figura 39 y tabla 18). Con la excepción de la trehalosa en salinidad, todas las diferencias metabólicas entre mutantes y WT se observaron bajo la condición control, donde ambas líneas mutantes mostraron niveles consistentemente más bajos de glucosa, fructosa, myo-inositol y  $\beta$ -alanina, mientras que los niveles de serina y sacarosa fueron significativamente más bajos solo en el mutante KO2.

**Tabla 18. Niveles relativos de metabolitos en plantas de *A. thaliana* genotipos silvestre (WT) y dos mutantes KO *Attrxo1* crecidos en ausencia (C) y en presencia (S) de 100 mM de NaCl. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 6 réplicas biológicas normalizadas al valor de la media en el WT en cada condición. Los números en negrita indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) respecto a la condición control de cada genotipo y los asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) relativas al WT en cada condición usando el test t-Student.**

Metabolito	WT C	KO1 C	KO2 C	WT S	KO1 S	KO2 S
Piruvato	1 $\pm$ 0,11	0,9 $\pm$ 0,09	1,07 $\pm$ 0,34	1,28 $\pm$ 0,18	1,09 $\pm$ 0,1	1,08 $\pm$ 0,1
Guanidina	1 $\pm$ 0,21	1,16 $\pm$ 0,39	0,8 $\pm$ 0,19	0,93 $\pm$ 0,2	0,95 $\pm$ 0,06	0,5 $\pm$ 0,11
Valina	1 $\pm$ 0,09	0,93 $\pm$ 0,07	0,84 $\pm$ 0,13	1,12 $\pm$ 0,06	0,95 $\pm$ 0,07	0,97 $\pm$ 0,15
Glicerol	1 $\pm$ 0,05	1,06 $\pm$ 0,21	0,86 $\pm$ 0,12	<b>1,34<math>\pm</math>0,13</b>	1,05 $\pm$ 0,15	1 $\pm$ 0,1
Isoleucina	1 $\pm$ 0,16	1,11 $\pm$ 0,25	0,86 $\pm$ 0,09	0,82 $\pm$ 0,07	0,69 $\pm$ 0,13	0,64 $\pm$ 0,09

Glicina	1±0,20	1,14±0,26	1,59±0,31	<b>0,25±0,05</b>	<b>0,19±0,03</b>	<b>0,23±0,03</b>
Serina	1±0,10	0,83±0,06	0,76±0,04*	<b>2,01±0,2</b>	<b>2,29±0,44</b>	1,95±0,56
Ác, fosfórico	1±0,14	0,88±0,06	0,84±0,07	<b>0,43±0,12</b>	<b>0,26±0,1</b>	<b>0,22±0,07</b>
Prolina	1±0,28	0,74±0,19	1,4±0,43	<b>2,6±0,13</b>	<b>2,54±0,05</b>	<b>2,59±0,22</b>
GABA	1±0,06	1,03±0,22	0,92±0,25	1,31±0,23	1±0,15	0,86±0,17
Glicerato	1±0,15	1,04±0,18	1,18±0,19	0,85±0,12	1±0,09	1,25±0,37
Alanina	1±0,14	1,09±0,15	1,48±0,62	1,11±0,23	1,04±0,15	0,88±0,27
Succinato	1±0,10	1,16±0,25	1,03±0,23	<b>0,57±0,07</b>	0,62±0,12	0,58±0,13
Treonina	1±0,15	0,77±0,14	0,74±0,23	<b>0,58±0,06</b>	0,59±0,05	0,5±0,04
Fumarato	1±0,17	0,94±0,24	1,01±0,43	<b>0,17±0,01</b>	<b>0,17±0,02</b>	0,18±0,02
β-Alanina	1±0,13	0,51±0,08*	0,39±0,07*	0,78±0,09	0,91±0,19	1,02±0,41
Eritritol	1±0,14	0,87±0,21	0,9±0,19	0,73±0,11	0,71±0,13	0,54±0,12
Malato	1±0,17	1,15±0,37	1±0,33	<b>0,26±0,02</b>	<b>0,27±0,04</b>	0,35±0,11
Hidroxiprolina	1±0,21	1,01±0,11	1,47±0,38	1,29±0,15	1,18±0,14	0,96±0,17
Aspartato	1±0,05	0,98±0,06	1,1±0,2	<b>0,75±0,05</b>	<b>0,72±0,07</b>	<b>0,6±0,06</b>
Metionina	1±0,16	0,91±0,15	1,08±0,16	1,38±0,13	1,18±0,16	1,13±0,16
Glutamina	1±0,11	0,96±0,1	1±0,12	0,88±0,26	0,91±0,19	1,11±0,46
Xilosa	1±0,24	0,66±0,19	0,55±0,24	0,44±0,06	0,55±0,1	0,47±0,1
Putrescina	1±0,14	0,61±0,11	0,96±0,15	0,78±0,18	0,84±0,19	1,01±0,27
Fenilalanina	1±0,07	1,22±0,28	1,06±0,11	1±0,06	0,86±0,13	0,81±0,08
Asparagina	1±0,18	0,77±0,14	0,77±0,18	0,76±0,17	0,71±0,16	0,96±0,32
Ornitina	1±0,26	0,9±0,23	1,15±0,18	1,55±0,19	1,37±0,1	1,36±0,22
Glicerol-3-P	1±0,09	0,69±0,15	0,88±0,25	1,18±0,24	0,88±0,24	0,74±0,2
Manosa	1±0,24	0,57±0,23	0,73±0,5	0,49±0,2	0,71±0,24	0,25±0,05
Arginina	1±0,13	0,66±0,1	0,99±0,16	1,29±0,2	<b>1,17±0,14</b>	0,91±0,07

Lisina	1±0,14	0,72±0,19	1,03±0,2	1,28±0,12	1,15±0,09	1,03±0,07
Deshidro- ascorbato	1±0,19	1,25±0,31	0,9±0,28	<b>0,17±0,02</b>	<b>0,14±0,01</b>	<b>0,14±0,01</b>
Tiramina	1±0,13	0,65±0,11	0,69±0,18	0,82±0,07	<b>1,12±0,15</b>	0,66±0,08
Tirosina	1±0,13	0,76±0,1	0,77±0,1	0,81±0,09	0,84±0,11	0,76±0,13
Histidina	1±0,12	0,69±0,12	0,93±0,2	<b>1,77±0,07</b>	<b>1,66±0,2</b>	2±0,54
Triptófano	1±0,14	1,01±0,29	0,9±0,14	0,66±0,1	0,61±0,12	<b>0,51±0,08</b>
Maltosa	1±0,14	0,62±0,1	0,76±0,36	1,43±0,19	<b>1,77±0,5</b>	1,54±0,72
Trehalosa	1±0,55	0,83±0,35	0,19±0,11	<b>7,03±1,25</b>	0,45±0,3*	0,08±0,02*
Galactinol	1±0,35	0,36±0,07	0,85±0,5	0,64±0,17	<b>0,99±0,27</b>	0,78±0,18
Rafinosa	1±0,32	0,66±0,12	1,08±0,42	<b>2,67±0,31</b>	<b>4,28±1,02</b>	<b>3,06±0,59</b>
Glutamato	1±0,18	0,67±0,17	0,89±0,14	<b>2,3±0,18</b>	<b>2,45±0,36</b>	2,46±0,62
Fructosa	1±0,12	0,04±0,01*	0,04±0,01*	<b>0,12±0,01</b>	0,14±0,04	<b>0,09±0,02</b>
Glucosa	1±0,1	0,04±0,01*	0,05±0,01*	<b>0,11±0,01</b>	0,13±0,04	0,08±0,02
mio-Inositol	1±0,19	0,4±0,06*	0,3±0,04*	0,6±0,05	<b>0,7±0,09</b>	<b>0,62±0,08</b>
Sacarosa	1±0,11	0,73±0,05	0,62±0,07*	<b>1,76±0,19</b>	<b>1,78±0,23</b>	<b>1,64±0,31</b>

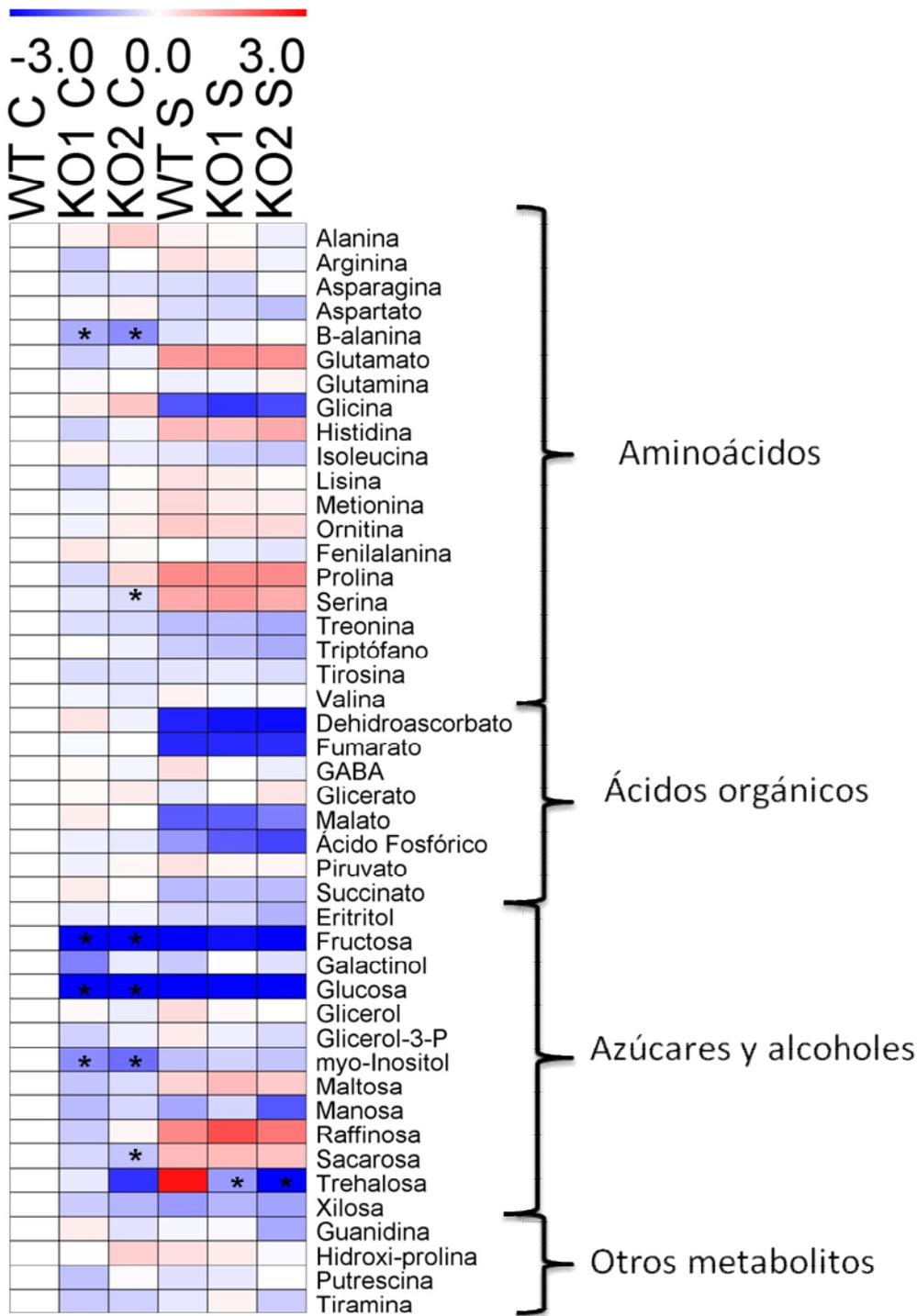


Figura 39. Mapa de calor (heatmap) con los niveles relativos de metabolitos en plantas de *A. thaliana* genotipos silvestre (WT) y dos mutantes KO *Attrx1* crecidos en ausencia (control) y en presencia de 100 mM de NaCl. Los metabolitos se agrupan por clases en aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, azúcares alcoholes y otros. Los niveles relativos en hojas de todas las líneas en condiciones control y salina se normalizan respecto al valor medio de las plantas WT bajo condición control y los cambios se transforman por log2 (ej. El nivel de metabolitos del WT en condición control es 0). Los colores rojo y azul representan el incremento de log2 veces y el

*descenso, respectivamente. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 6 réplicas y los asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) respecto del WT en cada condición usando el test t-Student. Las diferencias significativas estadísticamente entre control y salinidad de cada genotipo se presentan en la tabla 18.*

## **2. Análisis de la interacción TRXo1-PYR1**

### ***2.1. Estudio de la interacción y regulación de PYR1 por TRXo1***

En esta Tesis se ha realizado un estudio de la interacción de TRXo1 con el receptor de ABA PYR1 identificado previamente en nuestro laboratorio como una posible diana de esta tiorredoxina en núcleo. Esta identificación se llevó a cabo por cromatografía de afinidad fijando a una columna la proteína recombinante PsTRXo1 anclada mediante colas de Histidina a la que se añadió un extracto de proteínas nucleares de hojas de guisante (Martí y col., 2009), reteniéndose aquellos péptidos que interaccionasen con PsTRXo1. Entre los péptidos encontrados se obtuvieron dos con una alta homología al receptor de ABA PYR1. Una vez identificado, y para comprobar la interacción entre estas proteínas, no solo en guisante sino también en *Arabidopsis*, en esta Tesis se han utilizado diferentes técnicas que nos permitieran en un inicio, comprobar que efectivamente ambas proteínas interaccionan, como un paso preliminar al estudio de la regulación que pueda ejercer esta tiorredoxina sobre la proteína PYR1 y sobre su actividad.

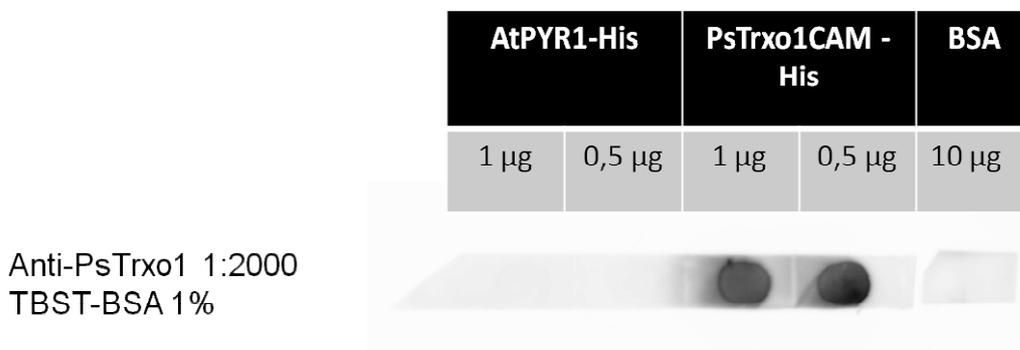
### ***2.2. Ensayo dot-blot trampa***

Como estrategia de aproximación se realizó un dot-blot trampa en el que se dispusieron individualmente proteínas recombinantes purificadas AtPYR1-His y dos versiones de proteína PsTRXo1, una silvestre y otra mutada en una Cys de su centro activo (CAM) en membranas de nitrocelulosa.

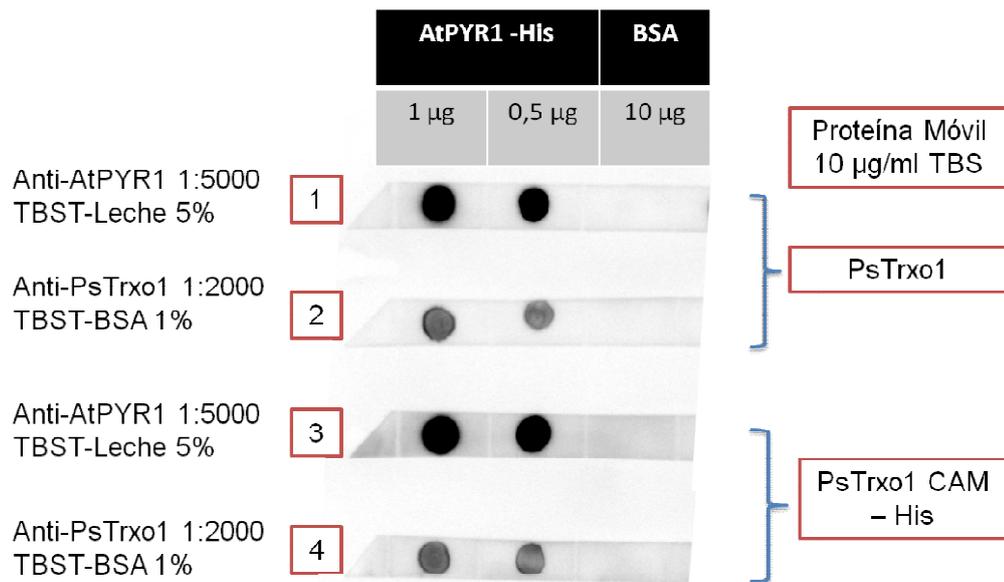
En primer lugar se realizaron los controles de reconocimiento de las proteínas por parte de los anticuerpos correspondientes probando la ausencia de reconocimientos inespecíficos y una correcta señal que permitiese la detección (Figura 40).

Una vez realizados los controles se llevó a cabo el ensayo de Dot-Blot trampa, para lo cual se depositaron independientemente las proteínas recombinantes sobre las membranas de nitrocelulosa y tras un lavado exhaustivo y un bloqueo de las membranas, se incubaron con una solución de TBS donde la proteína a interaccionar con la proteína fijada en la membrana se hallaba disuelta. La presencia de ambas proteínas interaccionando PYR-TRXo1 se reconoció mediante el uso de anticuerpos primarios específicos de ambas, tanto de la proteína fijada (control positivo) como la de la proteína móvil que hubiese sido retenida por la fijada, de esta manera comprobando la interacción. Como control negativo se utilizó albúmina (10 µg BSA) como proteína fijada.

En la Figura 41, en las membranas 1, 2, 3 y 4 se depositaron gotas con 0,5 y 1 µg de proteína recombinante PYR1-His. En la membrana 1 se muestra el reconocimiento del anticuerpo α-AtPYR1 sobre la proteína AtPYR1-His fijada y en la membrana 2 puede observarse el reconocimiento del α-PsTRXo1 sobre la PsTRXo1 que ha quedado retenida en la membrana por interacción con AtPYR1-His tras ser incubada como se describe en la sección de materiales y métodos 4.1. Las membranas 3 y 4 son réplicas de la 1 y 2 respectivamente, con la diferencia de que la proteína móvil fue la recombinante mutada en una Cys de su centro activo PsTRXo1CAM. En este experimento pudimos comprobar que existe una interacción de ambas proteínas PYR1 y TRXo1 y que además esta interacción se da tanto con la versión silvestre como con la versión mutada de TRXo1.

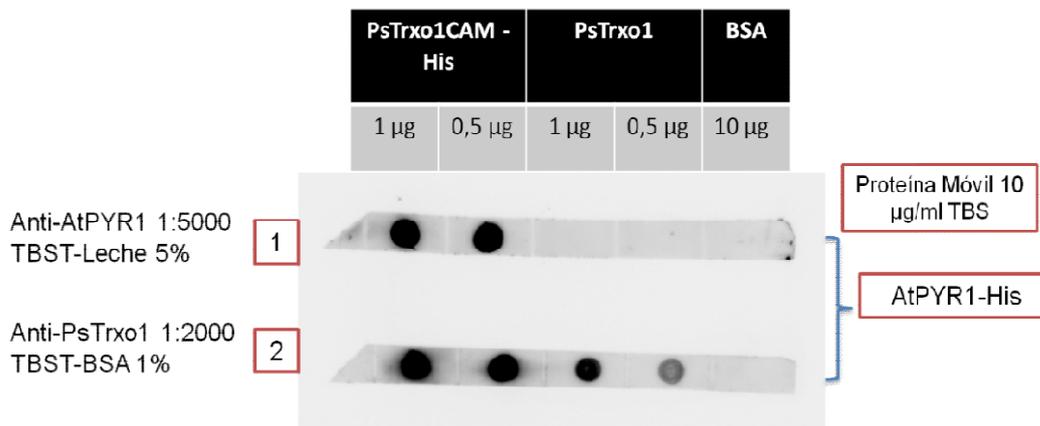


**Figura 40. Control de anticuerpo α-PsTRXo1.** Reconocimiento de PsTRXo1CAM-His por el anticuerpo y ausencia de señal sobre BSA o PYR1-His.



**Figura 41. Dot-blot trampa con AtPYR1-His fija y PsTRXo1 móvil.** La proteína albúmina (BSA) se utiliza como control negativo.

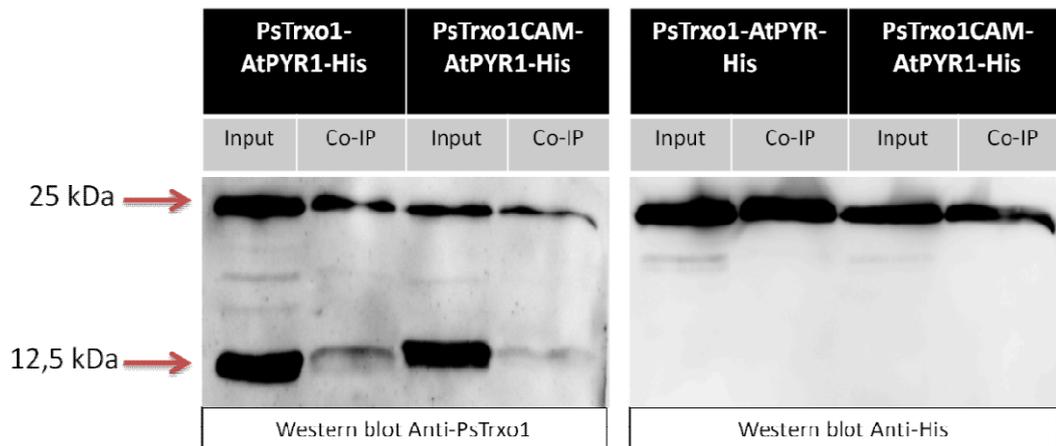
Al invertir el sistema fijando a la membrana la PsTRXo1 y PsTRXo1CAM e incubando con el AtPYR1-His como proteína móvil (Figura 42), pudimos observar que el anticuerpo  $\alpha$ -PsTRXo1 reconoce a PsTRXo1 tanto en su versión silvestre como mutada cargadas en la membrana 2 como control positivo. En la membrana 1 donde se cargó la misma cantidad de las proteínas, el anticuerpo Anti-PYR1 reconoció al PYR1-His que había quedado retenido por su interacción con la PsTRXo1CAM. No observamos señal en las casillas donde se depositó la PsTRXo1 en su versión silvestre (WT); sin embargo, esto no invalida necesariamente la posible interacción entre las proteínas puesto que puede existir una interacción de PYR1-His con la PsTRXo1 sin mutar que no sea lo suficientemente estable en el tiempo como para quedar retenida tras varios lavados exhaustivos. Se ha descrito que la mutación de una Cys del centro activo de TRXs estabiliza el complejo con su diana, y de hecho es una estrategia para atrapar proteínas diana en cromatografías de afinidad.



**Figura 42.** Dot-blot trampa con PsTRXo1 y PsTRXo1CAM fijas y AtPYR1-His móvil. La proteína albúmina (BSA) se utiliza como control negativo.

### 2.3. Ensayo de Co-inmunoprecipitación

Para corroborar el resultado obtenido en el dot-blot trampa, se realizó una Co-inmunoprecipitación (Co-IP) de proteínas recombinantes. Para ello, utilizamos el kit comercial µMACS Anti-HisMicroBeads tal como se describió en la sección de materiales y métodos 4.2. Tras haber incubado AtPYR1-His junto con las dos versiones de la PsTRXo1 por separado y las micropartículas magnéticas cubiertas del anticuerpo anti-His que ofrece este kit, la proteína AtPYR1-His quedó retenida en la columna magnética. Posteriormente fue eluida con el tampón de elución indicado por el fabricante. En la Figura 43 se presenta en la primera y tercera calle el “input” equivalente a una fracción de la solución en la que se incubaron las proteínas antes de pasar por la columna, mientras que la segunda y la cuarta calle muestran el contenido del eluido donde se hallan las proteínas retenidas por las micropartículas magnéticas cubiertas del anticuerpo anti-His. Como puede observarse, se obtuvo en el eluido la proteína PsTRXo1 en sus dos versiones (revelada con anti-PsTRXo1, forma monomérica de aprox. 12,5 kDa y dimérica de 25 kDa), junto a la proteína AtPYR1-His evidenciado en la misma membrana tras mild stripping (ver sección 10.1 de materiales y métodos) revelada con anti-His de aproximadamente 24 kDa (PYR1 = 21,575kDa + His-tag: 2,5kDa), lo que confirma la interacción entre las proteínas AtPYR1-His y PsTRXo1/CAM.

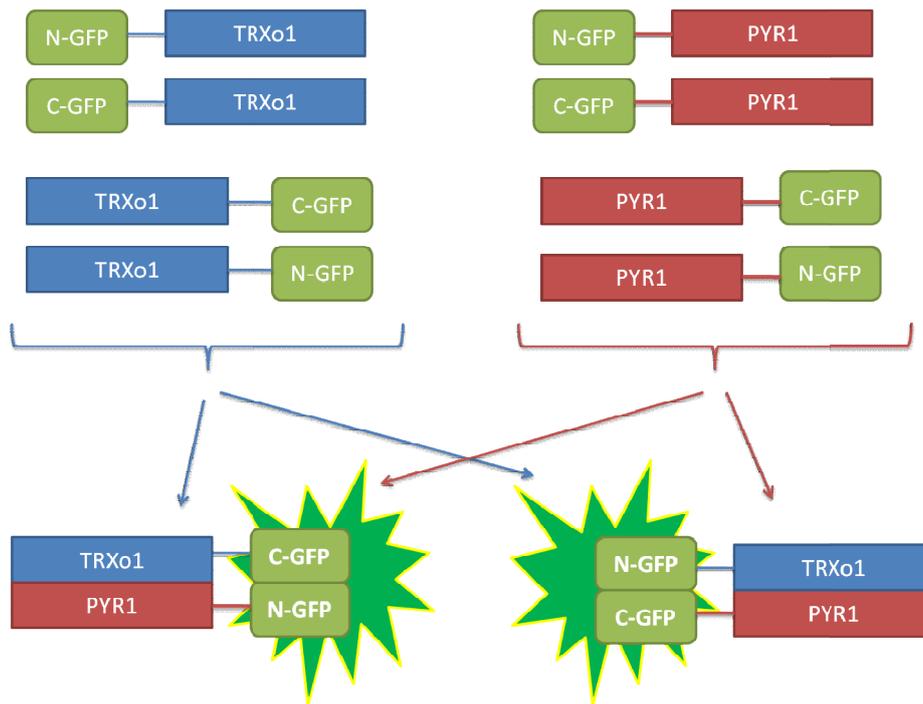


**Figura 43.** Western blot sobre el resultante de la Co-IP entre PsTRXo1 versión silvestre y mutada en su centro activo (CAM) y AtPYR1, revelando frente a PsTRXo1 e His. Se muestra a 12,5 kDa la banda producto del reconocimiento de PsTRXo1 sobre el monómero de la PsTRXo1. La banda a 25 kDa en la membrana incubada con Anti-PsTRXo1 corresponde en peso molecular con el dímero de la PsTRXo1, mientras que en la membrana incubada con Anti-His se detecta al AtPYR1-His.

#### 2.4. Ensayo de complementación bimolecular fluorescente

La tercera técnica empleada para comprobar la interacción *in vivo* entre las proteínas TRXo1 y PYR1 de *arabidopsis* y guisante fue la complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC, *Bimolecular Fluorescence Complementation*). Para esta técnica se realizó la expresión transitoria de nuestras proteínas de interés TRXo1 y PYR1 tanto de *Arabidopsis* como de guisante fusionadas a las distintas mitades de la GFP en tejido vegetal mediante dos técnicas de transformación, la biolística en epidermis de cebolla (*Allium cepa*) y la agroinfiltración en plantas de *Nicotiana benthamiana*.

La expresión de estas proteínas fusionadas a la proteína GFP permitiría que de producirse la interacción, las dos mitades se aproximaran lo suficiente como para reconstituir la GFP completa emitiendo fluorescencia al excitar con la luz de longitud de onda adecuada (ver secciones de materiales y métodos 4.3.4. y 4.4.3.) (Figura 44).

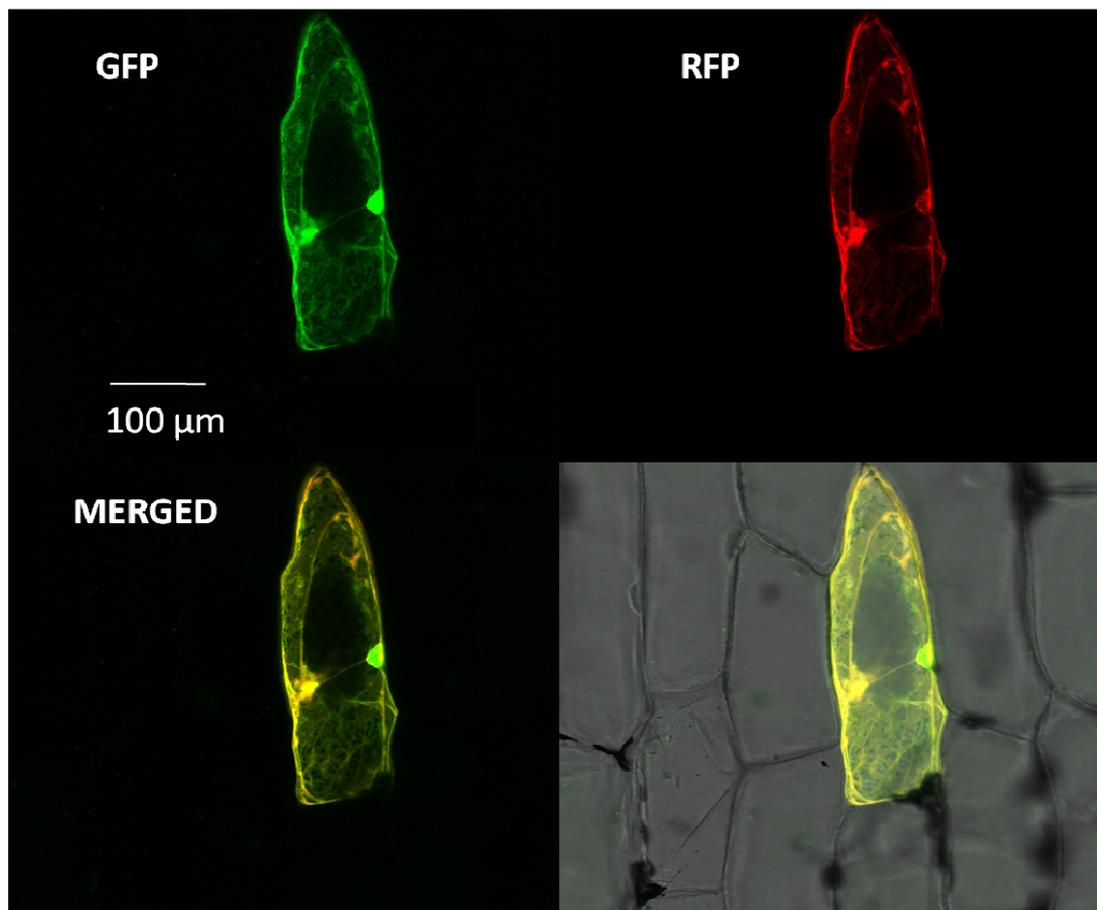


**Figura 44.** Esquema explicativo sobre las construcciones empleadas en la complementación bimolecular fluorescente. Se muestran las distintas construcciones con una de las dos mitades de la GFP a la que se fusionaron las proteínas de interés, así como sus posiciones relativas en cada caso. Se muestran también dos ejemplos de posible interacción entre las proteínas de interés y la consecuente complementación entre las mitades de la GFP permitiendo su detección por fluorescencia.

Para el ensayo de BiFC en cebolla se realizó la biolística con las dos proteínas fusionadas cada una de ellas a 1 de las mitades (al extremo amino o al carboxilo) complementarias de la proteína GFP, mediante la creación de construcciones génicas creadas en los vectores CD3 como se describe en las secciones de materiales y métodos 3.8.1. y 3.8.5. Tras realizar la transformación por biolística como se describe en la sección de materiales y métodos 4.3. se observaron los epitelios de cebolla al microscopio confocal al cabo de 48 horas, pudiendo observarse un alto porcentaje de células transformadas en aquellas muestras bombardeadas con los controles positivos compuesto por los vectores CD3 con el gen de la GFP completa y la RFP como marcador de membranas, tal como puede observarse en la figura 45. Sin embargo observamos un menor número de células transformadas en las muestras problema como mostraba la tinción de RFP. Además la visualización de la fluorescencia de la GFP corroboró la

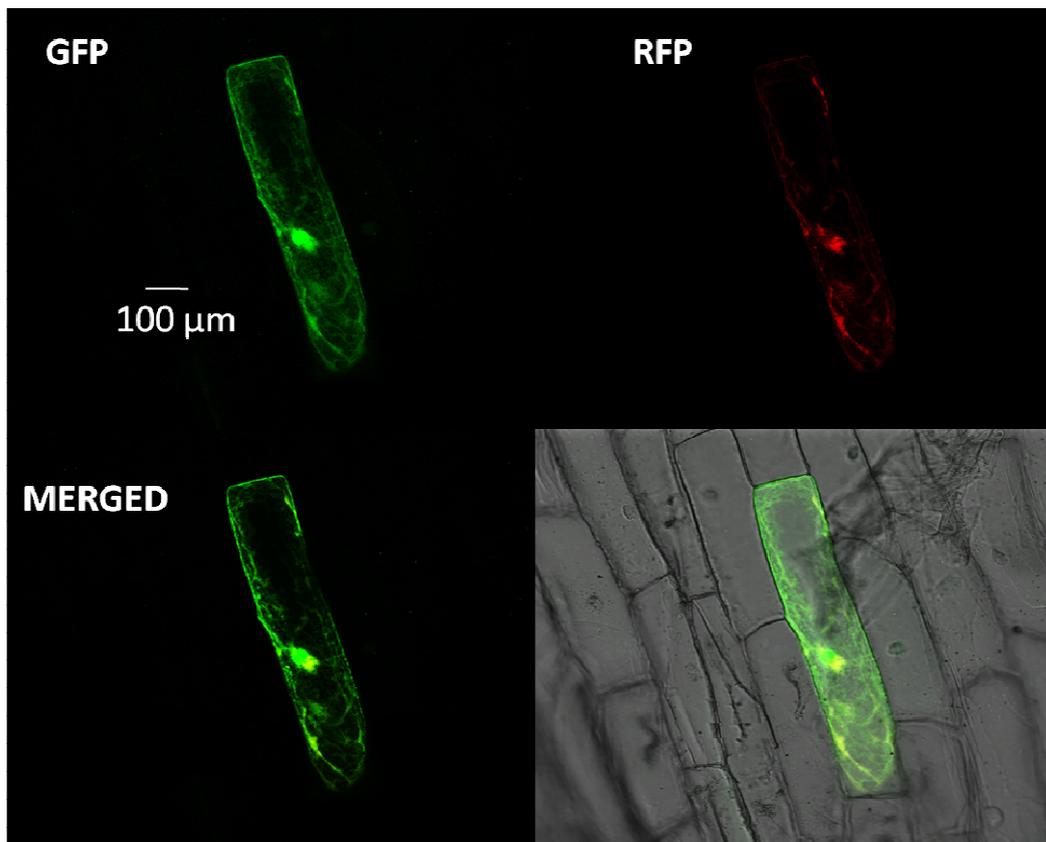
interacción de nuestras proteínas TRX $\alpha$ 1 y PYR1 que ocurría principalmente en el núcleo, aunque también se observó señal citoplasmática (Figura 46). En aquellas muestras donde se transformó con los genes de guisante no observamos ninguna célula que ofreciera una imagen claramente positiva de la interacción.

### Control: pCD3-GFP+pCD3-RFP



**Figura 45. BiFC en *Allium cepa*.** Controles positivos con la expresión de la GFP completa y el marcador de membrana RFP.

## Interacción AtTRXo1-CGFP\_AtPYR1-NGFP

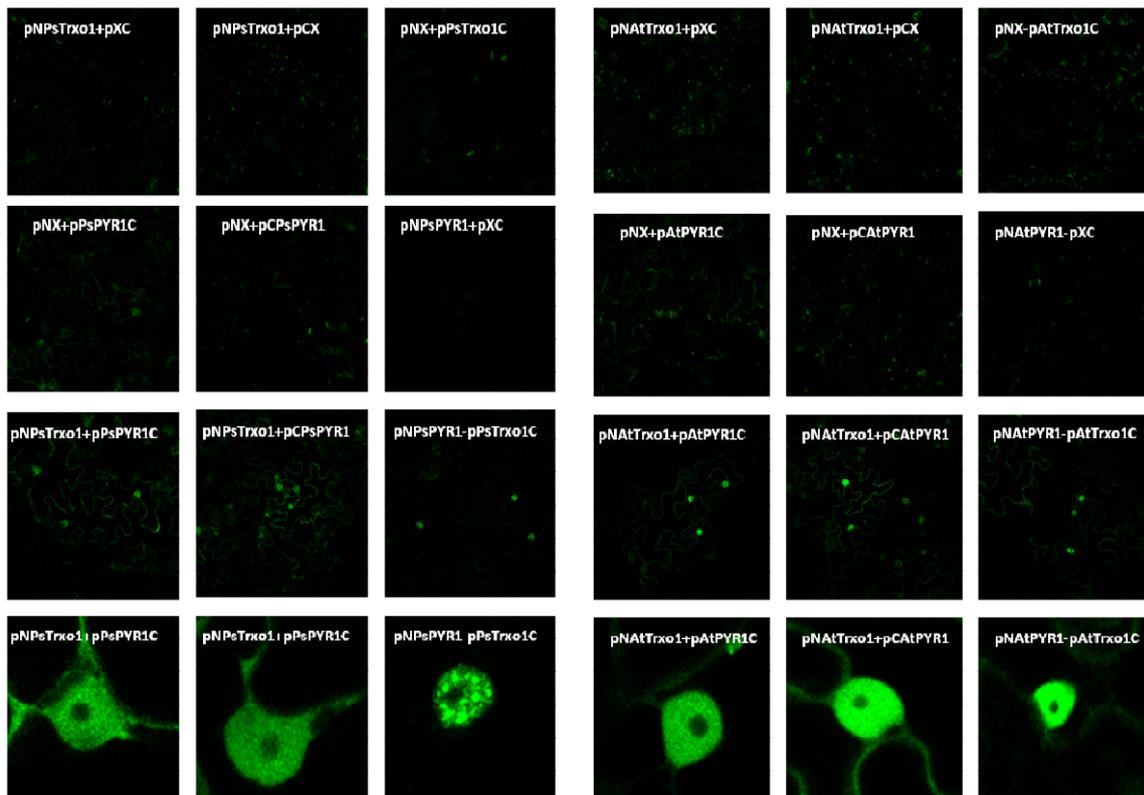


**Figura 46. BiFC en *Allium cepa*.** Resultado de interacción positiva en la muestra transformada con la combinación en la que la TRXo1 fue fusionada con el extremo C-terminal de la GFP y el AtPYR1 se encontraba fusionado al extremo N-terminal de la GFP.

Debido al bajo número de resultados positivos para las proteínas de arábidopsis y la ausencia de resultados positivos con las proteínas de guisante, decidimos abordar la BiFC mediante otra técnica de transformación utilizando *Nicotiana benthamiana*. Para ello, se realizó la agrotransformación con las dos proteínas fusionadas cada una de ellas a 1 de las mitades (al extremo amino o al carboxilo) complementarias de la proteína GFP mediante la creación de construcciones génicas por tecnología Gateway tal y como se describe en las secciones de materiales y métodos 3.8.3 y 3.8.6.

Como controles positivos se usaron las proteínas ATML1 y PDF2 clonadas en los mismos vectores usados para las construcciones empleadas en este nuevo ensayo, y que por tanto se encontraban fusionadas a las mitades de la GFP y cuya interacción estaba

ya descrita y confirmada por Rombolá-Caldente y col. (2014). Con esta interacción se establecieron los parámetros de medida en el microscopio confocal para la toma de imágenes de las interacciones a ensayar. Como controles negativos se han utilizado tanto la versión amino-GFP como la carboxi-GFP sin fusionarse a ninguna de las proteínas de interés, co-expresadas en cada caso con la versión complementaria de GFP fusionada a PYR1 o TRXo1 según el caso. Aunque obtuvimos señales positivas en la mayoría de las combinaciones ensayadas, en la Figura 47 se presentan únicamente aquellas combinaciones que dieron señal positiva tanto con las proteínas de *Arabidopsis* como con las de *Pisum*, además de confirmarse la ausencia de señal en sus respectivos controles negativos. La interacción, al igual que en el ensayo de biolística en cebolla, tuvo lugar principalmente en el núcleo aunque también se detectó señal en el citoplasma.



**Figura 47. BiFC en *Nicotiana benthamiana*. Combinaciones con proteínas de *Arabidopsis* y *guisante*. Se muestran resultados positivos de interacción entre TRXo1-PYR1 a las que dieron lugar las transformaciones de *Nicotiana benthamiana* con las distintas combinaciones entre construcciones realizadas con los genes de *guisante* y *Arabidopsis*, clonados en los vectores pCX,**

*pXC, pNX, pXN donde las letras N y C indican la presencia en el vector del extremo amino (N) o carboxilo (C) terminal de la GFP. La posición de la X representa la posición relativa del gen de interés respecto a la mitad de la GFP a la que va fusionada.*

Los resultados obtenidos en la BiFC confirmaron la interacción de estas dos proteínas, tanto las de guisante como las de Arabidopsis, situando dicha interacción en el núcleo y excluyéndose la señal del nucléolo. También se observó señal en el citoplasma y se advirtió además la acumulación de señal en estructuras vesiculares en el citoplasma en algunas de las combinaciones ensayadas. Como particularidad de las combinaciones de proteínas de guisante, se encontraron “speackles”(punteaduras) en el interior del núcleo en algunas combinaciones.

### **2.5. Actividad de PYR1 mediada por TRXo1**

Una vez confirmada la interacción entre las proteínas PYR1 y TRXo1, buscamos la posible funcionalidad fisiológica de la misma, tratando de implicar a la TRXo1 en la actividad de este receptor de ABA. PYR1 tiene una actividad inhibitoria de fosfatasa tipo PP2C cuando se encuentra activo y unido a la fitohormona. La actividad de este receptor se analizó entonces de forma indirecta por medida de la actividad fosfatasa HABI *in vitro* siguiendo el método colorimétrico descrito en la sección de materiales y métodos 9.2. por cambios en absorbancia a 405 nm. Se utilizó en el ensayo la proteína AtPYR1-His recombinante previamente modificada por distintos tratamientos de reducción con DTT, oxidación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y nitrosilación con GSNO (sección de materiales y métodos 9.1.).

En primer lugar analizamos la actividad fosfatasa de HAB1. Tal como puede observarse en la Figura 48, el control negativo compuesto solo por la mezcla de la solución de reacción no generó apenas cambio en la absorbancia a 405 nm. En el control positivo que contenía HAB1 pudo observarse la actividad de esta fosfatasa que fue considerada como el 100%. Cuando la reacción se realizaba en presencia de PsTRXo1 previamente reducida con DTT, se producía un efecto activador quizás por reducción de la parte que aún quedara oxidada de HAB1. Sin embargo, el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producía un efecto inhibitorio sobre la actividad fosfatasa.

A continuación se analizó si el estado redox del PYR1 influía en la actividad de HABI. Para cada reacción se realizó un control interno en ausencia de ABA que sería utilizado posteriormente para calcular la actividad PYR (presentada en la Figura 49). Cuando el PYR1 se encontraba reducido ( $_{red}$ ) y activo por la presencia de ABA, la fosfatasa HABI se veía inhibida, reduciendo su actividad hasta alrededor del 20% de su actividad máxima con respecto al control +. Sin embargo cuando el PYR1 fue oxidado ( $_{oxid}$ ), la actividad fue sobre el 70 % del control +. Al nitrosilar PYR1 ( $_{SN}$ ) se registraron valores similares de actividad fosfatasa a cuando estaba reducido. Una vez probado el efecto de los diferentes tratamientos sobre PYR1 en su actividad, se realizó el ensayo en presencia de la proteína PsTRXo1 recombinante previamente reducida con DTT para activarla como se describe en la sección de materiales y métodos 9.1., para comprobar si la reducción de PYR1 por la TRXo1 y no por DTT producía el mismo efecto. Efectivamente puede observarse en la Figura 48 (6 últimas barras) que al añadir a la reacción la proteína recombinante PsTRXo1, si el PYR1 se encuentra ya reducido, la capacidad del PYR1 de inhibir a la fosfatasa apenas se ve afectada, es decir, en presencia de ABA la actividad fosfatasa se ve inhibida de forma muy similar a como lo hace cuando no está presente la PsTRXo1. Sin embargo al incubar la tiorredoxina PsTRXo1 con el PYR1 oxidado que resultaba poco activo, se produce una recuperación de la actividad PYR1 que consigue inhibir a la fosfatasa en presencia de ABA hasta niveles similares a cuando PYR1 estaba reducido por DTT en presencia de ABA. En el caso del PYR1 nitrosilado incubado con PsTRXo1 se observa una actividad inhibitoria de PYR1 sobre la fosfatasa HABI similar a la presentada por el PYR1 reducido.

Teniendo en cuenta los controles internos en ausencia de ABA, a continuación han expresado los valores de actividad PYR1 resultantes de calcular el porcentaje de disminución de actividad fosfatasa en presencia de ABA. Así puede mostrarse más ilustrativamente el efecto que la PsTRXo1 tiene sobre la actividad PYR1 cuando ésta se encuentra previamente modificada por tratamientos de reducción, oxidación o nitrosilación. El efecto más significativo registrado se encuentra en la notable recuperación de la actividad PYR1 cuando es previamente inhibida por oxidación y posteriormente incubada con la PsTRXo1. También se observa una leve recuperación de la actividad PYR1 previamente disminuida por nitrosilación y posteriormente incubada

con la PsTRXo1, si bien en este caso la actividad PYR1 no se vio tan disminuida por la nitrosilación como por la oxidación y su recuperación, debida a la presencia de PsTRXo1, no es tan reseñable. Al tratarse de porcentajes, no resulta adecuado realizar una estadística que cuantifique la significancia de los cambios observados, si bien la recuperación de la actividad PYR1 resultó evidente sobre todo en el caso del PYR1 oxidado.

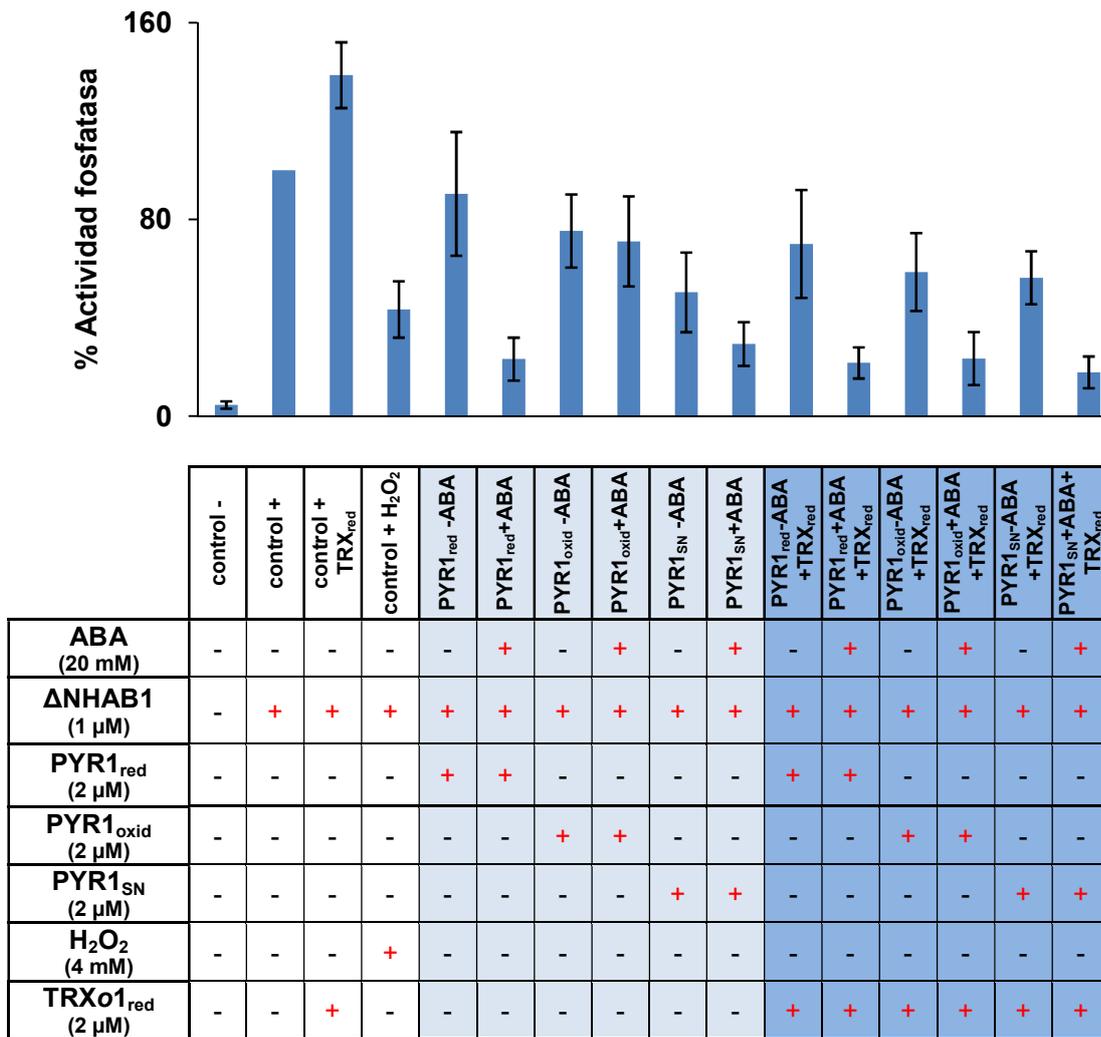
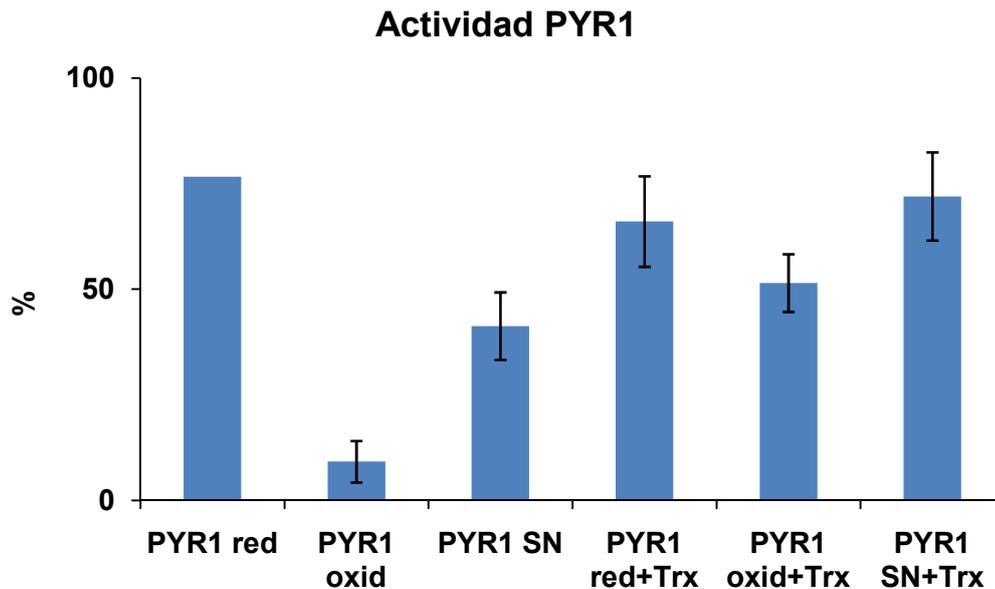


Figura 48. Actividad fosfatasa de AtPYR1-His recombinante. Los valores representan el porcentaje de actividad fosfatasa registrado en la reacción con los distintos componentes especificados en cada caso, en comparación con la actividad fosfatasa en solitario (control +) la cual representa el 100%.



**Figura 49. Actividad PYR.** Los valores representan la actividad PYR medida de forma indirecta a través de la inhibición de la actividad fosfatasa. Los porcentajes son calculados comparando la actividad PYR1 en presencia de ABA para cada caso con su control negativo correspondiente en ausencia de ABA. El porcentaje de disminución en la actividad fosfatasa producido al añadir ABA se expresa como actividad PYR1.

A la vista de estos resultados, confirmamos que la TRXo1 es capaz, al menos in vitro, de rescatar la actividad del PYR1 oxidado y por tanto la interacción TRXo1-PYR1 podría tener una funcionalidad fisiológica ante una posible modulación redox de la actividad PYR1 en la que podría estar implicada la TRXo1. Estos resultados suponen una nueva regulación de carácter redox no descrita de la actividad de PYR1.

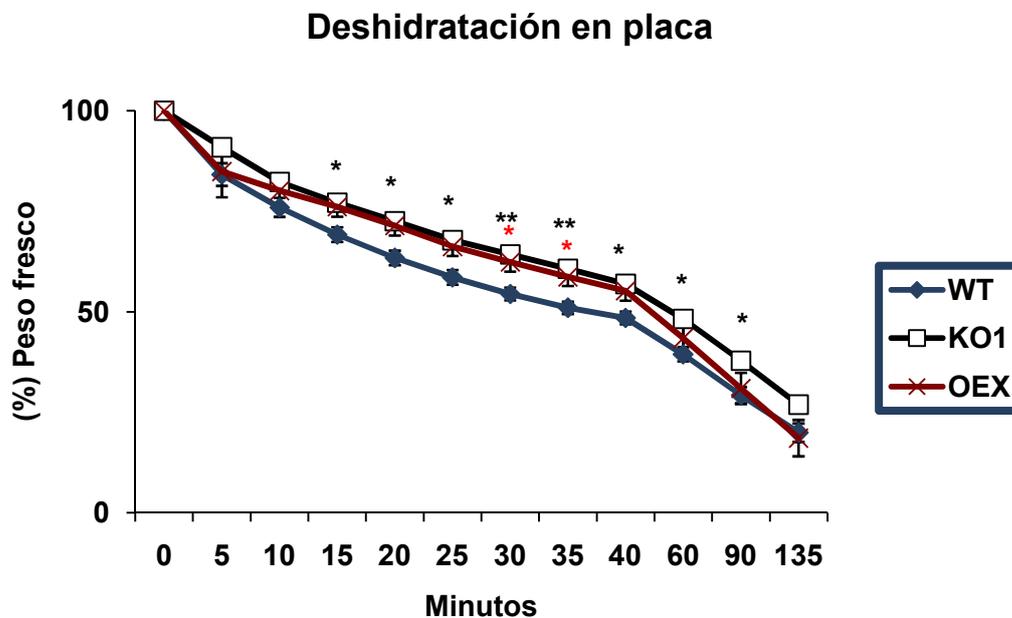
## **2.6. Caracterización de la sensibilidad a ABA de mutantes KO1 y OEX Attrxo1**

Una vez comprobada la regulación de PYR1 por TRXo1 realizamos un estudio de respuesta a ABA en mutantes tanto KO como sobre-expresantes de esta tiorredoxina esperando una alteración en procesos en los que esta fitohormona está implicada, como son la deshidratación, la germinación en presencia de ABA y la respuesta estomática a ABA.

**2.7. Ensayo de deshidratación**

El estudio de deshidratación se ha realizado en plantas de 21 días de crecimiento en placa crecidas en ciclo largo analizando en las condiciones del laboratorio (55% Hr; 23°C) el peso fresco durante 135 minutos mientras las plantas se deshidratan tal como se describe en la sección de materiales y métodos 1.3.4.2.

Como muestra la Figura 50 el genotipo que más diferencia muestra con el WT y que mantiene dicha diferencia durante más tiempo es el KO1, que presenta diferencias significativas entre los 15 y 90 minutos según el t-test aplicado. El OEX presenta diferencias significativas con el WT entre los minutos 30 y 35.



**Figura 50. Deshidratación de plantas crecidas en placa.** Se representa la disminución de peso fresco de grupos de 5 plantas a lo largo del tiempo mostrando los porcentajes de peso de cada genotipo en cada tiempo respecto a su peso inicial. Los asteriscos representan diferencias significativas de cada genotipo comparado con el WT en cada tiempo de medida según el test t-Student (\*= $P < 0,05$ ; \*\*= $P < 0,01$ ).

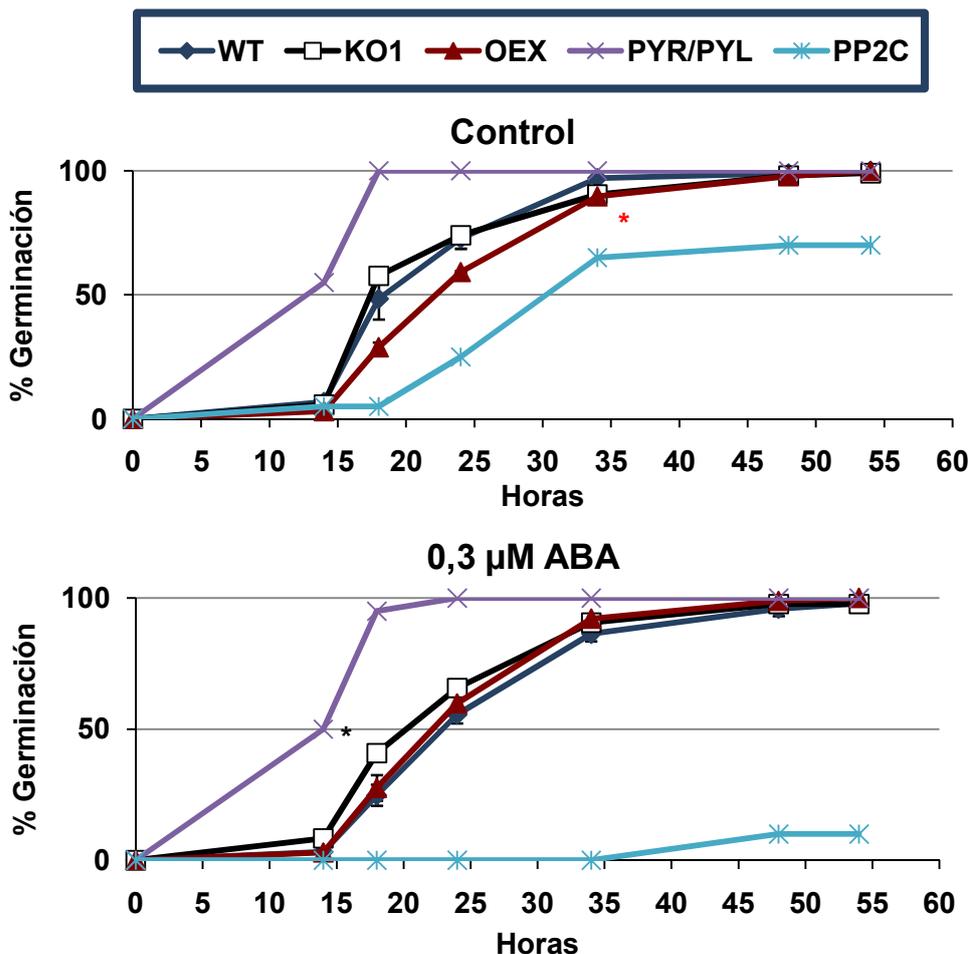
## 2.8. Germinación en presencia de ABA

Se ha realizado un estudio de germinación en respuesta a ABA que se ha descrito como un factor que retrasa este proceso, tanto del genotipo WT como el KO1 y OEX *Attrxo1*. En este estudio también se han utilizado controles conocidos de hipersensibilidad como el mutante *PP2C* y de hiposensibilidad como un mutante de los receptores de ABA *PYR/PYL*. La germinación de semillas de *PP2C* efectivamente se encontraba retrasada respecto del WT ya en condiciones control (Figura 51) debido a su alta sensibilidad incluso a los niveles endógenos de ABA debida a la falta del regulador negativo de la ruta de señalización de ABA, la fosfatasa, cuya ausencia evita la desactivación de las kinasas de dicha ruta (ver sección de introducción 6.3). A partir de la presencia de ABA 0,3  $\mu\text{M}$  estas semillas no germinaron (apenas 10% a las 48 horas). Esto contrastaba con el fenotipo de la línea mutada en receptores *PYR/PYL* de germinación rápida, que es insensible al ABA tanto de origen endógeno (Control) como en presencia de concentraciones crecientes de ABA exógeno germinando con una velocidad similar a la registrada en condiciones control. El análisis del comportamiento germinativo de los mutantes de *TRXo1* reveló que las velocidades de germinación en ausencia de ABA apenas presentaban diferencias manteniendo un ritmo de germinación intermedio entre los dos controles de hiper e hiposensibilidad a ABA. Solo pudo observarse un cierto retraso en la germinación del OEX en estas condiciones control, este retraso resulta estadísticamente significativo solamente a las 34 horas. Este retraso del OEX en condiciones control fue observado también en los ensayos de germinación en salinidad donde tanto en condiciones control como en condiciones salinas el OEX presentó una germinación más lenta que la del genotipo silvestre. Ya en presencia de 0,3  $\mu\text{M}$  de ABA, los mutantes KO1 y OEX presentan un perfil de germinación más rápido que en el caso del genotipo silvestre, sobre todo en el caso del KO1 que presenta una germinación significativamente más rápida que el WT a las 18 horas, mientras el OEX deja de mostrar un retraso en la germinación al compararlo con el WT. En presencia de 0,5  $\mu\text{M}$  de ABA, se registran perfiles parecidos a lo observado a 0,3  $\mu\text{M}$  de ABA quedando el WT ligeramente retrasado respecto a los genotipos mutantes *Attrxo1*. En las placas que contenían 1  $\mu\text{M}$  de ABA aumentaron las diferencias observadas a concentraciones menores de la fitohormona generando perfiles de germinación más rápidos en el caso

de los mutantes *Attrxo1* con respecto al WT. Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas a las 24 y 34 horas en el caso del KO1 y a las 34 y 48 horas en el caso del OEX.

Si bien, no se trató de grandes diferencias, hemos podido observar una distinta sensibilidad al ABA por parte de los mutantes *Attrxo1* con respecto al WT, mostrando los primeros una cierta hiposensibilidad a la fitohormona, sobre todo en el caso del KO1. Es también llamativo el retraso en la germinación por parte del OEX con respecto al WT, que es revertido al aumentar la concentración de ABA exógeno.

Los perfiles de germinación comentados anteriormente y representados en la Figura 51 se acompañan de la representación de los tiempos  $t_{50}$  en los que había un 50% de semillas germinadas, que evidencian los resultados anteriormente comentados de un adelanto en germinación en los mutantes en presencia de ABA, más acusado en el KO1.



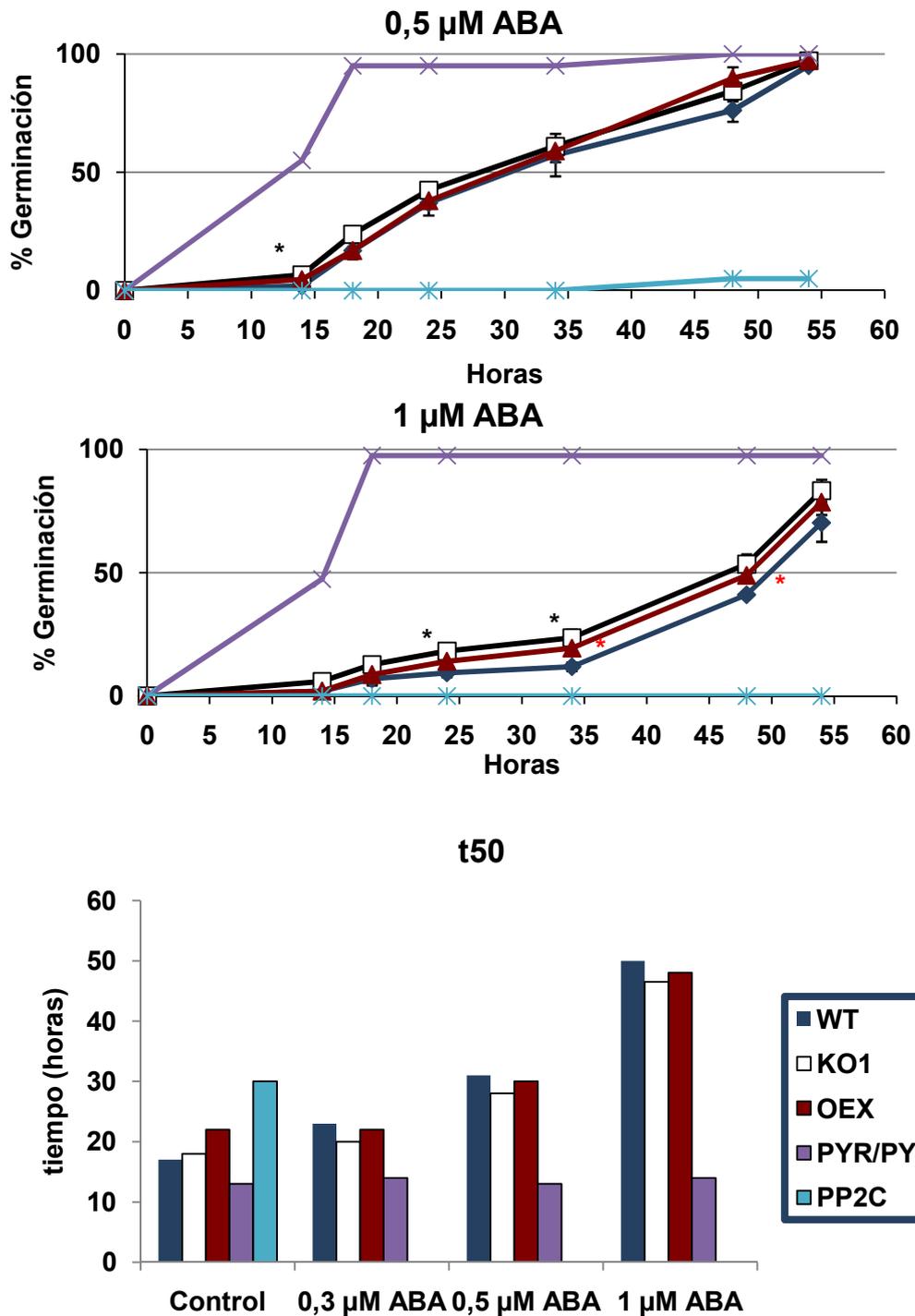


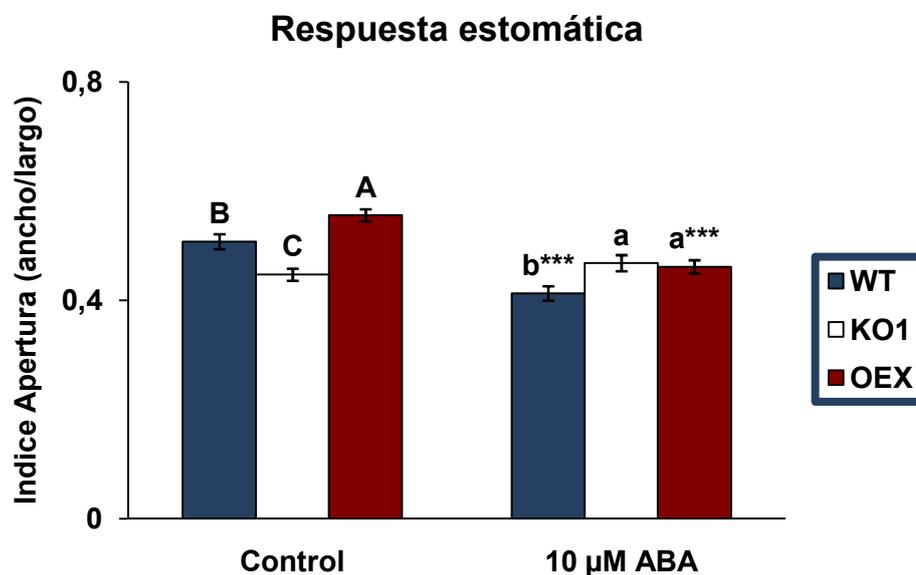
Figura 51. Germinación en presencia y ausencia de ABA. Se muestran los valores expresados como porcentajes de semillas germinadas dentro del número total (35) de semillas sembradas en placa en ausencia o presencia de ABA a distintas concentraciones (0,1;0,5;1 μM). Los asteriscos representan diferencias significativas con el WT en el mismo tiempo y tratamiento. Se

representan también los tiempos en los que cada genotipo en cada condición alcanza el 50% de germinación ( $t_{50}$ ).

Estos resultados indican que el mutante que sobre-expresa *AtTRXo1* presenta un marcado fenotipo de hiposensibilidad a ABA durante la germinación desde las primeras fases de la misma, mientras el mutante que carece de *TRXo1* muestra una cierta hiposensibilidad a ABA durante la germinación que se da principalmente a partir de las 24 horas de los tratamientos con ABA.

**2.9. Dinámica estomática en respuesta a ABA**

Se ha realizado a continuación un estudio de respuesta estomática a un tratamiento con ABA de peeling de la parte del envés de las hojas tal y como se describe en la sección de materiales y métodos 8.2. Cuando los peeling se incubaron en una solución control sin ABA, los diferentes genotipos mostraron un comportamiento de apertura estomática distintos entre sí, con una mayor apertura estomática en el OEX, una apertura intermedia en el WT y una menor apertura en el KO1 (Figura 52).



**Figura 52. Respuesta estomática en ausencia y presencia de ABA.** Se representa el índice de apertura estomática de hojas de plantas de *A. thaliana silvestres* (WT) y mutantes KO1 y sobre-expresante (OEX) *Attrxo1* de 33 días de crecimiento. Los datos son media  $\pm$  error estándar de al menos tres experimentos independientes. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $P$

*<0,05) entre genotipos en cada condición de acuerdo al test de Tukey, y los asteriscos diferencias significativas de cada genotipo en salinidad comparado con la condición control, usando el test t-Student ( $P < 0,05$ ).*

Tras incubar los peeling con ABA 10  $\mu\text{M}$  observamos una respuesta similar a esta fitohormona por parte del WT y el OEX, que presentaban estomas más cerrados que aquellos incubados en solución control; el KO1 sin embargo no mostró un cambio en comparación con el peeling incubado en la solución control, lo cual indica una cierta insensibilidad al ABA por parte de este genotipo.

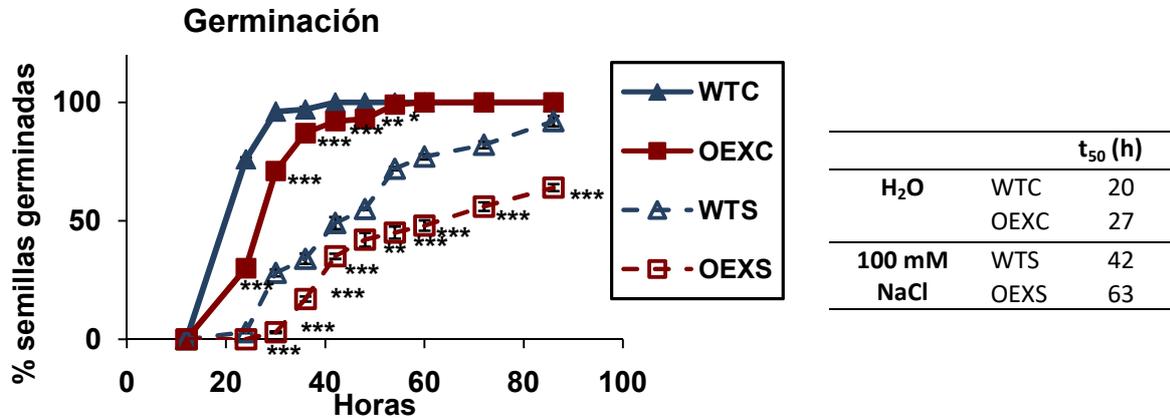
### **3. Estudio funcional de AtTrxo1 en fotosíntesis**

Con el objetivo de realizar un estudio sobre la influencia de la falta y sobre-expresión de *AtTRXo1* sobre el metabolismo fotosintético en salinidad, se han analizado plantas de genotipos WT, KO1 y una línea sobre-expresante (OEX) crecidas en ausencia y presencia de 100 mM NaCl y en día corto.

#### **3.1. Caracterización de parámetros de desarrollo**

Inicialmente en esta Tesis doctoral se llevó a cabo la segregación de semillas obtenidas anteriormente en el laboratorio de un genotipo sobre-expresante (OEX) *Attrxo1*. Como paso inicial de su caracterización, se ha realizado un estudio de tasa germinativa en condiciones tanto de ausencia como de presencia de 100 mM NaCl, para compararlo con un estudio similar ya realizados en el mutante KO1 (Ortiz-Espín y col., 2017). Ambos genotipos serán utilizados en este capítulo de Tesis para un estudio de su respuesta a nivel fotosintético en las dos condiciones. Como se observa en la Figura 53, las semillas del OEX en ambas condiciones retrasaron su germinación respecto al WT: en la condición control presentaron un  $t_{50}$  de 20 y 27 h para las WT y OEX, respectivamente (Figura 53). Además, en esta condición el OEX consiguió un 100% de germinación a las 60 h mientras que el WT lo había alcanzado a las 42 h. La salinidad retrasó en ambos la germinación aunque mucho más acusadamente al OEX, con  $t_{50}$  de 42 y 63 h para el WT y

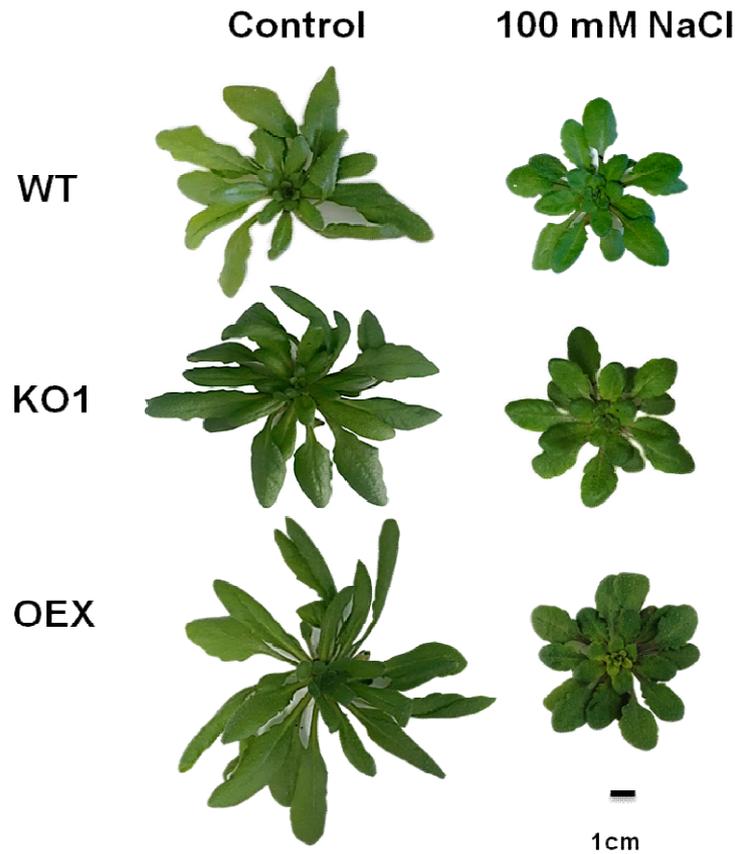
OEX, respectivamente. Por otro lado, las semillas WT en esta condición salina alcanzaron un 92% de germinación tras 86 h mientras que a ese tiempo, las semillas del OEX se vieron más afectadas en su tasa germinativa, ya que sólo germinaron el 64%.



**Figura 53. Germinación de semillas embebidas en agua (Control, C, símbolos rellenos) o en 100 mM NaCl (S, símbolos abiertos) de plantas silvestres (WT) y sobre-expresantes (OEX) *Attrxo1*.** Los valores  $t_{50}$  (tiempo requerido para la emergencia de la raíz en 50% de las semillas) se indican en la tabla. Los datos son media  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas de cada genotipo en salinidad comparado con la condición control usando el test t-Student ( $P < 0,05$ ).

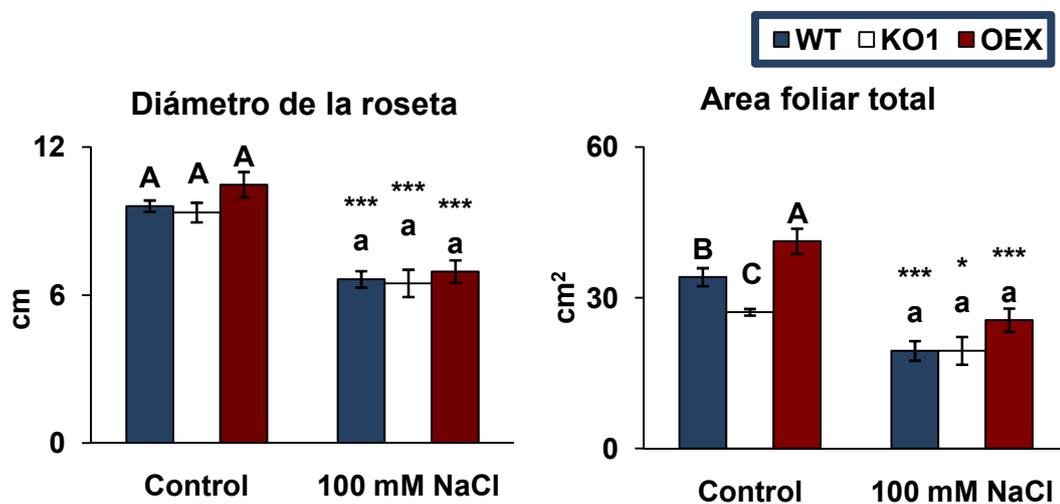
Las plantas de *Arabidopsis* tanto WT como mutantes carentes (KO1) y sobre-expresantes (OEX) *Attrxo1* se crecieron en condiciones de fotoperiodo corto y con una intensidad lumínica de  $300 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR, condiciones óptimas para la posterior medida de parámetros fotosintéticos. Las plantas de 12 días de edad se cultivaron en turba en ausencia y presencia de 100 mM de NaCl durante 21 días.

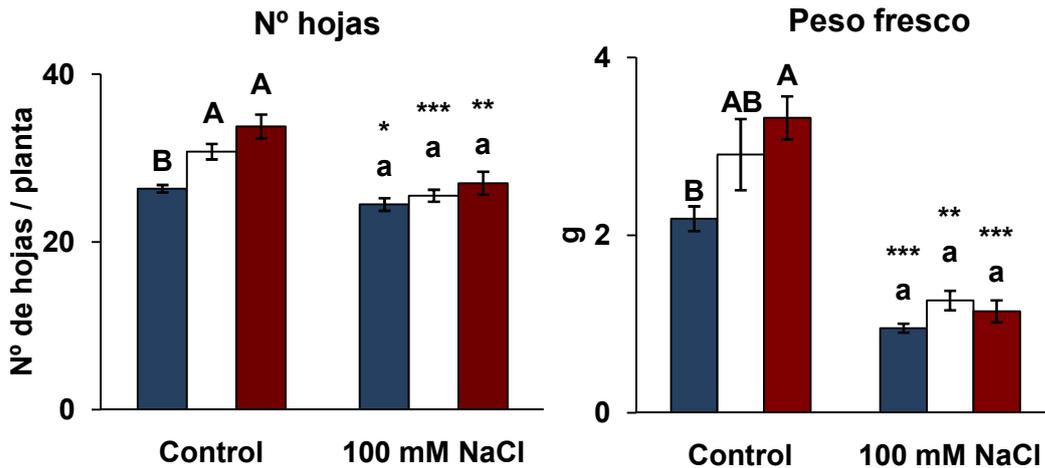
El crecimiento de las plantas tanto silvestres como mutantes *Attrxo1* no se diferenció a simple vista tanto en ausencia como en presencia de la sal (Figura 54), si bien esta condición producía una clara disminución del crecimiento en todas ellas.



**Figura 54.** Plantas de *Arabidopsis* de 33 días de crecimiento representativas de los genotipos WT, KO1 y OEX *Attrxo1* crecidas en ausencia (Control) y presencia de 100 mM NaCl durante 21 días.

Para realizar una caracterización fisiológica de la parte aérea de las plantas se midieron los parámetros peso fresco, diámetro de roseta, área foliar total de la planta y número de hojas (Figura 55).





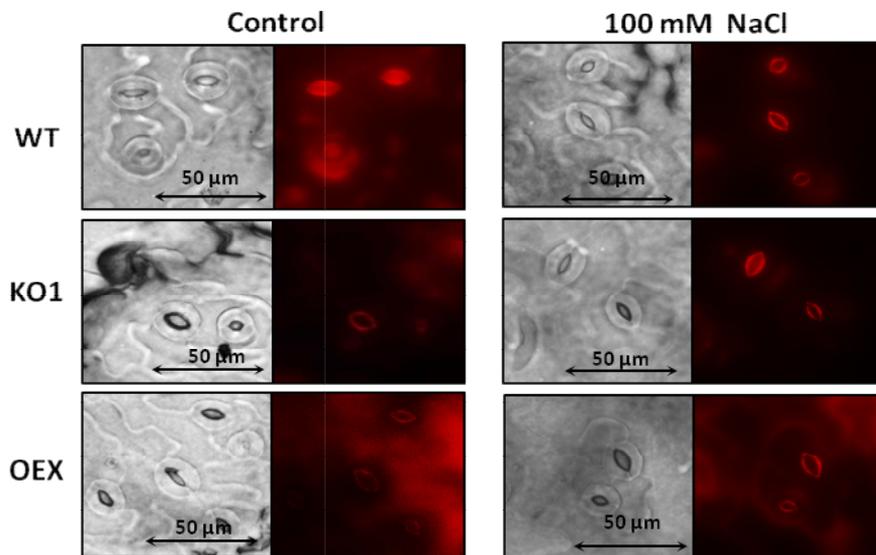
**Figura 55. Medida de diámetro de la roseta, área foliar total de la planta, número de hojas y peso fresco de la parte aérea de plantas de *A. thaliana*.** Las plantas silvestres (WT) y mutantes KO1 y sobre-expresantes (OEX) *Attrxo1* crecieron en ausencia y presencia de 100 mM NaCl. Los datos son media  $\pm$  error estándar de al menos ocho experimentos independientes. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre genotipos en cada condición de acuerdo al test de Tukey, y los asteriscos diferencias significativas de cada genotipo en salinidad comparado con la condición control usando el test t-Student ( $P < 0,05$ ).

En condiciones control, se encontraron diferencias significativas entre genotipos mutantes respecto al silvestre en el área foliar por planta, que resultó ser menor en los KO y mayor en los sobre-expresantes, así como en el número de hojas que era mayor en los KO y OEX (Figura 55). También las diferencias fueron significativas en el peso fresco en los sobre-expresantes que era mayor que el de las plantas silvestres. En condiciones salinas todos los genotipos presentaban un descenso de todos los parámetros si bien no se encontraron diferencias entre genotipos en esta condición de estrés.

### 3.2. Caracterización de parámetros fisiológicos: densidad estomática y contenido en clorofilas

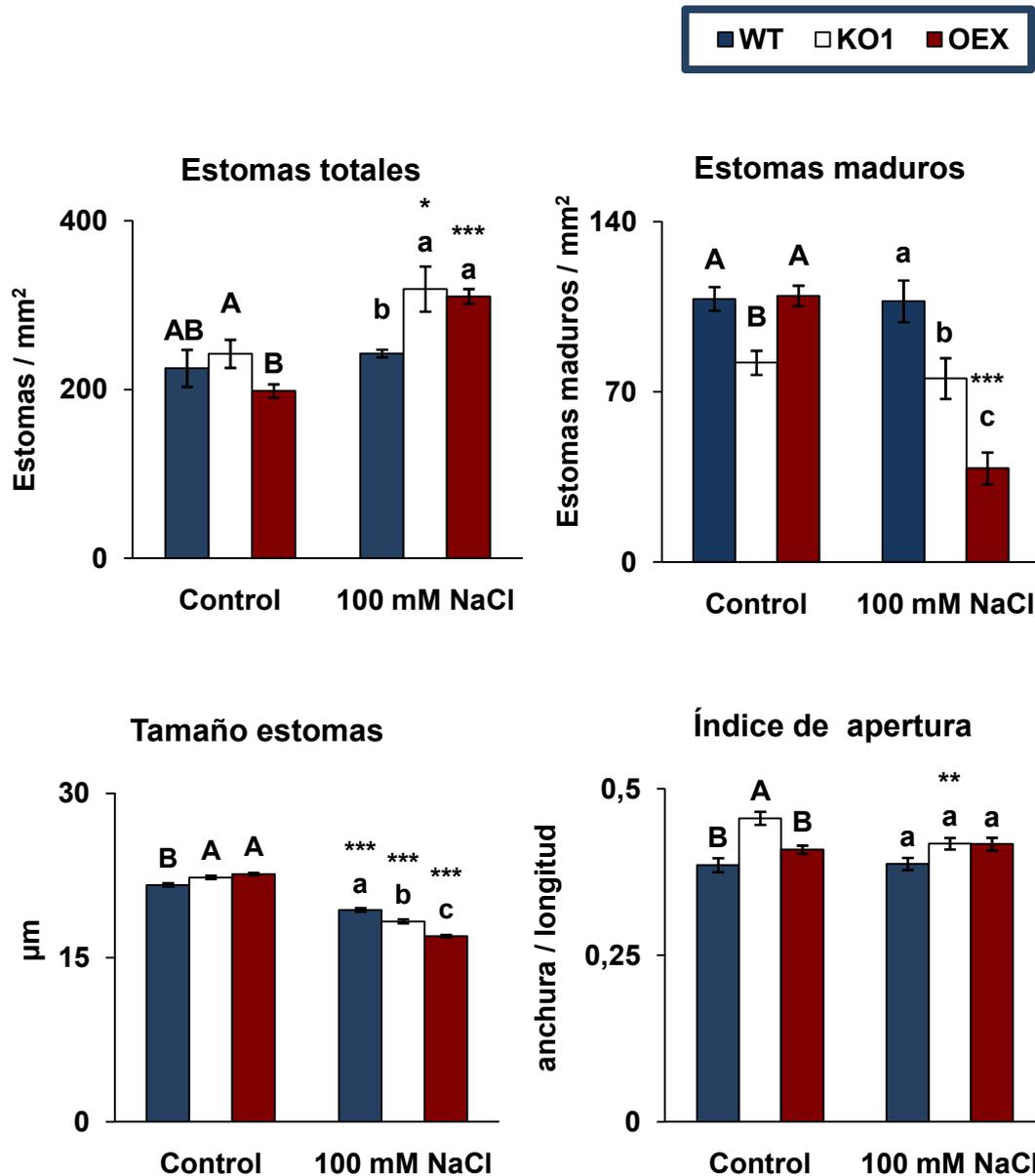
Una característica de desarrollo que está relacionada con la adaptación al estrés salino es la densidad estomática que presentan las plantas en el envés de sus hojas, así como la modulación de los mecanismos de cierre y apertura estomática.

La Figura 56 muestra imágenes representativas del envés foliar de plantas crecidas en condiciones control y en presencia de 100 mM NaCl, teñidas con rodamina para la mejor visualización y medida de los estomas.



**Figura 56. Epidermis foliar de plantas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en presencia de 100 mM NaCl. Imagen capturada con un microscopio de campo claro y un objetivo 40x de la epidermis de plantas silvestres (WT) y mutantes KO1 y sobre-expresante (OEX) *Attrxo1*.**

En condiciones control tanto la falta como sobre-expresión de *AtTRXo1* no influenció el número de estomas totales (incluyendo indiferenciados y maduros) si bien los KO presentaban menos estomas maduros (Figura 57) que el WT. Sin embargo en condiciones salinas, los mutantes tanto KO como OEX presentaron un mayor número de estomas indiferenciados y menor de maduros, más acusado este último caso en los sobre-expresantes. La salinidad aumentó en número de estomas totales en ambos genotipos mutantes mientras que disminuyó los maduros sólo en los sobre-expresantes.

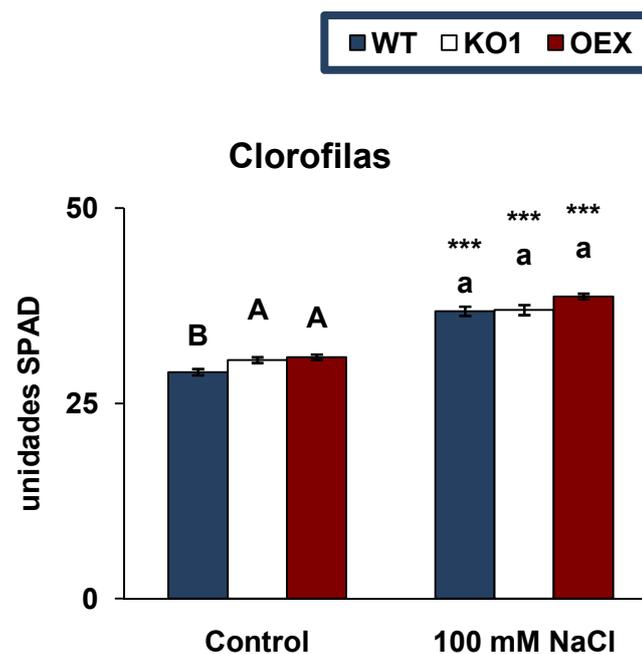


**Figura 57.** Densidad, tamaño e índice de apertura estomáticos medidos en el envés de las hojas de *A. thaliana* genotipos silvestre (WT), KO1 y OEX *Attrxo1* crecidos en condiciones control y en presencia de 100 mM de NaCl. El índice de apertura representa la medida de la anchura/longitud del poro estomático. Los datos son media ± error estándar de al menos ocho experimentos independientes. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre genotipos en cada condición de acuerdo al test de Tukey, y los asteriscos diferencias significativas de cada genotipo en salinidad comparado con la condición control usando el test *t*-Student ( $P < 0,05$ ).

El tamaño de los estomas era mayor en los KO y OEX en condiciones control comparados como el WT (Figura 57) mientras que en condiciones salinas ocurría lo

contrario, siendo más pequeños los estomas de las plantas mutantes. El crecimiento en las condiciones salinas produjo una disminución en el tamaño de los estomas de todos los genotipos. En cuanto a la apertura estomática, los genotipos KO presentaron un mayor índice de apertura en condiciones control que las plantas WT y OEX mientras que en condiciones de salinidad, la apertura fue similar. Sólo las plantas KO1 presentaron un cambio con la salinidad, disminuyendo la apertura estomática.

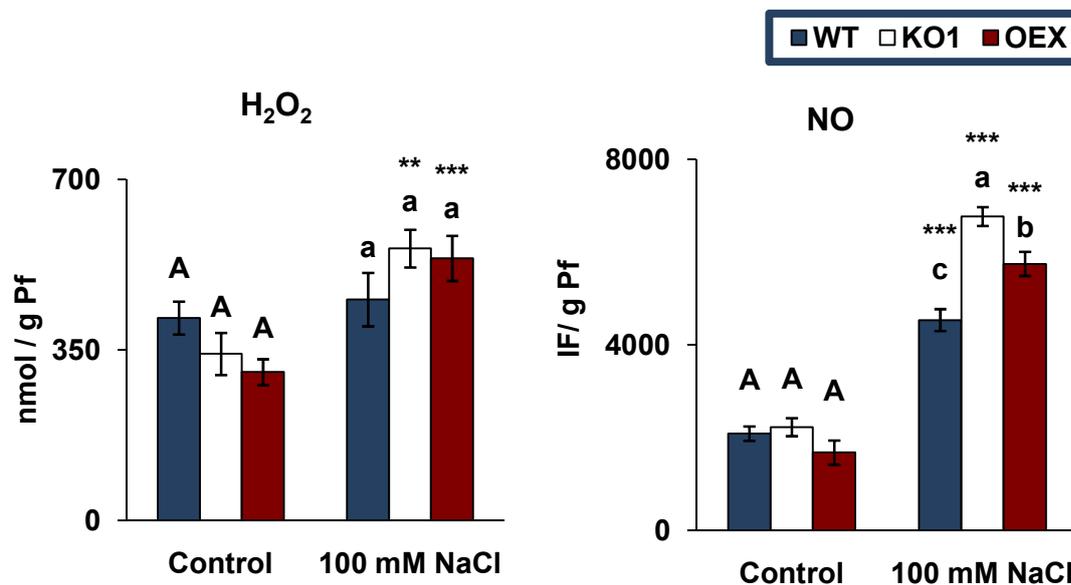
Otra variable indicativa de la respuesta a estrés salino es el contenido en clorofilas necesarias para llevar a cabo la función fotosintética. La medida de clorofila total utilizando un SPAD reveló diferencias significativas en ambos mutantes en condiciones control, donde tanto el KO como OEX contenían mayores niveles. La salinidad provocó un aumento del contenido significativo en todos los genotipos que no se diferenciaron entre sí en esta condición (Figura 58).

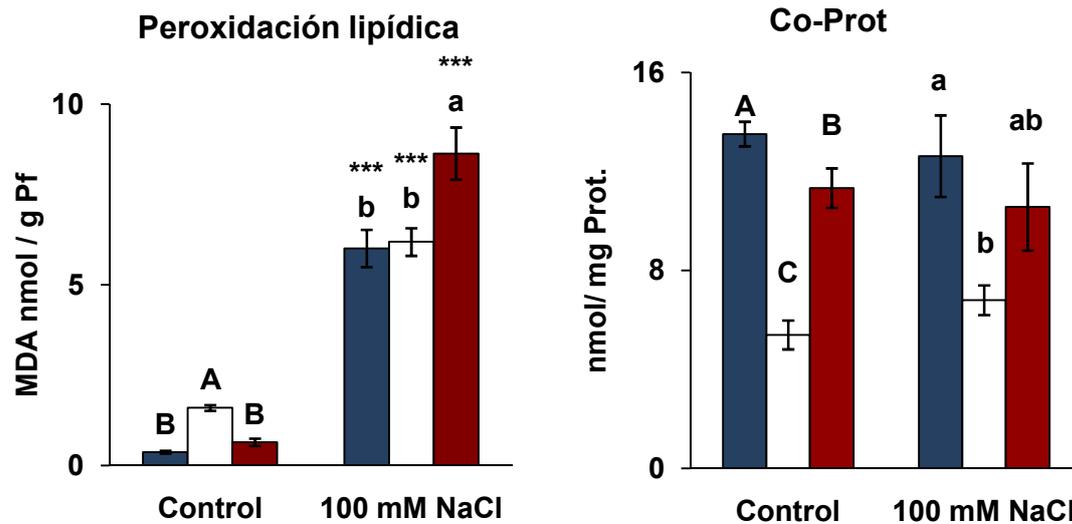


**Figura 58. Medida de clorofila total.** Las plantas de *A. thaliana* silvestres (WT) y mutantes KO1 y sobre-expresantes (OEX) *Attrxo1* crecieron durante 33 días en ausencia (Control) y presencia (21 días) de 100 mM NaCl. Los datos son media  $\pm$  error estándar de al menos tres experimentos independientes. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre genotipos en cada condición de acuerdo al test de Tukey, y los asteriscos diferencias significativas de cada genotipo en salinidad comparado con la condición control usando el test t-Student ( $P < 0,05$ ).

3.3. Medida de marcadores y metabolitos oxidativos

El contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> así como el de NO fue analizado en las plantas silvestres, KO y OEX *Attrxo1* crecidas en condiciones control y salino. En cuanto al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no se encontraron diferencias significativas entre genotipos ni en condición control ni en las plantas crecidas en presencia de la sal, si bien, la salinidad aumentó los niveles sólo en los mutantes KO y OEX (Figura 59). Con respecto al óxido nítrico, mutantes KO1 y OEX presentaron un contenido mayor que el WT en condiciones salinas que provocaron un aumento en todos los genotipos respecto a las plantas crecidas en ausencia de la sal.



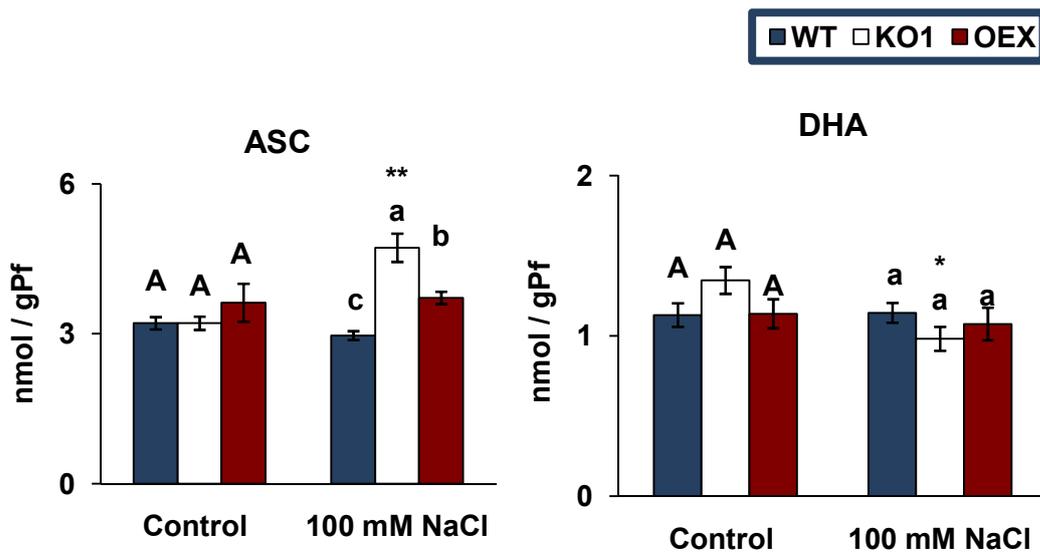


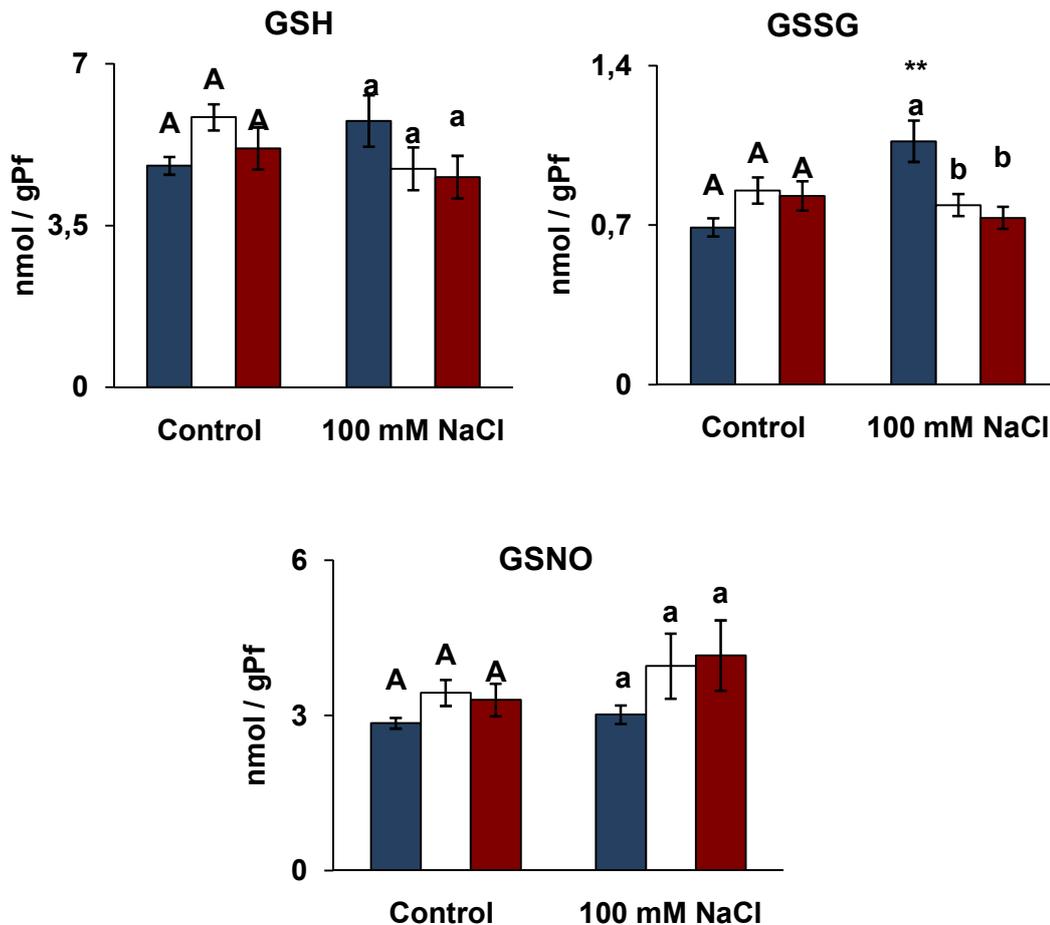
**Figura 59. Marcadores de estrés y daño oxidativo en hojas de *A. thaliana* crecidas en ausencia y presencia de 100 mM de NaCl.** Medida de peróxido de hidrógeno (A), fluorescencia relativa de óxido nítrico (B), cuantificación de malondialdehído (C), y carbonil proteínas (D). Las plantas de *A. thaliana* silvestres (WT) y mutantes KO y sobre-expresantes (OEX) *Attrxo1* crecieron durante 33 días en ausencia (CONTROL) y presencia (21 días) de 100 mM NaCl. Los datos son media  $\pm$  error estándar de al menos tres experimentos independientes. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre genotipos en cada condición de acuerdo al test de Tukey, y los asteriscos diferencias significativas de cada genotipo en salinidad comparado con la condición control usando el test t-Student ( $P < 0,05$ ).

Otras variables que son utilizadas como biomarcadores de daño oxidativo son el producto de acumulación de las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica, el malondialdehído (MDA) y las concentraciones de proteínas que presentan un grupo carbonilo (CO-Proteínas). En condiciones control, las plantas carentes de *AtTRXo1* presentaron mayores niveles de MDA que las WT o OEX mientras que en condiciones salinas eran las OEX las que presentaban mayores contenidos (Figura 59). La falta y sobre-expresión de *AtTRXo1* provocaba además una disminución en carbonilación proteica en condiciones control mientras que sólo era significativa en los KO1 en condiciones salinas. Además la salinidad no provocó cambios significativos en ningún genotipo.

**3.4. Medida de glutatión, nitrosoglutatión y ascorbato**

Las moléculas antioxidantes que participan en el ciclo de Halliwell-Asada-Foyer (glutatión reducido y ascorbato reducido) así como el producto derivado nitrosoglutatión (reservorio de óxido nítrico y glutatión), se cuantificaron en los tres genotipos y en las dos condiciones, control y salinidad. Ninguno de estos parámetros incluyendo las formas reducidas y oxidadas de ascorbato (ASC y deshidroascorbato, DHA) o glutatión (GSH y GSSG) presentaron cambios entre los diferentes genotipos en ambas condiciones exceptuando mayores contenidos en ASC y menores en GSSG en ambos mutantes que en WT en salinidad (Figura 60). Los únicos cambios significativos diferenciales (asteriscos en la Figura) provocados por la salinidad, fueron un aumento en ASC en plantas KO, una disminución de su forma oxidada DHA en este genotipo y condición, así como un aumento de GSSG en el WT.





**Figura 60. Medida de ascorbato y glutatión y estado de óxido-reducción de glutatión.** Ascorbato reducido ASC (A), deshidroascorbato DHA (B), glutatión reducido GSH (C), glutatión oxidado GSSG (D) y nitrosoglutatión GSNO(E). Las plantas de *A. thaliana* silvestres (WT) y mutantes KO y sobre-expresantes (OVX) *Attrxo1* crecieron durante 33 días en ausencia (Control) y presencia (21 días) de 100 mM NaCl. Los datos son media  $\pm$  error estándar,  $n > 5$  de al menos tres experimentos independientes. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre genotipos en cada condición de acuerdo al test de Tukey, y los asteriscos diferencias significativas de cada genotipo en salinidad comparado con la condición control, usando el test *t*-Student ( $P < 0,05$ ).

El estado redox o relación entre el glutatión o ascorbato reducidos con respecto al glutatión o ascorbato totales, medidos como porcentaje, es un indicador de la velocidad de oxidación de estos antioxidantes y por tanto es una variable indirecta del nivel de estrés oxidativo que soporta un organismo. El estado redox del ascorbato y glutatión no cambió muy patentemente con la salinidad que en general disminuía algo este ratio, excepto en los genotipos KO y OEX que presentaban mayores porcentajes de reducción

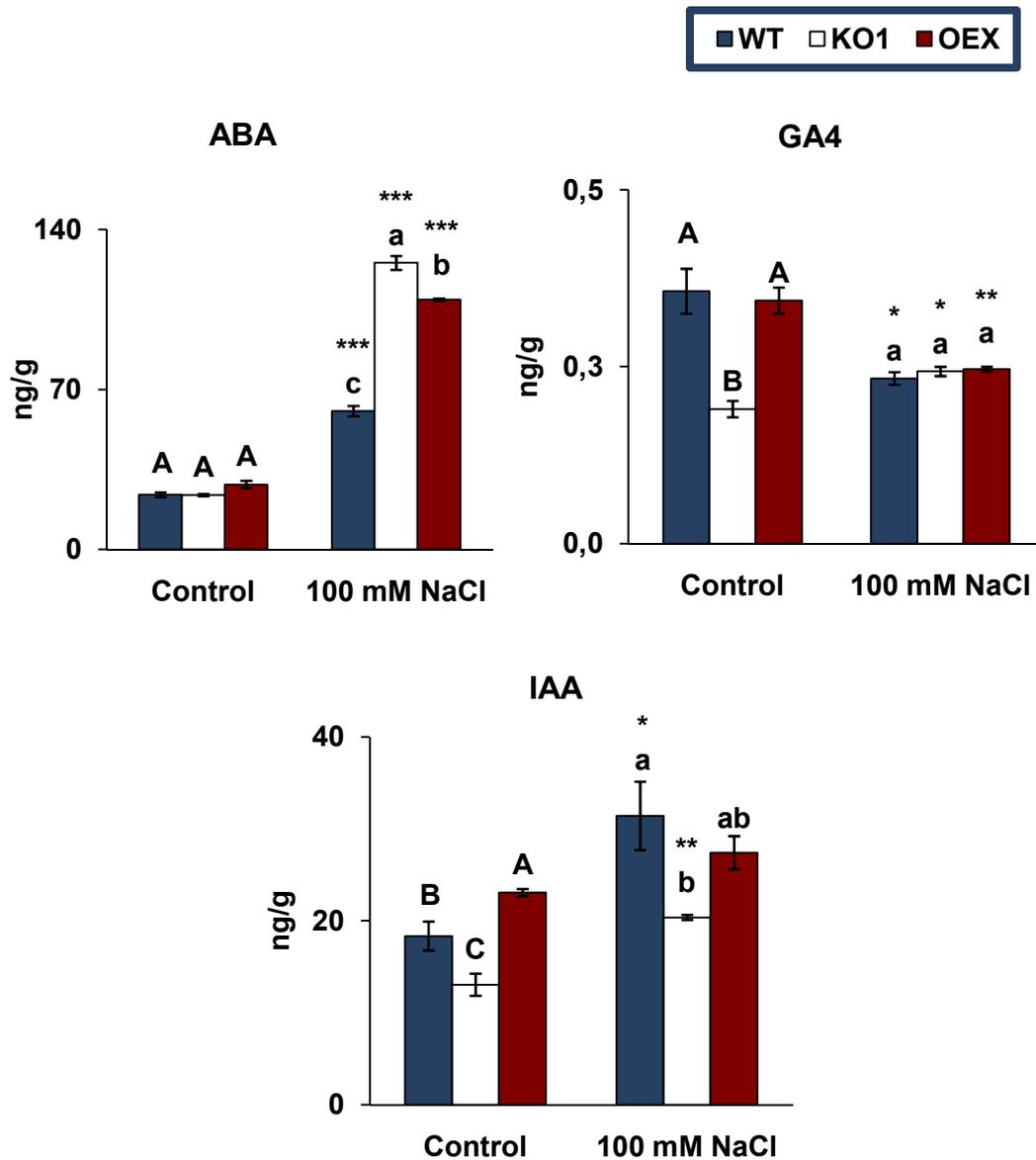
de ascorbato, reflejo posiblemente del aumento de este antioxidante en su forma reducida en estas plantas crecidas en condiciones salinas (tabla 19).

**Tabla 19. Estado redox de ascorbato (ASC reducido y deshidroascorbato (DHA) oxidado) y glutatión (GSH reducido y GSSG oxidado) en plantas de *A. thaliana* genotipos silvestre (WT) y dos mutantes KO *Attrxo1* crecidos en ausencia (Control) y en presencia de 100 mM de NaCl**

	Estado redox ASC/ASC+DHA (%)		
	WT	KO1	OVE
<b>Control</b>	74,0	70,5	76,1
<b>100 mM NaCl</b>	72,1	<b>82,8</b>	<b>81,0</b>
	Estado redox GSH/GSH+GSSG (%)		
<b>Control</b>	87,4	87,3	86,2
<b>100 mM NaCl</b>	84,4	85,7	86,2

### **3.5. Medida de hormonas**

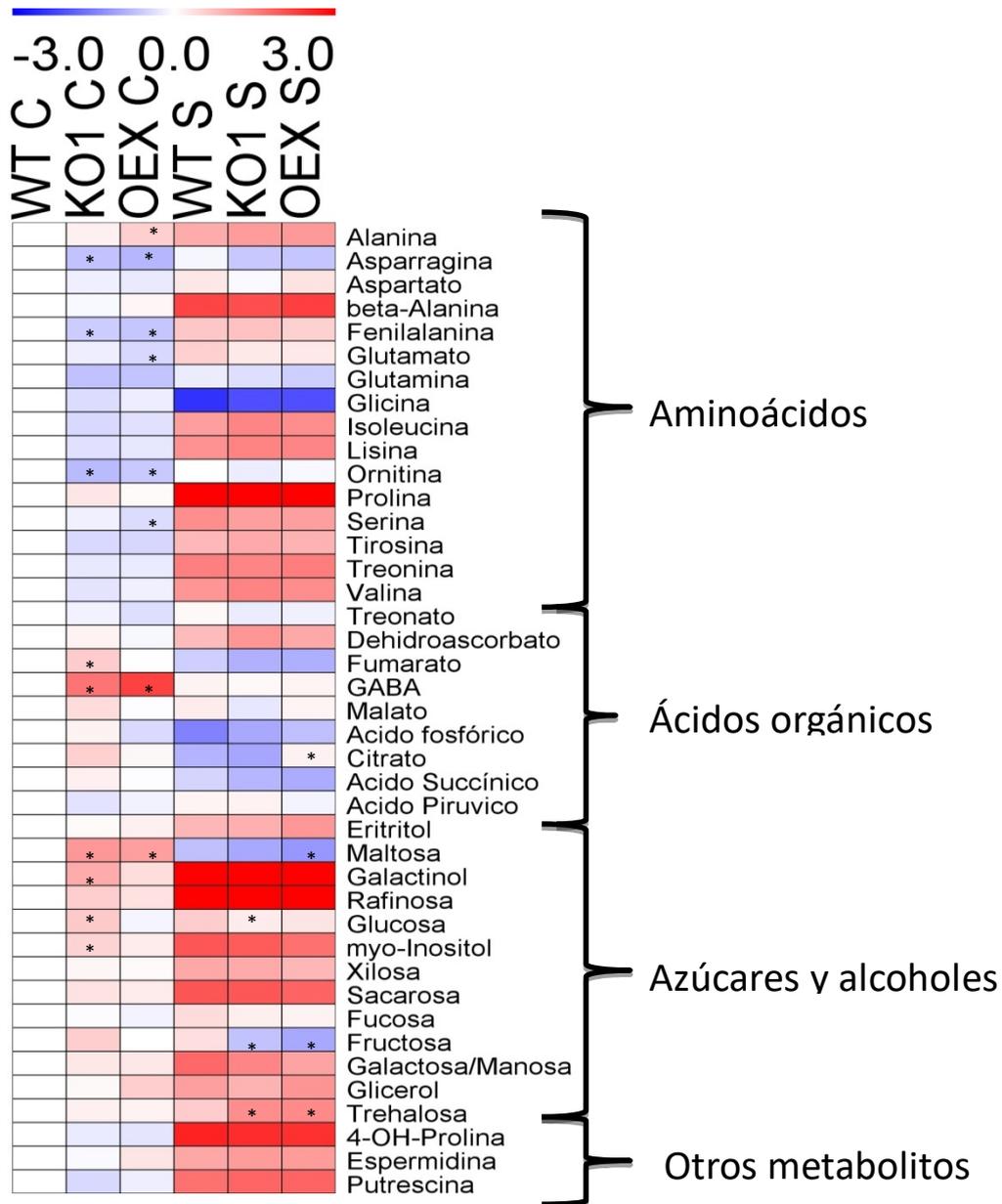
Se cuantificaron las hormonas ácido abscísico (ABA), indolacético (AIA) y la giberelina bioactiva GA4 en los tres genotipos y en las dos condiciones de crecimiento, control y salina. Ambos mutantes KO y OEX presentaron valores de ABA similares al WT en condiciones control mientras que los contenidos eran muy superiores en las plantas crecidas en salinidad (Figura 61). Esta condición además producía un aumento de ABA en los tres genotipos, mucho más acusado en los mutantes. Los niveles de GA4 fueron menores en el KO1 en condición control y la salinidad redujo los niveles en los tres genotipos (Figura 61). Respecto a AIA, el KO1 también presentó niveles inferiores y el OVX superiores al WT en condición control mientras que sólo KO1 contenía niveles inferiores en condición salina, siendo el KO1 el que presentaba menores contenidos. La salinidad produjo un aumento significativo en las plantas WT y más acusado en la KO1.



**Figura 61. Medida de ABA, GA4 e IAA.** Las plantas de *A. thaliana* silvestres (WT) y mutantes KO1 y sobre-expresantes (OEX) *Attrx1* crecieron durante 33 días en ausencia (Control) y presencia (21 días) de 100 mM NaCl. Los datos son media  $\pm$  error estándar de al menos tres experimentos independientes. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre genotipos en cada condición de acuerdo al test de Tukey, y los asteriscos diferencias significativas de cada genotipo en salinidad comparado con la condición control, usando el test t-Student ( $P < 0,05$ ).

### **3.6. Medida de metabolitos**

La medida de metabolitos en la parte aérea de las plantas WT y mutantes KO y OEX reveló que en condiciones control, las plantas carentes de TRXo1 respecto a las WT presentaban mayores contenidos de fumarato, GABA, maltosa, galactinol, glucosa y myo-inositol mientras que menores valores de asparragina, fenilalanina y ornitina (Figura 62). Los OEX presentaron mayores contenidos de alanina, GABA y maltosa y menores de asparragina, fenilalanina, glutamato, ornitina y serina. En condiciones salinas, los KO contenían menos glucosa y fructosa, mientras que los sobre-expresantes mayores de citrato y trehalosa y menores de maltosa y fructosa.



**Figura 62. Mapa de calor (heatmap) con los niveles relativos de metabolitos en plantas de *A. thaliana* genotipos silvestre (WT) y mutantes KO1 y sobre-expresante (OEX) crecidos en ausencia (Control) y en presencia de 100 mM de NaCl. Los niveles relativos en hojas de todas las líneas en condiciones control y salina se normalizan respecto al valor medio de las plantas WT bajo condición control y los cambios se transforman por log2 (ej. El nivel de metabolitos del WT en condición control es 0). Los colores rojo y azul representan el incremento de log2 veces y el descenso, respectivamente. Los valores representan la media ± error estándar de 6 réplicas y los asteriscos indican diferencias significativas (P < 0,05) respecto del WT en cada condición usando el test t-Student. Las diferencias estadísticamente significativas entre control y salinidad de cada genotipo se presentan en la tabla 20.**

Respecto al efecto de la salinidad, no cambiaron en ninguno de los genotipos asparragina, aspartato, glutamina y treonato (tabla 20). Disminuyeron en todos ellos

glicina, fumarato, ácido succínico y maltosa, mientras que el resto de metabolitos aumentó en todos los genotipos en condiciones salinas.

**Tabla 20. Niveles relativos de metabolitos en plantas de *A. thaliana* genotipos silvestre (WT) y dos mutantes KO *Attrxo1* crecidos en ausencia (C) y en presencia (S) de 100 mM de NaCl. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de 6 réplicas biológicas normalizadas al valor de la media en el WT en cada condición. Los números en negrita indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) respecto a la condición control de cada genotipo y los asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) relativas al WT en cada condición usando el test t-Student.**

<b>Metabolito</b>	<b>WT C</b>	<b>KO1 C</b>	<b>OEX C</b>	<b>WT S</b>	<b>KO1 S</b>	<b>OEX S</b>
<i>Alanina</i>	1 $\pm$ 0,05	1,13 $\pm$ 0,06	1,48 $\pm$ 0,08*	<b>1,98<math>\pm</math>0,18</b>	<b>2,25<math>\pm</math>0,05</b>	<b>2,29<math>\pm</math>0,12</b>
<i>Aspargina</i>	1 $\pm$ 0,15	0,61 $\pm$ 0,16*	0,55 $\pm$ 0,07*	0,93 $\pm$ 0,18	0,64 $\pm$ 0,03	0,62 $\pm$ 0,03
<i>Aspartato</i>	1 $\pm$ 0,09	0,88 $\pm$ 0,1	0,85 $\pm$ 0,09	1,22 $\pm$ 0,21	0,96 $\pm$ 0,15	1,26 $\pm$ 0,18
<i>beta-Alanina</i>	1 $\pm$ 0,09	0,95 $\pm$ 0,03	1,08 $\pm$ 0,05	<b>4,63<math>\pm</math>0,35</b>	<b>4,26<math>\pm</math>0,15</b>	<b>4,82<math>\pm</math>0,15</b>
<i>Fenilalanina</i>	1 $\pm$ 0,15	0,66 $\pm$ 0,04*	0,63 $\pm$ 0,03*	<b>1,58<math>\pm</math>0,19</b>	<b>1,65<math>\pm</math>0,08</b>	<b>1,46<math>\pm</math>0,06</b>
<i>Glutamato</i>	1 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,11	0,73 $\pm$ 0,02*	<b>1,47<math>\pm</math>0,2</b>	<b>1,20<math>\pm</math>0,18</b>	<b>1,21<math>\pm</math>0,14</b>
<i>Glutamina</i>	1 $\pm$ 0,15	0,6 $\pm$ 0,1	0,61 $\pm$ 0,07	0,86 $\pm$ 0,11	0,77 $\pm$ 0,15	0,68 $\pm$ 0,07
<i>Glicina</i>	1 $\pm$ 0,09	0,76 $\pm$ 0,11	0,87 $\pm$ 0,09	<b>0,19<math>\pm</math>0,01</b>	<b>0,24<math>\pm</math>0,02</b>	<b>0,24<math>\pm</math>0,07</b>
<i>Isoleucina</i>	1 $\pm$ 0,14	0,74 $\pm$ 0,03	0,78 $\pm$ 0,05	<b>2,22<math>\pm</math>0,22</b>	<b>2,71<math>\pm</math>0,15</b>	<b>2,51<math>\pm</math>0,07</b>
<i>Lisina</i>	1 $\pm$ 0,11	0,78 $\pm$ 0,02	0,82 $\pm$ 0,04	<b>2,46<math>\pm</math>0,36</b>	<b>2,77<math>\pm</math>0,24</b>	<b>2,71<math>\pm</math>0,08</b>
<i>Ornitina</i>	1 $\pm$ 0,11	0,57 $\pm$ 0,06*	0,65 $\pm$ 0,05*	1,01 $\pm$ 0,12	<b>0,86<math>\pm</math>0,05</b>	<b>0,95<math>\pm</math>0,03</b>
<i>Prolina</i>	1 $\pm$ 0,34	1,23 $\pm$ 0,34	1,05 $\pm$ 0,29	<b>93,70<math>\pm</math>3,10</b>	<b>66,26<math>\pm</math>8,18</b>	<b>77,17<math>\pm</math>13,79</b>
<i>Serina</i>	1 $\pm$ 0,02	0,89 $\pm$ 0,04	0,75 $\pm$ 0,05*	<b>2,53<math>\pm</math>0,21</b>	<b>2,20<math>\pm</math>0,11</b>	<b>2,19<math>\pm</math>0,04</b>
<i>Tirosina</i>	1 $\pm$ 0,17	0,74 $\pm$ 0,02	0,72 $\pm$ 0,06	1,79 $\pm$ 0,36	<b>2,01<math>\pm</math>0,23</b>	<b>1,87<math>\pm</math>0,08</b>
<i>Treonina</i>	1 $\pm$ 0,02	0,83 $\pm$ 0,04	0,85 $\pm$ 0,06	<b>2,85<math>\pm</math>0,19</b>	<b>2,71<math>\pm</math>0,11</b>	<b>2,89<math>\pm</math>0,08</b>
<i>Valina</i>	1 $\pm$ 0,08	0,81 $\pm$ 0,04	0,89 $\pm$ 0,04	<b>2,36<math>\pm</math>0,24</b>	<b>2,73<math>\pm</math>0,12</b>	<b>2,51<math>\pm</math>0,07</b>
<i>Treonato</i>	1 $\pm$ 0,07	0,90 $\pm$ 0,08	0,77 $\pm$ 0,07	1,06 $\pm$ 0,17	0,86 $\pm$ 0,09	0,89 $\pm$ 0,07
<i>Dehidroascorbato</i>	1 $\pm$ 0,24	1,12 $\pm$ 0,10	0,94 $\pm$ 0,14	1,74 $\pm$ 0,23	<b>2,36<math>\pm</math>0,18</b>	<b>2,03<math>\pm</math>0,16</b>
<i>Fumarato</i>	1 $\pm$ 0,10	1,52 $\pm$ 0,21*	0,99 $\pm$ 0,05	<b>0,68<math>\pm</math>0,08</b>	<b>0,53<math>\pm</math>0,04</b>	<b>0,52<math>\pm</math>0,08</b>

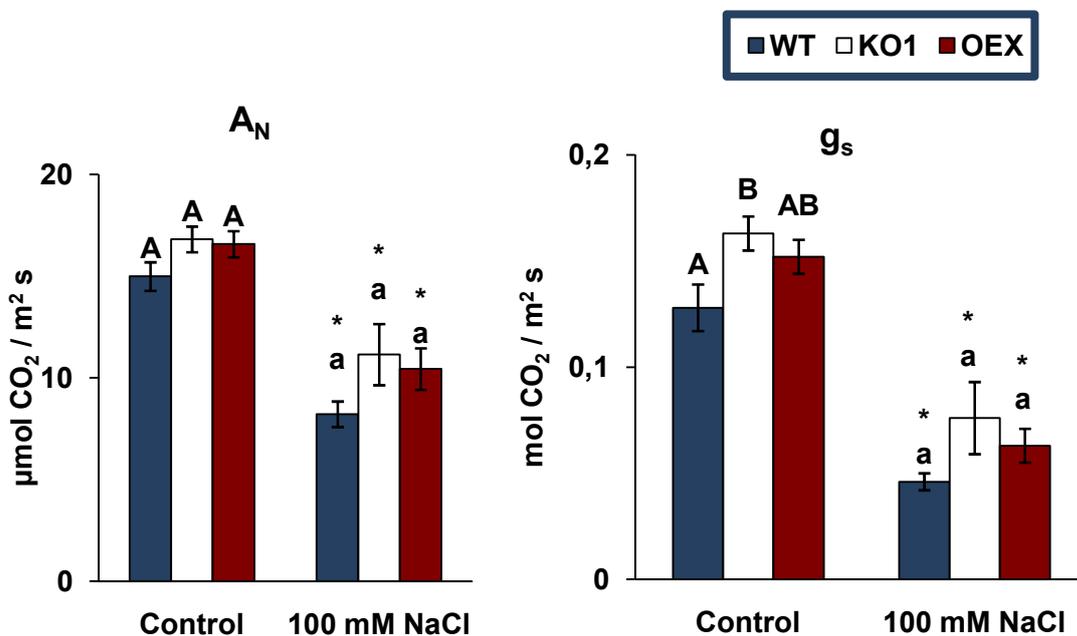
<i>GABA</i>	1±0,08	3,14±0,39*	4,72±0,49*	1,11±0,04	<b>1,06±0,10</b>	<b>1,10±0,09</b>
<i>Malato</i>	1±0,19	1,34±0,12	0,99±0,11	1,18±0,25	<b>0,82±0,13</b>	1,10±0,22
<i>Ácido fosfórico</i>	1±0,15	1,11±0,12	0,74±0,12	<b>0,36±0,07</b>	<b>0,49±0,08</b>	0,60±0,11
<i>Citrato</i>	1±0,27	1,47±0,18	1,07±0,19	0,54±0,08	<b>0,49±0,10</b>	1,12±0,19*
<i>Acido Succínico</i>	1±0,06	1,13±0,11	0,99±0,06	<b>0,71±0,09</b>	<b>0,55±0,06</b>	<b>0,51±0,07</b>
<i>Acido Pirúvico</i>	1±0,10	0,80±0,06	0,90±0,06	1,09±0,07	<b>1,12±0,05</b>	0,92±0,06
<i>Eritritol</i>	1±0,07	1,05±0,07	1,13±0,08	<b>1,80±0,17</b>	<b>1,92±0,16</b>	<b>2,35±0,18</b>
<i>Maltosa</i>	1±0,05	2,33±0,34*	2,22±0,22*	<b>0,60±0,03</b>	<b>0,49±0,02</b>	<b>0,43±0,05*</b>
<i>Galactinol</i>	1±0,07	1,99±0,14	1,33±0,09	<b>20,11±3,53</b>	<b>19,16±2,68</b>	<b>11,39±0,87</b>
<i>Rafinosa</i>	1±0,27	1,51±0,17	1,28±0,14	<b>38,59±8,24</b>	<b>50,21±6,07</b>	<b>31,78±2,53</b>
<i>Glucosa</i>	1±0,09	1,56±0,20*	0,93±0,07	<b>1,53±0,09</b>	1,18±0,05*	<b>1,24±0,09</b>
<i>myo-Inositol</i>	1±0,08	1,43±0,12*	1,18±0,08	<b>3,97±0,20</b>	<b>3,84±0,35</b>	<b>3,20±0,14</b>
<i>Xilosa</i>	1±0,11	1,08±0,03	1,04±0,07	<b>2,04±0,17</b>	<b>2±0,10</b>	<b>1,80±0,06</b>
<i>Sacarosa</i>	1±0,16	1,26±0,12	1,17±0,12	<b>4±0,4</b>	<b>3,94±0,32</b>	<b>3,56±0,14</b>
<i>Fucosa</i>	1±0,05	0,98±0,04	0,91±0,04	<b>1,34±0,8</b>	<b>1,14±0,05</b>	<b>1,11±0,05</b>
<i>Fructosa</i>	1±0,19	1,5±0,21	1±0,11	1,31±0,12	<b>0,61±0,05*</b>	<b>0,49±0,09*</b>
<i>Galactosa/</i>						
<i>Manosa</i>	1±0,13	1,22±0,09	1,22±0,17	<b>3,43±0,51</b>	<b>2,71±0,17</b>	<b>2,13±0,12</b>
<i>Glicerol</i>	1±0,05	1,06±0,13	1,49±0,35	<b>2,19±0,39</b>	<b>1,87±0,17</b>	2,38±0,43
<i>Trehalosa</i>	1±0,06	1,13±0,13	1,12±0,08	1,52±0,29	<b>2,51±0,22*</b>	<b>2,60±0,16*</b>
<i>4-OH-Prolina</i>	1±0,13	0,85±0,04	0,81±0,05	<b>6,10±0,52</b>	<b>5,58±0,33</b>	<b>5,43±0,28</b>
<i>Espermidina</i>	1±0,16	0,95±0,13	1,24±0,11	<b>2,06±0,13</b>	<b>2,27±0,10</b>	<b>2,27±0,12</b>
<i>Putrescina</i>	1±0,07	0,74±0,05	0,88±0,11	<b>3,20±0,45</b>	<b>3,53±0,38</b>	<b>3,56±0,23</b>

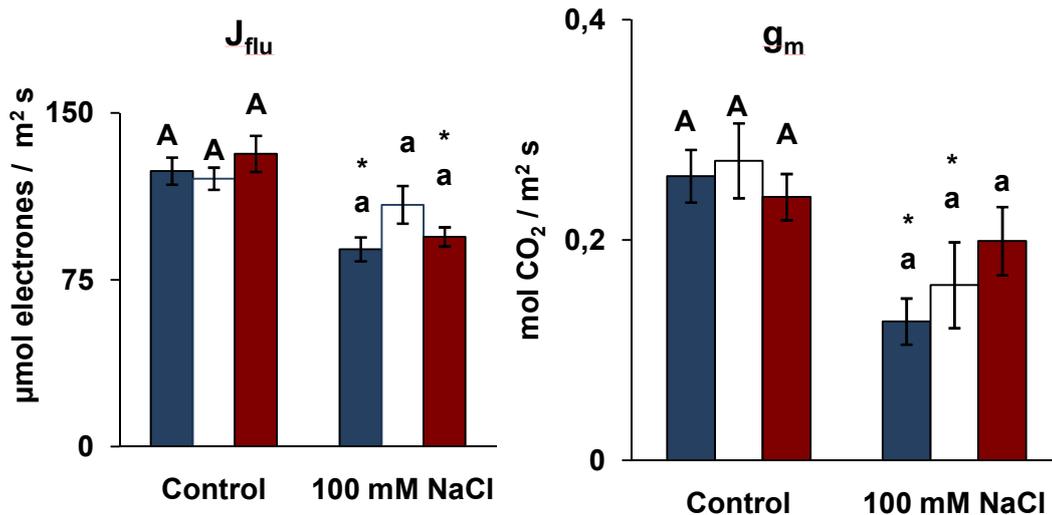
Resaltar como cambios significativos diferentes en los distintos genotipos en salinidad los siguientes: el WT presentó aumentos en glicerol, glucosa, y menores contenidos de ácido fosfórico. El KO1 presentó aumentos por la salinidad de ácido pirúvico, glicerol, ornitina, deshidroascorbato, tirosina, trehalosa mientras que descendieron los contenidos de ácido fosfórico, malato, GABA, fructosa y citrato. Las plantas OEX

presentaron aumentados sus niveles de ornitina, glucosa, deshidroascorbato, tirosina, y trehalosa, mientras que descendieron los de GABA y fructosa.

**3.7. Medida de parámetros fotosintéticos**

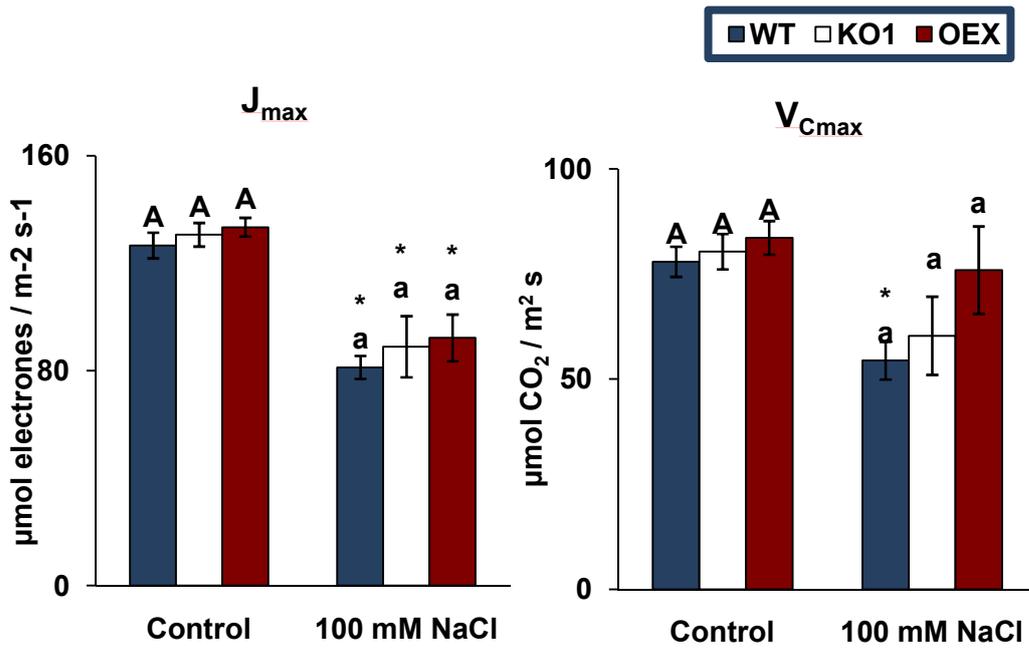
La medida del ratio de asimilación fotosintética neta ( $A_N$ ) en los tres genotipos crecidos en condiciones control y salinas, reveló la ausencia de cambios significativos entre genotipos en ambas condiciones, si bien la salinidad disminuía de forma similar en todos ellos este parámetro (Figura 63). La conductancia estomática ( $g_s$ ) sin embargo resultó ser mayor en los mutantes carentes de *AtTRXo1* en condiciones control, y la salinidad de nuevo reducía este parámetro a todos los genotipos. El transporte electrónico ( $J_{flu}$ ) fue similar en todos los genotipos en ambas condiciones si bien la salinidad lo disminuyó de forma significativa en las plantas WT y OEX y no en los KO. Por otro lado la conductancia del mesófilo ( $g_m$ ) fue también similar en todos los genotipos en las dos condiciones y la salinidad la disminuyó en los WT y KO y no en los OEX.





**Figura 63. Medida de parámetros fotosintéticos asimilación fotosintética neta ( $A_N$ ), conductancia estomática ( $g_s$ ), transporte electrónico ( $J_{flu}$ ) y conductancia del mesófilo ( $g_m$ ).** Las plantas de *A. thaliana* silvestres (WT) y mutantes KO1y sobre-expresante (OEX) *AtTrxo1* crecieron durante 33 días en ausencia (Control) y presencia (21 días) de 100 mM NaCl. Los datos son media  $\pm$  error estándar de al menos tres experimentos independientes. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre genotipos en cada condición de acuerdo al test de Tukey, y los asteriscos diferencias significativas de cada genotipo en salinidad comparado con la condición control, usando el test t-Student ( $P < 0,05$ ).

Además los parámetros de máxima velocidad de carboxilación de la RuBisCo ( $V_{Cmax}$ ) y tasa máxima de transporte electrónico ( $J_{max}$ ) tampoco se diferenciaron entre genotipos (Figura 64), si bien la salinidad ejerció un efecto diferente solo en la  $V_{Cmax}$  ya que los mutantes no la disminuyeron como ocurría en las plantas WT.  $J_{max}$  sin embargo disminuyó de forma similar en todos los genotipos cuando crecieron en presencia de la sal.



**Figura 64. Medida de parámetros fotosintéticos de máxima velocidad de carboxilación de la RuBisCo ( $V_{Cmax}$ ) y tasa máxima de transporte electrónico ( $J_{max}$ ).** Las plantas de *A. thaliana* silvestres (WT) y mutantes KO1y sobre-expresante (OEX) *Attrxo1* crecieron durante 33 días en ausencia (Control) y presencia (21 días) de 100 mM NaCl. Los datos son media  $\pm$  error estándar de al menos tres experimentos independientes. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre genotipos en cada condición de acuerdo al test de Tukey, y los asteriscos diferencias significativas de cada genotipo en salinidad comparado con la condición control, usando el test t-Student ( $P < 0,05$ ).

# DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

### 1. Estudio del metabolismo respiratorio en mutantes *Attrxo1* en salinidad.

El estrés por salinidad provoca cambios complejos en la fisiología y el metabolismo de las plantas que tratan de hacer frente a los estreses asociados como el estrés iónico, osmótico, oxidativo o nitrosativo. Los cambios dependen de muchos factores como la intensidad y la duración del estrés, el tipo de tejido y la etapa de desarrollo, pero también de la capacidad inherente de las plantas para detectar, enfrentar o inducir mecanismos de defensa que mejoran los efectos perjudiciales (Bartels y Sunkar, 2005; Lázaro y col., 2013). Se ha descrito que los sistemas antioxidantes y TRX/PRX desempeñan un papel en la respuesta a la salinidad, y en trabajos anteriores hemos sugerido que específicamente la TRXo1 de localización mitocondrial, podría proteger a estos orgánulos del estrés oxidativo probablemente a través de la regulación de proteínas diana involucradas en varios procesos de su metabolismo (Martí y col., 2009; Martí y col., 2011; Sevilla y col., 2015). En este estudio hemos sometido a plantas silvestres WT y dos mutantes KO *Attrxo1* a un tratamiento de salinidad a largo plazo, cultivándolas en agar que contenía 100 mM NaCl y hemos purificado las mitocondrias de sus hojas. El crecerlas en placa en agar fue elegido como sistema en el que las plantas desarrollan tricomas menos agresivos (bien por su dureza y/o cantidad) que pueden dañar y romper las mitocondrias durante su aislamiento.

#### 1.1. Caracterización fisiológica, metabolismo oxidativo y antioxidante

El efecto de la sal en la reducción en el peso fresco de todos los genotipos fue similar al observado previamente en las mismas plantas mutantes cultivadas en tierra y expuestas a un tratamiento de salinidad a corto plazo (7 días a 100 mM NaCl) (Calderón y col., 2018). Sin embargo a diferencia de ese estudio, el mutante KO2 en placa mostró una reducción tanto en la acumulación de peso fresco como en la longitud de la raíz en condiciones control y un mayor número de hojas. Estas diferencias podrían deberse entonces a las diferentes condiciones de crecimiento aplicadas en ambos estudios.

Cuando se cultivó en tierra, la salinidad indujo una menor pérdida de agua y un mayor cierre estomático,  $H_2O_2$  y niveles de peroxidación de lípidos en estos mutantes KO a nivel foliar. Estos efectos fueron acompañados por una mayor actividad de algunos componentes del sistema antioxidante como la catalasa y SOD a nivel de la hoja, probablemente como una forma de compensar la falta de TRXo1 (Calderón y col., 2018). En el presente estudio, los contenidos de  $H_2O_2$  en hojas no aumentaron con la salinidad en ninguno de los genotipos, lo que sugiere que el estrés oxidativo de estas plantas es más leve. Nuevamente, las diferentes condiciones de crecimiento y también la duración del estrés aplicado, muy probablemente, han influido en las diferencias observadas con los resultados obtenidos previamente. Para comprender mejor las respuestas a la salinidad a nivel mitocondrial, se determinaron los parámetros de estrés oxidativo en las mitocondrias aisladas de los mutantes *Attrxo1*. La falta de *AtTRXo1* no dio lugar a un daño oxidativo importante de los orgánulos, aunque las plantas mutantes KO2 presentaron un comportamiento diferente con una mayor peroxidación lipídica, lo que demuestra su mayor sensibilidad. Por otro lado, la salinidad no provocó cambios significativos en los parámetros de estrés oxidativo mitocondrial, probablemente debido a la respuesta de un sistema antioxidante mitocondrial eficiente.

La cadena respiratoria mitocondrial es una fuente de ROS y la presencia de un sistema de captación de los mismos en este orgánulo le permite hacer frente al estrés oxidativo inducido principalmente en situaciones de estrés. Por esta razón, los componentes del ciclo ASC-GSH colaboran con Mn-SOD y el sistema TRX/PRX presente en este compartimento celular. Los cambios previamente descritos de los sistemas antioxidantes y redox, indican que la tolerancia al estrés probablemente requiera la inducción de isoformas específicas en los diferentes compartimentos celulares o un contenido constitutivamente mayor de antioxidantes, según la especie, la variedad o la fuerza y la duración del estrés (Lázaro y col., 2013; Hossain y Dietz, 2016). Se ha descrito un aumento en la actividad mitocondrial de Mn-SOD y en su expresión en un cultivar de guisante tolerante a la salinidad pero no en uno más sensible, siendo estas inducciones dependientes de la concentración de sal (Gómez y col., 1999; Hernández y col., 2000), y en ocasiones se ha sugerido la existencia de una regulación post-transcripcional para explicar un mantenimiento de la proteína Mn-SOD durante el estrés en aquellos

cultivares de guisante tolerantes que muestran una actividad alta de Mn-SOD (Camejo y col., 2013). Así mismo, se ha descrito que la sobreexpresión de Mn-SOD aumentó la tolerancia a la salinidad en diferentes plantas como *Arabidopsis* y álamo (Wang y col., 2004). Más recientemente, y en un estudio realizado en estos mismos mutantes *Attrxo1*, hemos encontrado un aumento en todas las isoenzimas SOD en las plantas de *Arabidopsis* cultivadas en el suelo con salinidad, que fue más pronunciada en los KO que en las plantas WT y coincidió con un mayor contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las hojas (Calderón y col., 2018). El hecho de que ni la actividad mitocondrial de Mn-SOD ni la de CAT respondieran a la falta de *AtTRXo1* o salinidad en el presente estudio apunta a eventos compensadores que ocurren en los mutantes KO en condiciones control y salinas cuando se cultivan en placa, lo que finalmente les permitió mantener los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> constantes. Cuando se analizaron los indicadores de estrés oxidativo en las mitocondrias, ni la oxidación de proteínas ni la peroxidación lipídica aumentaron durante el tratamiento con sal, lo que sostiene que las plantas no están sometidas a un estrés oxidativo severo en estas condiciones salinas. Por otro lado, no se observaron cambios en las actividades de Mn-SOD y CAT en *Arabidopsis* y plantas de guisantes bajo salinidad u otros tipos de estrés ambiental (Kliebenstein y col., 2002; Wang y col., 2004; Martí y col., 2011), en los que se indujo un leve estrés oxidativo. Ese patrón parece ser muy similar al observado en nuestro estudio, ya sea en mutantes KO *Attrxo1* como en plantas WT.

En este escenario, también hemos examinado las enzimas del ciclo ASC-GSH mitocondrial como otro sistema antioxidante importante que regula los niveles endógenos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de manera muy efectiva (Jiménez y col., 1997; Chew y col., 2003). En el estudio anterior que utilizó los mismos genotipos de *Arabidopsis*, describimos que la actividad APX total de la hoja aumentó en salinidad tanto en WT como en KO mutantes *Attrxo1* (Calderón y col., 2018). Los estudios a nivel de la hoja han reportado resultados controvertidos con respecto a la actividad de APX (Wang y col., 2013). Nuestro objetivo en el presente estudio fue centrarnos en los efectos de la mutación *Attrxo1* en el ciclo ASC-GSH a nivel mitocondrial en el que la información es bastante reducida. La presencia de APX en las mitocondrias se confirmó previamente tanto en las hojas de guisante como en los tubérculos de patata (Jiménez y col., 1997; De Leonardis y col.,

2000). En *Arabidopsis*, la APX está dirigida dualmente a los compartimentos mitocondrial y estromático (Chew y col., 2003). En nuestro estudio, la menor actividad mitocondrial de APX que regula el  $H_2O_2$  en el mutante KO2 podría tener un impacto en la oxidación observada en los lípidos en estas plantas, sin eliminar la posibilidad de la contribución de otros antioxidantes como PRXIF que también controla los niveles de peróxido. Por otro lado, la actividad de la APX mitocondrial no cambió significativamente en las plantas WT bajo salinidad, mientras que las actividades de MDHAR mitocondrial y GR aumentaron. Este patrón de cambio en las actividades de MDHAR y GR es similar al reportado en las mitocondrias de cultivares de tomate tolerantes a la sal y plantas de guisantes relativamente tolerantes a la sal, aunque en el guisante, la actividad de APX también se incrementó bajo estrés salino leve y severo (Mittova y col., 2003; Lázaro y col., 2013). En los mutantes *Attrxo1*, ninguna de las actividades de los componentes mitocondriales de las enzimas del ciclo ASC-GSH fue inducida por el tratamiento de salinidad. Cabe destacar que la actividad mitocondrial de GR fue mayor en ambos mutantes que en las plantas WT bajo condiciones control y no disminuyó con la salinidad. Esta observación, junto con los niveles mantenidos de actividad de DHAR, podría haber influido en el reciclaje de glutatión y ascorbato y el nivel de  $H_2O_2$ . Como se mencionó anteriormente, específicamente bajo salinidad, los aumentos en la actividad de GR se han correlacionado positivamente con la tolerancia a la salinidad (Lázaro y col., 2013). Además, se ha descrito que la sobreexpresión de GR aumenta la tolerancia de las plantas de tabaco y álamo a la salinidad, encontrando un mayor contenido de ASC en las hojas (Aono y col., 1993; Foyer y col., 1995). De esta manera, la falta de *TRXo1* podría compensarse con una mayor actividad de GR bajo condiciones control en los mutantes, y el mantenimiento de ese nivel constitutivo en salinidad contribuyó a una respuesta eficiente de estas plantas a la condición de estrés. También se ha descrito una relación inversa entre TRX y GSH en las células BY-2 de tabaco con sobre-expresión de *PsTRXo1*, en el mutante doble *trx1-trx2* de levadura y en un mutante sin meristemo deficiente en GSH de *Arabidopsis* (Ortiz-Espín y col., 2015; Schnaubelt y col., 2015; Calderón y col., 2017).

## 1.2. Vías respiratorias

Una inducción de la actividad de la vía respiratoria alternativa (AOX) *in vivo* bajo salinidad solo se ha observado después de un estrés severo a corto plazo (Del-Saz y col., 2016), mientras que a largo plazo, o bien desciende en el caso de un estrés muy severo (Del-Saz y col., 2016), o se mantiene la actividad (Martí y col., 2011). En el presente estudio, se aplicó un estrés salino a largo plazo en plantas cultivadas en placas de agar que como se comentó anteriormente, solo causaron un estrés oxidativo leve. Bajo esta condición, la AOX mostró una reducción de su actividad *in vivo* en todos los genotipos, lo que sugiere que probablemente no fue necesaria su actividad debido a una adaptación de las plantas al estrés. Sin embargo, la mayor partición electrónica hacia la vía AOX bajo salinidad observada en ambos mutantes denota una respuesta relativamente mayor de la AOX que puede actuar previniendo la generación del radical superóxido a nivel de la UQ (Purvis, 1997; Cvetkovska y Vanlerberghe, 2013), junto con una posible influencia en la respuesta del sistema enzimático que controla los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en estas plantas. Lo esperado sería que la falta del activador propuesto de la AOX, la TRX01, causara una disminución en el nivel de reducción de la AOX y por lo tanto que limitara su activación en condiciones salinas. Para seguir investigando esto, determinamos el estado redox de la proteína AOX en fracciones mitocondriales enriquecidas. A diferencia de los extractos de hojas, la proteína AOX en mitocondrias aisladas de Arabidopsis, guisantes y tabaco se ha descrito principalmente en su forma oxidada dimérica (Rhoads y col., 1998; Martí y col., 2009; Vanlerberghe, 2013), muy probablemente debido a su oxidación durante el procedimiento de aislamiento (Umbach y Siedow, 1997; Nietzel y col., 2017). El uso de un agente de bloqueo químico como el NEM durante los procedimientos de aislamiento o enriquecimiento mitocondrial debería evitar la formación de formas diméricas lo cual se aproximaría a la situación del estado redox *in vivo*. Al utilizar esta técnica, no se detectaron cambios aparentes en el estado redox de AOX en los mutantes *Attrxo1* en comparación con las plantas WT. Además, la AOX se encontró invariablemente en su estado monomérico reducido no solo en condiciones de salinidad sino también en condición control. Estos resultados no nos permiten establecer una falta de regulación redox directa de AOX por la TRX01 *in vivo*, debido a la presencia de otros sistemas que involucran otras tiorredoxinas o

tiolreductasas como glutarredoxinas (Meng y col., 2010; Moseler y col., 2015; Ströher y col., 2016), que podrían realizar una función de mantenimiento, evitando cualquier oxidación o revertiéndola de manera eficiente, en lugar de una función de regulación AOX. De hecho, esta posibilidad se ha sugerido recientemente para explicar la función de TRX mitocondrial sobre AOX (Nietzel y col., 2017). En este caso, la actividad GR constitutiva en los mutantes, en niveles más altos y/o similares a los del genotipo WT, podría facilitar el GSH necesario para la reducción de GRX, algo que merece investigaciones adicionales. Sin embargo, nuestros resultados están en la línea de varios estudios previos que sugieren que la proteína AOX se encuentra mayoritariamente en su estado reducido y, por lo tanto, su actividad *in vivo* está probablemente regulada principalmente por el mecanismo que implica la interacción de los ácidos orgánicos y por su disponibilidad de sustrato (Del-Saz y Ribas-Carbo, 2018). La presencia de diferentes bandas en nuestro análisis de Western-blot es similar a la descrita por varios autores en diferentes especies, incluida *Arabidopsis* (Djajanegara y col., 2002; Umbach y col., 2005). Simons y col. (1999) describieron la existencia de diferentes bandas de proteína posiblemente como resultado de la familia multigénica de AOX en *Arabidopsis* (Saisho y col., 1997) como se observó en soja (Whelan y col., 1996). También Wanniarachchi y col. (2018), recientemente han descrito dos formas monoméricas que pueden reflejar dos genes diferentes o, como se describe en soja, un inicio diferente de la traducción de un gen AOX. Estos autores describieron el control dependiente del tejido y del desarrollo de las diferentes expresiones de los genes AOX, respondiendo también a diferentes señales ambientales y generando varias bandas de proteínas AOX en inmuno-transferencias (Tanudji y col., 1999). Independientemente del estado redox, el mutante KO2 mostró un patrón diferente en la cantidad de proteína AOX total detectada en extractos de hojas enteras que es similar a su patrón de partición *in vivo* hacia la AOX. Esto sugiere que la actividad de AOX *in vivo* en este mutante puede estar funcionando a su capacidad total y, por lo tanto, depende de las cantidades de proteína, es decir, es limitante bajo la condición control y luego aumenta bajo salinidad, en comparación con las plantas WT. El motivo de este patrón alterado en la expresión de AOX y su posible activación completa sigue siendo difícil de explicar. Sin embargo, un efecto indirecto de la falta de TRXo1 sobre la actividad *in vivo* de AOX puede estar relacionado con la regulación metabólica. A este respecto, se ha demostrado que TRXo1

regula el flujo de carbono en el ciclo TCA (Daloso y col., 2015) que puede afectar el nivel de ácidos orgánicos y la producción de NADH mitocondrial que, a su vez, afectan la actividad AOX (Del-Saz y col., 2017; Selinski y col., 2017). Los ácidos orgánicos como el oxaloacetato y el 2-oxoglutarato pueden estimular de forma diferente las isoformas de AOX1a, AOX1c y AOX1d, mientras que el piruvato puede activarlas todas (Selinski y col., 2018). El hecho de que nuestros mutantes *Attrxo1* no presenten cambios en la cantidad de piruvato pero muestren una expresión alterada de diferentes isoformas, puede apuntar a una posible regulación diferencial por otros ácidos orgánicos. La presencia y la inducción de diferentes isoformas AOX en nuestros mutantes puede ser también debido a la regulación diferencial de la expresión génica. Se ha demostrado que AOX1a es la forma predominante en *Arabidopsis*, que es altamente inducible por muchos tratamientos, mientras que el AOX1c se expresa ampliamente pero su expresión no cambia con los tratamientos inducidos por el estrés oxidativo (Thirkettle-Watts, 2003; Clifton y col., 2005; Elhafez y col., 2006). También el comportamiento diferente de las isoformas podría deberse, como lo mencionaron (Selinski y col., 2018), a las diferencias entre homodímeros y heterodímeros de AOX, algo que merecería una investigación *in vitro* e *in vivo* más profunda.

### **1.3. Cambios metabólicos**

Se ha demostrado que TRXo1 mitocondrial desactiva a la succinato deshidrogenasa mitocondrial y a la fumarasa y activa a la ATP-citrato liasa citosólica, regulando así el flujo de carbono a través del ciclo TCA (Daloso y col., 2015). De hecho, algunos intermediarios del ciclo TCA se acumulan en plantas mutantes *Attrxo1* cultivadas en tierra bajo un fotoperiodo corto (Daloso y col., 2015). En nuestro trabajo no hemos detectado cambios significativos en los niveles de ácidos orgánicos, pero observamos claramente cambios pronunciados en los niveles de azúcares en los mutantes *Attrxo1* en condiciones tanto control como salinas, lo que también indica una reorganización en las rutas centrales de carbono. Se observó una disminución dramática en los niveles de glucosa y fructosa en ambos mutantes KO en comparación con las plantas WT. Esto

podría indicar un mayor uso de estos azúcares en la ruta glucolítica que causaría un aumento de la respiración, probablemente debido a un aumento del flujo de carbono a través del ciclo de TCA como se sugirió anteriormente (Daloso y col., 2015). De acuerdo con esto, se observó una mayor actividad respiratoria *in vivo* a través de la ruta de la COX en nuestros mutantes KO. Este aumento en la respiración acoplada a ATP también podría indicar un aumento en la demanda de energía de la hoja en los mutantes bajo condiciones control.

Recientemente, se han postulado nuevas hipótesis que sugieren que la sacarosa es un regulador clave del movimiento estomático (Lima y col., 2018). Durante la apertura estomática, la sacarosa puede servir como fuente de energía en las células guarda a través de su oxidación por el metabolismo del ciclo glucolítico y TCA (Medeiros y col., 2018). Curiosamente, las hojas de los mutantes KO *Attrxo1* mostraron una mayor cantidad de estomas que las de plantas WT (Calderón y col., 2018), por lo que potencialmente requieren un mayor flujo respiratorio a nivel de la hoja. Por lo tanto, los niveles más bajos de sacarosa, glucosa y fructosa observados en nuestro trabajo en los mutantes *Attrxo1* pueden explicarse como resultado de su mayor oxidación por la glucolisis y la actividad cíclica del TCA acoplada a la producción de ATP por la actividad COX. Este alto coste respiratorio podría ser la causa de un balance de carbono más negativo en los mutantes *Attrxo1*, lo que explicaría su crecimiento reducido en comparación con las plantas WT bajo condiciones control. En condiciones salinas, los niveles de azúcares disminuyeron probablemente debido a una actividad fotosintética reducida típicamente observada en esta condición (Martí y col., 2011), anulando así el fenotipo metabólico observado de las plantas mutantes *Attrxo1*. Sin embargo, el patrón opuesto de los niveles de trehalosa observados en WT y plantas mutantes probablemente refleja cambios en la detección de azúcar, el metabolismo y la regulación estomática (Lunn y col., 2014) como consecuencia del metabolismo del azúcar perturbado en los mutantes KO. Se requerirán experimentos futuros para establecer los mecanismos precisos que involucran la compleja interacción entre la respiración, el metabolismo de azúcares y la apertura estomática, procesos en los que proteínas redox como TRXo1 parecen estar involucradas.

## 2. Estudio de la interacción TRXo1-PYR1

Aunque el sistema TRX fue descrito en el cloroplasto y la mayoría de trabajos sobre estas proteínas se han centrado en su papel en este orgánulo, en las últimas décadas el horizonte de actuación de las TRXs se ha extendido hacia la mitocondria, citosol y en menor medida al núcleo (Buchanan y Balmer, 2005; Geigenberger y Fernie, 2014). Concretamente en el núcleo se ha descrito recientemente en el laboratorio donde se ha desarrollado esta Tesis doctoral, al PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) como diana de la TRXo1 de localización mitocondrial y nuclear (Martí y col., 2009; Calderón y col., 2017), pero el papel de esta tiorredoxina en este orgánulo es bastante desconocido. Aparte de esta evidencia, se ha demostrado que 1-Cys PRX y NTRA se encuentran también en el núcleo y esta última es capaz de reducir a nucleorredoxinas *in vitro* (Pulido y col., 2009; Marchal y col., 2014). También una TRXh fue localizada junto a NTR en este orgánulo en células de aleurona y escultento de trigo en una situación de estrés oxidativo como la que se asocia a germinación, trasladándose desde el citosol al núcleo (Serrato y col., 2001; Serrato y Cejudo, 2003). En este escenario, y como hemos comentado, el alcance de la función de TRXo1 en núcleo apenas se conoce, por lo que los resultados que hemos obtenido comprobando la interacción de TRXo1 con PYR1, receptor de ABA, así como el efecto que tiene esta interacción en la actividad de este sensor suponen un avance importante en el estudio de la vía de señalización por ABA y del papel de TRX en núcleo.

El ácido abscísico juega un papel fundamental en varios aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta como la germinación de semillas, respuesta estomática, adaptación a estreses, y desarrollo y maduración del fruto, entre otros. En semillas, ABA participa a través de componentes de su ruta de señalización en la dormancia, longevidad e inhibición de la germinación en situaciones desfavorables tales como alta salinidad en el suelo (Sakata y col., 2014; Ruggiero y col., 2019). La ruta de señalización por ABA incluye una serie de sensores y transductores que en último término van a producir una respuesta a nivel génico a fin de controlar la situación que provocó el aumento de esta hormona. Dentro de los sensores se encuentran los receptores PYR1 (Pyrabactin Resistance1), PYL (PYR1-like) y RCAR (Regulatory Component of ABA

Receptor 1) (Park y col., 2009) mientras que los transductores son fosfatasa y kinasas de las familias PP2Cs y SnRK2, respectivamente. El modo de acción es el siguiente: la unión de ABA al receptor PYR1/PYL conduce a la supresión de proteínas fosfatasa 2Cs (PP2Cs), que inhiben a los reguladores positivos de respuesta a ABA: las proteínas kinasas SnRK2s relacionadas con SNF1 (sucrose non-fermenting1), facilitando la señalización dependiente de esta hormona.

La familia PP2C se subdivide en 11 clases en arroz y Arabidopsis (Singh y col., 2018) y actúan como inhibidores de MAPK (Fuchs y col., 2013), estando implicadas en la percepción de ABA y la activación de 3 proteínas de la familia SnRK2s (Cutler y col., 2010). Algunas PP2C en Arabidopsis como ABI1 y ABI2 (ABA-insensitive) y HAB1, HAB2 (ABA-HYPERSENSITIVE) regulan negativamente la respuesta a ABA (Bheri y Pandey, 2019). En la respuesta dependiente de ABA, cuando los niveles de esta hormona aumentan como consecuencia de un estrés que pueda provocar una deshidratación, ABA se une a los receptores solubles y estabiliza sus conformaciones activas permitiéndoles unirse e inhibir a PP2Cs. Esto a su vez permite la acumulación de SnRK2 kinasas activas, cuyas dianas son SAC1 (slow anion channel 1) que controla la apertura de la célula guarda y los factores de unión a elementos de respuesta a ABA, unos factores de transcripción bZIP que median la expresión génica regulada por ABA. Así el ABA controla el uso de agua y la fisiología de respuesta a estrés (Puli y Raghavendra, 2012) permitiendo el cierre de los estomas ante falta de agua, el mantenimiento de la dormancia en semilla seca o el retraso de la germinación en condiciones adversas.

A diferencia de ABA, el  $H_2O_2$  tiene una estructura demasiado simple para ser reconocida específicamente por una proteína, así que es difícil que la modulación de la fosforilación por  $H_2O_2$  esté mediada por la unión reversible de esta molécula a proteínas fosfatasa y kinasas. Sin embargo, el carácter oxidativo leve provoca la oxidación de residuos de Cys en las proteínas para generar formas sulfénicas o puentes disulfuro, ambos reducidos a Cys por diversos reductores celulares. Dado el carácter eminentemente reductor de TRX y ya que hemos comprobado que PYR1 es efectivamente una de sus dianas nucleares por diversas técnicas de interacción proteína-proteína, el estudio de la regulación redox de este receptor nos llevó a comprobar también el efecto que la oxidación tiene sobre su actividad, comprobando

que efectivamente regula su estado de oxidación y como consecuencia de ello su actividad. Por otro lado, la oxidación que ejerce el  $H_2O_2$  sobre las PP2C y SnRKS nos lleva a plantearnos si TRX podría ser el reductor fisiológico de estas proteínas. Nuestros resultados apuntan hacia la regulación redox no sólo del PYR1 y por tanto de su actividad como inhibidor de fosfatasa como HAB1, sino también de la propia fosfatasa. Se ha descrito la inhibición de HAB1 por oxidación y formación de puentes disulfuro con otras HAB1 implicando a las Cys  $C_{186}$  y  $C_{274}$  (Sridharamurthy y col., 2014), un proceso que se revierte con reductores como GSH o DTT, sin embargo no se ha descrito si pudiera estar regulado por TRXs. También se ha descrito que AtABI1 y ABI2 son sensibles a redox y se inactivan reversiblemente por  $H_2O_2$  *in vitro* en la presencia de glutatión en concentraciones fisiológicas (Meinhard y Grill, 2001). La oxidación de un residuo crítico de Cys en ABI2 responsable de su inactivación incrementa la señalización dependiente de ABA, por lo que se ha propuesto a esta fosfatasa como diana de regulación redox en la señalización hormonal (Meinhard y col., 2002). Por otro lado, hemos mostrado que la S-nitrosilación de PYR1 también parece estar regulando su actividad de forma negativa y que TRXo1 recupera algo la actividad perdida. En este sentido, TRXo1 podría desnitrosilar a PYR1 pero todos estos ensayos deberían ser analizados más en profundidad. Si bien se ha descrito que ciertas TRXs pueden reducir a proteínas S-nitrosiladas o S-glutationiladas (Bedhomme y col., 2012; Kneeshaw y col., 2014), si la TRXo1 posee esta propiedad podría ayudar a comprender la ausencia de glutarredoxinas con actividad deglutationalizante en la mitocondria, algo que merecería una investigación más detallada. Nuestros resultados por tanto, no sólo corroboran la regulación redox de PYR1 y de la fosfatasa HAB1 sino también que TRX podría ser el reductor fisiológico, algo muy interesante y totalmente novedoso.

Otro ejemplo de regulación redox de la señalización por ABA ligado a TRX es el ejercido por la glutatión peroxidasa GPX3 que la relaciona con  $H_2O_2$  en el cierre estomático en Arabidopsis (Miao y col., 2006), proponiéndose como sensor de ROS al complejo GPX3-ABI2. GPX3 oxidada provoca la oxidación de ABI2 y en menor medida de ABI1 y la inactiva, por lo que GPX3 podría ser un sensor de ROS intracelular y junto con ABI, estar implicados en señalización por oxidación y por ABA. Así, GPX3 se propone que actuaría tanto como eliminador, como transmisor de la señal oxidativa del  $H_2O_2$ .

Interesantemente, diversos autores han establecido que es TRX y no GSH el donador electrónico fisiológico de la familia de GPXs en Arabidopsis (Comtois y col., 2003; Iqbal y col., 2006) lo que encajaría con el papel que proponemos para nuestra TRXo1 en la regulación del movimiento estomático. Otra diana de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es CPK21 (Ueoka-Nakanishi y col., 2013) que activa canales iónicos en células guarda. Su oxidación provoca un puente disulfuro asociado con pérdida de actividad que puede restablecerse con TRXh. Se ha sugerido que tras el cierre estomático por el incremento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, proteínas como CPK21 se inactivan y provocan un “feedback” negativo para desensibilizar la señalización por ABA.

En nuestros ensayos, el hecho de que tantos los mutantes OEX como sobre todo los KO1 presenten una hiposensibilidad al ABA en cuanto a la germinación de semillas, y en su comportamiento estomático en el caso de los KO1, apuntan a que existe una regulación redox en las rutas de percepción y respuesta a esta hormona y que TRXo1 está implicada en este proceso. Estos resultados son muy novedosos en cuanto a la regulación redox de PYR1, algo que hasta ahora se desconoce. Como hemos comentado, si bien se ha mostrado la regulación redox de ciertos componentes de la ruta de señalización como ciertas fosfatasas y kinasas, no se conoce el reductor fisiológico *in vivo*, por lo que los estudios realizados en esta Tesis doctoral abren un campo de investigación creemos que muy interesante en estos aspectos. Entre las regulaciones post-traduccionales ya mediadas por NO se encuentran la S-nitrosilación sobre residuos de Cys y la nitración de Tyr, y de hecho se ha descrito que la nitración y no la S-nitrosilación afecta la actividad de varios miembros de la familia PYR/PYL (Castillo y col., 2015). Todos estos resultados implican no sólo la existencia de una regulación redox sobre las rutas de señalización por ABA sino que las modificaciones oxidativas y reductoras así como las nitrosativas regulan la actividad de los componentes que interaccionan con PYR, algo que afecta a procesos tan importantes como germinación de semillas y respuesta a déficit hídrico y salino. La investigación en esta línea permitirá avanzar en el conocimiento de las rutas de señalización por ABA con el fin de mejorar la respuesta de plantas a situaciones adversas cada día más agresivas a las que se enfrenta la producción vegetal.

### 3. Estudio del proceso fotosintético en mutantes *Attrxo1*

La salinidad tiene un gran impacto negativo en el crecimiento de las plantas siendo uno de los procesos más afectados el de la fotosíntesis debido entre otras causas, a los estreses osmótico y oxidativo asociados (Mudrik y col., 2003). Como consecuencia, el metabolismo redox y antioxidante se altera y contribuye en la respuesta a esta situación de estrés. En este contexto, la falta y/o sobre-expresión de una proteína implicada en regulación redox como la TRXo1, podría afectar a dicha respuesta y de hecho, estudios recientes realizados en nuestro laboratorio en mutantes KO *Attrxo1* crecidos en condiciones de salinidad han puesto de manifiesto un papel para esta TRXo1 en la respuesta a esta situación adversa (Martí y col., 2011). Por otro lado la corroboración que hemos realizado de que PYR1 receptor de ABA está regulado por TRXo1, nos llevó a plantear el estudio del posible papel de esta TRXo1 afectando al proceso fotosintético que está regulado entre otros factores por el intercambio gaseoso que se produce a través de los estomas, cuya apertura y cierre está a su vez regulado por ABA y por las condiciones ambientales y de estrés. Para ello, en esta Tesis doctoral hemos analizado la respuesta de plantas tanto WT como KO1 y una nueva línea obtenida de sobre-expresión de *AtTRXo1* (OEX) crecidas en ausencia (condición control) y presencia de 100 mM NaCl. Las plantas crecieron en fotoperiodo corto y con una intensidad lumínica superior a la del crecimiento de las plantas utilizadas en el estudio anterior de respuesta del metabolismo mitocondrial, ya que eran condiciones propicias para la medida de alguno de los parámetros fotosintéticos como la conductancia del mesófilo.

En un principio se ha caracterizado la nueva línea sobre-expresante OEX y como paso inicial se realizó un estudio de su tasa germinativa tanto en condición control como en semillas embebidas en 100 mM NaCl, comparando la respuesta con la que presentaron los mutantes KO1 descrita por Ortiz-Espín y col. (2017). Así, encontramos que el retraso observado en germinación de este OEX tanto en condición control como sobre todo en la condición salina es contrario al observado por los KO1 que en condiciones control no se diferenciaba del WT, mientras que en salinidad adelantaba su germinación. Estos resultados podrían apoyar el papel que en su día sugerimos para esta TRXo1 como posible sensor de estrés salino, de forma que su falta provocaría que la semilla no

detectara de igual forma el estrés y adelantara su germinación (algo en un principio no deseable por las condiciones adversas), mientras que su sobre-expresión podría inducir lo contrario y retrasar lo posible la germinación en esta condición desfavorable.

### **3.1. Caracterización fisiológica**

Continuando con el estudio funcional del posible papel de TRXo1 sobre el proceso de fotosíntesis, como hemos comentado, analizamos la influencia de falta y sobre-expresión de *AtTRXo1* en plantas que crecieron en fotoperiodo corto y con una intensidad lumínica alta. En un inicio caracterizamos la respuesta de estas plantas a nivel fisiológico y el estrés oxidativo al que estaban sometidas. Así, el estudio del crecimiento de las plantas en condiciones salinas reveló que ambos mutantes presentaban una disminución similar de los parámetros fisiológicos medidos como diámetro de roseta, número de hojas, área foliar y peso fresco de la parte aérea. Sin embargo, la falta o sobre-expresión de *AtTRXo1* en condiciones control reveló algunas diferencias en ciertos parámetros como menor área foliar de los KO y mayor de los OEX, mayor número de hojas en ambos mutantes y mayor peso fresco en los OEX que las plantas WT, indicando un alteración fisiológica como consecuencia de la falta o sobre-expresión de esta proteína. Como ya hemos comentado, en trabajos anteriores en estos mismos mutantes KO crecidos en diferentes condiciones de luz de menos intensidad y fotoperiodo de día largo, la falta de *AtTRXo1* tampoco provocó un cambio fenotípico apreciable, si bien no se produjeron cambios significativos en estos mismos parámetros fisiológicos ni en condiciones control ni salinas (Calderón y col., 2018). Esto podría indicar que las diferentes condiciones de crecimiento afectan de forma distinta y provocan una respuesta a la falta de esta *AtTRXo1*, que podría influenciar el metabolismo de la planta. Además de la relación TRXo1-PYR1, algunos de los resultados obtenidos en ese estudio anterior nos indicaron que el proceso fotosintético podría estar alterado en los mutantes, como fueron las diferencias encontradas en densidad y apertura estomática. Así, los mutantes presentaron una mayor densidad estomática y menor apertura tanto en condiciones control como salina, si bien no presentaban diferencias en conductancia estomática y además perdían menos agua en condiciones salinas. Todo ello, nos llevó a plantear este estudio del efecto ya no sólo de la falta, sino también de sobre-expresión

de *AtTRXo1*, en el proceso fotosintético en las dos condiciones, ausencia y presencia de 100 mM NaCl.

El estrés salino al igual que la limitación de agua afecta negativamente la fotosíntesis y la respiración dependiendo de la duración y gravedad impuestas. Los efectos están relacionados con las limitaciones estomáticas y del mesófilo, afectando la difusión de CO<sub>2</sub> y por tanto limitando los procesos bioquímicos fotosintéticos (Flexas y col., 2004; Chaves y col., 2009). El estrés por salinidad al igual que por sequía, provoca una respuesta muy compleja, que implica la interacción de limitaciones en diferentes lugares y escalas de tiempo en relación con el desarrollo de las plantas (Chaves y col., 2009). Las plantas tienen una alta plasticidad y pueden modular su desarrollo y morfología ajustando mecanismos fisiológicos y bioquímicos (Taji y col., 2004; Acosta-Motos y col., 2015). Esto incluye la compartimentación o exclusión de iones tóxicos y la síntesis de osmolitos, activación de componentes antioxidantes para regular la homeostasis redox hormonal (Gomez y col., 2004; Kosová y col., 2013; Lázaro y col., 2013). De hecho diversos estudios describen una correlación entre la tolerancia a la salinidad y la regulación positiva de enzimas antioxidantes específicas (Hernández y col., 1993 y 2001; Mittova y col., 2003; Flowers y Colmer, 2008). Bajo diferentes condiciones de estrés que incluyen salinidad, déficit de agua o temperaturas extremas, las ROS se generan a nivel celular, con posibles consecuencias negativas, por el estrés oxidativo inducido (Hernández y col., 1999 y 2000; Hasegawa y col., 2000). Las respuestas tempranas a la salinidad y la sequía incluyen una reducción de la conductancia estomática para evitar la pérdida de agua (Chaves y col., 2009), de esta manera disminuyendo el contenido interno de CO<sub>2</sub> y la asimilación de carbono. De hecho, durante la fotosíntesis y bajo estrés por sequía se ha descrito una mayor pérdida de electrones al O<sub>2</sub> por la reacción de Mehler en plantas de trigo y girasol (Biehlery Fock, 1996; Sgherri y col., 1996). También la vía fotorrespiratoria se induce, especialmente cuando la oxigenación de RuBP (ribulosa 1,5 bifosfato) es máxima, debido a la limitación de la fijación de CO<sub>2</sub>, lo que puede representar más del 70% de la producción peroxisomal total de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en condiciones de estrés por sequía (Noctor y col., 2002). Se ha demostrado que la desecación y la salinidad perturban el estado redox, inhiben los mecanismos antioxidantes y aumentan la producción de ROS no sólo en los peroxisomas (del Río y

col, 1996; Mittova y col., 2003) sino en mitocondrias, cloroplastos y apoplasto como ya se ha descrito en la introducción de esta Tesis.

En el control del estado redox las tiorredoxinas tienen un papel fundamental. Algunas de estas proteínas cloroplastídicas como PsTRX*m1*, *m2*, *m4* y de tipo *f* y ZmTRX*m1* responden a la salinidad durante la germinación aumentando su expresión génica. Además, la sobre-expresión de PsTRX*m1*, PsTRX*m2* y PsTRX*f* confirieron resistencia a la salinidad (Fernández-Trijueque y col., 2012), aunque se ha descrito que TRX*m* en lugar de TRX*f* está involucrada en la respuesta al estrés oxidativo (Okegawa, y Motohashi, 2015). También es interesante la hipersensibilidad de los mutantes KO de *AtNTRC* al estrés salino (Serrato y col., 2004), lo que sugiere que las TRXs cloroplastídicas están involucradas directa o indirectamente en la tolerancia a esta condición de estrés. Otra TRX involucrada es OsTRX*h1*, que responde con una mayor expresión en el nivel de proteína bajo salinidad (Zhang y col., 2011). Esta TRX se secreta en el espacio apoplástico y las plantas KO presentan un fenotipo enano con menos brotes, mientras que su sobre-expresión (OEX) conduce a un fenotipo sensible a la sal en arroz. De manera interesante, y al igual que ocurre con nuestros mutantes KO1 y OEX *Attrxo1*, tanto las plantas KO como OEX OsTRX*h1* presentaron una sensibilidad disminuida a ABA durante la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas acompañadas por una mayor cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el apoplasto de las KO, así como una menor cantidad en las plantas OEX en comparación con WT en condiciones salinas. Todo esto apunta a que tanto nuestra TRXo1 como la descrita TRX*h1* están involucradas en la regulación del estado redox de la mitocondria/núcleo y del espacio extracelular, respectivamente, lo que influye en el desarrollo de la planta bajo salinidad. Otros tipos de TRX*h* responden a la salinidad, lo que aumenta su contenido de proteína en las raíces de genotipos de tomate sensibles a salinidad, mientras que disminuye en plantas más tolerantes, lo que sugiere un papel para esta TRX en la respuesta al estrés oxidativo, que es más prolongado en los cultivares sensibles (Manaa y col., 2011). En cuanto a la tiorredoxina mitocondrial/nuclear TRXo1, como ya hemos comentado en la introducción anteriormente, se encuentra implicada en la respuesta de plantas de guisante a salinidad proporcionando a la célula con un mecanismo para responder a través de la modulación de su actividad sobre sus proteínas diana, probablemente protegiendo a la

mitocondria del estrés oxidativo junto a otras enzimas antioxidantes como Mn-SOD, AOX, y PRXII F (Martí y col., 2011) y tal y como hemos desarrollado anteriormente, hemos descrito su papel sobre el metabolismo mitocondrial. Sin embargo, la implicación que esta TRXo1 pudiera tener afectando su falta o sobre-expresión a procesos clave llevados a cabo en otros orgánulos celulares como los cloroplastos, concretamente en la respuesta fotosintética, en una situación adversa como es la salinidad se desconoce y es parte del estudio abordado en esta Tesis doctoral.

Como hemos comentado, uno de los principales efectos del estrés salino es la limitación de la producción vegetal por inhibición de la fotosíntesis. Esta inhibición puede deberse al cierre de los estomas y a la limitación de los niveles intracelulares de CO<sub>2</sub> (Mäkelä y col., 1999; Yang y Lu, 2005), pero también a una disminución en la actividad del PSII y el transporte de electrones (Lu y Vonshak, 2002; Rabhi y col., 2010). El nivel de proteína TRX<sub>m</sub> ha sido descrito que disminuye por el estrés salino en *Arabidopsis* y hojas de *P. tenuiflora* (Pang y col., 2011). AtTRX<sub>m1</sub> y *m2* regulan positivamente la síntesis del PSII mediante la reducción de la subunidad CP47, lo que hipotéticamente confiere resistencia al estrés por salinidad (Wang y col., 2013). En el proceso de fotosíntesis, la actividad de la enzima NDH (NADH-deshidrogenasa) y la PGR (complejo de regulación del gradiente de protones) aumentan en *G. cyrtoloba* en condiciones de salinidad (Yang y col., 2007). Sin embargo, AtTRX<sub>m4</sub> y NtTRX<sub>m</sub> regulan negativamente *in vivo* la actividad de la fotosíntesis, interactuando e inactivando la enzima NADH-deshidrogenasa y el complejo PGR (Courteille y col., 2013). Aunque la fijación de CO<sub>2</sub> es limitada, se ha descrito que los ARNm de fructosa bifosfatasa (FBP) y fosforribulokinasa (PRK) disminuyen (Chaves y col., 2009), pero en hojas de cebada, HvSBP (sedoheptulosa-1,7-bifosfatasa) y HvPRK aumentaron el nivel de proteína en un genotipo tolerante a salinidad y lo disminuyeron en uno sensible (Rasoulnia y col., 2011). Las proteínas diana del sistema Ferredoxina FTR/TRX son algunas enzimas de Calvin-Benson en reacciones dependientes de la luz, como FBP, PRK, GAPDH (glicerladehido-3-fosfato deshidrogenasa), Rubisco activasa y SBP (Raines, 2003). AtTRX<sub>f1</sub> regula positivamente GAPDH, AtTRX<sub>f1</sub> y AtTRX<sub>f2</sub> regulan FBP, SBP y Rubisco activasa, AtTRX<sub>m1</sub> y AtTRX<sub>m2</sub> controlan PRK y AtTRX<sub>m2</sub> y AtTRX<sub>m4</sub> ajustan la actividad de SBP. El CP12 (Calvin cycle protein 12) es un inhibidor de PRK y GAPDH y se inactiva *in vivo* por la

reducción mediada por TRX dependiente de la luz de *AtTRXf1*, *AtTRXm1* y *AtTRXm2* (Michelet y col., 2013), pudiendo regular así su actividad bajo la condición salina.

En esta Tesis hemos estudiado el efecto que la falta y sobre-expresión de una TRX de localización mitocondrial y nuclear como es *AtTRXo1* pudiera tener sobre el funcionamiento del proceso fotosintético junto a la fisiología y funcionamiento de los estomas, tanto en una condición control como en una de crecimiento en presencia de NaCl. El hecho de que en una situación control, no haya diferencia en la densidad estomática total entre los genotipos pero sí la haya en el número de estomas maduros que disminuye en las plantas KO parece apuntar a un efecto de la falta de esta *TRXo1* en el desarrollo estomático. Además, la salinidad afecta diferencialmente a los mutantes que presentaban mayor densidad de estomas totales y menor de maduros en ambos genotipos mutantes (KO y OEX). Esto es, en condiciones salinas la falta y sobre-expresión deben perturbar el estado redox que podría estar implicado en la maduración estomática. Sin embargo la participación del control redox en el desarrollo estomático es algo aún bastante inexplorado. Se ha descrito que el desarrollo de estomas, encargados del control del intercambio gaseoso y de agua, es dependiente de procesos en los que están implicadas proteínas kinasas activadas por mitógeno (MAPK). Así, MAP kinasas 3 y 6 colaboran en el control de la distribución y diferenciación estomática en *Arabidopsis*, si bien los mecanismos por los que se activan/inactivan y regulan los distintas etapas del desarrollo son bastante desconocidos (Song y col., 2014). Recientemente, se ha identificado una fosfatasa dual, MAP kinasa fosfatasa 1 (MPK1) que promueve el paso hacia el destino celular estomático controlando la activación de MAP kinasas en los estadios iniciales de desarrollo (Tamnanloo y col., 2018). Así, la inhibición de MAPKs en células precursoras mediada por MKT1 dirige sus destino hacia la diferenciación estomática. En este contexto, se ha descrito la existencia de un control redox sobre ciertas MAPKs (Gupta y Luan, 2003), de forma que el  $H_2O_2$  inactiva a la fosfatasa PTP1 y no permite la desfosforilación de kinasas que por tanto, permanecen fosforiladas y ejercen su función fosforilando a proteínas implicadas en el cierre estomático.

Otro ejemplo de control redox sobre la densidad estomática y que además implica a proteínas del sistema TRX/PRX es el de las proteínas SDD1 (Stomatal Density and Distribution1-1) y EPF1 (Epidermal Patterning Factor1) de membrana plasmática que son

reguladoras negativas del desarrollo estomático (Casson y Gray, 2008). Los mutantes *sdd1-1* presentan una elevada densidad estomática como es el caso también de mutantes de la NADPH tiorredoxina reductasa *ntrc*. Es conocido que este proceso está controlado por factores ambientales como luz/sombra y presión parcial de CO<sub>2</sub> (Lake y col., 2001; 2002). De hecho la sombra sobre hojas maduras de *Arabidopsis* provoca la inducción de la expresión de SDD1 en hojas jóvenes que por señalización sistémica se acompaña de una menor densidad estomática en las jóvenes, consistente con un papel represor del desarrollo de SDD1 (Coupe y col., 2006). Además en el control del desarrollo estomático se ha descrito la participación de la duración del fotoperiodo en *Arabidopsis* (Lepisto y col., 2009). Así, la falta de NTRC en los mutantes provoca una mayor densidad estomática y mayor apertura en plantas que crecen en día corto que además, presentan una represión de los genes *SDD1* y *EFP1*. Esta inhibición influencia el desarrollo, por lo que estos mutantes no son capaces de controlarlo correctamente, sobre todo en condiciones de día corto donde el control negativo es más crucial para disminuir el número de estomas y así igualar las pocas horas de luz y evitar mayores pérdidas de agua (Lake y col., 2001).

La apertura y cierre estomático se lleva a cabo por el llenado osmótico o el constreñimiento de las 2 células acompañantes o células guarda que conforman el estoma, de forma que un incremento en la presión osmótica en estas células causado por una entrada de K<sup>+</sup> resulta en la apertura del mismo. Las células guarda son capaces de detectar señales tanto intra- como extracelulares y responder rápidamente para conseguir la apertura o cierre del estoma. Entre estas señales se encuentran la luz, CO<sub>2</sub>, humedad, patógenos, contaminantes y hormonas como el ABA, auxinas, citoquininas y etileno (Murata y col., 2014). Estas señales provocan cambios en la actividad de los canales de aniones y median el flujo de osmorreguladores como Cl<sup>-</sup> y malato desde las células guarda regulando el cierre, y de esta manera median la respuesta estomática a estímulos fisiológicos y de estrés (Song y col., 2014). Las ROS también se han descrito como reguladoras de este proceso y de hecho en 1996 se describió por primera vez que provocan el cierre estomático e inhiben su apertura a través de aumentos de Ca<sup>+2</sup> citosólico (McAinsh y col. 1996) que controla la actividad de múltiples kinasas que a su vez regulan la producción de ROS y a canales iónicos. Además las ROS actúan

directamente sobre proteínas a través de modificaciones post-traduccionales para la regulación fina de la señalización en las células guarda. Se ha descrito de hecho que la actividad de los canales iónicos puede ser modificada por  $H_2O_2$  por lo que podrían actuar de sensores redox (Sierla y col., 2016). Como ejemplos, el  $H_2O_2$  activa canales de  $Ca^{2+}$  en células guarda de *Arabidopsis* (Pei y col., 2000) e inhibe tanto a canales de entrada como de salida de  $K^+$  en *Vicia faba* (Köhler y col., 2003). Otros sensores redox que se han sugerido son las kinasa RLKs y entre ellas unas ricas en residuos de Cys (CRKs) (Bourdais y col., 2015) que se han visto implicadas en el control de la apertura basal y la respuesta estomática a estímulos.

Otro proceso regulatorio describe la S-nitrosilación de OST1 que restringiría la ruta regulando negativamente la actividad kinasa (Wang y col., 2015). Se ha descrito una acumulación de NO por ABA entre los eventos tardíos de señalización por ABA que permitiría el “reseteado” de la misma. Sabiendo que OST1 regula la actividad de la NADPH oxidasa generadora de ROS se podría asumir que el descenso en su actividad reduciría la acumulación de ROS, pero todos estas sugerencias sobre los mecanismos que permiten el restablecimiento del balance redox y el estado antes del cierre estomático de las células guarda aún tienen que ser esclarecidas.

Mientras que en sistemas animales el papel de las modificaciones oxidativas de canales iónicos está bien documentado, en plantas es un campo de investigación emergente, y la capacidad para “sensar” ROS de estos y otros posibles sensores aún está por demostrar. En este contexto, los resultados que hemos obtenido en esta Tesis doctoral nos permiten sugerir un posible papel para TRXo1 en la regulación redox de la respuesta estomática debido a las diferencias observadas en comportamiento estomático de los mutantes especialmente del KO1, si bien es cada vez más demostrado el papel que las modificaciones redox sobre componentes clave de la señalización por ABA, aún queda por establecer el papel que proteínas como TRX puedan ejercer sobre dianas específicas dentro de la compleja red de señalización. Creemos que los resultados derivados de esta Tesis doctoral pueden aportar un elemento más como es la TRXo1 con un posible papel activo en este proceso, abriendo el campo de investigación en nuestro grupo de trabajo hacia la regulación redox de procesos dependientes de ABA.

### 3.2. Metabolismo hormonal

Dentro del proceso de señalización que dirige y regula el crecimiento y desarrollo de las plantas se encuentran las fitohormonas, con un papel crucial en la respuesta a situaciones de estrés como la salinidad, modulando la adaptación (Verma y col., 2016). Entre ellas, en esta Tesis nos hemos centrado en el análisis de ABA, GA4 e IAA en los mutantes KO1 y OEX crecidos en condiciones de salinidad para estudiar si la falta o sobre-expresión de *AtTRXo1* influenciaba sus niveles foliares.

El precursor del **ABA** xantoxina es generado desde las xantofilas de los tilacoides y se ha sugerido que puede funcionar como una señal retrógrada del cloroplasto al citosol. El paso limitante en la biosíntesis de ABA es el llevado a cabo por la 9-cis-epoxi carotenoide dioxigenasa (NCED) que genera la xantoxina (Oelze y col., 2008). Este intermediario se transporta al citosol donde es oxidado por aldehído oxidasa generando ABA (Qin y Zeevaart, 1999). La regulación transcripcional de NCED depende en hojas de la luz y sugiere una relación con la fotosíntesis y probablemente con la señalización redox (Thompson y col., 2007), aunque no se conoce muy bien si está sujeta también a regulación post-traduccional. Una relación circunstancial entre biosíntesis de ABA y estado redox del cloroplasto se establece a través del ascorbato, ya que mutantes *vtc1* con bajo ascorbato se correlacionan con incrementos en ABA en las hojas (Pastori y col., 2003). Otra posible relación se establece a través de la Mg quelatasa implicada en síntesis de clorofilas, señal retrógrada plastidio-núcleo y percepción de ABA, sin llegar a ser un receptor. Se ha descrito que esta proteína se regula de forma redox por TRXs, concretamente *TRXf* y *TRXm*. De hecho el silenciamiento de ambas afecta a la expresión de genes de biosíntesis de tetrapirroles y provoca acumulación de ROS (Luo y col., 2012). La falta y sobre-expresión de *TRXo1* en este trabajo de Tesis doctoral no ha provocado cambios en los niveles de ABA en condiciones control en comparación a plantas sin transformar, por lo que parece que no se relaciona directamente en esta situación con la ruta biosintética. Sin embargo, cuando crecen en salinidad, tanto KO1 como OEX presentan niveles mucho más elevados de ABA, lo que podría indicar que el desequilibrio redox es sentido en esta situación de estrés y afecta el contenido de la hormona. De hecho se ha descrito al ABA como una hormona del estrés que se acumula en salinidad al igual que ocurre en nuestras plantas de *Arabidopsis* tanto WT como

mutantes *Attrxo1*, regulando genes de respuesta (Raghavendra y col., 2010). Se ha descrito además que el ABA reduce la acumulación de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y aumenta la de prolina y azúcares (Gurmani y col., 2013) algo que también hemos observado en nuestras plantas crecidas en salinidad.

Las **auxinas** son fitohormonas promotoras del crecimiento mediante la inducción de la división y expansión celular, la formación de raíces laterales, el dominio apical, el desarrollo del fruto (Pospíšilová, 2003) y el control del desarrollo del tejido vascular (Wang y col., 2001). Las auxinas desempeñan un papel crítico en el crecimiento de las plantas también en condiciones de estrés, incluido el estrés por salinidad. El ácido indolacético (IAA) atenúa el estrés salino y este fenómeno ha sido descrito en múltiples estudios. Dentro de su relación con el metabolismo redox, las auxinas podrían regular los niveles de ROS y dirigir su función como señalizadores celulares o como agentes de daño celular oxidativo (Krishnamurthy y Rathinasabapathi, 2013). De hecho, la aplicación exógena de auxinas puede inducir la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  o su disminución mediante el aumento de expresión y actividad de enzimas como la catalasa, las peroxidasas o las SOD (Tyburski y col., 2009). La relación entre la señalización por auxinas y las ROS y su efecto sobre el crecimiento es patente en procesos como la elongación de células de plantas inducida por auxina y mediada por la producción de  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Schopfer y Bechtold, 2002). Las auxinas exógenas afectan también a la actividad de antioxidantes enzimáticos diferenciándose espacialmente en procesos de crecimiento y desarrollo como en el caso de la actividad de la ascorbato peroxidasa que se estimula con el tratamiento con auxina en la parte lateral de la raíz de tomate, mientras la actividad ascorbato oxidasa aumenta por las auxinas en la parte distal de la raíz. A su vez las auxinas provocaron la inhibición de enzimas reductoras de ASC como la deshidroascorbato reductasa en la parte proximal o la actividad de la monodeshidroascorbato reductasa en las partes proximal y distal de la raíz (Tyburski y col., 2008).

La relación ya descrita entre metabolismo redox y auxinas se ve reforzada por nuestros resultados. El hecho de que en nuestros mutantes KO1 *Attrxo1* los niveles de AIA estén disminuidos mientras que en los sobre-expresantes OEX están aumentados respecto a plantas WT, apunta hacia una posible regulación redox sobre esta hormona. Interesantemente, se ha descrito que las ROS tienen efectos sobre las auxinas afectando

a su biosíntesis, metabolismo, transporte y señalización (Tognetti y col., 2012). Además, los sistemas de reducción de tiol, glutarredoxinas, TR dependientes de NADPH y el glutatión (GSH) afectan a los procesos de desarrollo en *Arabidopsis* al interferir con la señalización de la auxina (Bashandy y col. 2010; Cheng y col., 2011) o con su biosíntesis. Como ejemplo, los niveles de auxina son modulados por  $H_2O_2$  en el estudio llevado a cabo por Gao y col. (2014) quienes además muestran la inducción por parte del GSH de la transcripción de genes de biosíntesis de auxinas en hojas de *Arabidopsis*. Sin embargo el posible papel de TRX sobre la síntesis y metabolismo de auxinas es bastante desconocido.

Por otro lado, en salinidad se produce un desequilibrio en la homeostasis de auxinas y su distribución en diferentes tejidos como en meristemas de raíces de *Arabidopsis* (Jiang y col., 2016). Se ha descrito que la señalización por auxinas participa en la respuesta adaptativa frente al estrés oxidativo generado por la salinidad interaccionando con componentes del metabolismo redox como APX, GST y CAT y con otras hormonas como GAs en *Arabidopsis*, si bien los mecanismos están aún por esclarecer (Iglesias y col., 2010). En raíces, las auxinas incrementan los niveles de GA induciendo la degradación de DELLAs y por tanto inhibiendo la respuesta de inducción de sistemas antioxidantes de defensa (Achard y col., 2008). Se ha sugerido entonces que la supresión de la señalización por auxinas podría ser una estrategia para aumentar tolerancia a estrés abiótico tal y como se ha descrito para estreses bióticos (Navarro y col., 2006). En nuestro estudio, la salinidad aumenta los niveles de AIA en las plantas WT y KO1 pero no en las OEX apuntando a un desequilibrio redox que puede alterar la respuesta en los sobre-expresantes mientras que los KO logran contrarrestar la falta de TRX, probablemente por redundancia.

Centrándonos en las **giberelinas** (GAs), las diferencias que hemos encontrado en GA4 en los mutantes KO1 *Attrxo1* que presentan disminuido su contenido, apuntan hacia una implicación de regulación redox en el metabolismo de esta hormona. Las GAs son esenciales para muchos procesos de desarrollo en las plantas, como la germinación de semillas, el alargamiento del tallo, la expansión de las hojas, el desarrollo del tricoma, la maduración del polen y la inducción de la floración (Achard y Genschik, 2009). Las GAs funcionan promoviendo la destrucción de las proteínas nucleares DELLA, que son

reguladores negativos de la señalización de GAs y reprimen el crecimiento. Cuando hay GA, ésta se une a GID1 (receptor de GA) que a su vez se une a DELLA y libera a los factores de transcripción que tiene inhibidos/acomplejados. En presencia de GA las DELLA se degradan por el proteosoma (Xia y col., 2015). La vía de señalización de GAs comprende la biosíntesis de las hormonas activas, su percepción, la transducción de señales y la inactivación, y cada uno de estos procesos está sujeto a la regulación por señales ambientales, incluido el estrés abiótico (Colebrook y col., 2014). Las DELLA promueven la supervivencia en condiciones adversas (Achard y col., 2006). Se ha demostrado que la reducción de los niveles de GA y su señalización contribuyen a la restricción del crecimiento de la planta en la exposición a varios estreses, incluidos el frío, la sal y el estrés osmótico (Colebrook y col., 2014). Las formas bioactivas predominantes son GA1 y GA4 (Sponsel y Hedden, 2004), que en presencia de sal disminuyen sus contenidos lo cual aumenta la acumulación de DELLA reprimiendo el crecimiento de las plantas y mejorando la protección contra el estrés salino (Achard y col., 2006). De acuerdo con esto, en nuestro trabajo hemos mostrado que la salinidad provoca una disminución de los niveles de GA4 similar en todos nuestros genotipos. Sin embargo, en ausencia de sal, los mutantes KO1 presentaban niveles inferiores de esta hormona. Analizando la bibliografía para encontrar evidencias de regulación redox o de metabolismo oxidativo sobre GAs, se ha descrito que las proteínas DELLA regulan los niveles de ROS a través de la inducción de la expresión de genes antioxidantes. El aumento de la capacidad de eliminación de ROS mediado por DELLA permite que los niveles de ROS permanezcan bajos después del estrés biótico o abiótico, lo que retrasa la muerte celular y promueve la tolerancia al estrés (Achard y col., 2008); por tanto la señalización de GAs media en la tolerancia al estrés mediante el control del estado redox. Sin embargo la participación de TRXo1 en esta vía hormonal se desconoce. Recientemente se ha descrito la regulación del proceso biosintético de auxinas por una nueva tiorredoxina mitocondrial DCC1 y se ha propuesto que los niveles de ROS mediados por esta TRX regulan la regeneración de tallos al menos en parte, a través de la modulación de la biosíntesis de auxinas y su ruta de señalización (Zhang y col., 2018).

Las giberelinas también juegan un papel disminuyendo los efectos adversos de la salinidad en parte a través de su efecto sobre otras fitohormonas. Existen evidencias emergentes de la interacción de las moléculas DELLA con componentes de la vía de

señalización del ácido jasmónico lo cual sugiere mecanismos adicionales que implican múltiples vías de señalización por GA en la respuesta al estrés (Colebrook y col., 2014). Otro ejemplo más interesante para nosotros es la influencia de otras hormonas sobre la señalización por GAs. En el estrés salino se induce un aumento en los niveles de ABA, lo que resulta en la estabilización de las proteínas DELLA dependiente de ABI1 (Achard y col., 2006). En nuestros mutantes la disminución en GA4 por la falta de *TRXo1* en las plantas KO1 y no por la sobre-expresión, podría estar relacionada con la posible regulación de esta TRX sobre el ABI1 para a través de él, influir en los contenidos de la giberelina, algo que merecería una investigación más en profundidad.

### **3.3. Metabolismo oxidativo y antioxidante**

Analizando el efecto que la falta y sobre-expresión de *AtTRXo1* pudiera tener sobre el posible estrés oxidativo generado en nuestras plantas, el aumento de ROS en condiciones de estrés como el salino ha sido ampliamente descrito. Como consecuencia, se produce un estrés oxidativo que afecta a diferentes componentes celulares como lípidos de membranas, proteínas, ADN... Por otro lado el componente señalizador de estas ROS y productos oxidativos afectados es fundamental a la hora de producir una respuesta de la plantas y su adaptación a las condiciones, jugando un papel esencial el sistema antioxidante y de balance redox que incluye a las TRXs, localizados en los diferentes compartimentos celulares (Lázaro y col., 2013; Sevilla y col., 2015; Calderón y col., 2018). En este trabajo de Tesis doctoral, el nivel de estrés salino aplicado ha producido un descenso de crecimiento, pero al menos en las plantas silvestres no ha provocado aumentos ni en  $H_2O_2$  ni en oxidación proteica medida como carbonil proteínas, y tan sólo se vieron afectados los lípidos al aumentar su índice de peroxidación. Sin embargo, los mutantes en salinidad se diferenciaron de las plantas silvestres en que presentaban mayores contenidos de  $H_2O_2$  y NO y en el caso del OEX también de peroxidación lipídica, implicando que la carencia y/o sobre-expresión sí que produce un desequilibrio en el estado oxidativo de estas plantas en condiciones salinas. En un trabajo anterior que realizamos con estos mismos mutantes KO pero crecidos en

condiciones diferentes de horas e intensidad de luz encontramos algunas diferencias en estos mismos parámetros. Así, las plantas KO1 crecidas en día largo presentaron ausencia de cambios en peroxidación lipídica y mayor oxidación de grupos carbonilos proteicos que las WT (Calderón y col., 2018) mientras que estas mismas plantas crecidas en este trabajo de Tesis en día corto y mayor intensidad lumínica presentaron mayores contenidos en MDA y menor de carbonilación. Por otro lado, también encontramos respuestas similares de comportamiento de estos parámetros en salinidad en los KO crecidos en una y otra condición como mayores contenidos de NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que los WT. La respuesta diferencial se producía en los niveles de peroxidación lipídica y carbonil proteínas ya que las plantas KO de día largo tenían mayores y similares contenidos respectivamente, a lo encontrado en las WT. Todo ello nos indica que las condiciones de crecimiento son fundamentales a la hora de provocar una respuesta a nivel oxidativo afectando a diferentes componentes celulares, y que la falta y/o sobre-expresión de *AtTRXo1* influye en el estado oxidativo final de determinados parámetros que implica a TRXo1 en la adaptación de las plantas a las diferentes condiciones de crecimiento.

Dentro del proceso de señalización por ROS se incluye la influencia sobre el sistema antioxidante compuesto entre otros por SOD, catalasa, POX y componentes del ciclo ascorbato-glutatión (Jiménez y col., 1997; Hernández y col., 2000; Camejo y col., 2013; Foyer y Noctor, 2013). Estos componentes fundamentalmente SOD, catalasa tanto en condiciones control como salinas, y las enzimas del ciclo solo en condicione salinas se encontraron alterados en los mutantes KO crecidos en condiciones de día largo (Calderón y col., 2018). Respecto a los antioxidantes ascorbato y glutatión componentes esenciales que actúan como tampones redox celulares, comentar que tanto en nuestras plantas crecidas en día corto como las que analizamos anteriormente de día largo (Calderón y col., 2018) en condición control la falta de TRX no provocó cambios en los niveles de ASC o las formas reducidas ni oxidadas de glutatión ni su forma conjugada al NO, el nitrosoglutatión. Sin embargo en salinidad, las plantas crecidas en día largo presentaban menores contenidos de ASC, GSH y GSSG y similares de GSNO que las WT mientras que las plantas de día corto analizadas en esta Tesis, presentaron como diferente, mayores niveles de ASC y de GSNO que las silvestres, acompañado por un estado redox de ASC y GSH aumentado. Se ha descrito que un menor contenido de ascorbato en los mutantes de *Arabidopsis vitc* provoca un incremento en la sensibilidad

provocado por el estrés oxidativo asociado a tratamientos salinos principalmente debido a un desequilibrio de la actividad de los componentes del ciclo ASC-GSH y de la actividad del fotosistema II (Huang y col., 2005). Así, en nuestros mutantes, la falta de *AtTRXo1* en este caso produce una alteración de contenido de ASC y estado redox aumentado de este antioxidante junto al de GSH que puede colaborar en la adaptación que presentan estas plantas a la situación de estrés salino. Comentar también que los sobre-expresantes presentaron un comportamiento similar de estos parámetros que indica que podría ser la alteración del estado redox controlado por TRXo1 la que provoca esta respuesta de estos componentes del sistema antioxidante para hacer frente a la situación de estrés.

### **3.4. Vía fotosintética**

Dentro del proceso fotosintético, las clorofilas juegan un papel fundamental y su metabolismo ha sido ampliamente estudiado bajo condiciones de estrés como la salina en las que en plantas sensibles mayoritariamente desciende su contenido mientras que en tolerantes se mantiene o incrementa, por lo que este parámetro se considera un marcador de tolerancia (Hernández y col., 1993; Stepien y Johnson, 2009; Turan y Tripathy, 2015). En relación con TRXs, se ha demostrado que en *Arabidopsis* y guisante, *PsTRXm*, *PsTRXf*, *AtTRXy1*, *AtTRXm2* y con menor eficiencia *AtTRXf1*, *x* and *z*, interaccionan con Mg-quelatasa regulando su actividad de forma positiva y de esta manera indirectamente la acumulación de clorofilas (Luo y col., 2012). Sin embargo, en *Hordeum vulgare* *TRXf* y *m* interaccionan *in vitro* con feoforbide A oxigenasa (PAO) aumentando la ruptura de clorofilas (Bartsch y col., 2008). El contenido en clorofila puede ser estimado usando el índice SPAD, que mide el ratio entre el grosor de la hoja (determinado por la transmisión de la luz en el infrarrojo) y el color verde de la hoja (determinado por la transmisión de luz roja) (Negrão y col., 2017). Este índice se ha descrito que desciende bajo salinidad en distintas especies como el trigo y que los descensos dependen de la variedad sugiriéndose la existencia de un control genético, y también de la intensidad del estrés (Adem y col., 2014). En nuestro trabajo, los mutantes tanto KO como OEX *Attrxo1* tienen aumentados los contenidos de clorofilas en condición

control, por lo que debe existir algún tipo de influencia de la alteración del estado redox por la falta o sobre-expresión que afecta este contenido. Por otro lado, la salinidad no provoca un descenso en los contenidos en clorofilas sino que aumentan, indicando que las plantas en estas condiciones se encuentran adaptadas al nivel salino, y que a pesar de este aumento, las plantas no presentan una mayor tasa fotosintética.

Analizando en detalle el funcionamiento del proceso fotosintético en mutantes KO y OEXA*Attrxo1* observamos que la falta o sobre-expresión de *AtTRXo1*, en ausencia de salinidad, no hay cambios en los parámetros fotosintéticos, excepto una mayor conductancia estomática en el KO1, que no influye en su tasa fotosintética. La conductancia máxima de una especie está relacionada con la densidad estomática y el tamaño de los estomas así como la conductancia hidráulica de la hoja (de Boer y col., 2015). En nuestro caso, la mayor conductancia del KO1 está acompañada de un mayor tamaño de los estomas así como de una mayor apertura que podrían estar influenciando a este parámetro, más que los contenidos en ABA ni en los metabolitos relacionados con  $g_s$  como el malato y algunos azúcares y azúcares alcohol que son similares en todos los genotipos. Destacar los mayores contenidos en maltosa en ambos mutantes, que sin embargo está descrito que se relaciona con la conductancia del mesófilo más que con la estomática (Gago y col., 2016). Cornic y col. (1989) señalaron la importancia de los cambios en la resistencia al paso del  $CO_2$  desde el aire hasta el lugar de carboxilación bajo condiciones de sequía de forma que una difusión en las hojas disminuida no se debe solo al cierre estomático sino a una menor conductancia del mesófilo  $g_m$ , un parámetro que puede cambiar tan rápido como  $g_s$  (Flexas y col., 2008). Existen pocos estudios que examinen la relación entre patrones de metabolitos y la fotosíntesis *in vivo* así como las conductancias. Particularmente la relación con  $g_s$  y  $g_m$  es interesante dado que las conductancias son el determinante fisiológico de difusión que dirige la productividad final de la planta y su relación con el medioambiente (Aranjuelo y col., 2013; Medeiros y col., 2015). Se ha descrito que  $g_s$  se encuentra más relacionada con ciertos azúcares, ácidos orgánicos, myo-inositol y shikimato mientras que  $g_m$  presenta una regulación más compleja (Gago y col., 2016). Otros metabolitos como malato y manosa aparecían relacionados con ambas conductancias sugiriendo una co-regulación entre ambas. En nuestro caso, no hay una correlación clara entre los cambios en

contenido de estos metabolitos y las conductancias observadas, por lo que la regulación parece ser más compleja.

Todos los genotipos presentan una respuesta típica a la condición salina. Las caídas observadas en los parámetros fotosintéticos medidos están de acuerdo con lo descrito en la bibliografía en cuanto a respuesta tanto a estrés salino como a sequía, si bien en algunos de los mutantes ciertos descensos no son significativos (Chaves, 1991; Cornic, 1994; Flexas y col., 1999; 2002). Esta respuesta suele presentarse en caso de un estrés moderado, donde se produce un cierre estomático, descenso de  $g_s$  y en consecuencia de  $A_N$  aunque en menor medida. Ya en estreses más intensos la respuesta suele ser de bajada de  $g_m$  y de todos los parámetros fotosintéticos. Una vez establecidas las relaciones generales entre ellos, es posible evaluar la importancia relativa de cada proceso en la limitación fotosintética a un determinado nivel de estrés representado por un valor de  $g_s$  (Medrano y col., 2002). Realmente la importancia relativa de los efectos estomáticos frente a los no estomáticos ha sido objeto de controversia durante mucho tiempo (Cornic, 1996; Flexas y Medrano, 2002; Flexas y col., 2018). Se ha descrito que generalmente para especies bien adaptadas a sequía, la limitación estomática es clave para explicar las reducciones de la mayoría de los parámetros fotosintéticos (revisado por Chaves, 1991), si bien los cambios pueden ser resultado de una co-regulación de ambos parámetros (Nadal y Flexas, 2018). Generalmente, cuando  $g_s$  desciende mucho, los parámetros fotosintéticos se ven mucho más afectados. Se considera que una  $g_s$  por encima de 0,05-0,1 corresponde a un estrés moderado mientras que valores inferiores se encuentran en estreses más intensos o perdurables (Flexas y col., 2009). En nuestro caso, la bajada de  $g_s$  en salinidad (sobre el 50%) queda en ese umbral, por lo que no se trata de un estrés muy intenso. Así, las bajadas de todos los parámetros entran dentro de los valores descritos en situaciones de estrés similares, como por ejemplo  $A_N$  que no disminuye más de 50%. De cualquier manera, nuestra condición de estrés correspondería según (Flexas y col., 2004) al estado de transición entre las limitaciones puramente difusivas y las de tipo metabólico, lo que explica que el cambio más significativo que hemos encontrado sea en  $g_s$ , mientras que los demás parámetros comienzan a responder en algunos genotipos más que en otros. La máxima velocidad de carboxilación de la RuBisCo ( $V_{C_{max}}$ ) es uno de los parámetros en el que los mutantes se diferencian en comportamiento en la condición salina ya que no disminuye como lo hace

en las plantas WT. De igual forma el  $J_{\max}$  flujo electrónico no desciende en el KO1 y la conductancia del mesófilo no lo hace en el OEX. Parece entonces que la falta de AtTRXo1 provoca un mantenimiento del flujo electrónico mientras que la sobre-expresión activa la conductancia del mesófilo, y ambos presentan un mantenimiento de la vía de carboxilación, por lo que el desequilibrio redox parece estar alterando la respuesta a estos niveles en estos mutantes.

Se ha descrito además la existencia de una gran variabilidad en la coordinación de la conductancia hidráulica foliar y los parámetros de intercambio gaseoso entre especies terrestres así como su respuesta a cambios lumínicos (Xiong y col., 2017). A este respecto y de acuerdo con estas observaciones, en trabajos anteriores describimos que en condiciones de crecimiento de día largo y menos intensidad lumínica, las plantas WT y KO1 presentaban valores más elevados de conductancia estomática tanto en ausencia como presencia de NaCl que las plantas crecidas en día corto (Calderón y col., 2018). Además, el mutante en condición control tenía  $g_s$  similar a las WT mientras que en condiciones más estresantes (según indica el menor  $g_s$  encontrado en las plantas crecidas en día corto y mayor luminosidad) este mismo mutante presenta mayor  $g_s$  que las plantas WT. Esto además se acompañaba por un mayor cierre estomático en las plantas KO1 en día largo mientras que en las de día corto presentan los estomas más abiertos. Por otro lado, el efecto de la salinidad también es diferente en ambas condiciones ya que en día largo los KO1 no cerraban como lo hacía el WT mientras que en día corto los KO1 cierran y el WT no lo hace. Todas estas diferencias por tanto, evidencian por un lado la influencia de las condiciones ambientales en la respuesta de los diferentes genotipos y por otro parecen indicar de nuevo que la falta de AtTRXo1 efectivamente está alterando dicha respuesta, lo que señala su implicación en el proceso de apertura y cierre estomático tanto en condiciones control como salinas.

### **3.5. Cambios metabólicos**

Adicionalmente, dentro de las señales intracelulares que regulan respuesta estomática se encuentran metabolitos sintetizados principalmente en el mesófilo por el

proceso fotosintético que se importan a las células guarda que no son muy activas fotosintéticamente (Reckmann y col., 1990), desde el apoplasto vía la actividad de los transportadores  $H^+/Suc$  (Lu y col., 1997; Daloso y col., 2016). Entre ellos, la sacarosa parece que juega un papel doble: se transporta vía transpiración hacia las células guarda induciendo cierre estomático en periodos donde hay una fotosíntesis elevada, mientras que su catabolismo sostiene la glicolisis, el ciclo de ácidos tricarbóxicos (TCA) y la biosíntesis de glutamina durante la apertura inducida por luz (Lima y col., 2018; Medeiros y col., 2018). En nuestro caso la sacarosa no es limitante en la condición de sal, sino que por contrario, aumenta respecto a la situación control en todos los genotipos, por lo que los mutantes no presentan una alteración en esta vía.

En la válvula de malato, el ácido málico y el ácido oxalacético (OAA) representan un par redox de compuestos regulados por malato deshidrogenasas (MDH). El intercambio de ambos metabolitos por el transporte de membrana controla el equilibrio del poder reductor, transfiriendo el exceso de equivalentes del cloroplasto fotosintetizador a MDH dependiente de NADP regulada por TRX para reducir el OAA al malato, controlando así el estado redox del cloroplasto y jugando un papel importante en la respuesta al estrés salino (Scheibe y col., 2005). Se ha descrito que la actividad tanto cloroplastídica como mitocondrial MDH aumenta en cultivares de arroz resistentes a salinidad mientras que se reduce en sensibles crecidos en condiciones salinas (Kumar y col., 2000). En *A. thaliana*, algunas TRXs pueden activar NADP-MDH *in vitro*, siendo TRXf1 la más eficiente, seguida de TRXs f2, m1, m2, m4, m3 y x (Collin y col., 2003). MDH además es diana de TRXo en la mitocondria (Balmer y col., 2004) y su estado de oligomerización así como su activación por reducción se ha descrito para la MDH citosólica por una TRXh (Hara y col., 2006). El mantenimiento de malato que presentan nuestras plantas en salinidad con excepción del KO1 parece indicar que la falta de esta TRX influye en el contenido de este metabolito posiblemente a través de la regulación de esta enzima, algo que merecería una investigación más en profundidad dada la importancia de este paso del ciclo TCA. Por otro lado la sobre-expresión de *AtTRXo1* permite a las plantas comportarse como las silvestres en esta condición de estrés colaborando en su respuesta a la salinidad.

Comentar la diferencia observada en el patrón de metabolitos en plantas crecidas en nuestro anterior trabajo en placa en presencia de sacarosa en fotoperiodo de día largo y

a menor intensidad lumínica (Sánchez-Guerrero, 2019) con estas plantas crecidas en tierra, en día corto y mayor intensidad de luz. Comparando a groso modo ambos perfiles y heatmap (Figuras 39 y 62), sigue siendo en la condición control donde más diferencias significativas existen entre mutantes y WT. Las plantas de día corto presentan más metabolitos alterados que las de día largo, por lo que estas condiciones de por sí, ya están permitiendo que la falta o sobre-expresión de *AtTRXo1* afecte este patrón. También en salinidad hay más metabolitos alterados en los mutantes crecidos en día corto que en las plantas de día largo, si bien lo más llamativo es la diferencia de comportamiento de la mayoría de ellos tanto en condición control como salina. En general, los cambios en aminoácidos exceptuando glicina y asparragina, aumentan con la sal mucho más en las plantas de día corto; los ácidos orgánicos en general son menores que en la condición control, en ambas situaciones mientras que los azúcares son contrarios, presentando una tendencia a la acumulación las plantas de día corto y alta luminosidad.

Ya centrándonos en los cambios significativos encontrados, en la condición control los mutantes presentan descensos en aminoácidos y aumentos en azúcares que podrían implicar la alteración de las rutas de síntesis y utilización o degradación de estos compuestos por la falta y/o sobre-expresión de esta TRXo1. Concretamente cambios en niveles de Ala, Asp y Ser podrían ser el resultado de una alteración en la regulación por TRX de aminotransferasas y enzimas de la fotorrespiración (Daloso y col., 2015) descritas algunas como dianas de TRXo1 (Martí y col., 2009) mientras que el aumento en fumarato indicaría una posible alteración del TCA tal y como se ha observado en estos mutantes crecidos en tierra en día corto (Daloso y col., 2015). De hecho se ha descrito una relación de Ala y fotorrespiración con el ciclo TCA (Obata y col., 2011). En la condición salina sin embargo, los mutantes presentan cambios significativos respecto a las plantas WT solo en algunos azúcares.

Se ha descrito la implicación de esta TRXo1 en la respuesta de plantas a estrés hídrico sobre todo en una fase de recuperación del mismo (Da Fonseca-Pereira y col., 2019). Así, el mutante KO1 presenta una mayor eficiencia fotosintética y menor sensibilidad cuando se somete a ciclos de sequía, recuperándose antes acumulando metabolitos secundarios y presentando una mayor  $g_s$ . Estas plantas además presentaban incrementos en

metabolitos secundarios derivados de fenilalanina, tirosina y triptófano. De forma similar nuestros mutantes tanto KO1 como OEX presentan alteración en los dos primeros aminoácidos, por lo que refuerza la idea de una regulación redox sobre metabolitos derivados (Daloso y col., 2015). De hecho se ha descrito una respuesta coordinada de genes de biosíntesis y acúmulo de flavonoides en mutantes *ntra ntrb* (Bashandy y col., 2009). Otro metabolito interesante es el GABA asociado con situaciones de respuesta a estrés energético, siendo un aminoácido no proteico que se acumula en respuestas a estrés (Scholz y col., 2017) y que actúa en sistemas animales como un neurotransmisor (Michaeli y Fromm, 2015). La vía en la que está implicado el GABA proporciona NADH y/o succinato al ciclo TCA: una vez sintetizado se transporta a la mitocondria donde se cataboliza a succínico semialdehído que puede ser oxidado para producir succínico (Carillo, 2018). Este metabolito se acumula en sequía y en mayor medida en el mutante KO1 *Attrxo1* en comparación con plantas WT (Da Fonseca-Pereira y col., 2019). En nuestras condiciones, los mutantes tanto KO1 como OEX presentan un contenido mucho mayor de GABA que las plantas WT en la condición control, mientras que la salinidad no altera los valores en el WT, los mutantes disminuyen este contenido, lo que podría apuntar a una regulación redox en el metabolismo de GABA. Además se ha descrito que el funcionamiento correcto de la vía GABA parece ser necesario para restringir la generación de ROS en situaciones de estrés (Renault y col., 2010). Se ha descrito en sistemas animales una regulación redox de receptores de GABA (Calvo y González, 2016) mientras que en plantas este tema es algo mucho menos estudiado aunque sí hay algunas evidencias de que el estado redox celular regula enzimas relacionadas con el metabolismo de GABA en semillas de soja y a la succínico semialdehído deshidrogenasa (SSD) de *Arabidopsis* (Shelp y col., 1995; Busch y Fromm, 1999).

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos del comportamiento tanto de mutantes KO como OEX *Attrxo1* parece existir una reprogramación metabólica compleja relacionada con regulación redox, respondiendo a las condiciones ambientales de crecimiento de la planta, tanto en una situación en ausencia como en presencia de NaCl. Este ajuste permite mantener el balance energético necesario para el crecimiento de la planta cuando falta o está sobre-expresada *AtTRXo1*. Estos resultados apuntan a una ampliación del papel de esta TRXo1 a través de la regulación redox de sus diferentes

proteínas diana implicadas en numerosos procesos de respuesta, que abre la investigación sobre su implicación en nuevas rutas. Además, refuerza las evidencias existentes sobre posibles regulaciones redox en rutas en las que es necesario confirmar o aclarar la identidad del reductor fisiológico. De cualquier manera, la tiorredoxina  $\alpha 1$  mitocondrial y nuclear contribuye a la respuesta metabólica que presentan las plantas de *Arabidopsis* en salinidad, que afecta al metabolismo tanto primario como posiblemente al secundario y que resulta en alteraciones redox de forma similar a lo descrito en respuesta a sequía. Llegar a conocer la interacción de las diferentes TRXs con sus proteínas diana regulando su actividad, dada la multitud de procesos en lo que parece estar implicada junto a su influencia en la comunicación interorganular, nos ayudará a comprender el alcance que la regulación redox pueda tener tanto en el crecimiento como en la adaptación de plantas al estrés y nos permitirá poder enfrentar los problemas que afectan la productividad vegetal en un medioambiente cada vez más cambiante al que nos enfrentamos. En este contexto el uso de mutantes en estas y otras proteínas de los sistemas antioxidantes y redox, ayudará a comprender el papel y los procesos de redundancia y complejidad de sus componentes.

## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES PRINCIPALES

a) En condiciones no salinas, la mayor respiración por la vía citocrómica en los mutantes KO *Attrxo1* era paralela a descensos en glucosa y fructosa, a una mayor actividad GR constitutiva mantenida en salinidad, y a cambios en el patrón de proteína AOX activa, que podrían ser debidos a una regulación diferencial de su expresión génica. En estas condiciones de estrés, la mayor partición electrónica por la vía alternativa en los mutantes KO2 coincidía con aumentos en la cantidad de proteína AOX, sugiriendo que su actividad *in vivo* debe estar operando a su máxima capacidad y depende del nivel total de AOX. Estos resultados implican la participación de TRXo1 en el metabolismo antioxidante y respiratorio a través de sus dianas específicas.

b) Mediante cromatografía de afinidad empleando PsTRXo1 de guisante mutada y núcleos aislados de hojas de guisante, se identificó a la proteína PYR1 (Pyrabactin Resistance 1) un receptor de la hormona ABA, como posible diana de PsTRXo1. La interacción entre ambas proteínas se ha corroborado mediante diversos ensayos *in silico* e *in vivo* que demuestran por primera vez, que ambas proteínas interactúan en el núcleo, tanto en plantas de guisante como en las de Arabidopsis. Los estudios de actividad oxido-reductasa de TRXo1 sobre su diana PYR1 previamente oxidada y nitrosilada, mostraron su capacidad para reducirla y de este modo activarla. Este efecto no fue tan patente sobre PYR1 previamente nitrosilado. Todo ello indica la existencia de una regulación redox de TRXo1 sobre PYR1 *in vitro*, por reducción de sus residuos de cisteína, hasta ahora no descrita.

c) Se ha obtenido una línea de sobre-expresión de *AtTRXo1*. Las diferencias encontradas en algunos parámetros de crecimiento y desarrollo en esta línea y en los mutantes KO en comparación con el genotipo silvestre, sugiere la implicación de TRXo1 en estos procesos. Los ensayos de respuesta a ABA durante el proceso de germinación de mutantes KO *Attrxo1* y OEX *Attrxo1*, han mostrado una cierta insensibilidad a la hormona, más patente en las plantas deficientes en TRXo1. Esta respuesta es similar a la presentada por mutantes carentes de los receptores PYR/PYL y señalan a la TRXo1 como

componente de la señalización por ABA en el proceso de germinación, a través de la regulación redox de PYR1 y posiblemente de alguna de las fosfatasa implicadas como HAB1.

d) En ambos mutantes de *Attrxo1* (KO y OEX) la dinámica estomática en respuesta a iluminación estaba alterada, con un menor índice de apertura en el genotipo KO y a la inversa en el OEX. Los ensayos de respuesta a ABA mostraron una insensibilidad a la hormona en la respuesta estomática patente en los mutantes KO, similar a lo observado en el proceso de germinación. Todo ello sostiene un papel para *TRXo1* en el desarrollo y dinámica de los estomas.

e) Los cambios estomáticos descritos no parecen tener un efecto significativo en los parámetros fotosintéticos analizados, aunque la falta o sobre-expresión de *TRXo1* influenciaba la respuesta a la salinidad. Los mutantes KO *Attrxo1* mantenían el flujo electrónico fotosintético mientras que los OEX *Attrxo1* activaban la conductancia del mesófilo, si bien ambos mutantes presentaban una actividad de carboxilación de RuBisCo mantenida. Todo ello indica la implicación de la regulación redox en la respuesta diferencial de los mutantes en las condiciones de salinidad.

# **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- Achard, P., & Genschik, P. (2009). Releasing the brakes of plant growth: How GAs shutdown della proteins. *Journal of Experimental Botany*, *60*(4), 1085–1092. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern301>
- Achard, P., Hui, C., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., ... Harberd, N. P. (2006). Integration of Plant Responses to Environmentally Activate Phytohormonal Signals. *Science*, *311*, 91–94. <https://doi.org/10.1038/098448b0>
- Achard, P., Renou, J. P., Berthomé, R., Harberd, N. P., & Genschik, P. (2008). Plant DELLAs Restrain Growth and Promote Survival of Adversity by Reducing the Levels of Reactive Oxygen Species. *Current Biology*, *18*(9), 656–660. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.034>
- Acosta-Motos, J. R., Diaz-Vivancos, P., Álvarez, S., Fernández-García, N., Sanchez-Blanco, M. J., & Hernández, J. A. (2015). Physiological and biochemical mechanisms of the ornamental *Eugenia myrtifolia* L. plants for coping with NaCl stress and recovery. *Planta*, *242*(4), 829–846. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2315-3>
- Adem, G. D., Roy, S. J., Zhou, M., Bowman, J. P., & Shabala, S. (2014). Evaluating contribution of ionic, osmotic and oxidative stress components towards salinity tolerance in barley. *BMC Plant Biology*, *14*(113). <https://doi.org/10.1353/pbm.1993.0016>
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, *105*, 121–126. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727660>
- Akter, S., Huang, J., Waszczak, C., Jacques, S., Gevaert, K., Van Breusegem, F., & Messens, J. (2015). Cysteines under ROS attack in plants: A proteomics view. *Journal of Experimental Botany*, *66*(10), 2935–2944. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv044>
- Almansa, M. S., Palma, J. M., Yarez, J., Rio, L. A. D. E. L., & Sevilla, F. (1991). *PURIFICATION OF AN IRON-CONTAINING SUPEROXIDE DISMUTASE FROM A CITRUS PLANT, CITRUS LIMONUM R.*

- Amoroso, A., Concia, L., Maggio, C., Raynaud, C., Bergounioux, C., Crespan, E., ... Maga, G. (2011). Oxidative DNA damage bypass in *Arabidopsis thaliana* requires DNA polymerase  $\lambda$  and proliferating cell nuclear antigen 2. *The Plant Cell*, *23*(2), 806–822. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081455>
- Aono, M., Kubo, A., Saji, H., Tanaka, K., & Kondo, N. (1993). Enhanced tolerance to photooxidative stress of transgenic *Nicotiana glauca* with high chloroplastic glutathione reductase activity. *Plant and Cell Physiology*, *34*(1), 129–135. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078386>
- Aranjuelo, I., Tcherkez, G., Molero, G., Gilard, F., Avice, J. C., & Nogués, S. (2013). Concerted changes in N and C primary metabolism in alfalfa (*Medicago sativa*) under water restriction. *Journal of Experimental Botany*, *64*(4), 885–897. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers367>
- Asada, K. (2006). Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology*, *141*(2), 391–396. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082040>
- Asai, S., Ohta, K., & Yoshioka, H. (2008). MAPK Signaling Regulates Nitric Oxide and NADPH Oxidase-Dependent Oxidative Bursts in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell Online*, *20*(5), 1390–1406. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055855>
- Ashley, R. H. (2003). Challenging accepted ion channel biology: p64 and the CLIC family of putative intracellular anion channel proteins (Review). *Molecular Membrane Biology*, *20*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1080/09687680210042746>
- Astier, J., Rasul, S., Koen, E., Manzoor, H., Besson-Bard, A., Lamotte, O., ... Wendehenne, D. (2011). S-nitrosylation: An emerging post-translational protein modification in plants. *Plant Science*, *181*(5), 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.02.011>
- Bachhawat, A. K., Thakur, A., Kaur, J., & Zulkifli, M. (2013). Glutathione transporters. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1830*(5), 3154–3164. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.018>

- Balmer, Y., Vensel, W. H., Tanaka, C. K., Hurkman, W. J., Gelhaye, E., Rouhier, N., ... Buchanan, B. B. (2004). Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(8), 2642–2647. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308583101>
- Balsera, M., Uberegui, E., Schürmann, P., & Buchanan, B. B. (2014). Evolutionary Development of Redox Regulation in Chloroplasts. *Antioxidants & Redox Signaling*, *21*(9), 1327–1355. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5817>
- Barkley, B., & Gregory, E. M. (1990). *Tetrameric Manganese Superoxide Dismutases from Anaerobic Actinomyces*. *280*(1), 192–200.
- Barranco-Medina, S., Kakorin, S., Lázaro, J. J., & Dietz, K.-J. (2008). Thermodynamics of the Dimer-Decamer Transition of Reduced Human and Plant. *Biochemistry*, *47*(27), 7196–7204.
- Barranco-Medina, S., Krell, T., Bernier-Villamor, L., Sevilla, F., Lázaro, J. J., & Dietz, K. J. (2008). Hexameric oligomerization of mitochondrial peroxiredoxin PrxIIIF and formation of an ultrahigh affinity complex with its electron donor thioredoxin Trx-o. *Journal of Experimental Botany*, *59*(12), 3259–3269. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern177>
- Barranco-Medina, S., Krell, T., Finkemeier, I., Sevilla, F., Lázaro, J. J., & Dietz, K. J. (2007). Biochemical and molecular characterization of the mitochondrial peroxiredoxin PsPrxII F from *Pisum sativum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *45*(10–11), 729–739. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.07.017>
- Barranco-Medina, S., Lázaro, J. J., & Dietz, K. J. (2009). The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function. *FEBS Letters*, *583*(12), 1809–1816. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.05.029>
- Bartels, D., & Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *24*(1), 23–58. <https://doi.org/10.1080/07352680590910410>
- Bartoli, C. G., Casalongué, C. A., Simontacchi, M., Marquez-Garcia, B., & Foyer, C. H. (2013). Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control

- of growth and cross tolerance to stress. *Environmental and Experimental Botany*, 94(January), 73–88. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.05.003>
- Bartoli, C. G., Guiamet, J. J., Kiddle, G. U. Y., Pastori, G. M., Cagno, R. D. I., Theodoulou, F. L., & Foyer, C. H. (2005). Ascorbate content of wheat leaves is not determined by maximal LGALDH activity under drought stress. *Plant, Cell and Environment*, 28, 1073–1081.
- Bartsch, S., Monnet, J., Selbach, K., Quigley, F., Gray, J., von Wettstein, D., ... Reinbothe, C. (2008). Three thioredoxin targets in the inner envelope membrane of chloroplasts function in protein import and chlorophyll metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(12), 4933–4938. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800378105>
- Bashandy, T., Guillemot, J., Vernoux, T., Caparros-rui, D., Ljung, K., Meyer, Y., & Reichheld, J.-P. J. (2010). Interplay between the NADP-Linked Thioredoxin and Glutathione Systems in Arabidopsis Auxin Signaling. *The Plant Cell*, 22(2), 376–391. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.071225>
- Bashandy, T., Taconnat, L., Renou, J. P., Meyer, Y., & Reichheld, J. P. (2009). Accumulation of flavonoids in an ntra ntrb mutant leads to tolerance to UV-C. *Molecular Plant*, 2(2), 249–258. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn065>
- Bass, H. W., Hoffman, G. G., Lee, T. J., Wear, E. E., Joseph, S. R., Allen, G. C., ... Thompson, W. F. (2015). Defining multiple, distinct, and shared spatiotemporal patterns of DNA replication and endoreduplication from 3D image analysis of developing maize (*Zea mays* L.) root tip nuclei. *Plant Molecular Biology*, 89(4–5), 339–351. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0364-4>
- Becana, M., Paris, F. J., Sandalio, L. M., & Rio, L. A. Del. (1989). Isoenzymes of Superoxide Dismutase in Nodules of *Phaseolus vulgaris* L., *Pisum sativum* L., and *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Plant Physiol*, 90, 1286–1292.
- Bedhomme, M., Adamo, M., Marchand, C. H., Couturier, J., Rouhier, N., Lemaire, S. D., ... Trost, P. (2012). Glutathionylation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate

- dehydrogenase from the model plant *Arabidopsis thaliana* is reversed by both glutaredoxins and thioredoxins in vitro . *Biochemical Journal*, 445(3), 337–347. <https://doi.org/10.1042/bj20120505>
- Bergmeyer, H. U. (1965). *Grundlagen und Fortschritte der enzymatischen Analyse*. 191(1964).
- Bernacchi, C. J., Singsaas, E. L., Pimentel, C., Long, S. P., & Portis Jr, A. R. (2001). Improved temperature response functions for models of Rubisco-limited photosynthesis. *Plant, Cell and Environment*, 24(2), 253–259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2001.00668.x>
- Bernier-Villamor, L., Navarro, E., Sevilla, F., & Lázaro, J. J. (2004). Cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from *Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany*, 55(406), 2191–2199. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh238>
- Bhattacharyya, S., Habibi-Nazhad, B., Amegbey, G., Slupsky, C. M., Yee, A., Arrowsmith, C., & Wishart, D. S. (2002). Identification of a novel archaeobacterial thioredoxin: Determination of function through structure. *Biochemistry*, 41(15), 4760–4770. <https://doi.org/10.1021/bi0115176>
- Bheri, M., & Pandey, G. K. (2019). Protein phosphatases meet reactive oxygen species in plant signaling networks. *Environmental and Experimental Botany*, 161(August 2018), 26–40. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.032>
- Biehler, K., & Fock, H. (1996). Evidence for the Contribution of the Mehler-Peroxidase Reaction in Dissipating Excess Electrons in Drought-Stressed Wheat. *Plant Physiol*, 112(72), 265–272.
- Bienert, G. P., & Chaumont, F. (2014). Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(5), 1596–1604. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.017>
- Bienert, G. P., Heinen, R. B., Berny, M. C., & Chaumont, F. (2014). Maize plasma membrane aquaporin ZmPIP2;5, but not ZmPIP1;2, facilitates transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*,

- 1838(1 PARTB), 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.08.011>
- Bose, J., Rodrigo-Moreno, A., Lai, D., Xie, Y., Shen, W., & Shabala, S. (2015). Rapid regulation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity is essential to salinity tolerance in two halophyte species, *Atriplex lentiformis* and *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany*, *115*(3), 481–494. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu219>
- Bourdais, G., Burdiak, P., Gauthier, A., Nitsch, L., Salojärvi, J., Rayapuram, C., ... Kangasjärvi, J. (2015). Large-Scale Phenomics Identifies Primary and Fine-Tuning Roles for CRKs in Responses Related to Oxidative Stress. *PLoS Genetics*, *11*(7), 1–36. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005373>
- Boursiac, Y., Léran, S., Corratgé-Faillie, C., Gojon, A., Krouk, G., & Lacombe, B. (2013). ABA transport and transporters. *Trends in Plant Science*, *18*(6), 325–333. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.01.007>
- Bouvier, F., d'Harlingue, A., Hugueney, P., Marin, E., Marion-Poll, A., & Camara, B. (1996). Xanthophyll Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(46), 28861–28867. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.46.28861>
- Bradford, M. M. (1976). Sistema séptico domiciliario | Rotomoldeo en Colombia Tanques Plasticos En Colombia Rotoplast. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brandes, N., Reichmann, D., Tienson, H., Leichert, L. I., & Jakob, U. (2011). Using quantitative redox proteomics to dissect the yeast redoxome. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(48), 41893–41903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.296236>
- Buchanan, B. B., & Balmer, Y. (2005). REDOX REGULATION: A Broadening Horizon. *Annual Review of Plant Biology*, *56*(1), 187–220. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144246>
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). [30] Microsomal lipid peroxidation. In S. F. and L. Packer (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 52, pp. 302–310). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)

- Bueno, P., Varela, J., Giménez-Gallego, G., & del Rio, L. A. (1995). Peroxisomal Copper , Zinc Superoxide Dismutase. Characterization of the Isoenzyme from Watermelon Cotyledons. *Plant Physiol*, *108*, 1151–1160.
- Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., ... Venter, J. C. (1996). Complete Genome Sequence of the Methanogenic Archaeon , Methanococcus jannaschii. *Science*, *273*(5278), 1058–1073.
- Busch, K. B., & Fromm, H. (1999). Plant Succinic Semialdehyde Dehydrogenase. Cloning, Purification, Localization in Mitochondria, and Regulation by Adenine Nucleotides. *Plant Physiology*, *121*(2), 589–598. <https://doi.org/10.1104/pp.121.2.589>
- Calderón, A., Lázaro-Payo, A., Iglesias-Baena, I., Camejo, D., Lázaro, J. J., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2017). Glutathionylation of Pea Chloroplast 2-Cys Prx and Mitochondrial Prx IIF Affects Their Structure and Peroxidase Activity and Sulfiredoxin Deglutathionylates Only the 2-Cys Prx. *Frontiers in Plant Science*, *08*(January), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00118>
- Calderón, A., Ortiz-Espín, A., Iglesias-Fernández, R., Carbonero, P., Pallardó, F. V., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2017). Thioredoxin (Trxo1) interacts with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and its overexpression affects the growth of tobacco cell culture. *Redox Biology*, *11*(November 2016), 688–700. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.018>
- Calderón, A., Sánchez-Guerrero, A., Ortiz-Espín, A., Martínez-Alcalá, I., Camejo, D., Jiménez, A., & Sevilla, F. (2018). Lack of mitochondrial thioredoxin o 1 is compensated by antioxidant components under salinity in *Arabidopsis thaliana* plants. *Physiologia Plantarum*, *164*(3), 251–267. <https://doi.org/10.1111/ppl.12708>
- Calderón, A., Sánchez-guerrero, A., Ortiz-espín, A., Martínez-alcalá, I., Jiménez, A., & Sevilla, F. (2018). Lack of mitochondrial Trx o 1 is compensated by antioxidant components under salinity in *Arabidopsis thaliana* plants. *Physiologia Plantarum*.
- Calderón, A., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2018). Redox Protein Thioredoxins: Function Under Salinity, Drought and Extreme Temperature Conditions. In *Antioxidants and*

- Antioxidant Enzymes in Higher Plants* (pp. v–ix). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-75088-0>
- Calero-Muñoz, N., Exposito-Rodríguez, M., Collado-Arenal, A. M., Rodríguez-Serrano M., M., Laureano-Marín, A. M., Santamaría, M. E., ... Sandalio, L. M. (2019). Cadmium induces ROS-dependent pexophagy in Arabidopsis leaves. *Plant, Cell & Environment*, pce.13597. <https://doi.org/10.1111/pce.13597>
- Calvo, D. J., & Gonzalez, A. N. B. (2016). Dynamic Regulation of the GABAA Receptor Function by Redox Mechanisms. *Molecular Pharmacology*, 90(3), 326–333. <https://doi.org/10.1124/mol.116.105205>
- Camejo, D., Martí, M. C., Jiménez, A., Cabrera, J. C., Olmos, E., & Sevilla, F. (2011). Effect of oligogalacturonides on root length, extracellular alkalinization and O<sub>2</sub>-accumulation in alfalfa. *Journal of Plant Physiology*, 168(6), 566–575. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.09.012>
- Camejo, D., Martí, M. C., Román, P., Ortiz, A., & Jiménez, A. (2010). Antioxidant system and protein pattern in peach fruits at two maturation stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(20), 11140–11147. <https://doi.org/10.1021/jf102807t>
- Camejo, D., Ortiz-Espín, A., Lázaro, J. J., Romero-Puertas, M. C., Lázaro-Payo, A., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2015). Functional and structural changes in plant mitochondrial PrxII F caused by NO. *Journal of Proteomics*, 119, 112–125. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.01.022>
- Camejo, D., Romero-Puertas, M. del C., Rodríguez-Serrano, M., Sandalio, L. M., Lázaro, J. J., Jiménez, A., & Sevilla, F. (2013). Salinity-induced changes in S-nitrosylation of pea mitochondrial proteins. *Journal of Proteomics*, 79, 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.12.003>
- Caplan, J. L., Kumar, A. S., Park, E., Padmanabhan, M. S., Hoban, K., Modla, S., ... Dinesh-Kumar, S. P. (2015). Chloroplast stromules function during innate immunity Jeffrey. *Development Cell*, 34(1), 45–57. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3663-1>

1.Progestin

- Carillo, P. (2018). GABA Shunt in Durum Wheat. *Frontiers in Plant Science*, 9(February), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00100>
- Casson, S., & Gray, J. E. (2008). Influence of environmental factors on stomatal development. *New Phytologist*, 178(1), 9–23. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02351.x>
- Castillo, M.-C., Lozano-Juste, J., González-Guzmán, M., Rodríguez, L., Rodríguez, P. L., & León, J. (2015). Inactivation of PYR/PYL/RCAR ABA receptors by tyrosine nitration may enable rapid inhibition of ABA signaling by nitric oxide in plants. *Science Signaling*, 8(392), ra89. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa7981>
- Caverzan, A., Passaia, G., Barcellos Rosa, S., Werner Riberiro, C., Lazzarotto, F., & Margis-Pinheiro, M. (2012). Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4), 1011–1019. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600016>
- Cejudo, F. J., Meyer, A. J., Reichheld, J.-P., Rouhier, N., & Traverso, J. A. (2014). Thiol-based redox homeostasis and signaling. *Frontiers in Plant Science*, 5(June), 2013–2015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00266>
- Cejudo, F. J., Ojeda, V., Delgado-Requerey, V., González, M., & Pérez-Ruiz, J. M. (2019). Chloroplast Redox Regulatory Mechanisms in Plant Adaptation to Light and Darkness. *Frontiers in Plant Science*, 10(April), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00380>
- Chan, Z. (2012). Expression profiling of ABA pathway transcripts indicates crosstalk between abiotic and biotic stress responses in Arabidopsis. *Genomics*, 100(2), 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2012.06.004>
- Chardonnet, S., Sakr, S., Cassier-Chauvat, C., Le Maréchal, P., Chauvat, F., Lemaire, S. D., & Decottignies, P. (2015). First proteomic study of S-glutathionylation in cyanobacteria. *Journal of Proteome Research*, 14(1), 59–71. <https://doi.org/10.1021/pr500625a>
- Chater, C., Peng, K., Movahedi, M., Dunn, J. A., Walker, H. J., Liang, Y. K., ... Hetherington,

- A. M. (2015). Elevated CO<sub>2</sub>-Induced Responses in Stomata Require ABA and ABA Signaling. *Current Biology*, 25(20), 2709–2716.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.013>
- Chaves, M. M. (1991). Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*, 42(1), 1–16.
- Chaves, M. M., Flexas, J., & Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103(4), 551–560. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>
- Cheeseman, J. M. (2006). Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. *Journal of Experimental Botany*, 57(10), 2435–2444.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erl004>
- Cheng, W.-H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H.-C., Arroyo, A., ... Sheen, J. (2002). A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *The Plant Cell*, 14(11), 2723–2743.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.006494.2>
- Chew, O., Whelan, J., & Millar, A. H. (2003). Molecular Definition of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Arabidopsis Mitochondria Reveals Dual Targeting of Antioxidant Defenses in Plants. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46869–46877. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307525200>
- Chiu, J., & Dawes, I. W. (2012). Redox control of cell proliferation. *Trends in Cell Biology*, 22(11), 592–601. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.08.002>
- Choi H J, Kang S W, Yang C H, Rhee S G, & Ryu S E. (1998). Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nature Structural Biology*, 5(5), 400–406.
- Clifton, R., Lister, R., Parker, K. L., Sappl, P. G., Elhafez, D., Millar, A. H., ... Whelan, J. (2005). Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology*, 58(2), 193–212.  
<https://doi.org/10.1007/s11103-005-5514-7>

- Colebrook, E. H., Thomas, S. G., Phillips, A. L., & Hedden, P. (2014). The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *Journal of Experimental Biology*, *217*(1), 67–75. <https://doi.org/10.1242/jeb.089938>
- Collin, V., Issakidis-Bourguet, E., Marchand, C., Hirasawa, M., Lancelin, J. M., Knaff, D. B., & Miginiac-Maslow, M. (2003). The Arabidopsis plastidial thioredoxins. New functions and new insights into specificity. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(26), 23747–23752. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302077200>
- Comtois, S. L., Gidley, M. D., & Kelly, D. J. (2003). Role of the thioredoxin system and the thiol-peroxidases Tpx and Bcp in mediating resistance to oxidative and nitrosative stress in *Helicobacter pylori*. *Microbiology*, *149*(1), 121–129. <https://doi.org/10.1099/mic.0.25896-0>
- Considine, M. J., Sandalio, L. M., & Foyer, C. H. (2015). Unravelling how plants benefit from ROS and NO reactions, while resisting oxidative stress. *Annals of Botany*, *116*(4), 469–473. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv153>
- Córdoba-Pedregosa, M. D. C., Córdoba, F., Manuel Villalba, J., & González-Reyes, J. A. (2003). Differential distribution of ascorbic acid, peroxidase activity, and hydrogen peroxide along the root axis in *Allium cepa* L. and its possible relationship with cell growth and differentiation. *Protoplasma*, *221*(1–2), 57–65. <https://doi.org/10.1007/s00709-002-0069-9>
- Cornic, G. (1994). Drought stress and high light effects on leaf photosynthesis. In *Photoinhibition of Photosynthesis: from Molecular Mechanisms to the Field* (pp. 297–313).
- Cornic, G., Gouallec, J.-L. Le, Briantais, J. M., & Hodges, M. (1989). Effect of dehydration and high light on photosynthesis of two C3 plants (*Phaseolus vulgaris* L. and *Elatostema repens* (Lour.) Hall f.). *Planta*, *177*, 84–85.
- Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2013). Nitro-oxidative stress vs oxidative or nitrosative stress in higher plants. *New Phytologist*, *199*(3), 633–635. <https://doi.org/10.1111/nph.12380>

- Coupe, S. A., Palmer, B. G., Lake, J. A., Overy, S. A., Oxborough, K., Woodward, F. I., ... Quick, W. P. (2006). Systemic signalling of environmental cues in Arabidopsis leaves. *Journal of Experimental Botany*, *57*(2 SPEC. ISS.), 329–341.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erj033>
- Courteille, A., Vesa, S., Sanz-Barrio, R., Cazale, A.-C., Becuwe-Linka, N., Farran, I., ... Rumeau, D. (2013). Thioredoxin m4 Controls Photosynthetic Alternative Electron Pathways in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *161*(1), 508–520.  
<https://doi.org/10.1104/pp.112.207019>
- Couturier, J., Chibani, K., Jacquot, J.-P., & Rouhier, N. (2013). Cysteine-based redox regulation and signaling in plants. *Frontiers in Plant Science*, *4*(April), 1–7.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00105>
- Couturier, J., Koh, C. S., Zaffagnini, M., Winger, A. M., Gualberto, J. M., Corbier, C., ... Rouhier, N. (2009). Structure-function relationship of the chloroplastic glutaredoxin S12 with an atypical WCSYS active site. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(14), 9299–9310. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807998200>
- Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., & Abrams, S. R. (2010). Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 61).  
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112122>
- Cvetkovska, M., & Vanlerberghe, G. C. (2013). Alternative oxidase impacts the plant response to biotic stress by influencing the mitochondrial generation of reactive oxygen species. *Plant, Cell and Environment*, *36*(3), 721–732.  
<https://doi.org/10.1111/pce.12009>
- D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(10), 813–824. <https://doi.org/10.1038/nrm2256>
- Da Fonseca-Pereira, P., Daloso, D. M., Gago, J., De Oliveira Silva, F. M., Condori-Apfata, J. A., Florez-Sarasa, I., ... Arajo, W. L. (2019). The Mitochondrial Thioredoxin System Contributes to the Metabolic Responses under Drought Episodes in Arabidopsis.

- Plant and Cell Physiology*, 60(1), 213–229. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy194>
- Daidoji, H., Takasaki, Y., & Nakane, P. K. (1992). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) in plant proliferating cells: Immunohistochemical and quantitative analysis using autoantibody and murine monoclonal antibodies to PCNA. *Cell Biochemistry and Function*, 10(2), 123–132. <https://doi.org/10.1002/cbf.290100209>
- Daloso, D. M., dos Anjos, L., & Fernie, A. R. (2016). Roles of sucrose in guard cell regulation. *New Phytologist*, 211(3), 809–818. <https://doi.org/10.1111/nph.13950>
- Daloso, D. M., Müller, K., Obata, T., Florian, A., Tohge, T., Bottcher, A., ... Fernie, A. R. (2015). Thioredoxin, a master regulator of the tricarboxylic acid cycle in plant mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(11), E1392–E1400. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424840112>
- Dalton, D. A., Baird, L. M., Langeberg, L., Taugher, C. Y., Anyan, W. R., Vance, C. P., & Sarath, G. (1993). Subcellular Localization of Oxygen Defense Enzymes in Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) Root Nodules. *Plant Physiology*, 102(2), 481–489. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12231836><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC158802>
- de Boer, H. J., Price, C. A., Wagner-Cremer, F., Dekker, S. C., Franks, P. J., & Veneklaas, E. J. (2016). Optimal allocation of leaf epidermal area for gas exchange. *New Phytologist*, 210(4), 1219–1228. <https://doi.org/10.1111/nph.13929>
- De Gara, L., Locato, V., Dipierro, S., & de Pinto, M. C. (2010). Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 173(SUPPL.), S13–S19. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.02.007>
- De Leonardis, S., Dipierro, N., & Dipierro, S. (2000). Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(10), 773–779. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)01188-8](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)01188-8)
- Deinlein, U., Stephan, A. B., Horie, T., Luo, W., Xu, G., & Schroeder, J. I. (2014). Plant salt-

- tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science*, 19(6), 371–379.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.02.001>
- Del-Saz, N. F., Florez-sarasa, I., Clemente-moreno, M. J., Mhadhbi, H., Flexas, J., Fernie, A. R., & Ribas-Carbó, M. (2016). Salinity tolerance is related to cyanide-resistant alternative respiration in *Medicago truncatula* under sudden severe stress. *Plant Cell and Environment*, 39(11), 2361–2369. <https://doi.org/10.1111/pce.12776>
- Del-Saz, N. F., & Ribas-Carbo, M. (2018). Ecophysiology of plant respiration. In *Annual Plant Reviews* (Vol. 50, pp. 269–292). <https://doi.org/10.1002/9781118906583.ch9>
- Del-Saz, N. F., Ribas-Carbo, M., McDonald, A. E., Lambers, H., Fernie, A. R., & Florez-Sarasa, I. (2017). An In Vivo Perspective of the Role(s) of the Alternative Oxidase Pathway. *Trends in Plant Science*, 23(3), 206–219.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.11.006>
- del Rio, L. A. (2006). Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. *Plant Physiology*, 141(2), 330–335. <https://doi.org/10.1104/pp.106.078204>
- Del Río, L. A. (2015). ROS and RNS in plant physiology: An overview. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2827–2837. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv099>
- del Río, L. A., & López-Huertas, E. (2016). ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Plant and Cell Physiology*, 57(7), 1364–1376.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcw076>
- del Río, L. A., Palma, J. M., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Pastori, G. M., Bueno, P., & López-Huertas, E. (1996). Peroxisomes as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants. *Biochemical Society Transactions*, 24, 434–438.
- del Rio, L. A., Sandalio, L. M., Altomare, D. A., & Zilinskas, B. A. (2003). Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, 54(384), 923–933.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erg091>

- del Río, L. A., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Lopez-Huertas, E., Palma, J. M., & Pastori, G. M. (1998). Activated oxygen-mediated metabolic functions of leaf peroxisomes. *Physiologia Plantarum*, Vol. 104, pp. 673–680. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1040422.x>
- del Rio, L. A., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Bueno, P., & Corpas, F. J. (1992). METABOLISM OF OXYGEN RADICALS IN PEROXISOMES AND CELLULAR IMPLICATIONS. *Free Radical Biology and Medicine*, 13, 557–580.
- Delorme-Hinoux, V., Bangash, S. A. K., Meyer, A. J., & Reichheld, J. P. (2016). Nuclear thiol redox systems in plants. *Plant Science*, 243, 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.12.002>
- Diaz Vivancos, P., Wolff, T., Markovic, J., Pallardó, F. V., & Foyer, C. H. (2010). A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochemical Journal*, 431(2), 169–178. <https://doi.org/10.1042/BJ20100409>
- Diaz, I., Martinez, M., Isabel-lamonedada, I., Rubio-somoza, I., & Carbonero, P. (2005). *The DOF protein, SAD, interacts with GAMYB in plant nuclei and activates transcription of endosperm-specific genes during barley seed development.* 652–662. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02402.x>
- Dietz, K.-J. (2011). Peroxiredoxins in Plants and Cyanobacteria. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(4), 1129–1159. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3657>
- Dietz, K.-J., Turkan, I., & Krieger-Liszkay, A. (2016). Redox- and Reactive Oxygen Species-Dependent Signaling into and out of the Photosynthesizing Chloroplast. *Plant Physiology*, 171(3), 1541–1550. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00375>
- Ding, M., Hou, P., Shen, X., Wang, M., Deng, S., Sun, J., ... Chen, S. (2010). Salt-induced expression of genes related to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> and ROS homeostasis in leaves of salt-resistant and salt-sensitive poplar species. *Plant Molecular Biology*, 73(3), 251–269. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9612-9>
- Ding, Y., Fromm, M., & Avramova, Z. (2012). Multiple exposures to drought “train” transcriptional responses in Arabidopsis. *Nature Communications*, 3, 740–749.

<https://doi.org/10.1038/ncomms1732>

Ditt, V., Lüsebrink, J., Tillmann, R. L., Schildgen, V., & Schildgen, O. (2011). Respiratory infections by HMPV and RSV are clinically indistinguishable but induce different host response in aged individuals. *PLoS ONE*, *6*(1), 1–9.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016314>

Djajanegara, I., Finnegan, P. M., Mathieu, C., McCabe, T., Whelan, J., & Day, D. A. (2002). Regulation of alternative oxidase gene expression in soybean. *Plant Molecular Biology*, *50*(4–5), 735–742. <https://doi.org/10.1023/A:1019942720636>

Douce, R., Mannella, C. A., & Bonner, W. D. (1973). The external NADH dehydrogenases of intact plant mitochondria. *BBA - Bioenergetics*, *292*(1), 105–116.

[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(73\)90255-7](https://doi.org/10.1016/0005-2728(73)90255-7)

Dowdle, J., Ishikawa, T., Gatzek, S., Rolinski, S., & Smirnov, N. (2007). Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant Journal*, *52*(4), 673–689.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2007.03266.x>

Droillard, M.-J., Bureau, D., Paulin, A., & Daussant, J. (1989). Identification of different classes of superoxide dismutase in carnation petals. *Electrophoresis*, *10*, 46–48.

Duchêne, A., & Giegé, P. (2012). Dual localized mitochondrial and nuclear proteins as gene expression regulators in plants? *Frontiers in Plant Science*, *3*(September), 1–6.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00221>

Dudkina, N. V., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., Boekema, E. J., & Braun, H. P. (2006). Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane. *Trends in Plant Science*, *11*(5), 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.03.007>

Edwards, E. A., Rawsthorne, S., & Mullineaux, P. M. (1990). Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, *180*(2), 278–284. <https://doi.org/10.1007/BF00194008>

Edwards, K., Johnstone, C., & Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the

- preparation of total plant DNA. *Oxford University Press*, 19(6), 1349.
- Eisele, J. F., Fäßler, F., Bürgel, P. F., & Chaban, C. (2016). A rapid and simple method for microscopy-based stomata analyses. *PLoS ONE*, 11(10), 1–13.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164576>
- Eklund, H., Gleason, F. K., & Holmgren, A. (1991). Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 11(1), 13–28. <https://doi.org/10.1002/prot.340110103>
- Elhafez, D., Murcha, M. W., Clifton, R., Soole, K. L., Day, D. A., & Whelan, J. (2006). Characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in arabidopsis: Intraorganelle location and expression. *Plant and Cell Physiology*, 47(1), 43–54. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci221>
- Elthon, T. E., Nickels, R. L., & McIntosh, L. (1989). Monoclonal Antibodies to the Alternative Oxidase of Higher Plant Mitochondria. *Plant Physiology*, 89(4), 1311–1317. <https://doi.org/10.1104/pp.89.4.1311>
- Fernandez-García, N., Martí, M. C., Jimenez, A., Sevilla, F., & Olmos, E. (2009). Sub-cellular distribution of glutathione in an Arabidopsis mutant (vtc1) deficient in ascorbate. *Journal of Plant Physiology*, 166(18), 2004–2012.  
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.06.006>
- Fernández-Trijueque, J., de Dios Barajas-López, J., Chueca, A., Cazalis, R., Sahrawy, M., & Serrato, A. J. (2012). Plastid thioredoxins f and m are related to the developing and salinity response of post-germinating seeds of *Pisum sativum*. *Plant Science*, 188–189, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.01.006>
- Finkelstein, R. (2013). Abscisic Acid Synthesis and Response. *The Arabidopsis Book*, 11(12), e0166. <https://doi.org/10.1199/tab.0166>
- Fischer, B. B., Hideg, É., & Krieger-Liszkay, A. (2013). Production, Detection, and Signaling of Singlet Oxygen in Photosynthetic Organisms. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(16), 2145–2162. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5124>

- Flexas, J., Barón, M., Bota, J., Ducruet, J. M., Gallé, A., Galmés, J., ... Medrano, H. (2009). Photosynthesis limitations during water stress acclimation and recovery in the drought-adapted Vitis hybrid Richter-110 (V. berlandieris × V. rupestris). *Journal of Experimental Botany*, *60*(8), 2361–2377. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp069>
- Flexas, J., Bota, J., Escalona, J. M., Sampol, B., & Medrano, H. (2002). Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Functional Plant Biology*, *29*, 461–471.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., & Sharkey, T. D. (2004). Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology*, *6*(3), 269–279. <https://doi.org/10.1055/s-2004-820867>
- Flexas, J., Carriquí, M., & Nadal, M. (2018). Gas exchange and hydraulics during drought in crops: Who drives whom? *Journal of Experimental Botany*, *69*(16), 3791–3795. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery235>
- Flexas, J., Diaz-Espejo, A., Galmés, J., Kaldenhoff, R., Medrano, H., & Ribas-Carbo, M. (2007). Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO<sub>2</sub> concentration around leaves. *Plant, Cell and Environment*, *30*(10), 1284–1298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01700.x>
- Flexas, J., Escalona, J. M., & Medrano, H. (1999). Water stress induces different levels of photosynthesis and electron transport rate regulation in grapevines. *Plant, Cell and Environment*, *22*(1), 39–48. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1999.00371.x>
- Flexas, J., & Medrano, H. (2002). Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: Stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany*, *89*(2), 183–189. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf027>
- Flexas, J., Ortuño, M. F., Ribas-Carbo, M., Diaz-Espejo, A., Flórez-Sarasa, I. D., & Medrano, H. (2007). Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist*, *175*(3), 501–511. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02111.x>
- Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Diaz-Espejo, A., Galmés, J., & Medrano, H. (2008). Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub>: Current knowledge and future prospects. *Plant, Cell and*

- Environment*, 31(5), 602–621. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01757.x>
- Florez-Sarasa, I., Araújo, W. L., Wallström, S. V., Rasmusson, A. G., Fernie, A. R., & Ribas-Carbo, M. (2012). Light-responsive metabolite and transcript levels are maintained following a dark-adaptation period in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 195(1), 136–148. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04153.x>
- Flowers, T. J., & Colmer, T. D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*, 179(4), 945–963. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02531.x>
- Formentin, E., Sudiro, C., Perin, G., Riccadonna, S., Barizza, E., Baldoni, E., ... Lo Schiavo, F. (2018). Transcriptome and Cell Physiological Analyses in Different Rice Cultivars Provide New Insights Into Adaptive and Salinity Stress Responses. *Frontiers in Plant Science*, 9(March), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00204>
- Foyer, C. H. (2018). Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environmental and Experimental Botany*, 154, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.003>
- Foyer, C. H., & Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133(1), 21–25. <https://doi.org/10.1007/BF00386001>
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2001). The Molecular Biology and Metabolism of Glutathione. In *Significance of Glutathione to Plant Adaptation to the Environment* (pp. 27–56). [https://doi.org/10.1007/0-306-47644-4\\_3](https://doi.org/10.1007/0-306-47644-4_3)
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2009). Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. *Antioxidant and Redox Signaling*, 11(4), 862–878.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*, 155(1), 2–18. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167569>
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2013). Redox Signaling in Plants. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(16), 2087–2090. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5278>

- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2016). Stress-triggered redox signalling: What's in pROspect? *Plant Cell and Environment*, *39*(5), 951–964. <https://doi.org/10.1111/pce.12621>
- Foyer, C. H., Ruban, A. V., & Noctor, G. (2017). Viewing oxidative stress through the lens of oxidative signalling rather than damage. *Biochemical Journal*, *474*(6), 877–883. <https://doi.org/10.1042/bcj20160814>
- Foyer, C. H., Souriau, N., Perret, S., Lelandais, M., Kunert, K. J., Pruvost, C., & Jouanin, L. (1995). Overexpression of Glutathione Reductase but Not Glutathione Synthetase Leads to Increases in Antioxidant Capacity and Resistance to Photoinhibition in Poplar Trees. *Plant Physiology*, *109*(3), 1047–1057. <https://doi.org/10.1104/pp.109.3.1047>
- Foyer, C. H., Trebst, A., & Noctor, G. (2008). Chapter 16 Signaling and Integration of Defense Functions of. In *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment*. (pp. 241–268).
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem*, *64*, 97–112.
- Fridovich, I. (1998). OXYGEN TOXICITY : A RADICAL EXPLANATION. *The Journal of Experimental Biology*, *201*, 1203–1209.
- Frohman, M. A., Dush, M. K., & Martin, G. R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of The*, *85*(December), 8998–9002. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/85/23/8998.short>
- Fuchs, S., Grill, E., Meskiene, I., & Schweighofer, A. (2013). Type 2C protein phosphatases in plants. *FEBS Journal*, *280*(2), 681–693. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08670.x>
- Fujita, Y., Yoshida, T., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013). Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiologia Plantarum*, *147*(1), 15–27. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01635.x>

- Gago, J., Daloso, D. de M., Figueroa, C. M., Flexas, J., Fernie, A. R., & Nikoloski, Z. (2016). Relationships of Leaf Net Photosynthesis, Stomatal Conductance, and Mesophyll Conductance to Primary Metabolism: A Multispecies Meta-Analysis Approach. *Plant Physiology*, *171*(1), 265–279. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01660>
- Gama, F., Keech, O., Eymery, F., Finkemeier, I., Gelhaye, E., Gardeström, P., ... Rouhier, N. (2007). The mitochondrial type II peroxiredoxin from poplar. *Physiologia Plantarum*, *129*(1), 196–206. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00785.x>
- Gao, X., Yuan, H. M., Hu, Y. Q., Li, J., & Lu, Y. T. (2014). Mutation of Arabidopsis CATALASE2 results in hyponastic leaves by changes of auxin levels. *Plant, Cell and Environment*, *37*(1), 175–188. <https://doi.org/10.1111/pce.12144>
- Gao, Y. (2010). The multiple actions of NO. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, *459*(6), 829–839. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0773-9>
- Garfin, D. E. (1990). One-Dimensional Gel Electrophoresis. *Methods in Enzymology*, *182*, 425–441.
- Geigenberger, P., & Fernie, A. R. (2014). Metabolic Control of Redox and Redox Control of Metabolism in Plants. *Antioxidants & Redox Signaling*, *21*(9), 1389–1421. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6018>
- Geigenberger, P., Thormählen, I., Daloso, D. M., & Fernie, A. R. (2017). The Unprecedented Versatility of the Plant Thioredoxin System. *Trends in Plant Science*, *22*(3), 249–262. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.008>
- Gelhaye, E., Rouhier, N., Gerard, J., Jolivet, Y., Gualberto, J., Navrot, N., ... Jacquot, J.-P. (2004). A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(40), 14545–14550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405282101>
- Genty, B., Briantais, J. M., & Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *990*(1), 87–92. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9)

- Gibbs, D. J., Lee, S. C., Isa, N. M., Gramuglia, S., Fukao, T., Bassel, G. W., ... Holdsworth, M. J. (2011). Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature*, *479*(7373), 415–418.  
<https://doi.org/10.1038/nature10534>
- Gibbs, D. J., Md Isa, N., Movahedi, M., Lozano-Juste, J., Mendiondo, G. M., Berckhan, S., ... Holdsworth, M. J. (2014). Nitric Oxide Sensing in Plants Is Mediated by Proteolytic Control of Group VII ERF Transcription Factors. *Molecular Cell*, *53*(3), 369–379.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.020>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *48*(12), 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Gilroy, S., Suzuki, N., Miller, G., Choi, W. G., Toyota, M., Devireddy, A. R., & Mittler, R. (2014). A tidal wave of signals: Calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends in Plant Science*, *19*(10), 623–630.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.06.013>
- Go, Y.-M., & Jones, D. P. (2010). Redox Control Systems in the Nucleus: Mechanisms and Functions. *Antioxidants & Redox Signaling*, *13*(4), 489–509.  
<https://doi.org/10.1089/ars.2009.3021>
- Gómez, J. M., Hernández, J. A., Jiménez, A., del Río, L. A., & Sevilla, F. (1999). Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. *Free Radical Research*, *31 Suppl*, S11-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10694035>
- Gomez, L. D., Noctor, G., Knight, M. R., & Foyer, C. H. (2004). Regulation of calcium signalling and gene expression by glutathione. *Journal of Experimental Botany*, *55*(404), 1851–1859. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh202>
- González-Guzmán, M., Apostolova, N., Bellés, J. M., Barrero, José M, Belles, J. M., Barrero, Jose M, ... Rodnguez, P. L. (2002). The Short-Chain Alcohol Dehydrogenase ABA2 Catalyzes the Conversion of Xanthoxin to Abscisic Aldehyde Pedro Piqueras ,

- María R . Ponce , José L . Micol , Ramón Serrano and Pedro L . Rodríguez Reviewed work ( s ): Published by : American Society of Plant B. *The Plant Cell*, 14(August), 1833–1846. <https://doi.org/10.1105/tpc.002477.development>
- Grant, J. J., & Loake, G. J. (2000). Role of Reactive Oxygen Intermediates and Cognate Redox Signaling in Disease Resistance. *Plant Physiology*, 124(September), 21–29.
- Gray, G. R., Maxwell, D. P., Villarimo, A. R., & McIntosh, L. (2004). Mitochondria/nuclear signaling of alternative oxidase gene expression occurs through distinct pathways involving organic acids and reactive oxygen species. *Plant Cell Reports*, 23(7), 497–503. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0848-1>
- Grek, C. L., Zhang, J., Manevich, Y., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2013). Causes and consequences of cysteine s-glutathionylation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(37), 26497–26504. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.461368>
- Gupta, B., & Huang, B. (2014). Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. *International Journal of Genomics*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/701596>
- Gupta, R., & Luan, S. (2003). Redox Control of Protein Tyrosine Phosphatases and Mitogen-Activated Protein Kinases in Plants. *Plant Physiology*, 132(3), 1149–1152. <https://doi.org/10.1104/pp.103.020792>
- Gurmani, A. R., Bano, A., Ullah, N., Khan, H., Jahangir, M., & Flowers, T. J. (2013). *Exogenous abscisic acid(ABA) and silicon (Si) promote salinity tolerance by reducing*. 7(9), 1219–1226.
- Haber, F., & Weiss, J. (1934). The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts \*. *Naturwiss*, 20, 948.
- Hall, A., Karplus, P. A., & Poole, L. B. (2009). Typical 2-Cys peroxiredoxins - Structures, mechanisms and functions. *FEBS Journal*, 276(9), 2469–2477. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06985.x>
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., & Press., O. U. (2015). *Free radicals in biology and*

*medicine*. Oxford: Oxford University Press.

Hara, S., Motohashi, K., Arisaka, F., Romano, P. G. N., Hosoya-Matsuda, N., Kikuchi, N., ... Hisabori, T. (2006). Thioredoxin-h1 reduces and reactivates the oxidized cytosolic malate dehydrogenase dimer in higher plants. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(43), 32065–32071. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605784200>

Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J.-K., & Bohnert, H. J. (2000). PLANT CELLULAR AND MOLECULAR RESPONSES TO HIGH SALINITY. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, *51*, 463–499.

Hata, S., Kouchi, H., Tanaka, Y., Minami, E., Matsumoto, T., Suzuka, I., & Hashimoto, J. (1992). Identification of carrot cDNA clones encoding a second putative proliferating cell-nuclear antigen, DNA polymerase  $\delta$  auxiliary protein. *European Journal of Biochemistry*, *203*(3), 367–371. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16559.x>

Heine, G. F., Hernández, J. M., & Grotewold, E. (2004). Two cysteines in plant R2R3 MYB domains participate in REDOX-dependent DNA binding. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(36), 37878–37885. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405166200>

Hernández, J. A., Campillo, A., Jiménez, A., Alarcón, J. J., & Sevilla, F. (1999). Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytology*, *141*, 241–251.

Hernández, J. A., Ferrer, M. A., Jiménez, A., Barceló, A. R., & Sevilla, F. (2001). Antioxidant systems and  $O_2(\cdot^-)/H_2O_2$  production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology*, *127*, 817–831. <https://doi.org/10.1104/pp.010188>

Hernández, J. A. J. A., Corpas, F. J., Gómez, M., del Río, L. A., Sevilla, F., Gomez, M., ... Sevilla, F. (1993). Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiologia Plantarum*, *89*(1), 103–110. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01792.x>

Hernández, J. A., Jiménez, A., Mullineaux, P., Sevilla, F., Jimenez, A., Mullineaux, P., &

- Sevilia, F. (2000). Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant, Cell and Environment*, 23(8), 853–862. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00602.x>
- Hiltscher, H., Rudnik, R., Shaikhali, J., Heiber, I., Mellenthin, M., Meirelles Duarte, I., ... Baier, M. (2014). The radical induced cell death protein 1 (RCD1) supports transcriptional activation of genes for chloroplast antioxidant enzymes. *Frontiers in Plant Science*, 5(September), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00475>
- Holmgren, A. (1979). Reduction of disulfides by thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 254(18), 9113–9119. <https://doi.org/10.1079>
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Ann. Rev. Biochem.*, 54, 237–271.
- Holmgren, A. (1995). Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure*, 3(3), 239–243. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00153-8](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00153-8)
- Holtum, J. A. M., & Winter, K. (1982). Activity of enzymes of carbon metabolism during the induction of Crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta*, 155(1), 8–16. <https://doi.org/10.1007/BF00402925>
- Horling, F., König, J., & Dietz, K. (2002). Type II peroxiredoxin C, a member of the peroxiredoxin family of *Arabidopsis thaliana*: its expression and activity in comparison with other peroxiredoxins. *Plant Physiol Biochem*, 40, 491–499.
- Hossain, M. A., & Asada, K. (1984). Inactivation of Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts on Dark Addition of Hydrogen Peroxide: Its Protection by Ascorbate. *Plant and Cell Physiology*, 25(7), 1285–1295.
- Hossain, M. S., & Dietz, K.-J. (2016). Tuning of Redox Regulatory Mechanisms, Reactive Oxygen Species and Redox Homeostasis under Salinity Stress. *Frontiers in Plant Science*, 7(May). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00548>
- Huang, C., He, W., Guo, J., Chang, X., Su, P., & Zhang, L. (2005). Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant. *Journal of Experimental*

- Botany*, 56(422), 3041–3049. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri301>
- Huang, S., Van Aken, O., Schwarzländer, M., Belt, K., & Millar, A. H. (2016). The Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Cellular Signaling and Stress Response in Plants. *Plant Physiology*, 171(3), 1551–1559. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00166>
- Iglesias-Baena, I., Barranco-Medina, S., Lázaro-Payo, A., López-Jaramillo, F. J., Sevilla, F., & Lázaro, J. J. (2010). Characterization of plant sulfiredoxin and role of sulphinic form of 2-Cys peroxiredoxin. *Journal of Experimental Botany*, 61(5), 1509–1521. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq016>
- Iglesias-Baena, I., Barranco-Medina, S., Sevilla, F., & Lázaro, J.-J. (2011). The Dual-Targeted Plant Sulfiredoxin Retroreduces the Sulfinic Form of Atypical Mitochondrial Peroxiredoxin. *Plant Physiology*, 155(2), 944–955. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166504>
- Iglesias, M. J., Terrile, M. C., Bartoli, C. G., D'Ippólito, S., & Casalougué, C. A. (2010). Auxin signaling participates in the adaptative response against oxidative stress and salinity by interacting with redox metabolism in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 74, 215–222. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9667-7>
- Iqbal, A., Yabuta, Y., Takeda, T., Nakano, Y., & Shigeoka, S. (2006). Hydroperoxide reduction by thioredoxin-specific glutathione peroxidase isoenzymes of Arabidopsis thaliana. *FEBS Journal*, 273(24), 5589–5597. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05548.x>
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2000). A Stress-Inducible Gene for 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase Involved in Abscisic Acid Biosynthesis under Water Stress in Drought-Tolerant Cowpea. *Plant Physiology*, 123(2), 553–562. <https://doi.org/10.1104/pp.123.2.553>
- Jensen, M. K., Kjaersgaard, T., Nielsen, M. M., Galberg, P., Petersen, K., O'Shea, C., & Skriver, K. (2010). The Arabidopsis thaliana NAC transcription factor family: structure–function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochemical Journal*, 426(2), 183–196. <https://doi.org/10.1042/bj20091234>

- Jiang, K., Moe-Lange, J., Hennen, L., & Feldman, L. J. (2016). Salt Stress Affects the Redox Status of Arabidopsis Root Meristems. *Frontiers in Plant Science*, 7(February), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00081>
- Jiménez, A., Gómez, J. M., Navarro, E., & Sevilla, F. (2002). Changes in the antioxidative systems in mitochondria during ripening of pepper fruits. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6–8), 515–520. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01424-9](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01424-9)
- Jimenez, A., Hernández, J. A., Barcelo, A. R., Sandalio, L. M., del Rio, L. A., & Sevilla, F. (1998). Mitochondrial and peroxisomal ascorbate peroxidase of pea leaves. *Physiologia Plantarum*, 104(4), 687–692. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1040424.x>
- Jiménez, A., Hernández, J. A., del Rio, L. A., & Sevilla, F. (1997). Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves: Changes Induced by Leaf Senescence. *Phyton - Annales Rei Botanicae*, 37(3), 101–108.
- Jiménez, A., Hernández, José A., del Rio, L. A., & Sevilla, F. (1997). Evidence for the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves. *Plant Physiology*, 114, 275–284.
- Jiménez, A., Martí, M. C., Camejo, D., & Sevilla, F. (2018). *H2O2 and NO metabolism in chloroplasts*.
- Jönsson, T. J., & Lowther, W. T. (2007). The Peroxiredoxin Repair Proteins. *Subcell Biochem*, 44, 115–141. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6051-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6051-9_6)
- Jönsson, T. J., Murray, M. S., Johnson, L. C., & Lowther, W. T. (2008). Reduction of cysteine sulfinic acid in peroxiredoxin by sulfiredoxin proceeds directly through a sulfinic phosphoryl ester intermediate. *Journal of Biological Chemistry*, 283(35), 23846–23851. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803244200>
- Kang, J., Yim, S., Choi, H., Kim, A., Lee, K. P., Lopez-Molina, L., ... Lee, Y. (2015). Abscisic acid transporters cooperate to control seed germination. *Nature Communications*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms9113>

- Kangasjärvi, S., Neukermans, J., Li, S., Aro, E. M., & Noctor, G. (2012). Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. *Journal of Experimental Botany*, *63*(4), 1619–1636. <https://doi.org/10.1093/jxb/err402>
- Karpinska, B., Karlsson, M., Schinkel, H., Streller, S., Süß, K., Melzer, M., & Wingsle, G. (2001). A Novel Superoxide Dismutase with a High Isoelectric Point in Higher Plants . Expression , Regulation , and Protein Localization. *Plant Physiology*, *126*, 1668–1677.
- Karpinska, B., Zhang, K., Rasool, B., Pastok, D., Morris, J., Verrall, S. R., ... Foyer, C. H. (2018). The redox state of the apoplast influences the acclimation of photosynthesis and leaf metabolism to changing irradiance. *Plant Cell and Environment*, *41*(5), 1083–1097. <https://doi.org/10.1111/pce.12960>
- Keech, O., Dizengremel, P., & Gardeström, P. (2005). Preparation of leaf mitochondria from *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, *124*(4), 403–409. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00521.x>
- Kerchev, P. I., Pellny, T. K., Vivancos, P. D., Kiddle, G., Hedden, P., Driscoll, S., ... Foyer, C. H. (2011). The Transcription Factor ABI4 Is Required for the Ascorbic Acid-Dependent Regulation of Growth and Regulation of Jasmonate-Dependent Defense Signaling Pathways in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, *23*(9), 3319–3334. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.090100>
- Kliebenstein, D. J., Monde, R.-A., & Last, R. L. (2002). Superoxide Dismutase in *Arabidopsis*: An Eclectic Enzyme Family with Disparate Regulation and Protein Localization. *Plant Physiology*, *118*(2), 637–650. <https://doi.org/10.1104/pp.118.2.637>
- Kneeshaw, S., Gelineau, S., Tada, Y., Loake, G. J., & Spoel, S. H. (2014). Selective protein denitrosylation activity of thioredoxin-h5 modulates plant immunity. *Molecular Cell*, *56*(1), 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.003>
- Kneeshaw, S., Keyani, R., Delorme-Hinoux, V., Imrie, L., Loake, G. J., Le Bihan, T., ... Spoel, S. H. (2017). Nucleoredoxin guards against oxidative stress by protecting

- antioxidant enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(31), 8414–8419. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703344114>
- Kodama, H., Ito, M., Ohnishi, N., Suzuka, I., & Komamine, A. (1991). Molecular cloning of the gene for plant proliferating-cell nuclear antigen and expression of this gene during the cell cycle in synchronized cultures of *Catharanthus roseus* cells. *European Journal of Biochemistry*, 197(2), 495–503. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb15937.x>
- Köhler, B., Hills, A., & Blatt, M. R. (2003). Control of Guard Cell Ion Channels by Hydrogen Peroxide and Abscisic Acid Indicates Their Action through Alternate Signaling Pathways. *Plant Physiology*, 131(2), 385–388. <https://doi.org/10.1104/pp.016014>
- Koncz, C., & Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *MGG Molecular & General Genetics*, 204(3), 383–396. <https://doi.org/10.1007/BF00331014>
- König, J., Galliardt, H., Jütte, P., Schäper, S., Dittmann, L., & Dietz, K. J. (2013). The conformational bases for the two functionalities of 2-cysteine peroxiredoxins as peroxidase and chaperone. *Journal of Experimental Botany*, 64(11), 3483–3497. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert184>
- Kopka, J., Schauer, N., Krueger, S., Birkemeyer, C., Usadel, B., Bergmüller, E., ... Steinhauser, D. (2005). GMD@CSB.DB: The Golm metabolome database. *Bioinformatics*, 21(8), 1635–1638. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti236>
- Koprivova, A., Mugford, S. T., & Kopriva, S. (2010). Arabidopsis root growth dependence on glutathione is linked to auxin transport. *Plant Cell Reports*, 29(10), 1157–1167. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0902-0>
- Kosová, K., Prášil, I. T., & Vítámvás, P. (2013). Protein contribution to plant salinity response and tolerance acquisition. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 6757–6789. <https://doi.org/10.3390/ijms14046757>
- Krasensky, J., & Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced

- metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1593–1608. <https://doi.org/10.1093/jxb/err460>
- Krishnamurthy, A., & Rathinasabapathi, B. (2013). Oxidative stress tolerance in plants: Novel interplay between auxin and reactive oxygen species signaling. *Plant Signaling and Behavior*, 8(10), 1–5. <https://doi.org/10.4161/psb.25761>
- Krueger, S., Niehl, A., Lopez Martin, M. C., Steinhauser, D., Donath, A., Hildebrandt, T., ... Hesse, H. (2009). Analysis of cytosolic and plastidic serine acetyltransferase mutants and subcellular metabolite distributions suggests interplay of the cellular compartments for cysteine biosynthesis in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment*, 32(4), 349–367. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01928.x>
- Kumar, R. G., Shah, K., & Dubey, R. S. (2000). Salinity induced behavioural changes in malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase activities in rice seedlings of differing salt tolerance. *Plant Science*, 156(1), 23–34. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00224-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00224-7)
- Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., ... Nambara, E. (2004). The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: Key enzymes in ABA catabolism. *EMBO Journal*, 23(7), 1647–1656. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600121>
- Kwak, J. M., C.Mori, I., Pei, Z.-M., Leonhardt, N., Torres, M. A., L.Dangl, J., ... Julian I.Schroeder. (2003). NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, 22(11), 2623–2633. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg277>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lagrimini, L. M., Burkhart, W., Moyer, M., & Rothstein, S. (1987). Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: Molecular analysis and tissue-specific expression. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences*, 84(21), 7542–7546. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7542>
- Lake, J. A., Quick, W. P., Beerling, D. J., & Woodward, F. I. (2001). Signals from mature to new leaves. *Nature*, 411(6834), 154. <https://doi.org/10.1038/35075660>
- Lake, J. A., Woodward, F. I., & Quick, W. P. (2002). Long-distance CO<sub>2</sub> signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(367), 183–193. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.367.183>
- Lázaro, J. J., Jiménez, A., Camejo, D., Iglesias-Baena, I., Martí, M. del C., Lázaro-Payo, A., ... Sevilla, F. (2013). Dissecting the integrative antioxidant and redox systems in plant mitochondria. Effect of stress and S-nitrosylation. *Frontiers in Plant Science*, 4(November), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00460>
- Lemaire, S. D., Guillon, B., Le Marechal, P., Keryer, E., Miginiac-Maslow, M., & Decottignies, P. (2004). New thioredoxin targets in the unicellular photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(19), 7475–7480. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402221101>
- León-Sánchez, L., Nicolás, E., Nortes, P. A., Maestre, F. T., & Querejeta, J. I. (2016). Photosynthesis and growth reduction with warming are driven by nonstomatal limitations in a Mediterranean semi-arid shrub. *Ecology and Evolution*, 6(9), 2725–2738. <https://doi.org/10.1002/ece3.2074>
- Lepisto, A., Kangasjarvi, S., Luomala, E.-M., Brader, G., Sipari, N., Keranen, M., ... Rintamaki, E. (2009). Chloroplast NADPH-Thioredoxin Reductase Interacts with Photoperiodic Development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 149(3), 1261–1276. <https://doi.org/10.1104/pp.108.133777>
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.-G., ... Stadtman, E. R. (1990). Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods in Enzymology*, 186(49), 464–478. [https://doi.org/10.1016/0049-0172\(79\)90003-9](https://doi.org/10.1016/0049-0172(79)90003-9)
- Li, C., Li, J., Chong, K., Harter, K., Lee, Y., Leung, J., ... Zhao, Y. (2016). Toward a Molecular Understanding of Plant Hormone Actions. *Molecular Plant*, 9(1), 1–3.

<https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.12.006>

- Licausi, F., Ohme-takagi, M., & Perata, P. (2013). Factors : Mediators of Stress Responses and Developmental Programs. *New Phytologist*, *199*(3), 639–649.
- Lichtenthaler, H. K. (1996). Vegetation Stress: an Introduction to the Stress Concept in Plants. *Journal of Plant Physiology*, *148*(1–2), 4–14. [https://doi.org/10.1016/s0176-1617\(96\)80287-2](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(96)80287-2)
- Lima, G. R., Mello, C. E., & Zimbrao, G. (2018). A New Modeling for Item Ratings Using Landmarks. *Proceedings of the International Joint Conference on Neural Networks, 2018-July*, 1–8. <https://doi.org/10.1109/IJCNN.2018.8489272>
- Lin, A., Wang, Y., Tang, J., Xue, P., Li, C., Liu, L., ... Chu, C. (2012). Nitric Oxide and Protein S-Nitrosylation Are Integral to Hydrogen Peroxide-Induced Leaf Cell Death in Rice. *Plant Physiology*, *158*(1), 451–464. <https://doi.org/10.1104/pp.111.184531>
- Ling, Q., Huang, W., & Jarvis, P. (2011). Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research*, *107*(2), 209–214. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9606-0>
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., & Fernie, A. R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*, *1*(1), 387–396. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.59>
- Liso, R., Innocenti, A. M., Bitonti, M. B., & Arrigoni, O. (1988). Ascorbic acid-induced progression of quiescent centre cells from G1 to S phase. *New Phytologist*, *110*(4), 469–471. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1988.tb00284.x>
- Liu, L., Wei, Y., Shi, F., Liu, C., Liu, X., & Ji, S. (2015). Intermittent warming improves postharvest quality of bell peppers and reduces chilling injury. *Postharvest Biology and Technology*, *101*(0), 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.11.006>
- Liu, S., Lv, Z., Liu, Y., Li, L., & Zhang, L. (2018). Network analysis of ABA-dependent and ABA-independent drought responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics and Molecular Biology*, *41*(3), 624–637. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017->

0229

- Liu, X. P., Liu, X. Y., Zhang, J., Xia, Z. L., Liu, X., Qin, H. J., & Wang, D. W. (2006). Molecular and functional characterization of sulfiredoxin homologs from higher plants. *Cell Research*, *16*(3), 287–296. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310036>
- Locato, V., Cimini, S., & De Gara, L. (2018). ROS and redox balance as multifaceted players of cross-tolerance: epigenetic and retrograde control of gene expression. *Journal of Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy039/4931479>
- Long, S. P., & Bernacchi, C. J. (2003). Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany*, *54*(392), 2393–2401. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg262>
- López, I., Khan, S., Vázquez-Ramos, J., & Hussey, P. J. (1995). Molecular cloning of a maize cDNA clone encoding a putative proliferating cell nuclear antigen. *Biochimica et Biophysica Acta Biophysica Acta*, *1260*(i), 119–121.
- Lozano-Juste, J., Colom-Moreno, R., & León, J. (2011). In vivo protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, *62*(10), 3501–3517. <https://doi.org/10.1093/jxb/err042>
- Lozano-Juste, J., & León, J. (2010). Nitric oxide modulates sensitivity to ABA. *Plant Signaling & Behavior*, *5*(3), 314–316. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2881288&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lu, C., & Vonshak, A. (2002). Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. *Physiologia Plantarum*, *114*(3), 405–413. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1140310.x>
- Lu, J., & Holmgren, A. (2009). Selenoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(2), 723–727. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800045200>
- Lu, P., Outlaw Jr, W. H., Smith, B. G., & Freed, G. A. (1997). A New Mechanism for the

- Regulation of Stomatal Aperture Size in Intact Leaves (Accumulation of Mesophyll-Derived Sucrose in the Guard-Cell Wall of *Vicia faba*). *Plant Physiology*, 114(1), 109–118. <https://doi.org/10.1104/pp.114.1.109>
- Luedemann, A., Strassburg, K., Erban, A., & Kopka, J. (2008). TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography - Mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics*, 24(5), 732–737. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn023>
- Lunn, J. E., Delorge, I., Figueroa, C. M., Van Dijck, P., & Stitt, M. (2014). Trehalose metabolism in plants. *Plant Journal*, 79(4), 544–567. <https://doi.org/10.1111/tpj.12509>
- Luo, T., Fan, T., Liu, Y., Rothbart, M., Yu, J., Zhou, S., ... Luo, M. (2012). Thioredoxin Redox Regulates ATPase Activity of Magnesium Chelatase CHL1 Subunit and Modulates Redox-Mediated Signaling in Tetrapyrrole Biosynthesis and Homeostasis of Reactive Oxygen Species in Pea Plants. *Plant Physiology*, 159(1), 118–130. <https://doi.org/10.1104/pp.112.195446>
- Maathuis, F. J. M., Ahmad, I., & Patishtan, J. (2014). Regulation of Na<sup>+</sup> fluxes in plants. *Frontiers in Plant Science*, 5(September), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00467>
- Mäkelä, P., Kontturi, M., Pehu, E., & Somersalo, S. (1999). Photosynthetic response of drought- and salt-stressed tomato and turnip rape plants to foliar-applied glycinebetaine. *Physiologia Plantarum*, 105(1), 45–50. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.105108.x>
- Manaa, A., Ben Ahmed, H., Valot, B., Bouchet, J. P., Aschi-Smiti, S., Causse, M., & Faurobert, M. (2011). Salt and genotype impact on plant physiology and root proteome variations in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2797–2813. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq460>
- Marchal, C., Delorme-Hinoux, V., Bariat, L., Siala, W., Belin, C., Saez-Vasquez, J., ... Reichheld, J. P. (2014). NTR/NRX define a new thioredoxin system in the nucleus of

- arabidopsis thaliana cells. *Molecular Plant*, 7(1), 30–44.  
<https://doi.org/10.1093/mp/sst162>
- Markley, N.-A., Bonham-Smith, P. C., & Moloney, M. M. (1993). Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the proliferating cell nuclear antigen from *Brassica napus* (oilseed rape). *Genome*, 36(3), 459–466. <https://doi.org/10.1139/g93-063>
- Markovic, J., Borrás, C., Ortega, Á., Sastre, J., Viña, J., & Pallardó, F. V. (2007). Glutathione is recruited into the nucleus in early phases of cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(28), 20416–20424.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M609582200>
- Martí, M. C., Camejo, D., Olmos, E., Sandalio, L. M., Fernández-García, N., Jiménez, A., & Sevilla, F. (2009). Characterisation and changes in the antioxidant system of chloroplasts and chromoplasts isolated from green and mature pepper fruits. *Plant Biology*, 11(4), 613–624. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00149.x>
- Martí, M. C., Florez-Sarasa, I., Camejo, D., Ribas-Carbó, M., Lázaro, J. J., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2011). Response of mitochondrial thioredoxin PsTrxo1, antioxidant enzymes, and respiration to salinity in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Journal of Experimental Botany*, 62(11), 3863–3874. <https://doi.org/10.1093/jxb/err076>
- Martí, M. C., Hubbard, K. E., Gardner, M. J., Jung, H. J., Aubry, S., Hotta, C. T., ... Webb, A. A. R. (2018). Circadian oscillations of cytosolic free calcium regulate the Arabidopsis circadian clock. *Nature Plants*, 4(9), 690–698. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0224-8>
- Martí, M. C., Olmos, E., Calvete, J. J., Díaz, I., Barranco-Medina, S., Whelan, J., ... Jiménez, A. (2009). Mitochondrial and nuclear localization of a novel pea thioredoxin: identification of its mitochondrial target proteins. *Plant Physiology*, 150(2), 646–657. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138073>
- Martín-Trillo, M., & Cubas, P. (2010). TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends in Plant Science*, 15(1), 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.003>
- Martins, L., Trujillo-Hernández, J. A., & Reichheld, J.-P. (2018). Thiol Based Redox

- Signaling in Plant Nucleus. *Frontiers in Plant Science*, 9(May), 1–9.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00705>
- Maxwell, D. P., Nickels, R., & McIntos, L. (2002). Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant Journal*, 29(3), 269–279.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01216.x>
- McAinsh, M. R., Clayton, H., Mansfield, T. A., & Hetherington, A. M. (1996). Changes in Stomatal Behavior and Guard Cell Cytosolic Free Calcium in Response to Oxidative Stress. *Plant Physiology*, 111(4), 1031–1042.  
<https://doi.org/10.1104/pp.111.4.1031>
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049–6055.
- McDonald, A. E., & Vanlerberghe, G. C. (2006). Origins, evolutionary history, and taxonomic distribution of alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, 1(3), 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2006.08.001>
- Medeiros, D. B., Daloso, D. M., Fernie, A. R., Nikoloski, Z., & Araújo, W. L. (2015). Utilizing systems biology to unravel stomatal function and the hierarchies underpinning its control. *Plant, Cell and Environment*, 38(8), 1457–1470.  
<https://doi.org/10.1111/pce.12517>
- Medeiros, D. B., Perez Souza, L., Antunes, W. C., Araújo, W. L., Daloso, D. M., & Fernie, A. R. (2018). Sucrose breakdown within guard cells provides substrates for glycolysis and glutamine biosynthesis during light-induced stomatal opening. *Plant Journal*, 94(4), 583–594. <https://doi.org/10.1111/tpj.13889>
- Medrano, H., Escalona, J. M., Bota, J., Gulías, J., & Flexas, J. (2002). Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: Stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany*, 89, 895–905.

<https://doi.org/10.1093/aob/mcf079>

- Mehler, A. H. (1951). Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 33(1), 65–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(51\)90082-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(51)90082-3)
- Meinhard, M., & Grill, E. (2001). Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from Arabidopsis. *FEBS Letters*, 508(3), 443–446. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03106-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03106-4)
- Meinhard, M., Rodriguez, P. L., & Grill, E. (2002). The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signalling. *Planta*, 214(5), 775–782. <https://doi.org/10.1007/s00425-001-0675-3>
- Meneguzzo, S., Sgherri, C. L. M., Navari-Izzo, F., & Izzo, R. (1998). Stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in NaCl-treated wheat. *Physiologia Plantarum*, 104, 735–740.
- Meng, L., Wong, J. H., Feldman, L. J., Lemaux, P. G., & Buchanan, B. B. (2010). A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8), 3900–3905. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913759107>
- Merilo, E., Jalakas, P., Laanemets, K., Mohammadi, O., Hõrak, H., Kollist, H., & Brosché, M. (2015). Abscisic acid transport and homeostasis in the context of stomatal regulation. *Molecular Plant*, 8(9), 1321–1333. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.06.006>
- Meyer, Y., Belin, C., Delorme-Hinoux, V., Reichheld, J.-P., & Riondet, C. (2012). Thioredoxin and Glutaredoxin Systems in Plants: Molecular Mechanisms, Crosstalks, and Functional Significance. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(8), 1124–1160. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4327>
- Meyer, Y., Reichheld, J. P., & Vignols, F. (2005). Thioredoxins in Arabidopsis and other plants. *Photosynthesis Research*, 86(3), 419–433. <https://doi.org/10.1007/s11120->

005-5220-y

- Mhamdi, A., Noctor, G., & Baker, A. (2012). Plant catalases: Peroxisomal redox guardians. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *525*(2), 181–194.  
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.015>
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., & Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: A focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, *61*(15), 4197–4220.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erq282>
- Miao, Y., Lv, D., Wang, P., Wang, X.-C., Chen, J., Miao, C., & Song, C.-P. (2006). An Arabidopsis Glutathione Peroxidase Functions as Both a Redox Transducer and a Scavenger in Abscisic Acid and Drought Stress Responses. *The Plant Cell Online*, *18*(10), 2749–2766. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044230>
- Michaeli, S., & Fromm, H. (2015). Closing the loop on the GABA shunt in plants: are GABA metabolism and signaling entwined? *Frontiers in Plant Science*, *6*(June), 1–7.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00419>
- Mignolet-Spruyt, L., Xu, E., Idänheimo, N., Hoerberichts, F. A., Mühlenbock, P., Brosche, M., ... Kangasjärvi, J. (2016). Spreading the news: Subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *Journal of Experimental Botany*, *67*(13), 3831–3844. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw080>
- Millar, A. H., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J. L., Bartoli, C. G., Theodoulou, F. L., & Foyer, C. H. (2003). Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiology*, *133*(2), 443–447.  
<https://doi.org/10.1104/pp.103.028399>
- Millar, A. H., Whelan, J., Soole, K. L., & Day, D. A. (2011). Organization and Regulation of Mitochondrial Respiration in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, *62*(1), 79–104.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103857>
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and*

- Environment*, 33(4), 453–467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x>
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11–19.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- Mittler, R., & Blumwald, E. (2015). The Roles of ROS and ABA in Systemic Acquired Acclimation. *The Plant Cell Online*, 27(1), 64–70.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.114.133090>
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., ... Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: The new wave? *Trends in Plant Science*, 16(6), 300–309. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.007>
- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M., & Guy, M. (2003). Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant, Cell and Environment*, 26(6), 845–856. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01016.x>
- Miyakawa, T., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Tanokura, M. (2013). Structure and function of abscisic acid receptors. *Trends in Plant Science*, 18(5), 259–266.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.11.002>
- Mock, H. P., & Dietz, K. J. (2016). Redox proteomics for the assessment of redox-related posttranslational regulation in plants. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1864(8), 967–973. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.01.005>
- Mor, A., Koh, E., Weiner, L., Rosenwasser, S., Sibony-Benyamini, H., & Fluhr, R. (2014). Singlet Oxygen Signatures Are Detected Independent of Light or Chloroplasts in Response to Multiple Stresses. *Plant Physiology*, 165(1), 249–261.  
<https://doi.org/10.1104/pp.114.236380>
- Moseler, A., Aller, I., Wagner, S., Nietzel, T., Przybyla-Toscano, J., Mühlenhoff, U., ... Meyer, A. J. (2015). The mitochondrial monothiol glutaredoxin S15 is essential for iron-sulfur protein maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(44), 13735–13740.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1510835112>

- Mou, Z., Fan, W., & Dong, X. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, *113*(7), 935–944. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12837250>
- Mudrik, V., Kosobrukhov, A., Knyazeva, I., & Pigulevskaya, T. (2003). Changes in the photosynthetic characteristics of *Plantago major* plants. *Plant Growth Regulation*, *40*, 1–6.
- Munne-Bosch, S., Queval, G., & Foyer, C. H. (2013). The Impact of Global Change Factors on Redox Signaling Underpinning Stress Tolerance. *Plant Physiology*, *161*(1), 5–19. <https://doi.org/10.1104/pp.112.205690>
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, *59*, 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *15*, 474–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Murata, Y., Mori, I. C., & Munemasa, S. (2015). Diverse Stomatal Signaling and the Signal Integration Mechanism. *Annual Review of Plant Biology*, *66*(1), 369–392. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114707>
- Murata, Y., Pei, Z. M., Mori, I. C., & Schroeder, J. (2001). Abscisic acid activation of plasma membrane Ca(2+) channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *The Plant Cell*, *13*(11), 2513–2523. <https://doi.org/10.1105/tpc.010210.2514>
- Nadal, M., & Flexas, J. (2018). Mesophyll Conductance to CO<sub>2</sub> Diffusion: Effects of Drought and Opportunities for Improvement. In *Water Scarcity and Sustainable Agriculture in Semiarid Environment*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813164-0.00017-X>

- Nájera, V. A., González, M. C., Pérez-Ruiz, J. M., & Cejudo, F. J. (2017). An event of alternative splicing affects the expression of the NTRC gene, encoding NADPH-thioredoxin reductase C, in seed plants. *Plant Science*, 258(February), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.02.001>
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant & Cell Physiology*, 22(May), 867–880.
- Nambara, E., & Marion-Poll, A. (2005). Abscisic Acid Biosynthesis and Catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 165–185. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046>
- Navarro, J. M., Flores, P., Garrido, C., & Martínez, V. (2006). Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry*, 96(1), 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.057>
- Negrão, S., Schmöckel, S. M., & Tester, M. (2017). Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of Botany*, 119(1), 1–11. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw191>
- Ng, S., De Clercq, I., Van Aken, O., Law, S. R., Ivanova, A., Willems, P., ... Whelan, J. (2014). Anterograde and retrograde regulation of nuclear genes encoding mitochondrial proteins during growth, development, and stress. *Molecular Plant*, 7(7), 1075–1093. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu037>
- Nietzel, T., Mostertz, J., Hochgräfe, F., & Schwarzländer, M. (2017). Redox regulation of mitochondrial proteins and proteomes by cysteine thiol switches. *Mitochondrion*, 33, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.07.010>
- Nishida, M., Harada, S., Noguchi, S., Satow, Y., Inoue, H., & Takahashi, K. (1998). Three-dimensional structure of Escherichia coli glutathione S-transferase complexed with glutathione sulfonate: Catalytic roles of Cys10 and His106. *Journal of Molecular Biology*, 281(1), 135–147. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1927>
- Niu, L., & Liao, W. (2016). Hydrogen Peroxide Signaling in Plant Development and Abiotic

- Responses: Crosstalk with Nitric Oxide and Calcium. *Frontiers in Plant Science*, 7(March), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00230>
- Noctor, G., De Paepe, R., & Foyer, C. H. (2007). Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science*, 12(3), 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.01.005>
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49, 249–279. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249>
- Noctor, G., Mhamdi, A., & Foyer, C. H. (2016). Oxidative stress and antioxidative systems: Recipes for successful data collection and interpretation. *Plant Cell and Environment*, 39(5), 1140–1160. <https://doi.org/10.1111/pce.12726>
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L., & Foyer, C. H. (2002). Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: A predominant role for photorespiration? *Annals of Botany*, 89(SPEC. ISS.), 841–850. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf096>
- Nunes-Nesi, A., Araújo, W. L., Obata, T., & Fernie, A. R. (2013). Regulation of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(3), 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.01.004>
- Obata, T., Matthes, A., Koszior, S., Lehmann, M., Araújo, W. L., Bock, R., ... Fernie, A. R. (2011). Alteration of mitochondrial protein complexes in relation to metabolic regulation under short-term oxidative stress in Arabidopsis seedlings. *Phytochemistry*, 72(10), 1081–1091. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.11.003>
- Oelze, M. L., Kandlbinder, A., & Dietz, K. J. (2008). Redox regulation and overreduction control in the photosynthesizing cell: Complexity in redox regulatory networks. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1780(11), 1261–1272. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.03.015>
- Ogawa, K., Kanematsu, S., & Asada, K. (1996). Intra- and Extra-Cellular Localization of "

- Cytosolic " CuZn-Superoxide Dismutase in Spinach Leaf and Hypocotyl. *Plant. Cell. Physiol.*, 37(6), 790–799.
- Ogawa, K., Kanematsu, S., & Takabe, K. (1995). Attachment of CuZn-Superoxide Dismutase to Thylakoid Membranes at the Site of Superoxide Generation ( PSI ) in Spinach Chloroplasts : Detection by Immuno-Gold Labeling After Rapid Freezing and Substitution Method. *Plant Cell Physiology*, 36(4), 565–573.
- Ojeda, V., Pérez-Ruiz, J. M., González, M., Nájera, V. A., Sahrawy, M., Serrato, A. J., ... Cejudo, F. J. (2017). NADPH Thioredoxin Reductase C and Thioredoxins Act Concertedly in Seedling Development. *Plant Physiology*, 174(3), 1436–1448. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00481>
- Okamoto, M., Kushiro, T., Jikumaru, Y., Abrams, S. R., Kamiya, Y., Seki, M., & Nambara, E. (2011). ABA 9'-hydroxylation is catalyzed by CYP707A in Arabidopsis. *Phytochemistry*, 72(8), 717–722. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.004>
- Okegawa, Y., & Motohashi, K. (2015). Chloroplastic thioredoxin m functions as a major regulator of Calvin cycle enzymes during photosynthesis in vivo. *Plant Journal*, 84(5), 900–913. <https://doi.org/10.1111/tpj.13049>
- Olafsdottir, K., Pascoe, G. A., & Reed, D. J. (1988). Mitochondrial Glutathione Status during Ca<sup>2+</sup> + Ionophore-induced Injury to Isolated Hepatocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 263(1), 226–235.
- Ortega-Galisteo, A. P., Rodríguez-Serrano, M., Pazmiño, D. M., Gupta, D. K., Sandalio, L. M., & Romero-Puertas, M. C. (2012). S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: Changes under abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 63(5), 2089–2103. <https://doi.org/10.1093/jxb/err414>
- Ortiz-Espín, A., Iglesias-Fernández, R., Calderón, A., Carbonero, P., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2017). Mitochondrial AtTrxo1 is transcriptionally regulated by AtbZIP9 and AtAZF2 and affects seed germination under saline conditions. *Journal of Experimental Botany*, 68(5), 1025–1038. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx012>
- Ortiz-Espín, A., Locato, V., Camejo, D., Schiermeyer, A., De Gara, L., Sevilla, F., & Jiménez,

- A. (2015). Over-expression of Trxo1 increases the viability of tobacco BY-2 cells under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. *Annals of Botany*, *116*(4), 571–582.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mcv076>
- Ortiz-Espín, A., Sánchez-Guerrero, A., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2017). *The Role of Ascorbate in Plant Growth and Development BT - Ascorbic Acid in Plant Growth, Development and Stress Tolerance* (M. A. Hossain, S. Munné-Bosch, D. J. Burritt, P. Diaz-Vivancos, M. Fujita, & A. Lorence, Eds.). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74057-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74057-7_2)
- Ortiz Espín, A. M. (2015). *Tesis ANA Ortiz* (Vol. 281).  
<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2171.2482>
- Pang, Q., Chen, S., Dai, S., Chen, Y., Wang, Y., & Yan, X. (2010). Comparative proteomics of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. *Journal of Proteome Research*, *9*(5), 2584–2599. <https://doi.org/10.1021/pr100034f>
- Park, S.-C., Park, E.-H., & Cho, J. (1999). Nucleotide sequence of a tobacco cDNA clone encoding a homolog of proliferating cell nuclear antigen. *Plant Physiology*, *119*:806((Accession No. AF038875)).
- Park, S.-W., Li, W., Viehhauser, A., He, B., Kim, S., Nilsson, A. K., ... Lawrence, C. B. (2013). Cyclophilin 20-3 relays a 12-oxo-phytodienoic acid signal during stress responsive regulation of cellular redox homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(23), 9559–9564. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218872110>
- Park, S.-Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., ... Cutler, S. R. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science (New York, N.Y.)*, *324*(5930), 1068–1071.  
<https://doi.org/10.1126/science.1173041>
- Park, S., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Zhao, Y., Lumba, S., ... Cutler, S. R. (2010). Abscisic acid inhibits PP2Cs via the PYR/PYL family of ABA-binding START proteins. *Science*, *324*(5930), 1068–1071. <https://doi.org/10.1126/science.1173041>.
- Pastori, G. M., Kiddle, G., Antoniw, J., Bernard, S., Veljovic-Jovanovic, S., Verrier, P. J., ...

- Foyer, C. H. (2003). Leaf Vitamin C Contents Modulate Plant Defense Transcripts and Regulate Genes That Control Development through Hormone Signaling. *The Plant Cell Online*, 15(4), 939–951. <https://doi.org/10.1105/tpc.010538>
- Pedrajas, J. R., & Bárcena, J. A. (2018). Peroxiredoxins: Types, Characteristics and Functions in Higher Plants. In *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants* (pp. 95–121). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-75088-0>
- Pedrajas, J. R., McDonagh, B., Hernández-Torres, F., Miranda-Vizueté, A., González-Ojeda, R., Martínez-Galisteo E. Padilla, C. A., & Bárcena, J. . (2016). Glutathione is the resolving thiol for thioredoxin peroxidase activity of 1-Cys Peroxiredoxin without being consumed during the catalytic cycle. *Antioxidants & Redox Signaling*, 3(Jan 20;24), 115–128.
- Pei, Z.-M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G. J., ... Schroeder, J. I. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 406(6797), 731–734. <https://doi.org/10.1038/35021067>
- Pineau, B., Layoune, O., Danon, A., & De Paepe, R. (2008). L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase is required for the accumulation of plant respiratory complex I. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47), 32500–32505. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805320200>
- Pospíšil, P. (2012). Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(1), 218–231. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.05.017>
- Pospíšilová, J. (2003). Participation of phytohormones in the stomatal regulation of gas exchange during water stress. *Biologia Plantarum*, 46(4), 491–506.
- Puli, M. R., & Raghavendra, A. S. (2012). Pyrabactin, an ABA agonist, induced stomatal closure and changes in signalling components of guard cells in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany*, 63(3), 1349–1356. <https://doi.org/10.1093/jxb/err364>

- Pulido, P., Cazalis, R., & Cejudo, F. J. (2009). An antioxidant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress. *Plant Journal*, *57*(1), 132–145.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03675.x>
- Purvis, A. C. (1997). Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, *100*(1), 165–170.  
<https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.1000119.x>
- Qin, X., & Zeevaart, J. A. (1999). The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(26), 15354–15361. Retrieved from  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10611388><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC24823>
- Queval, G., Issakidis-Bourguet, E., Hoerberichts, F. A., Vandorpe, M., Gakière, B., Vanacker, H., ... Noctor, G. (2007). Conditional oxidative stress responses in the Arabidopsis photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cel. *Plant Journal*, *52*(4), 640–657.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03263.x>
- Rabhi, M., Giuntini, D., Castagna, A., Remorini, D., Baldan, B., Smaoui, A., ... Ranieri, A. (2010). *Sesuvium portulacastrum* maintains adequate gas exchange, pigment composition, and thylakoid proteins under moderate and high salinity. *Journal of Plant Physiology*, *167*(16), 1336–1341. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.05.009>
- Raghavendra, A. S., Gonugunta, V. K., Christmann, A., & Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science*, *15*(7), 395–401.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.04.006>
- Rahantaniaina, M.-S., Tuzet, A., Mhamdi, A., & Noctor, G. (2013). Missing links in understanding redox signaling via thiol/disulfide modulation: how is glutathione oxidized in plants? *Frontiers in Plant Science*, *4*(November), 1–13.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00477>

- Raines, C. A. (2003). The Calvin cycle revisited. *Photosynthesis Research*, 75(1), 1–10.  
<https://doi.org/10.1023/A:1022421515027>
- Rasmusson, A. G., & Wallström, S. V. (2010). Involvement of mitochondria in the control of plant cell NAD(P)H reduction levels. *Biochemical Society Transactions*, 38(2), 661–666. <https://doi.org/10.1042/bst0380661>
- Rasoulnia, A., Bihamta, M. R., Peyghambari, S. A., Alizadeh, H., & Rahnama, A. (2011). Proteomic response of barley leaves to salinity. *Molecular Biology Reports*, 38(8), 5055–5063. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0651-8>
- Ravilious, G. E., & Jez, J. M. (2012). Structural biology of plant sulfur metabolism: From assimilation to biosynthesis. *Natural Product Reports*, 29(10), 1138–1152.  
<https://doi.org/10.1039/c2np20009k>
- Ravindran, P., Verma, V., Stamm, P., & Kumar, P. P. (2017). A Novel RGL2–DOF6 Complex Contributes to Primary Seed Dormancy in *Arabidopsis thaliana* by Regulating a GATA Transcription Factor. *Molecular Plant*, 10(10), 1307–1320.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.09.004>
- Reckmann, U., Scheibe, R., & Raschke, K. (1990). Rubisco Activity in Guard Cells Compared with the Solute Requirement for Stomatal Opening. *Plant Physiology*, 92(1), 246–253. <https://doi.org/10.1104/pp.92.1.246>
- Reczek, C. R., & Chandel, N. S. (2015). ROS-dependent signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*, 33, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.09.010>
- Reichheld, J.-P., Khafif, M., Riondet, C., Droux, M., Bonnard, G., & Meyer, Y. (2007). Inactivation of thioredoxin reductases reveals a complex interplay between thioredoxin and glutathione pathways in *Arabidopsis* development. *The Plant Cell*, 19(6), 1851–1865. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.050849>
- Renault, D., El Amrani, A., Arzel, M., Renault, H., Roussel, V., Deleu, C., & Bouchereau, A. (2010). The *Arabidopsis* pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. *BMC Plant Biology*, 10(1), 20.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-20>

- Rhind, N., & Gilbert, D. M. (2013). DNA Replication Timing. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(7), 1–26.
- Rhoads, D. M., Umbach, A. L., Subbaiah, C. C., & Siedow, J. N. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiology*, 141(2), 357–366.  
<https://doi.org/10.1104/pp.106.079129>
- Rhoads, D. M., Umbach, A. L., Sweet, C. R., Lennon, A. M., Rauch, G. S., & Siedow, J. N. (1998). Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. Identification of the cysteine residue involved in alpha-keto acid stimulation and intersubunit disulfide bond formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(46), 30750–30756. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.46.30750>
- Ribas-Carbo, M., Aroca, R., González-Meler, M. A., Irigoyen, J. J., & Sánchez-Díaz, M. (2000). The Electron Partitioning between the Cytochrome and Alternative Respiratory Pathways during Chilling Recovery in Two Cultivars of Maize Differing in Chilling Sensitivity. *Plant Physiology*, 122(1), 199–204.  
<https://doi.org/10.1104/pp.122.1.199>
- Ribas-Carbó, M., Robinson, S. A., & Giles, L. (2005). The application of the oxygen-isotope technique to assess respiratory pathway partitioning. In *Plant Respiration: Vol. Chapter 3* (pp. 31–42).
- Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C., Sanz-Fernández, M., Hu, J., & Sandalio, L. M. (2016). Peroxisomes Extend Peroxules in a Fast Response to Stress via a Reactive Oxygen Species-Mediated Induction of the Peroxin PEX11a. *Plant Physiology*, 171(3), 1665–1674. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00648>
- Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C., Zabalza, A., Corpas, F. J., Gomez, M., Del Rio, L. A., & Sandalio, L. M. (2006). Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant, Cell and Environment*, 29(8), 1532–1544.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01531.x>

- Romano, P. G. N., Horton, P., & Gray, J. E. (2004). The Arabidopsis Cyclophilin Gene Family. *Plant Physiology*, *134*(4), 1268–1282.  
<https://doi.org/10.1104/pp.103.022160>
- Rombolá-Caldentey, B., Rueda-Romero, P., Iglesias-Fernández, R., Carbonero, P., & Oñate-Sánchez, L. (2014). Arabidopsis DELLA and Two HD-ZIP Transcription Factors Regulate GA Signaling in the Epidermis through the L1 Box cis -Element . *The Plant Cell*, *26*(7), 2905–2919. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.127647>
- Romero-Puertas, M. C., Campostrini, N., Mattè, A., Righetti, P. G., Perazzolli, M., Zolla, L., ... Delledonne, M. (2008). Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis thaliana undergoing hypersensitive response. *Proteomics*, *8*(7), 1459–1469. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700536>
- Romero-Puertas, M. C., Rodríguez-Serrano, M., & Sandalio, L. M. (2013). Protein S-nitrosylation in plants under abiotic stress: an overview. *Frontiers in Plant Science*, *4*(September), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00373>
- Roos, G., & Messens, J. (2011). Protein sulfenic acid formation: From cellular damage to redox regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, *51*(2), 314–326.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.031>
- Rouhier, N. (2010). Plant glutaredoxins: Pivotal players in redox biology and iron-sulphur centre assembly. *New Phytologist*, *186*(2), 365–372.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03146.x>
- Rozema, J., & Flowers, T. (2008). Crops for a Salinized World. *Science*, *322*(5 December), 1478–1480.
- Ruggiero, A., Landi, S., Punzo, P., Possenti, M., Van Oosten, M. J., Costa, A., ... Batelli, G. (2019). Salinity and ABA Seed Responses in Pepper: Expression and Interaction of ABA Core Signaling Components. *Frontiers in Plant Science*, *10*(March), 1–14.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00304>
- Ruiz-Sola, M. Á., & Rodríguez-Concepción, M. (2012). Carotenoid Biosynthesis in Arabidopsis: A Colorful Pathway. *The Arabidopsis Book*, *10*, e0158.

<https://doi.org/10.1199/tab.0158>

Sah, S. K., Reddy, K. R., & Li, J. (2016). Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7(May), 1–26.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00571>

Saisho, D., Nambara, E., Naito, S., Tsutsumi, N., Hirai, A., & Nakazono, M. (1997). Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 35(5), 585–596.

Saito, S., Hirai, N., Matsumoto, C., Ohigashi, H., & Ohta, D. (2004). Arabidopsis CYP707As Encode ( + ) -Abscisic Acid 8'-Hydroxylase , a Key Enzyme in the Oxidative Catabolism of Abscisic Acid. *Plant Physiol*, 134(April), 1439–1449.

<https://doi.org/10.1104/pp.103.037614.1>

Sakata, Y., Komatsu, K., & Takezawa, D. (2014). ABA as a Universal Plant Hormone. In *Progress in Botany* (Vol. 15, p. 1571). [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88944-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88944-X)

Salin, M. L., & Bridges, S. M. (1980). Isolation and Characterization of an Iron-Containing Superoxide Dismutase from a Eucaryote, *Brassica campestris*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 201(2), 369–374.

Sambrook, J., E.F., F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (Second). Retrieved from <https://ia801601.us.archive.org/34/items/in.ernet.dli.2015.474251/2015.474251.Molecular-Cloning.pdf>

Sánchez-Guerrero, A., Del-Saz, N. F., Florez-Sarasa, I., Ribas-Carbó, M., Fernie, A. R., Jiménez, A., & Sevilla, F. (2019). Coordinated responses of mitochondrial antioxidative enzymes, respiratory pathways and metabolism in *Arabidopsis thaliana* thioredoxin *trxo1* mutants under salinity. *Environmental and Experimental Botany*, 162(November 2018), 212–222.

<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.026>

Sánchez-Montesino, R., Bouza-Morcillo, L., Marquez, J., Ghita, M., Duran-Nebreda, S.,

- Gómez, L., ... Oñate-Sánchez, L. (2019). A Regulatory Module Controlling GA-Mediated Endosperm Cell Expansion Is Critical for Seed Germination in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 12(1), 71–85. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.10.009>
- Sandalio, L. M., & Romero-Puertas, M. C. (2015). Peroxisomes sense and respond to environmental cues by regulating ROS and RNS signalling networks. *Annals of Botany*, 116(4), 475–485. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv074>
- Schauer, N., Steinhäuser, D., Strelkov, S., Schomburg, D., Allison, G., Moritz, T., ... Kopka, J. (2005). GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Letters*, 579(6), 1332–1337. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.029>
- Scheibe, R., Backhausen, J. E., Emmerlich, V., & Holtgreve, S. (2005). Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *Journal of Experimental Botany*, 56(416), 1481–1489. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri181>
- Schlüter, U., Muschak, M., Berger, D., & Altmann, T. (2003). Photosynthetic performance of an Arabidopsis mutant with elevated stomatal density (sdd1-1) under different light regimes. *Journal of Experimental Botany*, 54(383), 867–874. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg087>
- Schmidtman, E., König, A. C., Orwat, A., Leister, D., Hartl, M., & Finkemeier, I. (2014). Redox regulation of Arabidopsis mitochondrial citrate synthase. *Molecular Plant*, 7(1), 156–169. <https://doi.org/10.1093/mp/sst144>
- Schnaubelt, D., Queval, G., Dong, Y., Diaz-Vivancos, P., Makgopa, M. E., Howell, G., ... Foyer, C. H. (2015). Low glutathione regulates gene expression and the redox potentials of the nucleus and cytosol in Arabidopsis thaliana. *Plant, Cell and Environment*, 38(2), 266–279. <https://doi.org/10.1111/pce.12252>
- Scholz, S. S., Malabarba, J., Reichelt, M., Heyer, M., Ludewig, F., & Mithöfer, A. (2017). Evidence for GABA-Induced Systemic GABA Accumulation in Arabidopsis upon Wounding. *Frontiers in Plant Science*, 8(March), 1–9.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00388>

- Schopfer, P. (2001). Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth. *The Plant Journal*, 28(6), 679–688.
- Schopfer, P., & Bechtold, M. (2002). Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta*, 214, 821–828. <https://doi.org/10.1007/s00425-001-0699-8>
- Schürmann, P., & Jacquot, J. (2000). Plant thioredoxin system revisited. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 51, 371–400.
- Scotto-Lavino, E., Du, G., & Frohman, M. A. (2007a). 3' end cDNA amplification using classic RACE. *Nature Protocols*, 1(6), 2555–2562. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.480>
- Scotto-Lavino, E., Du, G., & Frohman, M. A. (2007b). Amplification of 5' end cDNA with “new RACE.” *Nature Protocols*, 1(6), 3056–3061. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.479>
- Selinski, J., Hartmann, A., Deckers-Hebestreit, G., Day, D. A., Whelan, J., & Scheibe, R. (2017). Alternative Oxidase Isoforms Are Differentially Activated by Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates. *Plant Physiology*, 176(2), 1423–1432. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01331>
- Selinski, J., Scheibe, R., Day, D. A., & Whelan, J. (2018). Alternative Oxidase Is Positive for Plant Performance. *Trends in Plant Science*, 23(7), 588–597. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.03.012>
- Serrato, A. J., & Cejudo, F. J. (2003). Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta*, 217(3), 392–399. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1009-4>
- Serrato, A. J., Crespo, J. L., Florencio, F. J., & Cejudo, F. J. (2001). Characterization of two thioredoxins h with predominant localization in the nucleus of aleurone and

- scutellum cells of germinating wheat seeds. *Plant Molecular Biology*, 46(3), 361–371. <https://doi.org/10.1023/A:1010697331184>
- Serrato, A. J., Pérez-Ruiz, J. M., Spínola, M. C., & Cejudo, F. J. (2004). A novel NADPH thioredoxin reductase, localised in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(42), 43821–43827. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404696200>
- Seth, D., Hess, D. T., Hausladen, A., Wang, L., Wang, Y. Juan, & Stamler, J. S. (2018). A Multiplex Enzymatic Machinery for Cellular Protein S-nitrosylation. *Molecular Cell*, 69(3), 451-464.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.025>
- Sevilla, F., Camejo, D., Ortiz-Espín, A., Calderón, A., Lázaro, J. J., & Jiménez, A. (2015, May 1). The thioredoxin/peroxiredoxin/sulfiredoxin system: Current overview on its redox function in plants and regulation by reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 66, pp. 2945–2955. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv146>
- Sevilla, F., Jiménez, A., & Lázaro, J. J. (2015). What Do the Plant Mitochondrial Antioxidant and Redox Systems Have to Say Under Salinity, Drought, and Extreme Temperature? In *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-20421-5>
- Sevilla, F., Lopez-Gorgé, J., & Del Rio, L. A. (1982). Characterization of a Manganese Superoxide Dismutase from the Higher Plant *Pisum sativum*. *Plant Physiol*, 70, 1321–1326.
- Sevilla, F., Lopez Gorge, J., & Del Rio, L. A. (1982). Characterization of a manganese superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) from the higher plant *Pisum sativum* cultivar Lincoln. *Plant Physiology*, 70, 1321–1326.
- Sewelam, N., Jaspert, N., Van Der Kelen, K., Tognetti, V. B., Schmitz, J., Frerigmann, H., ... Maurino, V. G. (2014). Spatial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling specificity: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from chloroplasts and peroxisomes modulates the plant transcriptome differentially. *Molecular Plant*, 7(7), 1191–1210. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu070>

- Sgherri, C. L. M., Pinzino, C., & Navari-Izzo, F. (1996). Sunflower seedlings subjected to increasing stress by water deficit: Changes in O<sub>2</sub>- production Aated to the composition of thylakoid membranes. *Physiologia Plantarum*, *96*(3), 446–452. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00457.x>
- Shaikhali, J., Heiber, I., Seidel, T., Ströher, E., Hiltcher, H., Birkmann, S., ... Baier, M. (2008). The redox-sensitive transcription factor Rap2.4a controls nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin A and other chloroplast antioxidant enzymes. *BMC Plant Biology*, *8*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-48>
- Sheard, L. B., & Zheng, N. (2009). Signal advance for abscisic acid. *Nature*, *462*(12), 575. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1730>
- Shelp, B. J., Walton, C. S., Snedden, W. A., Tuin, L. G., Oresnik, I. J., & Layzell, D. B. (1995). Gaba shunt in developing soybean seeds is associated with hypoxia. *Physiologia Plantarum*, *94*(2), 219–228. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1995.tb05304.x>
- Shi, K., Li, X., Zhang, H., Zhang, G., Liu, Y., Zhou, Y., ... Yu, J. (2015). Guard cell hydrogen peroxide and nitric oxide mediate elevated CO<sub>2</sub>-induced stomatal movement in tomato. *New Phytologist*, *208*(2), 342–353. <https://doi.org/10.1111/nph.13621>
- Shimizu, S., & Mori, H. (1998). Changes in protein interactions of cell cycle-related genes during the dormancy-to-growth transition in pea axillary buds. *Plant and Cell Physiology*, *39*(10), 1073–1079. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029304>
- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, *58*(2), 221–227. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl164>
- Sierla, M., Waszczak, C., Vahisalu, T., & Kangasjärvi, J. (2016). Reactive Oxygen Species in the Regulation of Stomatal Movements. *Plant Physiology*, *171*(3), 1569–1580. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00328>
- Simons, B. H., Millenaar, F. F., Mulder, L., Van Loon, L. C., & Lambers, H. (1999). Enhanced Expression and Activation of the Alternative Oxidase during Infection of

- Arabidopsis with *Pseudomonas syringae* pv tomato. *Plant Physiology*, 120(2), 529–538. <https://doi.org/10.1104/pp.120.2.529>
- Singh, A., Yadav, A. K., Kaur, K., Sanyal, S. K., Jha, S. K., Fernandes, J. L., ... Pandey, G. K. (2018). A protein phosphatase 2C, AP2C1, interacts with and negatively regulates the function of CIPK9 under potassium-deficient conditions in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 69(16), 4003–4015. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery182>
- Smirnoff, N. (2018). Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine*, 122(November 2017), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033>
- Smirnoff, N., & Wheeler, G. L. (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35(4), 291–314. <https://doi.org/10.1080/07352680091139231>
- Smith, L. (1955). Spectrophotometric Assay of Cytochrome c Oxidase. *Methods of Biochemica Analysis*, 2, 427–434. <https://doi.org/10.1002/9780470110188.ch13>
- Song, Y., Miao, Y., & Song, C. P. (2014). Behind the scenes: The roles of reactive oxygen species in guard cells. *New Phytologist*, 201(4), 1121–1140. <https://doi.org/10.1111/nph.12565>
- Sponsel, V. M., & Hedden, P. (2004). Gibberellin biosynthesis and inactivation. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* (pp. 63–94). [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_4)
- Sridharamurthy, M., Kovach, A., Zhao, Y., Zhu, J. K., Xu, H. E., Swaminathan, K., & Melcher, K. (2014). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibits ABA-signaling protein phosphatase HAB1. *PLoS ONE*, 9(12), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113643>
- Stachel, S. E., Messens, E., Van Montagu, M., & Zambryski, P. (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 318(6047), 624–629. <https://doi.org/10.1038/318624a0>

- Stamler, J. S., Fang, F. C., & Santiago, L. (2001). Nitrosylation: The Prototypic Redox-Based Signaling Mechanism. *Cell*, *106*, 675–683.
- Stepien, P., & Johnson, G. N. (2009). Contrasting Responses of Photosynthesis to Salt Stress in the Glycophyte *Arabidopsis* and the Halophyte *Thellungiella*: Role of the Plastid Terminal Oxidase as an Alternative Electron Sink. *Plant Physiology*, *149*(2), 1154–1165. <https://doi.org/10.1104/pp.108.132407>
- Streller, S., & Wingsle, G. (1994). *Pinus sylvestris* L. needles contain extracellular CuZn superoxide dismutase. *Planta*, *192*(1994), 195–201.
- Ströher, E., Grassl, J., Carrie, C., Fenske, R., Whelan, J., & Millar, A. H. (2016). Glutaredoxin S15 Is Involved in Fe-S Cluster Transfer in Mitochondria Influencing Lipoic Acid-Dependent Enzymes, Plant Growth, and Arsenic Tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *170*(3), 1284–1299. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01308>
- Strzalka, W., & Ziemienowicz, A. (2007). Molecular cloning of *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding proliferating cell nuclear antigen. *Journal of Plant Physiology*, *164*(2), 209–213. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.04.009>
- Strzalka, W., & Ziemienowicz, A. (2011). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany*, *107*, 1127–1140. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq243>
- Sun, Z., Jin, X., Albert, R., & Assmann, S. M. (2014). Multi-level Modeling of Light-Induced Stomatal Opening Offers New Insights into Its Regulation by Drought. *PLoS Computational Biology*, *10*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003930>
- Suzuka, I., Daidoji, H., Matsuoka, M., Kadowaki, K., Takasaki, Y., Nakane, P. K., & Moriuchi, T. (1989). Gene for proliferating-cell nuclear antigen (DNA polymerase delta auxiliary protein) is present in both mammalian and higher plant genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(9), 3189–3193. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.9.3189>
- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., & Dong, X. (2008). Plant

- Immunity Requires Conformational Changes of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science*, 321(5891), 1–9.  
<https://doi.org/10.1126/science.1156970>.Plant
- Taji, T., Seki, M., Satou, M., Sakurai, T., Kobayashi, M., Ishiyama, K., ... Shinozaki, K. (2004). Comparative Genomics in Salt Tolerance between Arabidopsis and Arabidopsis-Related Halophyte Salt Cress Using Arabidopsis Microarray. *Plant Physiology*, 135(July), 1697–1709. <https://doi.org/10.1104/pp.104.039909>.1993
- Taldone, F. S., Tummala, M., Goldstein, E. J., Ryzhov, V., Ravi, K., & Black, S. M. (2005). Studying the S-nitrosylation of model peptides and eNOS protein by mass spectrometry. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 13(3), 176–187.  
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2005.06.004>
- Tamnanloo, F., Damen, H., Jangra, R., & Lee, J. S. (2018). MAP KINASE PHOSPHATASE1 Controls Cell Fate Transition during Stomatal Development. *Plant Physiology*, 178(1), 247–257. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00475>
- Tanou, G., Filippou, P., Belghazi, M., Job, D., Diamantidis, G., Fotopoulos, V., & Molassiotis, A. (2012). Oxidative and nitrosative-based signaling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress. *Plant Journal*, 72(4), 585–599. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05100.x>
- Tanudji, M., Djajanegara, I. N., Daley, D. O., McCabe, T. C., Finnegan, P. M., Day, D. A., & Whelan, J. (1999). The multiple alternative oxidase proteins of soybean. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26(4), 337–344. <https://doi.org/10.1071/PP98122>
- Tavares, C. P., Vernal, J., Delena, R. A., Lamattina, L., Cassia, R., & Terenzi, H. (2014). S-nitrosylation influences the structure and DNA binding activity of AtMYB30 transcription factor from Arabidopsis thaliana. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1844(4), 810–817.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.02.015>
- Taylor, M. G., & Vasil, I. K. (1991). Histology of, and physical factors affecting, transient

- GUS expression in pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) embryos following microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports*, 125, 120–125.
- Tcherkez, G., Cornic, G., Bligny, R., Gout, E., & Ghashghaie, J. (2005). In Vivo Respiratory Metabolism of Illuminated Leaves. *Plant Physiology*, 138(3), 1596–1606.  
<https://doi.org/10.1104/pp.105.062141>
- Thanh, T., Chi, V. T. Q., Omar, H., Abdullah, M. P., & Napis, S. (2012). Sequence analysis and potentials of the native RbcS promoter in the development of an alternative eukaryotic expression system using green microalga *Ankistrodesmus convolutus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 2676–2691.  
<https://doi.org/10.3390/ijms13032676>
- Thirkettle-Watts, D. (2003). Analysis of the Alternative Oxidase Promoters from Soybean. *Plant Physiology*, 133(3), 1158–1169.  
<https://doi.org/10.1104/pp.103.028183>
- Thompson, A. J., Jackson, A. C., Parker, R. A., Morpeth, D. R., Burbidge, A., & Taylor, I. B. (2000). Abscisic acid biosynthesis in tomato: Regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. *Plant Molecular Biology*, 42(6), 833–845.  
<https://doi.org/10.1023/A:1006448428401>
- Thompson, A. J., Mulholland, B. J., Jackson, A. C., McKee, J. M. T., Hilton, H. W., Symonds, R. C., ... Taylor, I. B. (2007). Regulation and manipulation of ABA biosynthesis in roots. *Plant, Cell and Environment*, 30(1), 67–78.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01606.x>
- Thornton, P. K., Ericksen, P. J., Herrero, M., & Challinor, A. J. (2014). Climate variability and vulnerability to climate change: A review. *Global Change Biology*, 20(11), 3313–3328. <https://doi.org/10.1111/gcb.12581>
- Todaka, D., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015). Recent advances in the dissection of drought-stress regulatory networks and strategies for development of drought-tolerant transgenic rice plants. *Frontiers in Plant Science*, 6(February), 1–

20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00084>
- Tognetti, V. B., Mühlenbock, P., & van Breusegem, F. (2012). Stress homeostasis - the redox and auxin perspective. *Plant, Cell and Environment*, 35(2), 321–333. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02324.x>
- Tolbert, N. E., Oeser, A., Kisaki, T., Hageman, R. H., & Yamazaki, R. K. (1968). Peroxisomes from spinach leaves containing enzymes related to glycolate metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 243(19), 5179–5184. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4386510>
- Traverso, J. A., Pulido, A., Rodríguez-García, M. I., & Alché, J. D. (2013). Thiol-based redox regulation in sexual plant reproduction: new insights and perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 4(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00465>
- Triantaphylidès, C., & Havaux, M. (2009). Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science*, 14(4), 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.01.008>
- Tripathi, B. N., Bhatt, I., & Dietz, K. J. (2009). Peroxiredoxins: A less studied component of hydrogen peroxide detoxification in photosynthetic organisms. *Protoplasma*, 235(1–4), 3–15. <https://doi.org/10.1007/s00709-009-0032-0>
- Turan, S., & Tripathy, B. C. (2015). Salt-stress induced modulation of chlorophyll biosynthesis during de-etiolation of rice seedlings. *Physiologia Plantarum*, 153(3), 477–491. <https://doi.org/10.1111/ppl.12250>
- Turkan, I. (2018). ROS and RNS: Key signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 69(14), 3313–3315. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery198>
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 552(2), 335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Tuteja, N. (2007). Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants. In *Methods in Enzymology* (Vol. 428). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)28024-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)28024-3)

- Tyburski, J., Dunajska, K., Mazurek, P., Piotrowska, B., & Tretyn, A. (2009). Exogenous auxin regulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism in roots of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings affecting the expression and activity of CuZn-superoxide dismutase, catalase, and peroxidase. *Acta Physiologiae Plantarum*, *31*(2), 249–260.  
<https://doi.org/10.1007/s11738-008-0225-8>
- Tyburski, J., Krzemiński, Ł., & Tretyn, A. (2008). Exogenous auxin affects ascorbate metabolism in roots of tomato seedlings. *Plant Growth Regulation*, *54*(3), 203–215.  
<https://doi.org/10.1007/s10725-007-9241-8>
- Uberti-Manassero, N. G., Lucero, L. E., Viola, I. L., Vegetti, A. C., & Gonzalez, D. H. (2012). The class i protein AtTCP15 modulates plant development through a pathway that overlaps with the one affected by CIN-like TCP proteins. *Journal of Experimental Botany*, *63*(2), 809–823. <https://doi.org/10.1093/jxb/err305>
- Ueoka-Nakanishi, H., Sazuka, T., Nakanishi, Y., Maeshima, M., Mori, H., & Hisabori, T. (2013). Thioredoxin h regulates calcium dependent protein kinases in plasma membranes. *FEBS Journal*, *280*(14), 3220–3231.  
<https://doi.org/10.1111/febs.12301>
- Umbach, A. L., Fiorani, F., & Siedow, J. N. (2005). Characterization of transformed *Arabidopsis* with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue. *Plant Physiology*, *139*(4), 1806–1820.  
<https://doi.org/10.1104/pp.105.070763>
- Umbach, A. L., Ng, V. S., & Siedow, J. N. (2006). Regulation of plant alternative oxidase activity: A tale of two cysteines. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1757*(2), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2005.12.005>
- Umbach, A. L., & Siedow, J. N. (1997). Changes in the redox state of the alternative oxidase regulatory sulfhydryl/disulfide system during mitochondrial isolation: Implications for inferences of activity in vivo. *Plant Science*, *123*(1–2), 19–28.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(96\)04564-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(96)04564-5)
- Umbreen, S., Lubega, J., Cui, B., Pan, Q., Jiang, J., & Loake, G. J. (2018). Specificity in nitric

- oxide signalling. *Journal of Experimental Botany*, 69(14), 3439–3448.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/ery184>
- Umezawa, T., Nakashima, K., Miyakawa, T., Kuromori, T., Tanokura, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). Molecular Basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses: Sensing, Signaling and Transport. *Plant and Cell Physiology*, 51(11), 1821–1839. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq156>
- Vainonen, J. P., Jaspers, P., Wrzaczek, M., Lamminmäki, A., Reddy, R. A., Vaahtera, L., ... Kangasjärvi, J. (2011). RCD1–DREB2A interaction in leaf senescence and stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal*, 442(3), 573–581.  
<https://doi.org/10.1042/bj20111739>
- Vandenabeele, S., Vanderauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidlitz, H. K., ... Van Breusegem, F. (2004). Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 39(1), 45–58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02105.x>
- Vanderauwera, S. (2005). Genome-Wide Analysis of Hydrogen Peroxide-Regulated Gene Expression in *Arabidopsis* Reveals a High Light-Induced Transcriptional Cluster Involved in Anthocyanin Biosynthesis. *Plant Physiology*, 139(2), 806–821.  
<https://doi.org/10.1104/pp.105.065896>
- Vanlerberghe, G. C. (2013). Alternative oxidase: A mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 6805–6847.  
<https://doi.org/10.3390/ijms14046805>
- Vanlerberghe, G. C., Martyn, G. D., & Dahal, K. (2016). Alternative oxidase: a respiratory electron transport chain pathway essential for maintaining photosynthetic performance during drought stress. *Physiologia Plantarum*, 157(3), 322–337.  
<https://doi.org/10.1111/ppl.12451>
- Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12870->

016-0771-y

- Vescovi, M., Zaffagnini, M., Festa, M., Trost, P., Lo Schiavo, F., & Costa, A. (2013). Nuclear Accumulation of Cytosolic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase in Cadmium-Stressed Arabidopsis Roots. *Plant Physiology*, *162*(1), 333–346. <https://doi.org/10.1104/pp.113.215194>
- Vieira Dos Santos, C., Laugier, E., Tarrago, L., Massot, V., Issakidis-Bourguet, E., Rouhier, N., & Rey, P. (2007). Specificity of thioredoxins and glutaredoxins as electron donors to two distinct classes of Arabidopsis plastidial methionine sulfoxide reductases B. *FEBS Letters*, *581*(23), 4371–4376. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.07.081>
- Viola, I. L., Guttlein, L. N., & Gonzalez, D. H. (2013). Redox Modulation of Plant Developmental Regulators from the Class I TCP Transcription Factor Family. *Plant Physiology*, *162*(3), 1434–1447. <https://doi.org/10.1104/pp.113.216416>
- Vogel, M. O., Moore, M., König, K., Pecher, P., Alsharafa, K., Lee, J., & Dietz, K.-J. (2014). Fast Retrograde Signaling in Response to High Light Involves Metabolite Export, MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6, and AP2/ERF Transcription Factors in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *26*(3), 1151–1165. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.121061>
- Wakasugi, N., Tagaya, Y., Wakasugi, H., Mitsui, A., Maeda, M., Yodoi, J., & Tursz, T. (2006). Adult T-cell leukemia-derived factor/thioredoxin, produced by both human T-lymphotropic virus type I- and Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes, acts as an autocrine growth factor and synergizes with interleukin 1 and interleukin 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(21), 8282–8286. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.21.8282>
- Wallström, S. V., Florez-Sarasa, I., Araújo, W. L., Escobar, M. A., Geisler, D. A., Aidemark, M., ... Rasmusson, A. G. (2014). Suppression of NDA-type alternative mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases in arabidopsis thaliana modifies growth and metabolism, but not high light stimulation of mitochondrial electron transport. *Plant and Cell Physiology*, *55*(5), 881–896. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu021>

- Wang, H., Liang, X., Huang, J., Zhang, D., Lu, H., Liu, Z., & Bi, Y. (2010). Involvement of ethylene and hydrogen peroxide in induction of alternative respiratory pathway in salt-treated *Arabidopsis* calluses. *Plant and Cell Physiology*, *51*(10), 1754–1765. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq134>
- Wang, M., Wang, Y., Sun, J., Ding, M., Deng, S., Hou, P., ... Chen, S. (2013). Overexpression of PeHA1 enhances hydrogen peroxide signaling in salt-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *71*, 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.06.020>
- Wang, P., Du, Y., Hou, Y.-J., Zhao, Y., Hsu, C.-C., Yuan, F., ... Zhu, J.-K. (2015). Nitric oxide negatively regulates abscisic acid signaling in guard cells by S-nitrosylation of OST1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(2), 613–618. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423481112>
- Wang, Y., Feng, H., Qu, Y., Cheng, J., Zhao, Z., Zhang, M., ... An, L. (2006). The relationship between reactive oxygen species and nitric oxide in ultraviolet-B-induced ethylene production in leaves of maize seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, *57*(1–2), 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.04.009>
- Wang, Y., Mopper, S., & Hasenstein, K. H. (2001). Effects of salinity on endogenous ABA, IAA, JA, and SA in *Iris hexagona*. *Journal of Chemical Ecology*, *27*(2), 327–342. <https://doi.org/10.1023/A:1005632506230>
- Wang, Y., Ying, Y., Chen, J., & Wang, X. (2004). Transgenic *Arabidopsis* overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance. *Plant Science*, *167*(4), 671–677. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.03.032>
- Wangensteen, O. S., Chueca, A., Hirasawa, M., Sahrawy, M., Knaff, D. B., & López Gorgé, J. (2001). Binding features of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase-thioredoxin interaction. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1547*(1), 156–166. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00178-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00178-9)
- Wanniarachchi, V. R., Dametto, L., Sweetman, C., Shavrukov, Y., Day, D. A., Jenkins, C. L. D., & Soole, K. L. (2018). Alternative respiratory pathway component genes (AOX

- and ND) in rice and barley and their response to stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms19030915>
- Warren, C. R., & Dreyer, E. (2006). Temperature response of photosynthesis and internal conductance to CO<sub>2</sub>: Results from two independent approaches. *Journal of Experimental Botany*, 57(12), 3057–3067. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl067>
- Waszczak, C., Akter, S., Jacques, S., Huang, J., Messens, J., & Van Breusegem, F. (2015). Oxidative post-translational modifications of cysteine residues in plant signal transduction. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2923–2934. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv084>
- Waszczak, C., Carmody, M., Kangasjärvi, J., Mhamdi, A., & Van Breusegem, F. (2018). Reactive oxygen species in plant development. *Annual Review of Plant Biology*, 69(19 February), 5.1–5.28. <https://doi.org/10.1242/dev.164376>
- Weber, A. P. M., & Bauwe, H. (2013). Photorespiration - a driver for evolutionary innovations and key to better crops. *Plant Biology*, 15(4), 621–623. <https://doi.org/10.1111/plb.12036>
- Weiner, J. J., Peterson, F. C., Volkman, B. F., & Cutler, S. R. (2010). Structural and Functional Insights into Core ABA Signaling. *Curr Opin Plant Biol.*, 185(2), 974–981. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.182>
- Weisiger, R. A., & Fridovich, I. (1973). Superoxide Dismutase: Organelle specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, 248(10), 3582–3592.
- Whelan, J., Millar, A. H., & Day, D. A. (1996). The alternative oxidase is encoded in a multigene family in soybean. *Planta*, 198(2), 197–201. <https://doi.org/10.1007/BF00206244>
- Wilkinson, S., & Davies, W. J. (2010). Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell and Environment*, 33(4), 510–525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02052.x>
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Montagu,

- M. Van, ... Camp, W. Van. (1997). Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C<sub>3</sub> plants. *The EMBO Journal*, 16(16), 4806–4816. Retrieved from <http://emboj.embopress.org/content/16/16/4806.abstract>
- Willekens, H., Inzé, D., Montagu, M. Van, & Camp, W. Van. (1995). Catalases in plants. *Molecular Breeding*, 1, 207–228.
- Williams, C. E., & Grotewold, E. (1997). Differences between Plant and Animal Myb Domains Are Fundamental for DNA Binding Activity, and Chimeric Myb Domains Have Novel DNA Binding Specificities. *Journal of Biological Chemistry*, 272(1), 563–571. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.1.563>
- Wu, Q., Lin, J., Liu, J. Z., Wang, X., Lim, W., Oh, M., ... Park, S. (2012). Ectopic expression of Arabidopsis glutaredoxin AtGRXS17 enhances thermotolerance in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 10(8), 945–955. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00723.x>
- Xia, X. J., Zhou, Y. H., Shi, K., Zhou, J., Foyer, C. H., & Yu, J. Q. (2015). Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2839–2856. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv089>
- Xiong, D., Flexas, J., Yu, T., Peng, S., & Huang, J. (2017). Leaf anatomy mediates coordination of leaf hydraulic conductance and mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> in *Oryza*. *New Phytologist*, 213(2), 572–583. <https://doi.org/10.1111/nph.14186>
- Xiong, D., Yu, T., Zhang, T., Li, Y., Peng, S., & Huang, J. (2015). Leaf hydraulic conductance is coordinated with leaf morpho-anatomical traits and nitrogen status in the genus *Oryza*. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 741–748. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru434>
- Xu, Z.-Y., Lee, K. H., Dong, T., Jeong, J. C., Jin, J. B., Kanno, Y., ... Hwang, I. (2012). A Vacuolar  $\alpha$ -Glucosidase Homolog That Possesses Glucose-Conjugated Abscisic Acid Hydrolyzing Activity Plays an Important Role in Osmotic Stress Responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(5), 2184–2199.

<https://doi.org/10.1105/tpc.112.095935>

Yang, X., & Lu, C. (2005). Photosynthesis is improved by exogenous glycinebetaine in salt-stressed maize plants. *Physiologia Plantarum*, *124*(3), 343–352.

<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00518.x>

Yang, Y., Yan, C. Q., Cao, B. H., Xu, H. X., Chen, J. P., & Jiang, D. A. (2007). Some photosynthetic responses to salinity resistance are transferred into the somatic hybrid descendants from the wild soybean *Glycine cyrtoloba* ACC547. *Physiologia Plantarum*, *129*(3), 658–669. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00853.x>

Yokoyama, R., Hirakawa, T., Hayashi, S., Sakamoto, T., & Matsunaga, S. (2016). Dynamics of plant DNA replication based on PCNA visualization. *Scientific Reports*, *6*(June), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep29657>

Yoshida, K., Noguchi, K., Motohashi, K., & Hisabori, T. (2013). Systematic exploration of thioredoxin target proteins in plant mitochondria. *Plant and Cell Physiology*, *54*(6), 875–892. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct037>

Yoshida, T., Mogami, J., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014). ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *21*, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.07.009>

Yu, M., Lamattina, L., Spoel, S. H., & Loake, G. J. (2014). Nitric oxide function in plant biology: A redox cue in deconvolution. *New Phytologist*, *202*(4), 1142–1156. <https://doi.org/10.1111/nph.12739>

Yu, Y., & Richardson, D. R. (2011). Cellular iron depletion stimulates the JNK and p38 MAPK signaling transduction pathways, dissociation of ASK1-thioredoxin, and activation of ASK1. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(17), 15413–15427. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.225946>

Yun, B. W., Feechan, A., Yin, M., Saidi, N. B. B., Le Bihan, T., Yu, M., ... Loake, G. J. (2011). S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature*, *478*(7368), 264–268. <https://doi.org/10.1038/nature10427>

- Zaffagnini, M., De Mia, M., Morisse, S., Di Giacinto, N., Marchand, C. H., Maes, A., ... Trost, P. (2016). Protein S-nitrosylation in photosynthetic organisms: A comprehensive overview with future perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1864(8), 952–966.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.02.006>
- Zaffagnini, M., Michelet, L., Massot, V., Trost, P., & Lemaire, S. D. (2008). Biochemical characterization of glutaredoxins from *Chlamydomonas reinhardtii* reveals the unique properties of a chloroplastic CGFS-type glutaredoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 8868–8876. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709567200>
- Zaffagnini, M., Morisse, S., Bedhomme, M., Marchand, C. H., Festa, M., Rouhier, N., ... Trost, P. (2013). Mechanisms of nitrosylation and denitrosylation of cytoplasmic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(31), 22777–22789.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.475467>
- Zafra, A., Rejón, J. D., Hiscock, S. J., & Alché, J. de D. (2016). Patterns of ROS Accumulation in the Stigmas of Angiosperms and Visions into Their Multi-Functionality in Plant Reproduction. *Frontiers in Plant Science*, 7(August), 1–7.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01112>
- Zahedi Avval, F., & Holmgren, A. (2009). Molecular mechanisms of thioredoxin and glutaredoxin as hydrogen donors for mammalian S phase ribonucleotide reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(13), 8233–8240.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M809338200>
- Zannini, F., Roret, T., Przybyla-Toscano, J., Dhalleine, T., Rouhier, N., & Couturier, J. (2018). Mitochondrial *Arabidopsis thaliana* TRXo Isoforms Bind an Iron–Sulfur Cluster and Reduce NFU Proteins In Vitro. *Antioxidants*, 7(10), 142.  
<https://doi.org/10.3390/antiox7100142>
- Zhang, C.-J., Zhao, B.-C., Ge, W.-N., Zhang, Y.-F., Song, Y., Sun, D.-Y., ... Guo, Y. (2011). An Apoplastic H-Type Thioredoxin Is Involved in the Stress Response through Regulation of the Apoplastic Reactive Oxygen Species in Rice. *Plant Physiology*,

157(4), 1884–1899. <https://doi.org/10.1104/pp.111.182808>

Zhang, H., Zhang, T. T., Liu, H., Shi, D. Y., Wang, M., Bie, X. M., ... Zhang, X. S. (2018).

Thioredoxin-Mediated ROS Homeostasis Explains Natural Variation in Plant Regeneration. In *Plant Physiology* (Vol. 176). <https://doi.org/10.1104/pp.17.00633>

Zhang, X., Zhang, L., Dong, F., Gao, J., Galbraith, D. W., & Song, C.-P. (2001). Hydrogen Peroxide Is Involved in Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure in *Vicia faba*. *Plant Physiology*, 126(4), 1438–1448. <https://doi.org/10.1104/pp.126.4.1438>

Zhang, Y., Zhu, H., Zhang, Q., Li, M., Yan, M., Wang, R., ... Wang, X. (2009). Phospholipase D 1 and Phosphatidic Acid Regulate NADPH Oxidase Activity and Production of Reactive Oxygen Species in ABA-Mediated Stomatal Closure in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 21(8), 2357–2377. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.062992>

Zheng, Y., Ding, Y., Sun, X., Xie, S., Wang, D., Liu, X., ... Zhou, D. X. (2016). Histone deacetylase HDA9 negatively regulates salt and drought stress responsiveness in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 67(6), 1703–1713. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv562>

Zhu, J.-K. (2002). SALT AND DROUGHT STRESS SIGNAL TRANSDUCTION IN PLANTS. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 247–273. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329>

Zhu, J. K. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, 167(2), 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>

# **ANEXOS**



## ANEXOS

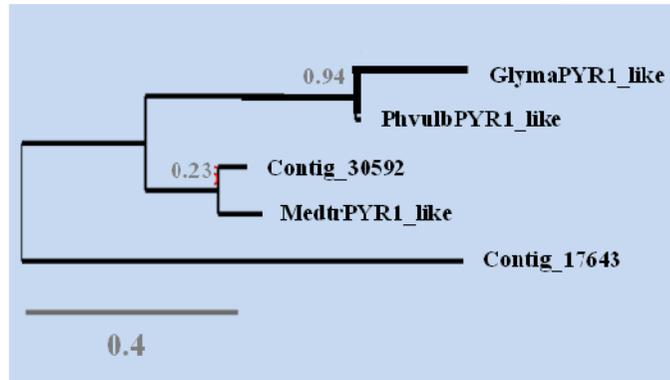
## Anexo1. TABLA DE PRIMERS

**Tabla S1. Oligonucleótidos utilizados en esta Tesis Doctoral.** Las secuencias en rojo señalan colas de recombinación o dianas de restricción que resultaron útiles para los clonajes. Las letras en negritas señalan el codón de stop, ausente en los oligos diseñados para el clonaje en fusiones con GFP.

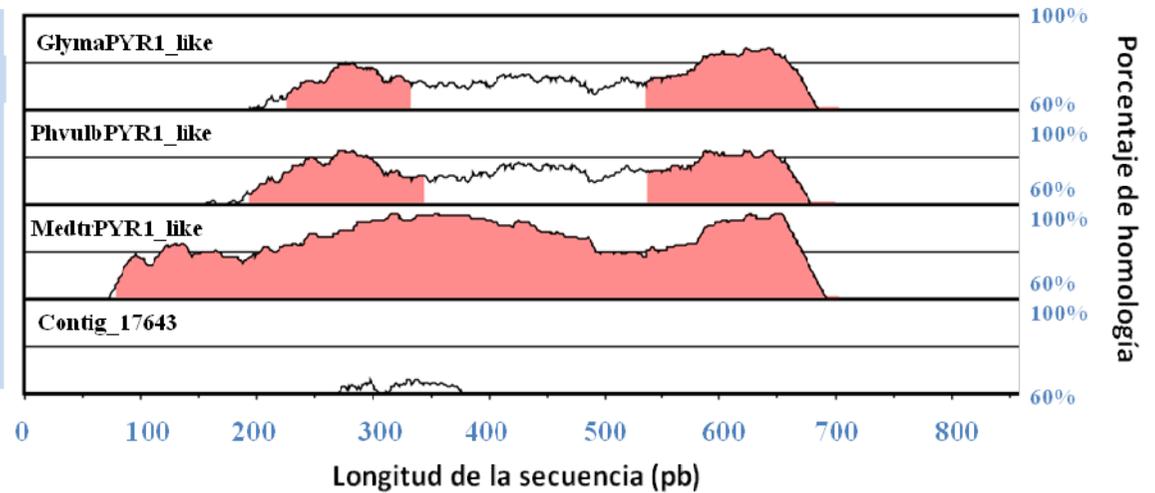
Nº ID	Nombre inserto	Secuencia	Utilidad
9	AtActina8 rev	TGCCTGGACCTGCTTCATC	Para comprobar presencia de DNAg
10	AtActina8 for	AGCTGCAGGGATCCACGAGA	Para comprobar presencia de DNAg
16	AtTrxo1 Salk_042792=N659374 for (2)	CCTCTGTTCCGGAAGCTGGAG	genotipado mutantes Attrxo1
17	AtTrxo1 Salk_042792 = N659374rev (2)	TTGCGCAAAGAGCCGTAAG	genotipado mutantes Attrxo1
55	AtTrxo1 Salk 143294c=N659590 for	AATCATCATCGTTGACTTGCC	no aparece en secuencia ni haciendo su reverso complementario
56	AtTrxo1 Salk 143294c=N659590 rev	ACACATCCACTTAGCGTGAGG	solo DNAg
215	LP AtTrxo2 SALK_107691.54.50.x	CAAACTTCACAAATCATGGC	genotipado mutante Attrxo2 LP+RP_PRODUCTSIZE_1232
216	RP AtTrxo2 SALK_107691.54.50.x	ACCATTGTACCACCATCAAGC	genotipado mutante Attrxo2; Lb1.3.+RP_PRODUCTSIZE 589-889
52	LBb1.3 rev	ATTTTGCCGATTCGGAAC	Para flanquear el T-DNA de inserción
137	M13 forw	CACGACGTGTAAAACGAC	PCR frente a vector pGEM
138	M13 rev	GGATAACAATTCACACAGG	PCR frente a vector pGEM
120	Qt-ADAPTER	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGACTCGAGCTCAAGC(T)17	Primers universales para amplificación de extremos 3' - 5' por RACE
121	QO-COLAS1	CCAGTGAGCAGAGTGACG	Primers universales para amplificación de extremos 3' - 5' por RACE
122	Q1-COLAS2	CAGGACTCGAGCTCAAGC	Primers universales para amplificación de extremos 3' - 5' por RACE
96	UAP-ADAPTER	GGCCACGCGTCTGACTAGTACCGGG55GGG55GGG55G	Amplificación inespecífica extremos Poli-C 5' cDNA
139	GSP1	CGCACACAACACCACCTAAC	Amplificación específica PsPYR1 extremo 3'
140	GSP2	GCTTCACAACGGTATCAGCA	Amplificación específica PsPYR1 extremo 5'
141	NGSP1	TGAAAGTCGGTGCACCAGA	Amplificación específica PsPYR1 extremo 3'
142	NGSP2	GCAAAAAGACGCGTATCCTC	Amplificación específica PsPYR1 extremo 5'
143	NNGSP1	CAATGTCATCTCCGGTCTCC	Amplificación específica PsPYR1 extremo 3'
144	NNGSP2	CAGAACAACCGTCCGGATCT	Amplificación específica PsPYR1 extremo 5'
147	RT-GSP 5' RACE	CATCAACTATATAAGAT	5' RACE PsPYR1 retrotranscripción
123	AtPYR1-ORF-XbaI Fw	AGTCTAGAAATGCCTTCGGAGTTAACACC	Clonación de ORF de AtPYR1 en vectores N/CGFP orientados en dirección XbaI-BamHI

124	AtPYR1-ORF-BamH1Rv	TCGGATCCTCACGTCACCTGAGAACCAC	Clonación de ORF de AtPYR1 en vectores N/CGFP orientados en dirección XbaI-BamHI
151	PsTrxo1_ORF_XbaIFw	AGTCTAGAATGGTTGGAACCAGAAATTTG	Clonación de ORF de PsTrxo1 en vectores N/CGFP orientados en dirección XbaI-BamHI
152	PsTrxo1_ORF-BamH1Rv	TCGGATCCTTAGTCCTTCTGAAGAGTT	Clonación de ORF de PsTrxo1 en vectores N/CGFP orientados en dirección XbaI-BamHI
153	AtTrxo1_ORF_XbaIFw	AGTCTAGAATGAAGGGAAATTGGTCGAT	Clonación de ORF de AtTrxo1 en vectores N/CGFP orientados en dirección XbaI-BamHI
154	AtTrxo1_ORF-BamH1Rv	TCGGATCCTCACTGTAGAGCTGTTCCA	Clonación de ORF de AtTrxo1 en vectores N/CGFP orientados en dirección XbaI-BamHI
155	AtTrxo1non-STOPBamH1Rv	TCGGATCCTTGTAGAGCTGTTCCATGA	Clonación de ORF de AtTrxo1 en vectores N/CGFP orientados en dirección XbaI-BamHI
156	PsTrxo1non-STOPBamH1Rv	TCGGATCCGTCCTTCTGAAGAGTTTCT	Clonación de ORF de PsTrxo1 en vectores N/CGFP orientados en dirección XbaI-BamHI
157	AtPYR1non-STOPBamH1Rv	TCGGATCCCGTCACCTGAGAACCCTT	Clonación de ORF de AtPYR1 en vectores N/CGFP orientados en dirección XbaI-BamHI
158	PsPYR1_ORF_XbaIFw	AGTCTAGAATGGAGAAAGCAGAGAGCT	Clonación de ORF de PsPYR1 en vectores N/CGFP orientados en dirección XbaI-BamHI
159	PsPYR1non-STOPBamH1Rv	TCGGATCCATGTGACTTACCGTACCCT	Clonación de ORF de PsPYR1 en vectores N/CGFP orientados en dirección XbaI-BamHI
172	PsPYR1_ORF-BamH1Rv	TCGGATCCCTAATGTGACTTACCGTCAC	Clonación de ORF de PsPYR1 en vectores N/CGFP orientados en dirección XbaI-BamHI
187	AtTrxo1gw_ORF_Fw	AAAAAAGCAGGCTTCATGAAGGGAAATTGGTCGAT	clonación gateway 1º PCR para posterior anidada
188	PsTrxo1gw_ORF_Fw	AAAAAAGCAGGCTTCATGGTTGGAACCAGAAATTTG	clonación gateway 1º PCR para posterior anidada
189	AtPYR1gw_ORF_Fw	AAAAAAGCAGGCTTCATGCCTTCGGAGTTAACACC	clonación gateway 1º PCR para posterior anidada
190	PsPYR1gw_ORF_Fw	AAAAAAGCAGGCTTCATGGAGAAAGCAGAGAGCT	clonación gateway 1º PCR para posterior anidada
191	AtTrxo1nSTPgw_Rv	CAAGAAAGCTGGGTCCTTGTAGAGCTGTTCCATGA	clonación gateway 1º PCR para posterior anidada
192	PsTrxo1nSTPgw_Rv	CAAGAAAGCTGGGTCGTCCTTCTGAAGAGTTTCT	clonación gateway 1º PCR para posterior anidada
193	AtPYR1nSTPgw_Rv	CAAGAAAGCTGGGTCGTCACCTGAGAACCCTT	clonación gateway 1º PCR para posterior anidada
194	PsPYR1nSTPgw_Rv	CAAGAAAGCTGGGTCATGTGACTTACCGTCCCGT	clonación gateway 1º PCR para posterior anidada
36	AttB1 cola 5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC	clonación gateway 2º PCR anidada
37	AttB2 cola 3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC	clonación gateway 2º PCR anidada

## Anexo 2. Análisis de ortólogos de PsPYR1.



**Figura S1:** Árbol filogenético de los ortólogos de PYR1 en leguminosas. Realizado con la aplicación: [phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/](http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/). Nº de acceso en base de datos phytozome: *Glycine max*ima (Glyma.01g097000); *Phaseolus vulgaris* (Phvul.003G285500); *Medicago truncatula* (Medtr5G030500).



**Figura S2:** Mapeo de secuencias conservadas (rosa >70% homología) entre los ortólogos de PYR1. Realizado con la aplicación: <http://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml>

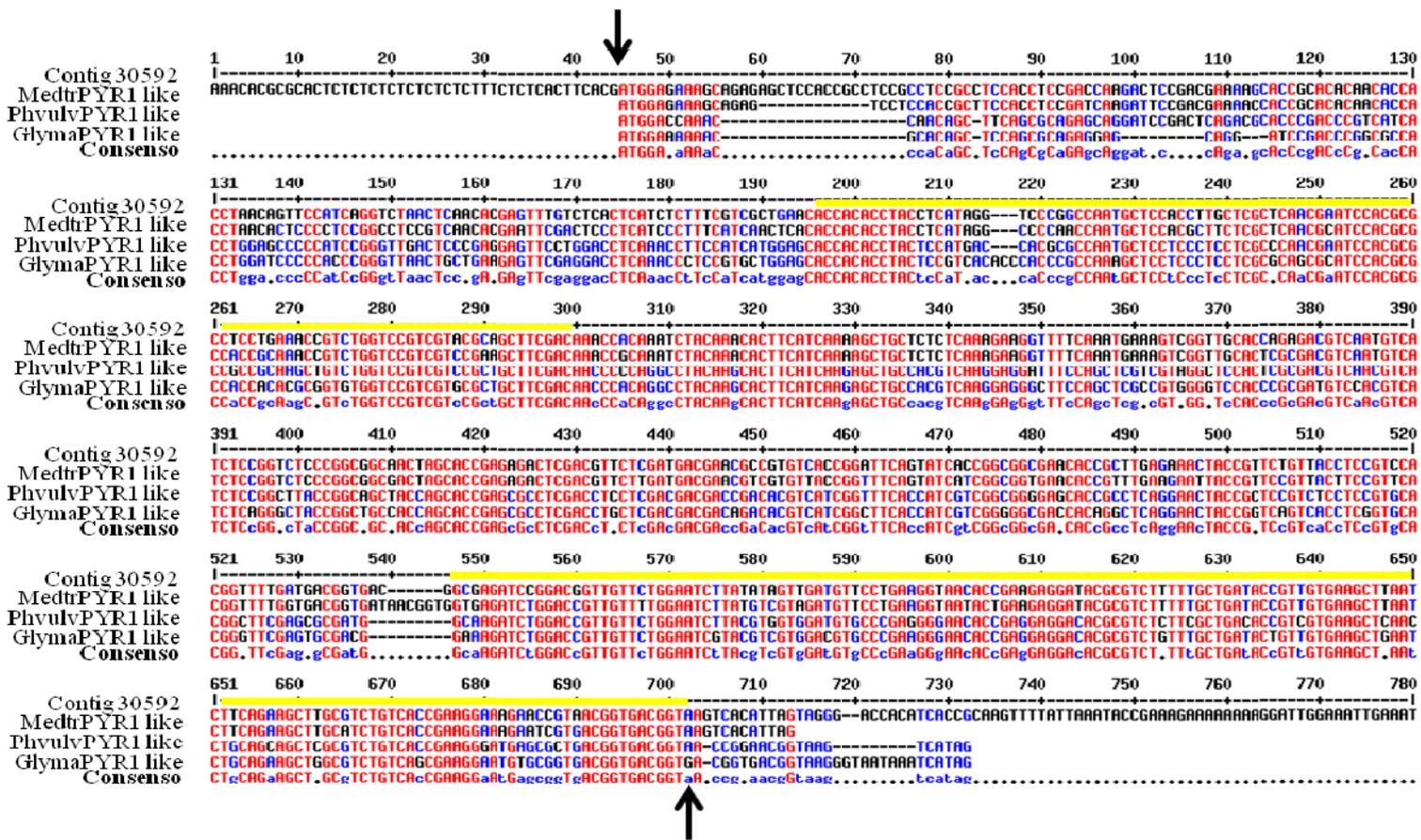


Figura S3: Alineamiento de secuencias entre los ortólogos de PYR1. En rojo las zonas conservadas en los cuatro genes, en azul en solo tres genes, en negro en menos de dos genes. En amarillo subrayamos las zonas más conservadas con más de un 70% de homología entre los ortólogos identificadas con el programa mvista. Las flechas indican el inicio y el fin más probable del ORF de PYR1. Realizado con la aplicación: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

### Anexo 3. Vectores.

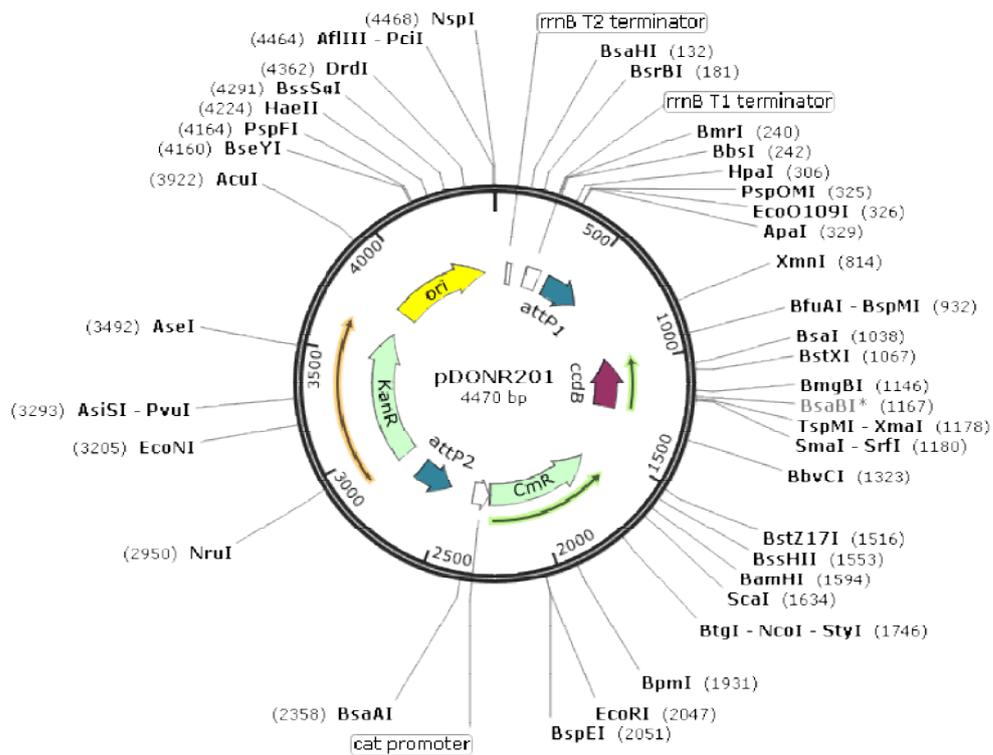
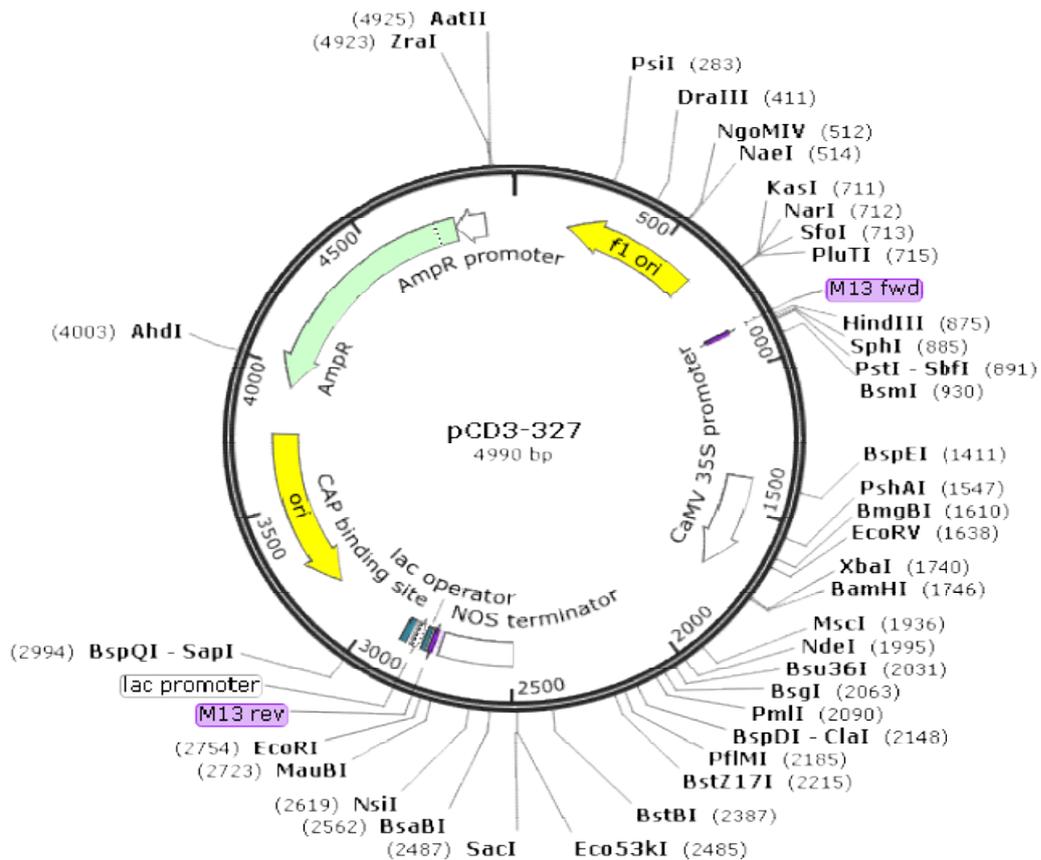
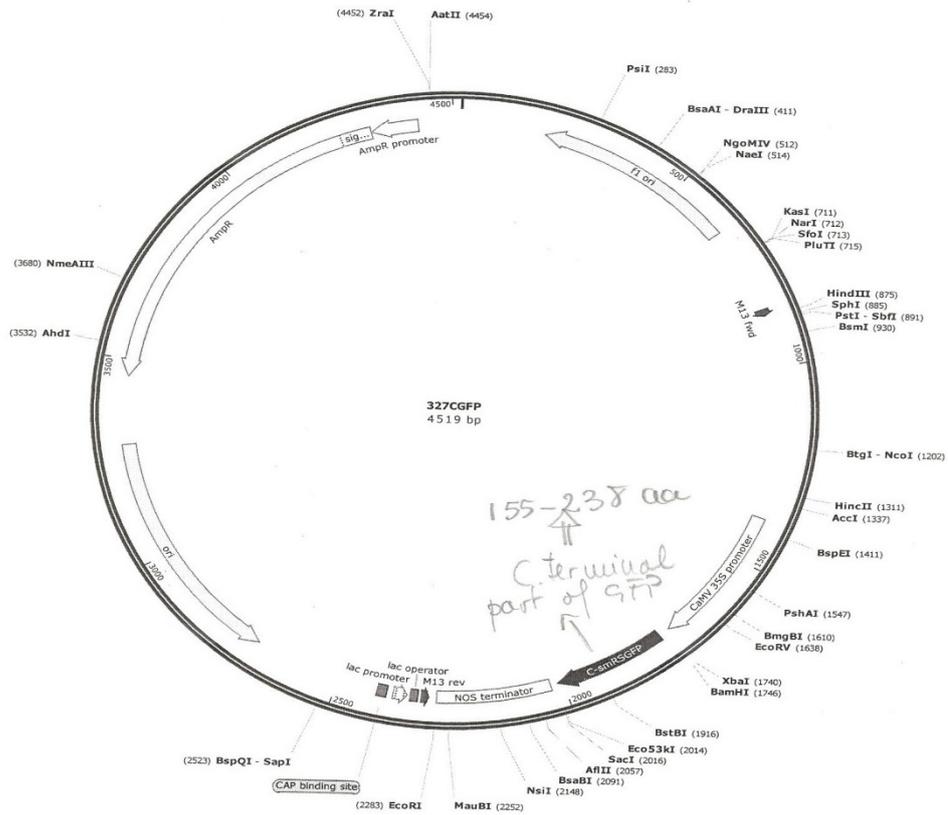


Figura S4. Vector pDONR201 usado para el subclonaje en sistema gateway.



**Figura S5. Vector pCD3-327 esquema básico a partir del cual se construyen los vectores pCD3-GFP; pCD3-RFP; pCD3-NGFP; pCD3-CGFP. Todos utilizados para la transformación y BiFC por biolística.**



**Figura S6. Vector pCD3-CGFP. Utilizado para BiFC por biolística**

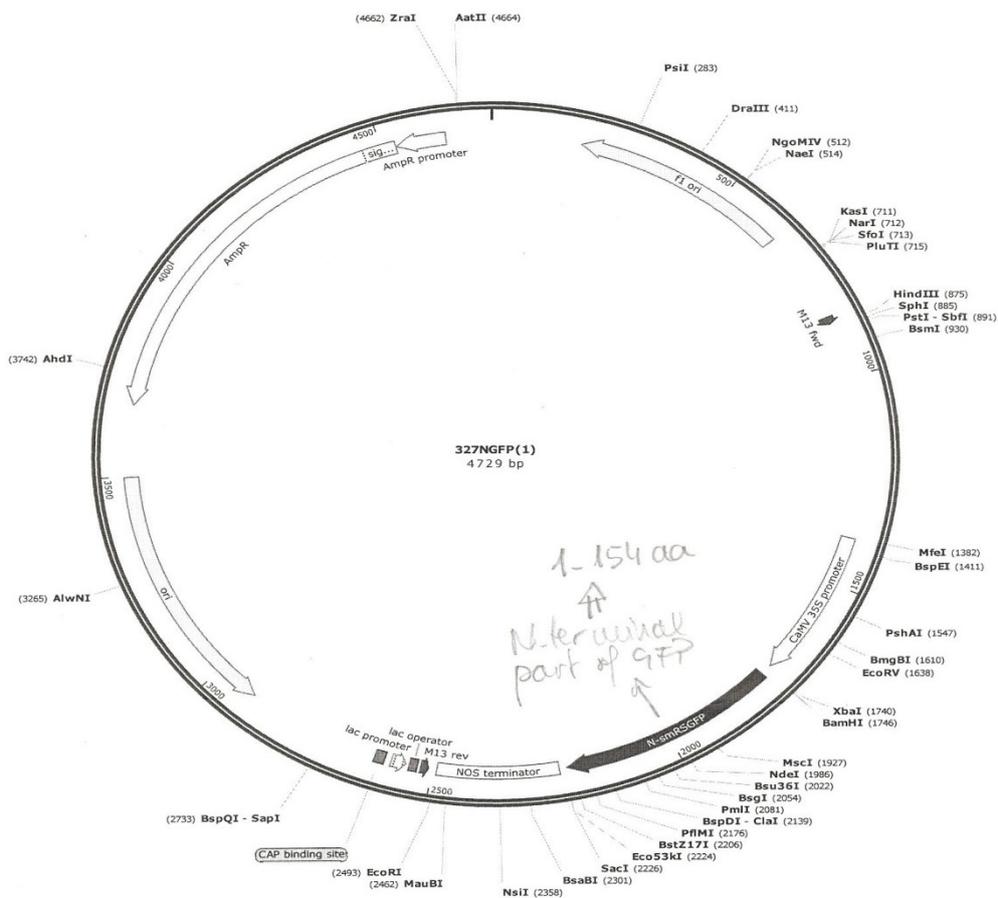
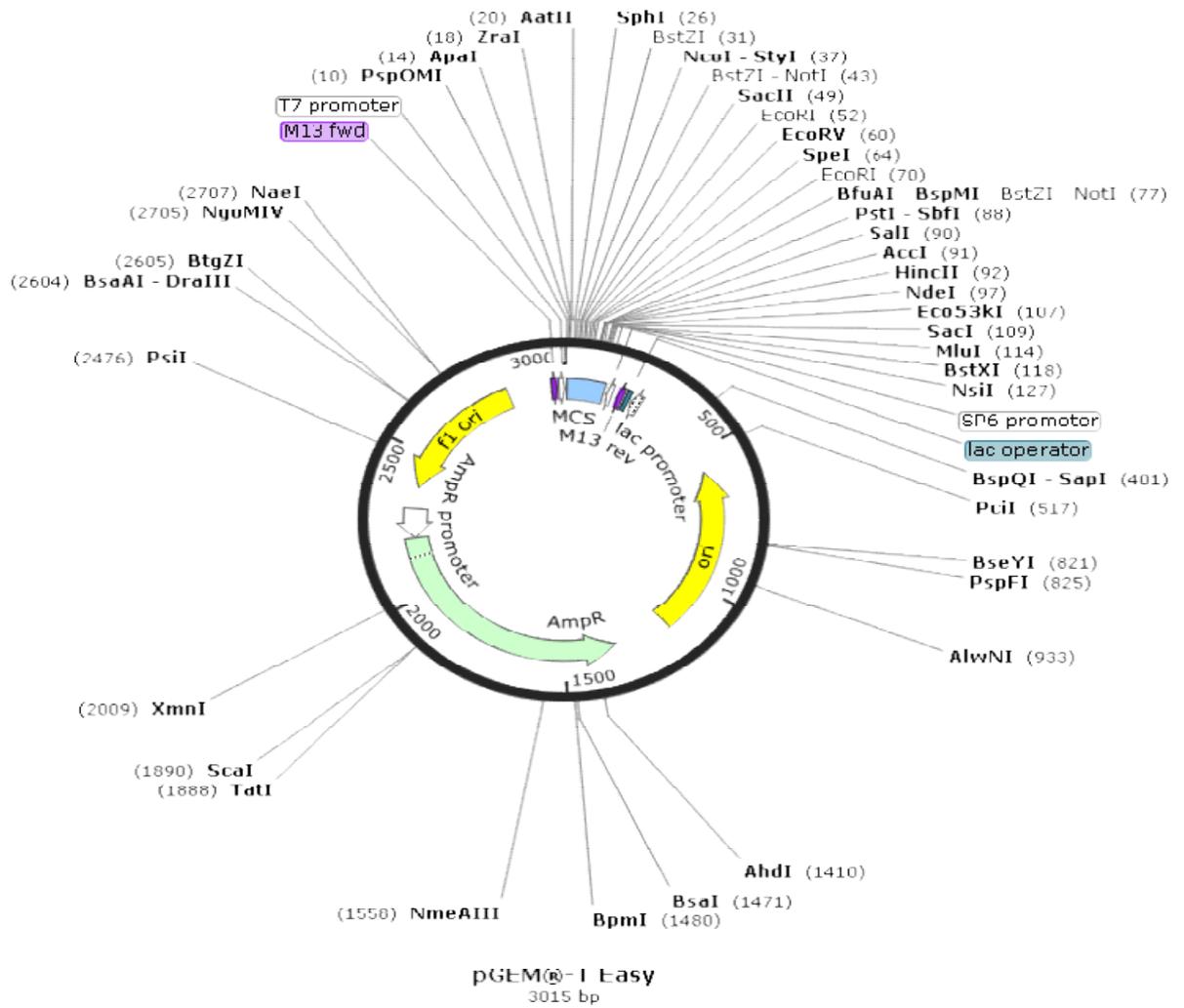
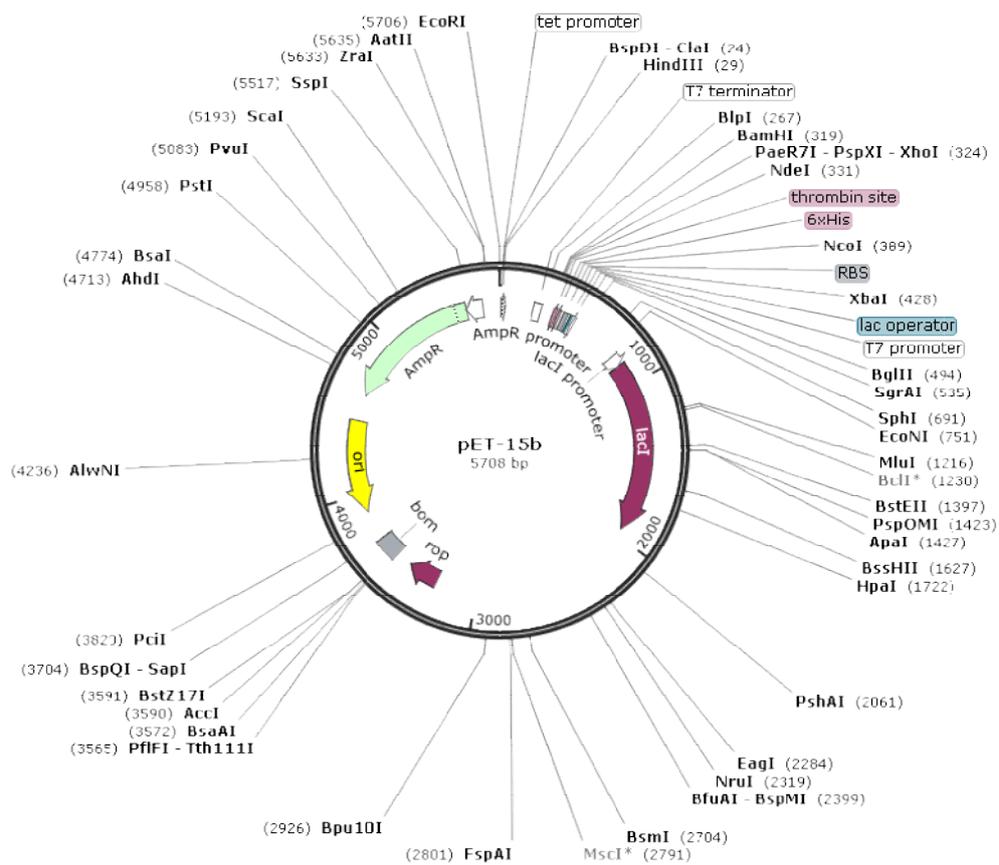


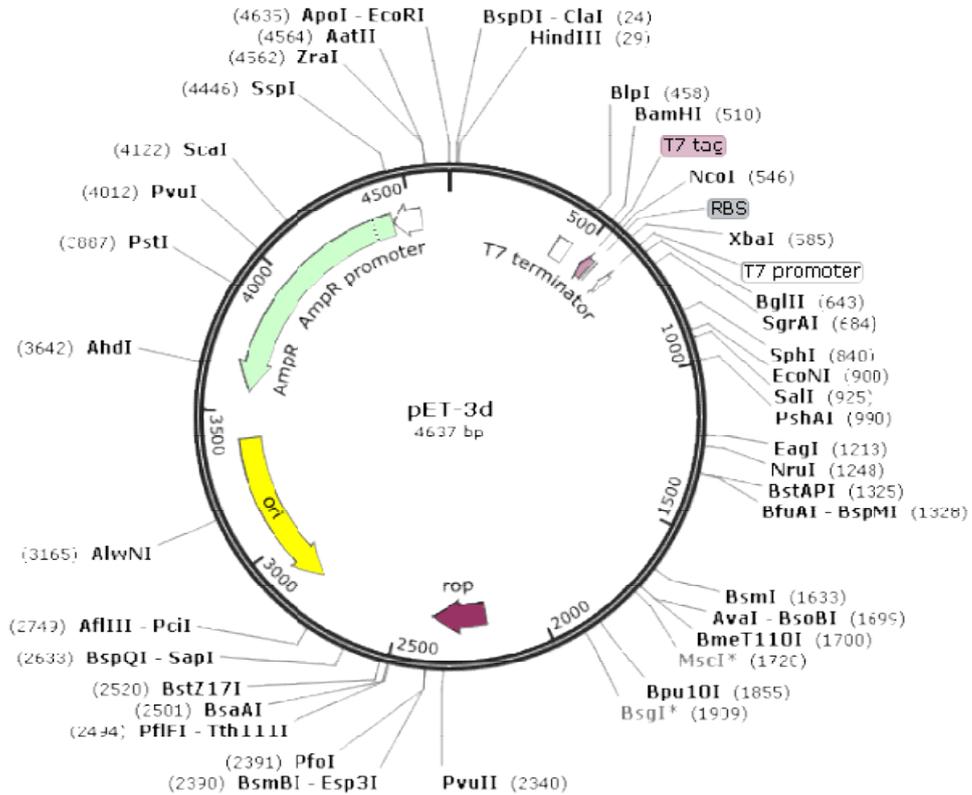
Figura S7. Vector pCD3-NGFP



**Figura S8.** Vector pGEM-T-Easy. Utilizado para el subclonaje en procesos de clonación convencional.



**Figura S9. Vector pET15b.** Utilizado para la expresión y obtención de la proteína recombinante PsTRXo1 con cola de Histidina (6xHis).



**Figura S9. Vector pET3d.** Utilizado para la expresión y obtención de la proteína recombinante PsTRXo1.