

Funció del peròxid d'hidrogen en l'aclimatació de *Cistus albidus* L. al dèficit hídric en condicions de camp. Relació estrès hídric-estrès oxidatiu

Tana Jubany Marí

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Facultat de Biologia
Departament de Biologia Vegetal

Funció del peròxid d'hidrogen en l'acimatació de
***Cistus albidus* L. al dèficit hídric en condicions de camp.**
Relació estrès hídric-estrès oxidatiu

Tana Jubany Marí
Barcelona, 2009

**Funció del peròxid d'hidrogen en l'aclimatació de
Cistus albidus L. al dèficit hídric en condicions de camp.
Relació estrès hídric-estrès oxidatiu**

Memòria presentada per Tana Jubany Marí per optar al títol de Doctora dins el programa de doctorat “La fisiologia de les plantes i l’ambient”, bienni 2000/2002, del departament de Biologia Vegetal de la Facultat de Biologia de La Universitat de Barcelona. Aquest treball ha esta realitzat en aquest departament, al *Department Biologie (Universiteit Antwerpen)* de Bèlgica i al *Department of Plant Biology (UC Berkeley)* dels Estats Units d’Amèrica sota la direcció de la Dra. Leonor Alegre Batlle i del Dr. Sergi Munné Bosch.

Codirectora

Codirector

Autora

Dra. Leonor Alegre Batlle

Dr. Sergi Munné Bosch

Tana Jubany Marí

**a la Lluïsa i la Fernandita,
que no hi podran ser**

**al Josep Lluís i la Glòria,
per ser-hi**

**al Martí i el Lluís,
perquè sí**

**No vayas a creer lo que te cuentan del mundo
en realidad el mundo es incontable
en todo caso es provincia de ti**

Mario Benedetti (*Las soledades de Babel*)

***CIENCIA: una manera de descubrir las cosas y
hacerlas funcionar. La Ciencia explica lo que
sucede a nuestro alrededor en todo momento. Lo
mismo hace la RELIGIÓN, pero la ciencia es
mejor porque cuando se equivoca ofrece excusas
más comprensibles. Hay mucha más Ciencia de lo
que uno imagina.***

***De Una enciclopedia científica para el joven
gnomo curioso, por Angalo de Mercería***

Terry Pratchett (*El éxodo de los gnomos*)

Agraïments	10
Llistat d'abreviatures	16
Introducció	20
1. Respostes de les plantes a l'estrès	
1.1. Concepte d'estrès	22
1.2. Model de Levitt	22
1.3. "Eustress" i "Distress"	23
1.4. Fases de l'estrès	24
1.5. Interacció entre estressos	24
1.6. Resitència i tolerància	25
1.7. Sequera i dèficit hídric	25
1.7.1. Respostes de les plantes a la sequera	26
1.8. Estrès oxidatiu	27
2. Peròxid d'hidrogen	29
2.1. Espècies actives de l'oxigen	29
2.2. Antioxidants	31
2.2.1. Àcid ascòrbic	31
2.2.1.1. AA i creixement	31
2.2.2. Cicle ascorbat glutatió	32
2.2.3. Catalasa	33
2.2.4. Peroxiredoxines	33
2.2.5. Superòxid dismutasa	33
2.3. Cicles de producció i eliminació de H ₂ O ₂ dins la cèl·lula vegetal	34
2.3.1. Mitochondri	34
2.3.2. Cloroplast	35
2.3.3. Peroxisoma	35
2.3.4. Plasmalema	36
2.3.5. Apoplast	36
2.4. Funció del peròxid d'hidrogen	38
2.4.1. Alleujament de cadenes de transport d'electrons sobrecarregades	38
2.4.2. Estructural	39
2.4.2.1. Diferenciació i lignificació de xilema	39
2.4.3. Transducció de senyals	40
2.4.3.1. H ₂ O ₂ i hormones	41
2.5. H ₂ O ₂ , AA i sequera	41

2.5.1.	H ₂ O ₂ , AA, i ABA	42
2.5.2.	H ₂ O ₂ , AA, i MeJA	43
3.	Regulació redox	44
3.1.	Proteïnes reguladores de l'estat redox	44
3.2.	Molècules no proteïques: parelles redox	45
3.3.	Proteïnes roGFP: un nou mètode per mesurar l'estat redox <i>in vivo</i>	46
3.3.1.	Proteïnes GFP	46
3.3.2.	Proteïnes roGFP	46
3.3.3.	Proteïnes roGFP en plantes	47
4.	Elecció del model experimental adequat	48
Objectius		50
Informe dels directors de la tesi del factor d'impacte dels articles publicats i participació de la doctoranda		54
Taula dels experiments realitzats		59
Resultats		63
1.	Capítol 1. <i>Estudis inicials I.</i> Localització de H ₂ O ₂ en una planta sensible a la sequera: H ₂ O ₂ i senescència	
	Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences in chloroplasts	65
2.	Capítol 2. <i>Estudis inicials II.</i> Localització de H ₂ O ₂ en dues plantes mediterrànies resistents a la sequera	
	Enhanced photo- and antioxidative protection, and hydrogen peroxide accumulation in drought-stressed <i>Cistus clusii</i> and <i>Cistus albidus</i> plants	91
3.	Capítol 3. Experiment <i>Variació anual.</i> El peròxid d'hidrogen està involucrat en l'acimatació de l'arbust mediterrani <i>Cistus albidus</i> L. a la sequera d'estiu.	
	Hydrogen peroxide is involved in the acclimation of the Mediterranean shrub, <i>Cistus albidus</i> L. to summer drought	119
4.	Capítol 4. Experiment <i>Estiu-tardor.</i> La coordinació de l'acumulació de metil jasmonat, H ₂ O ₂ i ascorbat durant el dèficit hídric i la recuperació en l'arbust mediterrani <i>Cistus albidus</i> L.	
	The timing of methyl jasmonate, H₂O₂ and ascorbate accumulation during water deficit and recovery in the Mediterranean shrub, <i>Cistus albidus</i> L.	149

5. Capítol 5. Relació estrès hídric-estrès oxidatiu. Utilització d'una proteïna GFP redox-sensible (c-roGFP1) per la monitorització a temps real de l'estat redox en plantes d'<i>Arabidopsis thaliana</i> sotmeses a estrès hídric	
Use of a redox-sensing GFP (c-roGFP1) for real-time monitoring of redox status in water-stressed <i>Arabidopsis thaliana</i> plants	175
Resum i discussió dels resultats	195
1. El H₂O₂ en l'acimatació de <i>Cistus albidus</i> a la sequera	196
1.1. Estudis inicials	197
1.1.1. El H ₂ O ₂ s'acumula en resposta a la sequera	197
1.1.1.1. Localització de H ₂ O ₂ a tres espècies mediterrànies arbustives amb diferents sensibilitats a la sequera	197
1.1.1.2. Quantificació de H ₂ O ₂ amb una tècnica semiquantitativa: variacions diürnes i estacionals a <i>C. clusii</i> i <i>C. albidus</i>	199
1.2. Estudi del H ₂ O ₂ en plantes de <i>C. albidus</i> crescudes en condicions de camp	200
1.2.1. Respostes de <i>C. albidus</i> a la sequera d'estiu	201
1.2.1.1. Relacions hídriques	201
1.2.1.2. Paràmetres de creixement	202
1.2.1.2.1. Caiguda de fulles	203
1.2.1.3. Fluctuacions de concentracions endògenes de H ₂ O ₂ induïdes per dèficit hídric	204
1.2.1.3.1. L'increment de H ₂ O ₂ durant la recuperació de les plantes WS	205
1.2.1.4. Localització de H ₂ O ₂ i ultraestructura	205
1.3. Funció del H ₂ O ₂ a fulles de <i>C. albidus</i> durant la sequera d'estiu	205
1.3.1. Efecte del H ₂ O ₂ a <i>C. albidus</i> : marcadors d'estrès oxidatiu	206
1.3.1.1. El H ₂ O ₂ no origina dany oxidatiu a <i>C. albidus</i>	206
1.3.1.2. H ₂ O ₂ i estat d'oxidació de l'ascorbat	207
1.3.2. Funció estructural del H ₂ O ₂	208
1.3.2.1. H ₂ O ₂ , lignina i creixement	208
1.3.2.2. H ₂ O ₂ i formació d'esclerènquima	209
1.3.3. H ₂ O ₂ com a transductor de senyals	210
1.3.3.1. H ₂ O ₂ i ABA	210
1.3.3.2. H ₂ O ₂ i MeJA	211
1.3.4. AA en relació a H ₂ O ₂ , ABA i MeJA	212
1.4. Esquema general dels resultats obtinguts	213
2. Relació estrès hídric-estrès oxidatiu a la planta model <i>A. thaliana</i>	215

2.1. Canvis en l'estat redox del citoplasma de cèl·lules foliars de plantes d' <i>A. thaliana</i> sotmeses a sequera gradual	215
Conclusions	219
Bibliografia	223
Annex I: Material i mètodes	247

Agraïments

Per fi...

Ha arribat el moment d'escriure els agraïments. Hi he pensat tantes vegades que ara em sembla que no sóc jo que els estic escrivint. Procuraré esmerçar-me perquè és la part que sé de bona tinta que tothom es llegirà. Si no hi sortiu procureu ser comprensius, que quan arribes a aquesta part ja tens dubtes si realment hi ha un món allà fora....

En primer lloc voldria començar per agrair-li tots aquest anys, que si els poses tots seguits són moltíssims, a l'Henar. Amb ella vaig descobrir la Físio Vegetal i ha actuat com a mestra i guia en molts aspectes, tant en els acadèmics com en els personals. Al Sergi també li agraeixo l'estímul que ha estat per mi en moltes ocasions, i li recordo que va ser ell, precisament, el que em va convèncer que comencés a fer els cursos de doctorat i després "ja veuria". Doncs ja veus, camí de ser doctoresa, ja falta molt poquet. Gràcies als dos!

I would like, as well, thank Dr. Prof. Els Prinsen for wellcoming me to her lab in Antwerpen Universiteit, and provide me all the material, techniques and time she could give. Thanks, also, to Sevgi Oden to teach me so nicely. It was in Antwerpen where I really learned how to move inside a lab. And many thanks to all the lab mates in there: Magda, Suzanne, Karim, Aga, Tim. And out there: Slavka, Stefan, Gulillem, Lidia i Miguel.

And thank you Dr. Prof. Lewis Feldman and Dr. Keni Jiang (dear Keni). You made me a home in UC Berkeley, and made me feel like a researcher when I really needed it. With you both I realised that the length between the idea and the fact is not so long, and that science is a really creative job. "That's the beginning of a beautiful, and shining (or maybe fluorescent), friendship". I al Marc, l'Eli i la Laura que em van ajudar molt a estar bé a tota la Bay Area.

I ara venen els companys del cole...Primer vull agrair-li a l'Iker totes les converses de ciència, i no tanta ciència, que hem tingut, tots els cops de mà que m'ha donat al laboratori i recordar-li que tenim un munt de cerveses pendants. A vere si ara que som tots dos doctors trobem un forat. Després vull agrair-li al Ricard (no et sorprenguis) perquè m'està ensenyant tot el que he après durant aquest temps i sé que el tinc allà per tot el que necessiti.

A la resta... bueno, ja us ho he dit però us ho repeteixo, sou el meu gran descobriment i no sé que hauria fet sense vosaltres aquest últim any. Entre tots fem

un equip eficient, caòtic, entranyable i divertit. Hem fet grupets (beixamels, sabonettes...) i grupassos (fisiogospel i algun grup jevi) i em sembla que hauria d'escriure una tesi doctoral per agrair-vos persona per persona, així que (com la xunga que sóc) us haureu de conformar amb que us enumeri per ordre alfabètic i després ho celebrem: Beth, Cristina, Fagua, Gemma (i Anabel), Guillem, Iker H, Isis, Jana, Juliana, Laia, Llorenç, Luis, Marta O, Marta P, Mercè G, Mireia, Ricard, Rubén, Salima i Samantha.

En aquest apartat també vull agrair a la resta de companys de departament en passat i present, com: Beatriz, Carmeta, Nuria Abat, Samir, Sergi Viadé, Toni Pardo, Cristina Agustí, Diana, Hamida, Santi, Iker A, Núria Roca, Eva Fernández, Eva Casanocas... I al professorat del departament que ensenyen dins i fora de les aules. I a les seces (Isabel i Mercè) i a la Carmen Cañueto, que fan que el departament funcioni.

Els nois dels Camps experimentals sempre tindran un raconet dins el meu cor: Jordi, Josep, Ricardo i Santi. Moltes gràcies al Ricardo, que si no m'haguessis donat la feina ho hauria tingut una mica negra per continuar la tesi. I moltes gràcies Josep, m'has ensenyat tot el que sé de com es comuniquen les plantes (t'ho dic molt sèria).

I en un altre racó tinc les noies de microscòpia electrònica (Núria, Almudena, Eva, Anita), que amb paciència de santes (molt especialment l'Almudena) m'han processat les mostres d'aquell material *tan* dur. Igual em trobeu a faltar a mi però sé de segur que a les meves mostres no.

I bé, fora de la facultat hi ha vida, ho sé perquè n'hi ha molts que m'ho heu recordat. Començant per les generacions de biòlegs que han passat per còrner, monolito, pou, etc. No us enumero perquè ja sabeu qui sou. Les caramelites, amigues, veïnes, companyes, germanes: Fanny i Magdala...i la Sònia, que m'ha passat més d'un cable tant en el sentit literal com en el figurat. La Rous allà a Lousiana. Les primes, els nens de Santako i Badalona. Al Joan per tot el que vam aprendre junts. Els de Cardedeu i la resta dels que viuen al Vallès.

I a la família, que estan allà, hi han estat i hi seran. Pares, mares, germans, cunyades, cosines, cosins, tietes, tiets i sobretot les tres joies: Laia, Paula i Guillem.

Ja he acabat!!!!!! Moltes gràcies a tots!!!!!!

Listat d'abreviatures

$^1\text{O}_2$ - singlet d'oxigen	H_2O_2 - peròxid d'hidrogen
AA - ascorbat	MDA - malondialdehid
APX - ascorbat peroxidasa	MDHA - monodehidroascorbat
CAT - catalasa	MDHAR - monodehidroascorbat reductasa
CHR - contingut hídric relatiu	MeJA - metil jasmonat / methyl jasmonate
DH- MeJA - di-hidro-methyl jasmonate	$\text{O}_2^{\cdot -}$ - ió superòxid
DHA - àcid dehidroascòrbic	OH^{\cdot} - ió hidroxil
DHAR - dehidroascorbat reductasa	PF - pes fresc
DPV - dèficit de pressió de vapor	PFD - photon flux density
DTT - ditiotreitòl	PS - pes sec
DW - dry weight	PT - pes turgent
EAO - espècies actives de l'oxigen	RWC - relative water content
EM - electron microscope	SOD - superòxid dismutasa
Fv/Fm - eficiència màxima del PSII	TW - turgid weight
FW - fresh weight	VPD - vapour pressure deficit
GR - glutatió reductasa	WS - water stressed
GSH - glutatió	WW - well watered
GSH - glutatió reduït	Ψ - potencial hídric
GSSG - glutatió oxidat	
H - hidratació	

1. Respostes de les plantes a l'estrès

1.1. Concepte d'estrès

El concepte original d'estrès aplicat als organismes vius el va desenvolupar Selye (1936), que va enunciar que qualsevol factor pot esdevenir estressant i que davant d'un estrès o factor estressant existeixen respostes específiques i respostes no específiques generals. L'any 1980 Levitt a més de definir el terme estrès com “qualsevol factor ambiental potencialment desfavorable per als organismes vius”, va aplicar el concepte d'estrès a les plantes. Estrès també es pot definir com una “desviació significativa de condicions òptimes per la vida que provoca canvis i respostes a tots els nivells funcionals dels organismes” (Larcher 2003). Parlem d'estrès biòtic quan està provocat per un altre organisme viu, i parlem d'estrès abiòtic quan està imposat per les condicions físiques i químiques del medi ambient. El estressos biòtics que afecten les plantes són l'atac per part de patògens, paràsits, herbivoria, competència... Alguns estressos abiòtics són el dèficit hídric, l'excés de llum, el fred, deficiències nutricionals i els contaminants (Lichtenthaler 1996, Schulze et al. 2005, Larcher 2003, Bray 2000). Davant l'estrès una planta pot ser resistent o sensible. La resposta de la planta depèn de les seves característiques morfològiques, fisiològiques, de la presència d'altres estressos i de la duració i severitat de l'estrès (Lichtenthaler 1996, Larcher 2003).

Pràcticament tots els processos fisiològics es veuen influïts per l'estrès (Alscher 1990) i per tant és difícil resumir-los. La problemàtica resideix en el significat de les variacions fisiològiques i moleculars que tenen lloc a les plantes com a resposta a l'estrès, cal saber si són purament una conseqüència de l'estrès o tenen algun significat en l'aclimatació/adaptació de les respostes de les plantes a l'estrès. Encara se sap molt poc sobre la percepció de l'estrès abiòtic a nivell molecular i la seva mesura en l'estudi de la fisiologia de les plantes sotmeses a estrès (Schulze et al. 2005). La resposta de les plantes davant un estrès imposat és determinant per a la seva supervivència, i en molts casos es dona estrès oxidatiu (Apel and Hirt 2004).

1.2. Model de Levitt

El model de Levitt (1980) presenta un concepte físic de l'estrès, on l'estrès és mesurat com la força necessària per produir una unitat de canvi que depèn de la força aplicada i de la deformació del cos sobre la qual s'aplica la força. En la equació 1 es presenta l'explicació matemàtica del model. La deformació del cos sota una força poc intensa té una resposta elàstica, però si la força s'intensifica pot arribar un moment en el qual la resposta és plàstica. Una resposta o deformació elàstica és una resposta reversible, un cop es deixa d'aplicar la força el cos torna a la seva forma original. La resposta plàstica, en canvi, és irreversible, el cos, encara que deixi d'aplicar-se la força, queda deformat, en aquest cas es podria parlar de dany.

$$M = \frac{\text{força}}{\text{deformació}} = \frac{\text{estrès}}{\text{resposta}}$$

Equació 1. M és el mòdul d'elasticitat, que també pot ser considerat una mesura de la resistència del cos sobre el qual s'aplica l'estrès (o força), la resposta és la deformació del cos.

En un sistema físic es té en compte només la intensitat de l'estrès i la deformació del cos, però en un sistema biològic cal tenir en compte altres factors que influiran en M, o la resistència a l'estrès, com ara la duració i la periodicitat de l'estrès, la interacció amb altres estressos, la capacitat de l'organisme que el rep de reparar-lo i l'aclimatació de l'organisme a l'estrès (Schulze et al. 2005).

En un sistema biològic la quantitat d'estrès aplicada sobre un cos és el producte entre la intensitat i la duració de l'estrès. Un estrès poc intens pot esdevenir un dany si dura massa temps, en altres paraules: passaria de ser una resposta elàstica a ser una resposta plàstica. Tot i això, si un organisme es capaç de reparar el dany, aleshores la deformació plàstica passaria a ser elàstica. L'aclimatació de la planta a l'estrès és un altre factor a tenir en compte en un sistema biològic, doncs un organisme és capaç de modificar el seu metabolisme per resistir a un estrès. Aleshores es parla d'enduriment. La periodicitat de l'estrès o, dit d'una altra manera, la recurrència fa que una planta tingui períodes d'enduriment i períodes de retorn a les condicions pre-estrès. Normalment, els organismes que viuen en ambients d'estrès recurrent, estan adaptats a aquest ambient. Generalment, en la naturalesa un estrès pot interaccionar amb algun altre estrès, en l'anomenada interacció d'estressos o multiplicitat d'estressos (Schulze et al. 2002).

1.3. “Eustress” i “Distress”

L'any 1987 Larcher va desenvolupar un nou concepte d'estrès incorporant els conceptes de resposta plàstica i resposta elàstica. En aquest concepte es parla de l'estrès beneficiós (*eustress*) i un estrès perjudicial (*distress*). La dinàmica d'aquests dos conceptes defineix el *distress* com un component desestabilitzador i destructiu, contraposat a mesures d'estabilització que és l'*eustress* (Larcher 2003).

Lichtenthaler (1996) va continuar desenvolupant aquests dos conceptes on defineix l'*eustress* com un estrès estimulant i un element positiu pel desenvolupament de la planta. El *distress*, en canvi és un estrès sever i real que causa dany.

L'*eustress* es comparable a l'estrès moderat que “activa el metabolisme cel·lular, incrementa l'activitat fisiològica de la planta, i no provoca efectes danyosos encara que es prolongui en el temps” (Lichtenthaler 1996). *Distress* és equivalent a estrès sever, que pot ser causat per una

major aplicació d'estrès, d'un estrès moderat aplicat durant massa temps o d'una interacció entre dos o més estressos.

És més comú l'aplicació dels termes estrès moderat i estrès sever, i a efectes pràctics la diferència entre estrès moderat i estrès sever radica en la recuperació de la planta un cop es deixa d'aplicar l'estrès. Si la seva recuperació és completa, els paràmetres mesurats són iguals que els paràmetres pre-estrès, es parla d'estrès moderat. Si la planta ha mort o no es recupera, els paràmetres no tornen a la seva posició original, es considera que hi hagut dany i ja es parla d'estrès sever.

1.4. Fases de l'estrès

La resposta de les plantes a l'estrès passa per diverses fases en el temps (Larcher 2003) que s'han de tenir en compte per aprofundir en la comprensió de les respostes de les plantes a l'estrès:

Fase d'alarma: l'establiment d'una pertorbació provoca una desestabilització de les condicions estructurals i funcionals necessàries per a la consecució d'activitats vitals normals. En aquesta fase se sol dividir en dues parts. La reacció a l'estrès, en la qual el catabolisme predomina sobre l'anabolisme; i la restitució del metabolisme, que s'aconsegueix quan la intensitat de l'estímul no canvia i la planta presenta processos de reparació com la síntesi de proteïnes i substàncies protectores.

Fase de resistència: és la conseqüència de la restitució del metabolisme en la fase d'alarma, la planta s'ha ajustat a la nova situació i d'alguna manera l'ha normalitzada. La resistència de la planta incrementa davant la continuïtat de l'estrès i s'endureix. L'enduriment pot durar un temps després que la pertorbació hagi finalitzat.

Estat d'exhauriment: si l'estrès persisteix durant massa temps, o la seva intensitat augmenta, la planta és vulnerable davant altres estressos i finalment mor (*distress*).

Fase de regeneració: és l'alternativa a la fase de l'exhauriment en que l'estrès o pertorbació era temporal. En quan deixa d'aplicar-se damunt la planta, aquesta retorna al seu estat funcional original i qualsevol dany ocorregut es repara. La planta es recupera, i probablement, ha millorat la seva resistència a l'estrès al qual ha estat sotmesa (enduriment, aclimatació, *eustress*).

1.5. Interacció entre estressos

A la natura un estrès sol acompanyar a un altre factor estressant, això es defineix com multiplicitat d'estressos (Schulze et al 2005; Larcher 2003). L'exposició a un estrès provoca en la planta que el rep vulnerabilitat a altres estressos, en l'anomenada interacció d'estressos. Un exemple molt clar és la manca d'aigua o el fred en presència de llum. En aquestes condicions el metabolisme de la planta (fotosíntesi, respiració...) disminueix de manera ostensible; així que la llum que rep, que en altres condicions seria beneficiosa o com a mínim útil per a la síntesi de

carbohidrats, es converteix en un excés d'energia d'excitació, que en la planta es rep com un estrès, que unit a l'altre estrès pot provocar danys més o menys irreversibles o irreparables (Schulze et al. 2005).

En altres casos de la interacció entre estressos l'exposició prèvia a un estrès pot originar resistència a un altre tipus d'estrès. Per exemple, els mecanismes de resistència a la manca d'aigua són molt similars als mecanismes de resistència al fred i si s'exposa una planta al fred és probable que resisteixi millor a la manca d'aigua quan se l'exposi a aquest estrès abiòtic, aleshores es parla de resistència creuada (Pastori i Foyer 2002).

1.6. Resistència i tolerància

La resposta de les plantes a l'estrès depèn en gran mesura de les característiques de l'estrès, però també depèn molt de les característiques de la planta que les rep. Davant un estrès determinat una planta pot ser sensible o resistent.

Una planta és sensible a l'estrès quan aquest representa un dany, i si dura massa temps, que pot ser relativament curt, la planta mor. Les plantes resistents són aquelles capaces de sobreviure a l'estrès. Aquestes plantes resisteixen l'estrès tolerant-lo o evitant-lo. Generalment, la resposta d'evitar és més freqüent, si bé les plantes poden utilitzar simultàniament els dos tipus de respostes. Per exemple, una planta tolerant a un estrès l'està evitant a nivell cel·lular (Bray 2000).

Dins les plantes resistents a un estrès o ambient estressant, o que viuen en un ambient amb un estrès estacional hi ha plantes adaptades a aquest estrès, i plantes que s'aclimaten a l'anomenat estrès. La diferència entre adaptació i aclimatació és subtil però molt important en la comprensió de les respostes de les plantes a l'estrès. L'adaptació es refereix al genotip de les plantes, als caràcters hereditaris que han fet que aquesta planta sigui capaç de sobreviure en condicions adverses, generalment l'adaptació a un estrès està molt relacionada amb la tolerància a aquest estrès. L'aclimatació, en canvi, fa més referència al fenotip, que pot tenir origen genotípic o ambiental. Dit d'una altra manera, són canvis que la planta presenta quan està sotmesa a un estrès, ja sigui funcional o estructural (Bray 2000). Aquests canvis no són hereditaris però poden persistir en la planta (resistència adquirida), tot i que hi ha plantes adaptades a un estrès que presenten mecanismes d'aclimatació per resistir-lo.

Les hormones i altres missatgers químics com el calci i espècies actives de l'oxigen (EAO), coordinen les respostes de les plantes a l'estrès (Larcher 2003).

1.7. Sequera i dèficit hídric

La sequera és una condició meteorològica marcada per períodes on hi ha poques, si n'hi ha, precipitacions. La sequera pot ser transitòria o prolongada i provoca que la disponibilitat d'aigua al sòl per al creixement de les plantes sigui baixa i provoqui dèficit hídric. El dèficit hídric és

estrès hídric per manca d'aigua, i si no es diu el contrari estrès hídric signifoca dèficit hídric. El dèficit hídric es dona en plantes quan la transpiració per les fulles és superior a l'absorció d'aigua per les arrels, provocant estrès hídric. El dèficit hídric es pot donar en plantes sotmeses a diversos factors estressants com la manca d'aigua al sòl (sequera), l'estrès salí, l'estrès osmòtic o el fred (Bray 1997). Molts factors afecten la resposta de les plantes a una deficiència d'aigua provocada per la sequera, com la taxa d'establiment de l'estrès i la possibilitat que la planta estigui aclimatada al dèficit hídric per una exposició prèvia a aquest tipus d'estrès (Bray et al. 2000). També depèn de l'hàbitat de la planta, de la profunditat i l'extensió del sistema radicular, de la taxa de transpiració i les propietats físico-químiques del sòl (Pereira i Chaves 1995); a més de la duració i la severitat de l'estrès (Larcher 2003).

1.7.1. Respostes de les plantes a la sequera

Les respostes de la planta a la sequera depenen tant de l'espècie com de la duració i la severitat del dèficit hídric, l'edat i l'estadi de desenvolupament, l'òrgan, el tipus cel·lular i el compartiment subcel·lular. Algunes plantes són molt sensibles al dèficit hídric i es marceixen (pèrdua de turgència) i d'altres són resistents. Les plantes poden resistir la sequera tolerant l'estrès o evitant-lo. Els mecanismes de tolerància solen ser inherents a la pròpia planta. Els mecanismes per evitar la sequera poden ser mecanismes a nivell de la planta sencera o a nivell cel·lular (Bray 1997).

Tot i que hi ha plantes que toleren la dessecació d'algunes o totes les seves cèl·lules, teixits i òrgans, la majoria de les plantes que viuen en ambients secs no són tolerants a la dessecació i han desenvolupat mecanismes per evitar la deshidratació de les seves cèl·lules (Pereira and Chaves 1993, 1995).

Les plantes que sobreviuen durant el període d'aridesa estival solen tenir estratègies similars per afrontar la combinació de dèficit hídric, altes radiacions i altes temperatures. El primer punt a tenir en compte és que l'establiment del dèficit hídric és gradual i que, abans d'afrontar la deshidratació de les fulles, les plantes són capaces de percebre la disminució de la humitat edàfica (Davies i Pereira 1992, Pereira i Chaves 1993, Schulze 1982). Aquest progrés en el dèficit hídric, permet que les plantes s'aclimatin a la sequera estival prenent mesures per evitar-la i/o afrontar-la, depenent de l'espècie, abans que aquesta arribi al punt de més severitat (Pereira i Chaves 1993, 1995), en altres paraules, el dèficit hídric gradual permet a les plantes aclimatar-se a la sequera.

La primera mesura que presenten la gran majoria de les espècies és aturar l'expansió foliar mentre les arrels continuen expandint-se (Pereira i Chaves 1993, 1995, Westgate i Boyer 1985, Sharp et al 1988, Nonami i Boyer 1990, Spollen et al 1993). D'aquesta manera redueixen la transpiració, augmenten la capacitat de conducció d'aigua (Larcher 2003) i permet l'absorció de l'aigua de les capes més profundes del sòl (Bartels i Sunkar 2005) a més disminueix la quantitat de radiació incident, fet que, juntament amb la disminució de la superfície fotosintètica,

contribueix a l'aturada del creixement tant de les fulles com de la part aèria de la planta (Pereira i Chaves 1993, 1995). El creixement és més sensible al dèficit hídric que l'intercanvi de gasos i sol succeir a dèficits hídrics moderats, fins i tot si no hi ha un canvi en les relacions hídriques de les fulles (Passioura 1988, Gowing et al 1990, Kuang et al 1990, Pereira i Chaves 1993). L'aturada en el creixement es pot considerar com una possibilitat de preservar carbohidrats per mantenir el metabolisme, allargar el subministrament d'energia i per una millor recuperació després de l'estrès (Bartels i Sunkar 2005)

Una de les altres mesures que prenen les plantes davant el dèficit hídric és el tancament d'estomes, que durant el procés d'aclimatació, a mida que l'esgotament de l'aigua s'accentua es dona durant un període més llarg del dia (Pereira et al 1986, Tenhunen et al 1987), resultat d'interaccions entre la pèrdua d'aigua a nivell d'arrel i el dèficit de pressió de vapor de l'aire (Schulze et al 1982). El tancament estomàtic evita la deshidratació de la planta en la fase de dèficit hídric moderat i, durant la fase d'estrès sever, evita fenòmens realment perillosos per la supervivència de la planta com la cavitació i l'embòlia del xilema provocant una pèrdua irreversible de la capacitat de conducció del sistema (Jones i Sutherland 1991).

La percepció del dèficit hídric i la transducció del senyal per obtenir una resposta de la planta és un tema bastant desconegut en l'estudi de la resposta de les plantes a l'estrès, tot i que se sap que hi intervenen quinases, fosfatases, fosfolípids, calci, hormones, EAOs i òxid nítric (Bartels i Sunkar 2005).

1.8. Estrès oxidatiu

El terme estrès oxidatiu, en essència, es refereix a un desequilibri entre la producció d'espècies actives de l'oxigen (EAO) i les defenses antioxidants (Halliwell i Gutteridge 1989). Una altra definició donada per Sies (1991) podria ser una pertorbació en l'equilibri pro-oxidant-antioxidant en favor del primer, portant a un dany potencial.

L'estrès oxidatiu pot venir donat per una disminució en els nivells d'antioxidants o per un increment en els nivells d'EAOs (Halliwell i Whiteman 2004).

Com tots els diferents tipus d'estrès, l'estrès oxidatiu pot provocar l'aclimatació o enduriment de l'organisme mitjançant l'activació del sistema de defensa, o la mort de la cèl·lula, teixit o planta en el que es manifesta. Depèn de l'estat de la planta, del lloc on es formen les EAOs, de les EAOs que es formen (Desikan et al. 2005) i de què ha provocat el desequilibri entre les EAOs i els antioxidants.

Existeix una diferència significativa entre estrès oxidatiu i dany oxidatiu. El dany oxidatiu està provocat per l'estrès oxidatiu, però és el dany a nivell molecular que pot ser causat per atac directe de les espècies actives de l'oxigen durant l'estrès oxidatiu. El dany oxidatiu pot afectar qualsevol biomolècula: lípids, DNA, proteïnes, carbohidrats, etc. (Halliwell i Whiteman 2004).

L'estrès oxidatiu es dona en la majoria d'estressos coneguts, ja siguin biòtics o abiòtics (Apel i Hirt 2004, Desikan et al. 2005).

2. Peròxid d'hidrogen

2.1. Espècies actives de l'oxigen

Està ben establert que la formació d'espècies actives de l'oxigen acompanya els processos metabòlics habituals en tots els organismes aerobis (Perl-Treves i Perl, 2002). L'origen de la majoria de les EAO es troba en la reducció incompleta de l'oxigen, que depenent d'on es trobi localitzada i en quines condicions dóna origen a diferents molècules altament oxidants (Fig. 1).

Quan l'O₂ només rep un electró es forma el O₂^{•-}, en una reacció que necessita energia, o l'ajuda d'un enzim, per produir-se ($\Delta G = +7.6 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$). A partir de la producció del O₂^{•-} les reaccions que es succeeixen són termodinàmicament favorables o espontànies. Així la producció de H₂O₂ i de OH[•] són espontànies ($\Delta G = -21.7$ i $-8.8 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectivament). La formació d'aquestes EAO es produeixen per l'activació química de l'oxigen, en canvi, la formació de ¹O₂ es produeix per una activació física (Perl-Treves i Perl 2002). Això vol dir que a diferència del O₂^{•-}, el H₂O₂ i el OH[•], que es formen per reaccions de reducció i en conseqüència un canvi en l'estructura química de la molècula original; la formació de ¹O₂ es produeix per un excés d'energia rebuda a la molècula d'O₂. Aquesta energia d'excitació aconsegueix produir un canvi de sentit en el gir d'un dels electrons (*spin*) de l'últim orbital d'aquesta molècula. Tal com es veu a la Figura 1, aquesta reacció necessita energia per produir-se ($\Delta G = +22.0 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$). Generalment la clorofil·la excitada és la responsable d'aquesta transferència d'energia a l'O₂.

En les cèl·lules vegetals les EAOs se solen produir en cadenes de transport d'electrons com la de la respiració o la de la fotosíntesi, encara que en algunes ocasions la formació d'EAOs també pot ser d'origen enzimàtic, sobretot el O₂^{•-} i el H₂O₂.

El H₂O₂ és la EAO de vida més llarga, juntament amb el O₂^{•-} (microsegons) i menys reactiva de totes les EAOs descrites fins ara (Perl-Treves i Perl 2002). Com no és un radical, té la capacitat de travessar membranes biològiques.

Excepte en la fotorespiració, el H₂O₂ és derivat del O₂^{•-} sigui de forma espontània quan l'entorn químic és àcid, o per acció de l'enzim superòxid dismutasa (SOD), en plantes present al citosol, mitocondris, cloroplasts, peroxisomes, glioxisomes i l'apoplast (Perl-Treves i Perl 2002). En conseqüència la formació de H₂O₂ es produeix a pràcticament tots els compartiments de la cèl·lula vegetal, i tot i que és la EAO menys reactiva continua tenint grans capacitats com a oxidant. Entre les quals hi figura la seva capacitat d'oxidar grups tiol de forma irreversible i no controlada (Kaiser 1979), i és precursor del radical hidroxil. L'estat redox dels grups tiol regulen l'activitat de gran quantitat d'enzims, per exemple la NADH deshidrogenasa, la fosforibuloquinasa i dues fosfatases del Cicle de Calvin que s'inactiven quan aquests grups estan oxidats. El radical hidroxil és una de les EAO més reactives i, en conseqüència, una de les més destructives per la cèl·lula (Fig. 1).

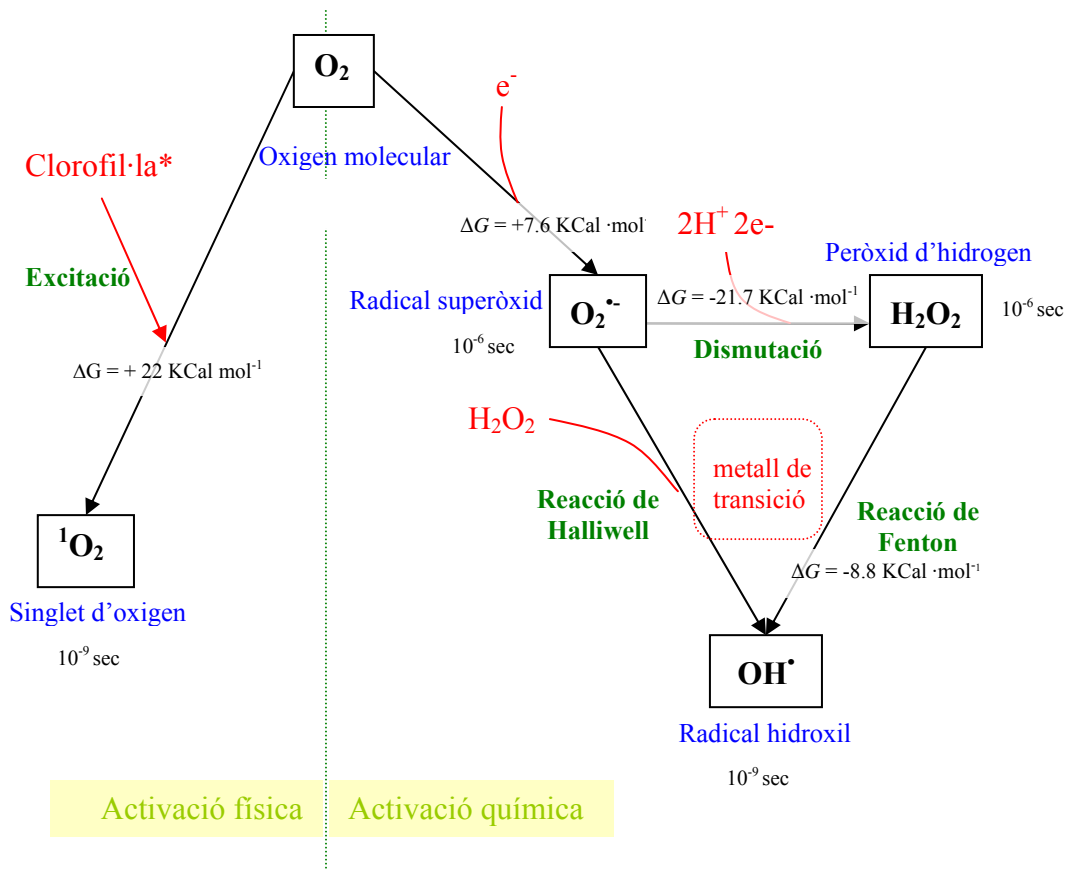


Figura 1. Espècies actives de l'oxigen. Producció de EAOs a partir de l'oxigen, on es diferencia l'activació física de la química. El singlet d'oxigen (1O_2) s'activa de forma física quan la clorofil·la excitada (Clorofil·la*) li transmet energia i inverteix l'*spin* d'un electró. La resta d'EAOs s'activen de forma química. L'oxigen molecular (O_2) rep un electró d'una font d'electrons produint el radical superòxid ($O_2^{\cdot-}$) que pot dismutar a peròxid d'hidrogen (H_2O_2). La formació del radical hidroxil (OH^{\cdot}) pot ser conseqüència de l'acumulació de H_2O_2 o de l'acumulació de H_2O_2 i $O_2^{\cdot-}$ en presència d'un metall de transició en la "reacció de Fenton" i la "reacció de Halliwell", respectivament. Al costat de cada EAO s'indica la seva vida mitjana en condicions fisiològiques i l'energia lliure de Gibbs (ΔG , $\text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$) associada a cada reacció redox de les EAO. Les reaccions en que $\Delta G < 0$ són espontànies, les reaccions en que $\Delta G > 0$ necessiten un aport d'energia per produir-se.

Es pot originar a partir de l'acumulació de superòxid i peròxid d'hidrogen en la presència d'un metall de transició en l'anomenada reacció de Haber-Weiss o a partir de l'acumulació de peròxid d'hidrogen en presència d'un metall de transició en la reacció de Fenton (Halliwell i Gutteridge 1999; Apel i Hirt 2004). Així doncs, per mantenir la integritat de les estructures i el metabolisme cel·lulars, les cèl·lules vegetals tenen una sèrie de mecanismes de control o regulació de la producció i l'acumulació de peròxid d'hidrogen al seu interior. La localització del H_2O_2 és fonamental per determinar el seu efecte en el metabolisme de la cèl·lula vegetal. Segons on es produeixi i en quines quantitats pot provocar danys irreversibles, com la inactivació permanent d'enzims, peroxidació de molècules biològiques, necrosi, mort cel·lular programada o, en canvi, pot actuar com a senyal o transductor de senyals en processos d'estrès (Desikan et al. 2005). Els diferents compartiments cel·lulars tenen compostos antioxidants o

mecanismes per eliminar i minimitzar la producció de H_2O_2 , alguns són comuns i d'altres exclusius de cada compartiment. Aquests mecanismes poden ser enzimàtics o no enzimàtics.

2.2. Antioxidants

Antioxidant és qualsevol substància que, present a molt baixes concentracions comparades amb les concentracions del substrat oxidable, retarda o prevé significativament l'oxidació d'aqueix substrat (Halliwell i Gutteridge 1999). Aquestes molècules tenen la capacitat de donar electrons o àtoms d'hidrogen formant radicals menys perniciosos que la molècula oxidant que ha estat reduïda per l'antioxidant. Els radicals derivats d'aquests compostos antioxidants es neutralitzarien mitjançant algun agent reductor amb la finalitat que cap estructura cel·lular resulti afectada. Aquestes molècules mostrarien aquestes qualitats en una correlació espacial i temporal amb l'estrès oxidatiu (Hernández et al. 2009).

Els antioxidants poden ser enzimàtics (ascorbat peroxidasa, glutatió reductasa, monodehidroascorbat reductasa, glutatió reductasa, catalasa, peroxiredoxina, entre altres) o no enzimàtics (entre els més coneguts: ascorbat, tocoferol, carotenoids, glutatió). En aquest apartat es descriuen els antioxidants més importants en l'eliminació de H_2O_2 .

2.2.1. Àcid ascòrbic

En plantes, el substrat més important per la detoxificació de H_2O_2 és l'ascorbat (AA), tot i que també pot reduir el $O_2^{\cdot-}$. L'àcid ascòrbic és, generalment, la molècula antioxidant de baix pes molecular més abundant en les plantes (Smirnoff 2005), assolint fins el 10 % del contingut de carbohidrats solubles en les cèl·lules vegetals (Smirnoff i Pallanca 1996). Es troba en gairebé tots els teixits vegetals (DeGara et al. 1997) i sol trobar-se en més altes concentracions a les fulles que a les arrels (Smirnoff 2005). També es troba a tots els compartiments cel·lulars, incloent-hi l'apoplast (Davey et al. 2000), tot i que a l'apoplast (Sanmartin et al. 2003) i la vacuola és on menys se n'acumula.

A pH fisiològic l'AA es dissocia en ascorbat i protons, per això se l'acostuma a anomenar ascorbat. La seva capacitat de cedir un electró el caracteritza com a antioxidant, a més dels seus derivats monodehidroascorbat (MDHA) i dehidroascorbat (DHA). Només el MDHA és un radical però és relativament poc reactiu i de seguida dismuta per formar DHA, que no té càrrega i per tant s'hauria d'anomenar àcid dehidroascòrbic (Smirnoff 2005).

L'AA elimina el H_2O_2 reaccionant directament amb aquesta EAO, formant H_2O i MDHA (Jones i Smirnoff 2005) o com a integrant del cicle ascorbat-glutatió, on actua com a substrat de l'ascorbat peroxidasa (APX, Noctor i Foyer 1998, Asada 1999).

2.2.1.1. AA i creixement

La relació entre la concentració d'AA i el creixement vegetal està establerta des de fa molt temps (Reid 1941) i està relacionada amb la regulació que aquest compost de baix pes

molecular exerceix sobre la proliferació cel·lular i l'extensibilitat de la paret de la cèl·lula vegetal (Jones i Smirnoff 2005, De Tullio i Arrigoni 2004; Alegre i Munné-Bosch 2005).

Hi ha diversos experiments que mostren que l'AA és necessari per a la regulació del cicle cel·lular (Liso et al. 1988; Critterio et al. 1994 Potters et al 2002). S'ha hipotetitzat que l'AA participa en el cicle cel·lular com a cofactor d'enzims com la prolil hidroxilasa (Potters et al 2002), i incrementa la regeneració del ferro d'altres enzims com la ribonucleòtid reductasa (Critterio et al. 1994), necessària per la producció de desoxiribonucleòtids.

L'AA de l'apoplast (fins un 10%, Sanmartín et al. 2003) contribueix a que la paret vegetal sigui més extensible, ja sigui com a metabolitzador de H_2O_2 , que al seu torn està implicat en la lignificació de la paret vegetal (veure apartat 2.4.2 d'aquesta introducció); com a inhibidor de les peroxidases de paret encarregades de produir els entrelligaments de paret (Takahama 1993, Otter i Polle 1994) o fins i tot contribuir a l'escissió no enzimàtica dels compostos de paret, tot i aquest darrer punt només s'ha comprovat *in vitro* (Fry 1998). La concentració o l'estat redox de l'ascorbat de l'apoplast també podria hiperpolaritzar l'ATPasa de protons de la membrana plasmàtica, portant a l'entrada de soluts, vacuolització i l'acidificació de la paret cel·lular (Hidalgo et al. 1989, González-Reyes et al 1994, De Cabo et al 1996).

2.2.2. Cicle ascorbat glutatió

El cicle ascorbat-glutió (Fig. 2) es va descriure per primer cop al cloroplasts (Foyer i Halliwell 1976), però s'han anat trobant els enzims que el componen en altres compartiments cel·lulars com el mitocondri, el peroxisoma o el citoplasma, així com en teixits no fotosintètics, com les arrels, l'endosperm, nòduls radicals i pètals (Creissen i Mullineaux 2002).

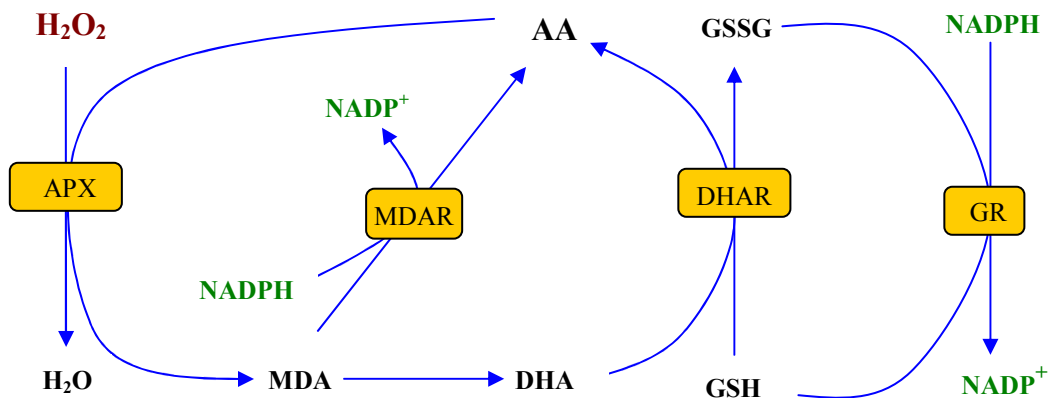


Figura 2. Cicle ascorbat-glutió. S'inicia amb la reducció de H_2O_2 per part de l'ascorbat peroxidasa (APX), que utilitza com a donant d'electrons l'ascorbat (AA) que s'oxida formant monodehidroascorbat (MDHA). El MDHA es pot reciclar a AA per acció de la MDHA reductasa (MDHAR), que utilitza el NADPH com a donant d'electrons; pot utilitzar directament la ferredoxina (Fd) com a reductor, o pot continuar oxidant-se per formar àcid dehidroascòrbic (DHA). El DHA es recicla per acció de la DHA reductasa (DHAR), que redueix el DHA mitjançant glutatió (GSH). La forma oxidada del GSH (GSSG) es recicla a la seva forma reduïda per acció de la glutatió reductasa (GR), en aquest cas el donant d'electrons és el NADPH.

Aquest cicle forma part del cicle aigua-aigua considerant que el cicle comença amb la fotòlisi de l'aigua al fotosistema II (PSII) i acaba amb la formació d'aigua, producte de la reacció del H_2O_2 amb l'APX (Asada 1999).

2.2.3. Catalasa

Les catalases redueixen el H_2O_2 en aigua i oxigen sense requerir un substrat reductor per dur a terme la reacció. Són enzims que es troben en grans quantitats a l'interior de les cèl·lules aeròbies i, pel que se sap fins ara, estan exclusivament dedicades a l'eliminació de H_2O_2 , tot i que tenen baixa afinitat per aquesta EAO, sobretot si es compara amb l'afinitat que tenen altres enzims reductors de H_2O_2 com l'APX (Nicholls et al. 2001). La regulació de la CAT depèn de diverses EAOs, entre elles el H_2O_2 . Com més H_2O_2 hi ha, més augmenta l'activitat d'aquest enzim, però en grans quantitats aconsegueix inhibir-la, com el $\text{O}_2^{\cdot-}$. S'ha demostrat que el $^1\text{O}_2$ també regula l'activitat d'aquest enzim (Lledías et al. 1998).

En plantes les CAT es troben gairebé exclusivament als peroxisomes (Feierabend 2005) tot i que hi ha indicis de la seva presència en mitocondris (Scandalios et al. 1980) i apoplast (Salguero i Böttger 1995).

2.2.4. Peroxiredoxines

Les peroxiredoxines (PRX) constitueixen el grup d'enzims antioxidants que metabolitzen H_2O_2 d'identificació més recent (Lim et al. 1994; Chae et al. 1994). Pertanyen a la super-família d'enzims de les tiol peroxidases i són capaces de reduir H_2O_2 , alquil hidroperòxids i peroxinitrits (Dietz et al. 2006; Rouhier et al. 2008). L'any 1996 es van identificar les primeres PRX en plantes (Stacy et al. 1996, Baier i Dietz 1996).

El mecanisme d'acció de les tiol peroxidases es basa en la interacció entre el grup tiol de la proteïna i el peròxid que estigui atacant (posem per exemple H_2O_2). D'aquesta interacció en resulta àcid sulfènic, que deriva del grup tiol, i aigua del H_2O_2 . En el cas que la molècula atacada fos un alquil peròxid en resultaria un alcohol, i si fos peroxinitrit en resultaria nitrit (Dietz et al. 2006; Rouhier et al. 2008). S'ha trobat que les PRX contribueixen a la detoxificació de H_2O_2 derivat de la reacció de Mehler de manera significativa (Dietz et al. 2002), apart de al cloroplast se n'han trobat al mitocondri (Dietz et al. 2006).

El reciclatge de les peroxiredoxines depèn de tioredoxina, ciclofilina, glutaredoxina i glutatió, dependent del grup de peroxiredoxines al qual pertanyen (Rouhier et al. 2008). La tioredoxina i la glutaredoxina són dues proteïnes molt importants en la regulació redox, que serà explicada amb més profunditat en l'apartat 3 d'aquesta introducció.

Per tant, les PRX a la cèl·lula vegetal actuen com antioxidants, moduladors de vies de transducció de senyals i sensors redox (Dietz et al. 2006).

2.2.5. Superòxid dismutasa

La SOD és un enzim amb dues funcions oposades: al mateix temps que és la primera línia de defensa contra l'estrès oxidatiu (Bannister et al. 1987), també actua com a font d'EAO, doncs és

la principal font de H_2O_2 en organismes aerobis i en alguns organismes anaerobis (Hassan 1989). La reacció que catalitza és la dismutació del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 i O_2 .

Les SOD són una família de metal·loenzims descrits per primer cop per McCord i Fridovich (1969). Les SOD es classifiquen segons el seu metall, així hi ha les MnSOD, les FeSOD i les Cu/ZnSOD que es troben en la majoria de compartiments: citosol, mitocondris (Rabinowitch i Fridovich 1983), cloroplasts (Salin 1987), peroxisomes (Sandalio i Del Río 1988) i l'apoplasm (Schinkel et al. 1998). D'aquesta manera, com a més són els enzims que reaccionen més ràpidament amb el seu substrat (Kitagawa et al 1991, Getzoff et al. 1992), totes les fonts del $O_2^{\cdot-}$ de la cèl·lula són potencialment fonts de H_2O_2 .

2.3. Cicles de producció i eliminació de H_2O_2 dins la cèl·lula vegetal

El H_2O_2 en les plantes forma part del seu metabolisme cel·lular i la seva correcta eliminació és indicador que el metabolisme no es troba amenaçat per cap factor extern o propi de la planta, així en condicions òptimes per al metabolisme cel·lular no es trobaran augments significatius d'aquesta EAO als teixits vegetals (Desikan et al. 2005). De totes maneres, com la seva formació depèn de vies metabòliques molt sensibles als canvis ambientals i es troba en gairebé tots els compartiments, les vies d'eliminació de H_2O_2 són molt efectives i sovint sensibles als seus canvis de concentració. A nivells basals, els H_2O_2 du a terme funcions de manteniments importants (Mori i Schroeder 2004). Quan les vies d'eliminació no són prou efectives perquè la formació de H_2O_2 augmenta de manera indiscriminada es desencadenen una sèrie de respostes, que poden anar des de la inducció d'enzims antioxidants, entre d'altres (Desikan et al. 2000), a la inducció de la mort cel·lular programada (Levine et al. 1994). Així, els cicles de formació i eliminació de H_2O_2 a l'interior de les cèl·lules vegetals són vitals per a la supervivència d'aquestes i el seu estudi permet entendre millor la resposta de les plantes a un entorn canviant.

2.3.1. Mitocondri

La formació de H_2O_2 a mitocondris es produeix per la dismutació espontània o mediada per MnSOD del superòxid (Scandalios 1993). El superòxid es produeix principalment a nivell de membrana interna, als complexos I i III de la cadena de transport d'electrons responsable de la síntesi d'ATP. Quan aquesta cadena de transport d'electrons es troba excessivament reduïda, sigui per la falta de ADP o per l'excés de NAD(P)H procedent del citosol, aquests dos complexos són capaços de cedir un electró a l'oxigen i produir superòxid (Møller 2001).

Tot i que al mitocondri hi ha sistemes antioxidants com AA, CAT i components del cicle AA-GSH (Jimenez et al. 1997), a l'interior d'aquest orgànul hi predominen els mecanismes de prevenció per minimitzar els danys que poden derivar de l'acumulació de H_2O_2 . A la mateixa cadena de transport d'electrons, formada per les proteïnes de la cadena respiratòria, hi ha cinc proteïnes que en altres organismes no es troben. Aquestes proteïnes són l'oxidasa alternativa (Purvis 1997), dues NADH oxidases situades a banda i banda de la membrana interna (Palmer

1976), i dues NADPH deshidrogenases també situades a banda i banda de la membrana interna (Agius et al. 1998). Són cinc proteïnes que consumeixen NAD(P)H sense transportar protons de la matriu a l'espai intermembrana, de manera que no contribueixen a la formació d'ATP al final de la cadena respiratòria. L'acumulació d'ATP al final de la cadena respiratòria és la causa principal de la formació de $O_2^{\cdot-}$ a nivell dels complexos I i III d'aquesta cadena de transport d'electrons (Møller 2001).

2.3.2. Cloroplast

La font principal de $O_2^{\cdot-}$ al cloroplast es produeix per la transferència d'electrons del fotosistema I (PSI) a l' O_2 (reacció de Mehler). El superòxid es pot detoxificar dismutant a H_2O_2 de forma espontània a pH baix o per acció de la superòxid dismutasa (SOD), reacció molt més ràpida que la dismutació espontània, o reduint la plastocianina i/o el citocrom b_6-f formant un cicle de flux d'electrons al voltant del PSI.

Aquesta via de formació de H_2O_2 generalment es potencia quan el cicle de Calvin no consumeix NADPH prou ràpid i aquest s'acumula al final de la cadena de transport d'electrons de la fotosíntesi. Aquest fenomen es dona generalment degut a un excés d'energia d'excitació (llum) rebuda a nivell de fotosistemes, que pot produir-se per altes radiacions en una planta d'ombra, o per la combinació de llum i dèficit hídric, entre altres factors (Noctor et al. 2002). El dèficit hídric produeix tancament d'estomes per evitar més pèrdues d'aigua, en conseqüència els nivells de CO_2 intracel·lular disminueixen, disminuint al seu torn la fixació de carboni al cicle de Calvin i el consum d'equivalents de reducció en forma de NADPH. La falta de $NADP^+$ lliure provoca que els electrons s'acumulin a nivell de PSI i siguin acceptats per l'oxigen formant $O_2^{\cdot-}$. La formació de H_2O_2 als cloroplasts es pot considerar, juntament amb el transport cíclic d'electrons i la fotorrespiració, una manera de dissipar NADPH acumulat (Tolbert 1980) i evitar la formació d'altres EAOs molt reactives com el singlet d'oxigen.

2.3.3. Peroxisoma

La ribulosa 1,5-bifosfat carboxilasa / oxigenasa (Rubisco) s'encarrega de fixar carboni procedent del CO_2 al cicle de Calvin, però també té activitat oxigenasa. L'activitat de la Rubisco està determinada per la disponibilitat de substrat, sigui CO_2 o O_2 . Se sap que, en condicions òptimes, per cada 4 molècules de CO_2 se'n fixa una d' O_2 . Així, la Rubisco té més afinitat cap el CO_2 però l' O_2 competeix amb el CO_2 per arribar al centre actiu d'aquest enzim. De la mateixa manera que per l'activitat carboxilasa d'aquest enzim s'inicia el cicle de Calvin, per la seva activitat oxigenasa s'activa la fotorrespiració. La fotorrespiració s'inicia al cloroplast amb la formació de fosfoglicolat, es transporta al peroxisoma en forma de glicolat i en aquest orgànul la glicolat oxidasa oxida aquest compost formant H_2O_2 i glioxilat (Siedow i Day 2000).

Quan hi ha baixa disponibilitat de CO_2 a l'interior del cloroplast, l'activitat oxigenasa de la Rubisco es troba potenciada en detriment de l'activitat carboxilasa. Generalment aquesta

condició es dona quan la planta rep altes radiacions o quan hi ha tancament d'estomes en presència de llum (Noctor et al. 2002).

Tot i que el H_2O_2 es forma a l'interior del peroxisoma en grans quantitats, aquest se sol metabolitzar al seu interior, doncs la presència de la CAT l'elimina (Feierabend 2005). També s'ha descrit la presència de l'APX a l'interior d'aquest orgànul, que donada la seva major afinitat pel H_2O_2 és probable que eviti possibles sortides de H_2O_2 cap a altres compartiments menys preparats, donada la difusibilitat d'aquesta EAO (del Río et al. 2006).

2.3.4. Plasmalema

El plasmalema no es considera un compartiment cel·lular però donada la seva doble naturalesa com a membrana i com a barrera física entre la cèl·lula i l'apoplast, és un lloc important a tenir en compte des del punt de vista cel·lular. La NADPH oxidasa és l'enzim responsable de la formació de superòxid a partir de la reducció univalent de l'oxigen. Es troba a nivell de plasmalema en fagocits i limfòcits B de mamífer per eliminar microorganismes invasors (Babior 1999), i s'han trobat homòlegs d'aquest enzim en plantes (Torres et al 2002). Aquest enzim normalment està relacionat amb la formació de lignina, mort cel·lular programada i la resposta sistèmica adquirida (Chen et al. 1993, Levine et al. 1994), en respostes de les plantes a l'estrès (Sagi i Fluhr 2001; Jiang i Zhang 2002; Sagi i Fluhr 2006), tot i que darrerament se l'ha relacionat amb processos de desenvolupament (Foreman et al. 2003), estrès hiperosmòtic (Coelho et al. 2002) i el tancament d'estomes mediat per àcid abscísic (ABA) (Kwak et al. 2003). A més, s'han relacionat les EAOs procedents d'aquest enzim amb cascades de senyalització que condueixen a canvis en l'expressió de gens, probablement mediada per MAP quinases (Kovtun et al. 2000). La regulació d'aquest enzim, probablement es troba regulada per Ca^{2+} (Keller et al. 1998, Sagi i Fluhr 2001), ROP GTPases, àcid fosfatídic i PI3P (Jones i Smirnoff 2005). El H_2O_2 format a nivell de plasmalema difon cap a l'apoplast, així que es tindrà en compte les capacitats antioxidants d'aquest compartiment.

2.3.5. Apoplast

Encara que el H_2O_2 format per l'acció de la NADPH oxidasa se sol acumular a l'apoplast, la seva síntesi és al plasmalema. A l'apoplast hi ha les peroxidases de paret, enzims responsables de la lignificació, que necessiten H_2O_2 per a realitzar la seva tasca. Des de la dècada del 1970 (Elstner i Heupel 1976) se sap que aquests enzims produeixen el H_2O_2 necessari per dur a terme la lignificació. Bolwell et al., (1995), va estudiar peroxidases lligades a paret cel·lular de diferents espècies i va trobar que l'augment en el pH òptim d'aquests enzims provocaven el canvi d'activitat peroxidasa a activitat oxigenasa.

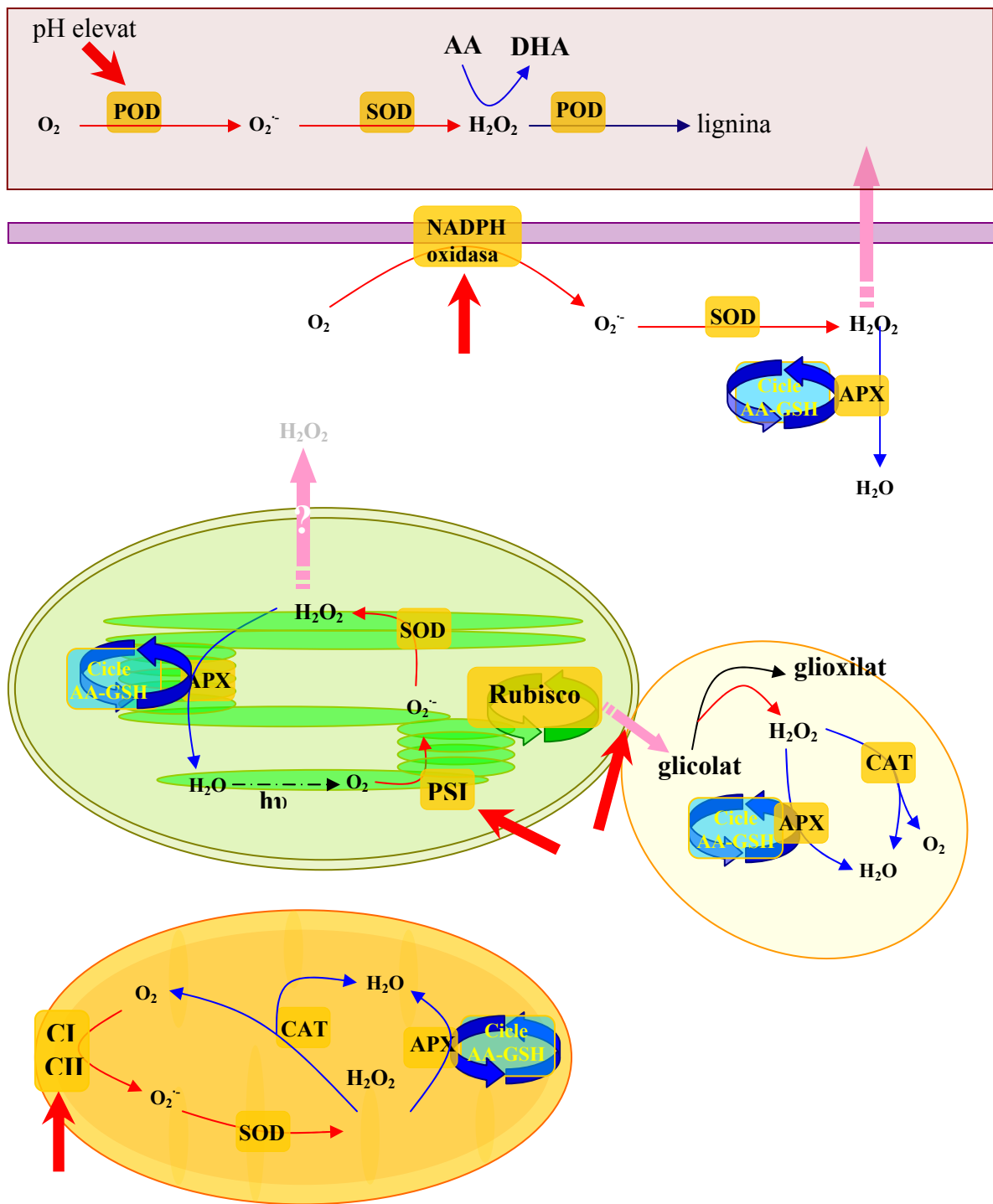


Figura 3. Formació i eliminació de H₂O₂ a l'interior de la cèl·lula vegetal. Les principals fonts de H₂O₂ a l'interior de la cèl·lula vegetal estan indicades amb fletxes primer de color vermell, les principals vies d'eliminació estan indicades en blau fosc. El cloroplast es verd, el mitocondri taronja i el peroxisoma groc, no estan a escala. El plasmalema es representa en morat i l'apoplast en marró. El cicle AA-GSH està indicat en blau (fletxes cíclicues). Els enzims s'indiquen a l'interior de quadres gros. Les fletxes en bloc vermelles indiquen les situacions en les quals s'indueixen les vies de formació de H₂O₂ a la cèl·lula vegetal. Les fletxes roses indiquen transport d'algun compost d'un compartiment a un altre. APX, ascorbat peroxidasa; CAT, catalasa; POD, peroxidasa; SOD, sueroxid dismutasa.

L'apoplast és el compartiment amb menys poder antioxidant de tots, per això, en estudis citohistoquímics, el H_2O_2 se sol trobar acumulat a nivell de paret cel·lular, tot i això a l'apoplast hi ha AA, i s'ha suggerit que l'estat redox del pool de AA és important per tasques reguladores a l'interior de la cèl·lula (Pignocchi i Foyer 2003). Donat el seu baix poder antioxidant, és probable que l'apoplast rebi H_2O_2 d'altres compartiments cel·lulars.

2.4. Funció del peròxid d'hidrogen

La formació de H_2O_2 als diferents compartiments cel·lulars té conseqüències que sovint poden ser perjudicials per a la cèl·lula, per això existeixen sistemes antioxidants. De totes maneres la presència d'enzims dedicats a la formació de H_2O_2 i el seu precursor $O_2^{\cdot-}$ són indicadors que el H_2O_2 probablement té funcions més concretes a l'interior de la cèl·lula vegetal. La funció del H_2O_2 depèn molt d'on es produeix i en quines quantitats (Desikan et al. 2005). En un extrem hi ha l'alleujament de la cadena de transport d'electrons excessivament reduïda de la fotosíntesi, on el H_2O_2 pràcticament s'elimina al mateix temps en que es produeix, i en un altre extrem hi ha les grans quantitats de H_2O_2 produïdes per activació de la NADPH oxidasa responsable de la resposta hipersensible.

2.4.1. Alleujament de cadenes de transport d'electrons sobrecarregades

La formació de H_2O_2 a l'interior de cloroplasts i peroxisomes es produeix quan hi ha un excés d'energia d'excitació a nivell de fotosistemes i aquests es troben excessivament reduïts (Perl-Treves i Perl 2002). Tot i que en primera instància la seva formació podria ser perjudicial per les molècules d'aquests dos orgànuls, la seva ràpida eliminació per part d'enzims com l'APX (cloroplast, peroxisoma) (Foyer i Noctor 1998, del Río 2006) i la CAT (peroxisoma) (Feierabend 2005) fan que la producció d'aquesta EAO no sigui un dany, sinó més aviat una manera d'assegurar el funcionament de la cadena de transport d'electrons de la fotosíntesi en condicions limitants com la baixa disponibilitat de CO_2 o l'excés d'energia d'excitació. Aquestes condicions condueixen a la baixa disponibilitat de $NADP^+$ i ADP lliure i, en conseqüència, provoquen l'acumulació d'electrons en les diferents proteïnes que formen la cadena de transport d'electrons de la fotosíntesi (Heber et al 1978).

L'eliminació de H_2O_2 (format a partir del PSI) per part de l'APX dins del cicle AA-GSH contribueix al reciclatge de $NADP^+$, doncs al seu torn participa en el reciclatge d'AA, que depèn de la MDHAR i la DHAR. La MDHAR utilitza com a donador d'electrons NADPH (Hossain et al. 1984) i la DHAR utilitza GSH, que passa a la seva forma oxidada GSSG. Per al reciclatge del GSH, la GR també utilitza com a donador d'electrons el NADPH (Fig.1). D'aquesta manera, la formació de H_2O_2 contribueix a augmentar el *pool* de $NADP^+$ lliure. A més, l'oxidació de la ferredoxina del PSI per part del MDHA (Miyake i Asada 1994), contribueix a mantenir la cadena de transport d'electrons de la fotosíntesi menys reduïda i a mantenir un flux constant d'electrons des de l'aigua cap al $NADP^+$.

Tal com s'explica a l'apartat 2.3.3. d'aquesta introducció, la fotorespiració s'inicia quan la Rubisco actua com oxigenasa (Ogren 1984) i es potencia quan hi ha baixa disponibilitat de CO₂ per la Rubisco, una via en la que es forma H₂O₂, s'utilitza poder reductor i ATP. D'aquesta manera, quan hi ha baixa disponibilitat de CO₂ respecte a la quantitat d'energia d'excitació a nivell de fotosistemes, el H₂O₂ format a nivell de peroxisoma, juntament amb el format a nivell de PSI, evita que hi hagi una reducció excessiva de la cadena de transport d'electrons de la fotosíntesi.

2.4.2. Estructural

El H₂O₂ està implicat en la formació de lignines a partir de la polimerització oxidativa d'alcohols *p*-hidroxicinàmics (Ros Barceló 1997), xiloglucans, entrelligament de proteïnes de paret (Brisson et al 1994) i en la deposició de fibres de cel·lulosa durant la formació de la paret cel·lular secundària (Potikha et al 1999). Aquesta funció proporciona a les plantes barreres físiques contra l'entrada de patògens (Brisson et al 1994), contribueix a la formació de xilema (Ros Barceló 1997) o participa en la diferenciació cel·lular al mateix temps que s'atura l'expansió cel·lular (Brisson et al 1994, Hohl et al 1995, Schopfer 1996). Tot i que pot semblar contradictori també contribueix a l'afluïxament de les parets cel·lulars, en aquest cas com a precursor del radical OH·, producte de la reacció de Fenton o de la reacció de Halliwell. El radical OH· s'ha trobat en les parets cel·lulars d'òrgans en elongació (Liskay et al 2004) i escindeix polímers de xiloglucans permetent que les parets cel·lulars s'allarguin (Fry 1998).

Generalment, la procedència del H₂O₂ en aquests processos és d'origen enzimàtic, essent l'origen més probable una NADPH oxidasa en relació a la lignificació del xilema (Ros Barceló 1998); peroxidases de paret (Bolwell et al. 2002); diamina oxidasa relacionada amb mort cel·lular programada i lignificació en la formació de xilema (Møller i Mc Pherson 1998); l'oxalat oxidasa estaria més relacionada amb l'explosió oxidativa que es dona en la germinació i conduiria a la formació de OH·, necessari per a l'expansió cel·lular típica d'aquest procés (Lane et al. 1993).

A més de la participació directa com a co-substrat de la polimerització oxidativa de les lignines o altres compostos responsables de l'enduriment de les parets cel·lulars, el H₂O₂ també pot actuar com a senyal per a la diferenciació de parets secundàries, doncs la seva generació podria estar mediada per *Rac small GTPase* (Potikha et al. 1999) i s'han identificat homòlegs de les proteïnes Rac com a components del sistema NADPH oxidasa en tomaquera (Kieffer et al. 1997) i tabac (Xing et al. 1997).

2.4.2.1. Diferenciació i lignificació de xilema

La formació del xilema és un procés en el que s'inclou l'allargament cel·lular i diferenciació cel·lular; deposició de lignina, i mort cel·lular programada (Turner et al. 2007).

Les lignines proporcionen rigidesa i suport estructural a gran part de les plantes vasculars i es troben bàsicament localitzades al xilema i altres teixits de suport mecànic com l'esclerènquima

contribuint a enfortir aquest sistema davant les grans tensions de la columna d'aigua i donar-li impermeabilitat (Lewis i Yamamoto 1990, Turner et al 2007). El H_2O_2 es produeix al mateix temps que la lignificació de les parets cel·lulars dels elements traqueals del xilema de *Zea mays* (Ros Barceló et al. 2002). També pot regular altres elements típics de la senyalització intracel·lular com el sistema Ca^{2+} /calmodulina, IP3 i quinases en la diferenciació del xilema, mostrant que aquest procés de diferenciació està regulat de manera exhaustiva (Ros Barceló 1998).

Apart de la lignificació, el procés de diferenciació del xilema també depèn de la mort cel·lular programada, doncs el procés de lignificació de cèl·lules protoxilemàtiques acaba amb la mort d'aquestes (Fukuda i Komamine 1982). Així el H_2O_2 està involucrat en els processos més coneguts de la diferenciació del xilema, com la lignificació i la mort cel·lular programada, tant de manera directa com activant elements de cascades de transducció de senyals

2.4.3. Transducció de senyals

Com ja s'ha comentat, les cèl·lules vegetals contenen enzims dedicats a la formació de $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 , com NADPH oxidases i peroxidases de paret, que s'activen en resposta a estressos biòtics i abiòtics (Bolwell et al. 2002; Mittler 2002; Neill et al. 2002). Aquesta activació mostra la possibilitat que les cèl·lules basin els seus senyals d'estrès en l'augment de l'activitat d'enzims formadors d'EOs i que aquests funcionin com a coordinadores centrals de la biologia cel·lular i de les respostes a gran nombre d'estímuls propis del desenvolupament i de la resposta a l'entorn de les plantes.

Els estudis que han portat a considerar la funció de les EOs com a molècules senyal es basen en que la formació d'EO s'activa en resposta a hormones vegetals i fitotoxines, i que, a més, regula part dels efectes d'aquests estímuls. Les EOs poden iniciar cascades de senyalització que resulten en l'alteració de les funcions cel·lulars o alterar directament proteïnes o altres estructures en resposta a un senyal primari (p.ex. hormona). Entre les EOs, el H_2O_2 es mostra com una molècula-senyal tipus, doncs és de baix pes molecular, sense càrrega, pot travessar membranes i es destrueix ràpidament (Desikan et al. 2005). A més, al ser un oxidant feble pot reaccionar amb molècules com les proteïnes, actuant com a missatger (Rhee et al. 2000; Cooper et al. 2002; Danon 2002). El H_2O_2 també està relacionat amb molècules tan importants en la transducció de senyals com el calci, MAP quinases i fosfatases.

El calci i el H_2O_2 es regulen mútuament (Coelho et al 2002; Desikan 2005). S'ha comprovat *in vitro* que algunes NADPH oxidases estan regulades per Ca^{2+} , (Keller et al. 1998; Sagi i Fluhr 2001) i que mutants d'*A. thaliana* deficients en *ArtbohC* (una isoforma de la NADPH oxidasa) no mostraven les oscil·lacions de calci necessàries per al desenvolupaments de pèls radiculars (Foreman et al 2003). En el tancament d'estomes mediat per ABA, el H_2O_2 activa l'obertura dels canals d'entrada de calci necessari per al tancament estomàtic (Pei et al. 2000).

A *A. thaliana*, s'ha observat l'activació de dues MAPKs (AtMPK3 i AtMPK6) en plantes exposades a H₂O₂ (Kotvun et al 2000, Desikan et al. 1999, 2001b), en un procés essencial per mediar la tolerància de les plantes a diferents tipus d'estrès (Kovtun et al. 2000); així com en *Medicago sativa* (MMK3, Nagakami et al. 2004). Pel que fa a l'activitat fosfatasa, el H₂O₂ la inhibeix, de manera que aquesta EAO incrementaria l'estat de fosforilació dins la cèl·lula vegetal (Desikan 2005). S'ha demostrat que el H₂O₂ modifica directament els residus tiol d'algunes fosfatases (Meinhard et al. 2001, 2002). En un altre cas, la fosfatasa d'*A. thaliana* AtPTP1 també es troba modificada directament per H₂O₂ *in vitro* (Gupta i Luan 2003).

S'ha demostrat que el H₂O₂ activa un gran nombre de gens (Desikan et al. 2000); i recentment s'ha teoritzat sobre la possibilitat que els factors de transcripció de les proteïnes de xoc de calor actuessin com receptors de H₂O₂ en les plantes en situacions d'estrès (Miller i Mittler 2006), tot i que el tipus de parella receptor-ligand que produeix el H₂O₂ seria d'una naturalesa diferent a l'acceptada fins ara (Cooper et al. 2002; Danon 2000).

Depenent de la seva localització el H₂O₂ podria interactuar amb diferents proteïnes, així, el factor més important per definir l'efecte del H₂O₂ és la seva localització a l'interior de la cèl·lula, doncs el lloc on es forma, i les zones més immediatament properes, és on actua. També s'ha de tenir en compte que l'aplicació exògena de H₂O₂ pot actuar en cèl·lules que normalment no perceben H₂O₂ i pot originar que l'efecte sigui el contrari al que es dona en condicions naturals (Desikan et al. 2005).

La producció de les EAO tant en resposta a l'estrès abiòtic com a l'estrès biòtic podria explicar fenòmens com l'aclimatació o tolerància creuada, doncs són la resposta comuna a un gran nombre diferent d'estressos (Apel i Hirt 2004; Desikan et al. 2005).

2.4.3.1. H₂O₂ i hormones

El H₂O₂ ha estat relacionat amb el mecanisme d'acció de la majoria d'hormones conegudes, entre les quals hi figuren auxines (Joo et al 2001), l'etilè (D'Haeze et al 2003), giberel·lines (Fath et al 2001), àcid salicílic (Torres et al 2005), àcid abscísic (ABA, Pei et al 2000) o jasmonats (Orozco-Cárdenas i Ryan 1999).

En aquest treball ens centrarem en la interacció entre ABA i H₂O₂ (apartat 2.5.1. de la Introducció) i la possible relació entre metil jasmonat i H₂O₂ (apartat 2.5.2. de la Introducció).

L'activació de quinases per part de H₂O₂ poden implicar aquesta molècula en l'expressió de gens, doncs una cascada de MAPKs pot fosforilar de factors de transcripció que en última instància conduirien a la regulació d'expressió de gens.

2.5. H₂O₂, AA i sequera

Apart de la producció de H₂O₂ induïda per ABA, tant en el tancament estomàtic (Pei et al 2000, Murata et al 2000, 2001, Zhang et al 2001, Kwak et al. 2003) com en l'aplicació externa a cèl·lules del mesòfil (Jiang i Zhang 2001, 2002), la producció de H₂O₂ en plantes sota dèficit

hídric s'ha descrit en plantes sotmeses a estrès osmòtic (Hohl et al 1995, Yahraus et al 1995, Coelho et al 2002, Jiang i Zhang 2002, Zhou et al 2007); en fulles tallades i deixades deshidratar (Yesbergenova et al. 2005) i en plantes crescudes en testos a les quals se'ls aplicava el dèficit hídric de forma gradual (Sairam i Srivastava 2001, Luna et al 2005, Sofo et al 2005, Selote i Khanna-Chopra 2006). Fins i tot s'ha descrit que l'aplicació de H_2O_2 a plantes d'ordi provocava la formació d'osmoprotectors (Uchida et al 2006).

En la majoria de treballs l'estudi de les concentracions de H_2O_2 s'han combinat amb la mesura d'antioxidants, enzimàtics i no enzimàtics, implicats en l'eliminació d'aquesta EAO (Sairam i Srivastava 2001, Luna et al 2005, Sofo et al 2005, Selote i Khanna-Chopra 2006, Jiang i Zhang 2002) entre els quals hi figuren l'AA, el DHA i la relació entre ells (relació AA/DHA) (Sairam i Srivastava 2001, Sofo et al 2005, Selote i Khanna-Chopra 2006), mostrant que quan les plantes es troben sota dèficit hídric estan constantment procurant mantenir l'equilibri entre espècies oxidants i antioxidants, aconseguint-ho especialment les més tolerants a la sequera (Sairam i Srivastava 2001, Sofo et al 2005) o les aclimatades al dèficit hídric (Selote i Khanna-Chopra 2006).

D'aquests tres dissenys experimentals (aplicació d'estrès osmòtic, dessecació de fulles, plantes crescudes en testos), el més proper a la realitat de la sequera al camp i als cultius és el que s'aplica a les plantes crescudes en testos, especialment Sofo et al (2005) que van dur a terme l'experiment a l'exterior. Tot i això encara manquen estudis de H_2O_2 en plantes crescudes al camp.

2.5.1. H_2O_2 , AA, sequera i ABA

L'estrès hídric indueix la producció d'ABA, que al seu torn indueix tancament estomàtic així com l'expressió de gens relacionats amb el dèficit hídric, i provoca canvis metabòlics. Les concentracions internes d'ABA, que venen determinades per la seva síntesi, metabolisme i transport, juguen un paper crucial en les respostes de les plantes al dèficit hídric, doncs en resposta a aquest estrès es donen grans fluctuacions en els nivells interns d'aquesta fitohormona (Seki et al. 2006). Darrerament s'estan estudiant en profunditat els mecanismes de transducció del senyal que significa l'ABA, sobretot a nivell de factors de transcripció pel que fa a l'activació de gens (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki 2005); i a la implicació del H_2O_2 en el tancament estomàtic (Pei et al 2000, Zhang et al 2001) que es troba produït per NADPH oxidases (Kwak et al 2003). Un altre estudi mostra l'acumulació de H_2O_2 a cèl·lules del mesòfil de fulles de *Zea mays* produïda per l'aplicació exògena d'ABA i la seva acumulació a la paret de cèl·lules del mesòfil (Hu et al 2005).

S'ha demostrat que la formació de H_2O_2 , molt probablement via NADPH oxidasa, és necessària per a l'obertura de canals de calci implicats en el tancament estomàtic (Pei et al 2000, Murata 2001), i per a la formació d'AA i altres antioxidants produïts per ABA a *Zea mays* (Jiang i

Zhang 2002, 2002b). Per una altra banda, s'ha trobat que la MDHAR s'indueix en mutants d'*A. thaliana* deficients en APX i catalasa (Rizhsky et al. 2002).

Tot i que l'ABA és l'hormona més relacionada amb el dèficit hídric hi ha estudis a nivell molecular que demostren que existeixen factors de transcripció induïts per dèficit hídric que depenen d'ABA i molts altres independents de l'ABA (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki 2006).

2.5.2. H₂O₂, AA, sequera i MeJA

Els jasmonats i el dèficit hídric s'han relacionat de forma indirecta, doncs s'ha provat que certes proteïnes es sintetitzen tant en resposta al dèficit hídric com en resposta a aquestes oxilipines (Mason i Mullet 1990, Blödner et al 2007, Beck et al 2007); estrès induït per osmolits (Lehman et al 1995, Kramell et al 1995) i dessecació en llavors (Finch-Savage et al 1996). Però també s'han relacionat de forma directa, doncs recentment s'ha trobat que l'estrès hídric sobre plàntules de pi (*Pinus pinaster* Ait) i papaia (*Carica papaya* L.) augmenta les concentracions endògenes d'àcid jasmònic (JA) (Pedranzani et al 2007, Mahouachi et al 2008).

Altres experiments mostraven que l'aplicació prèvia de metilmjasmonat (MeJA) reduïa la transpiració de maduixeres (*Fragaria vesca* cv. "Emb") i hi disminuïa els danys provocats per la sequera (Wang 1999), i que l'aplicació externa de jasmonats disminueix el dany provocat per estrès osmòtic (Li et al 1999, Bandurska et al 2003). El Me-JA provoca tancament estomàtic a través de la producció d'EAOs depenent de NADPH oxidasa, o a partir d'un enzim inhibible per DPI (difenílen-iodini, inhibidor de flavo-enzims com la NADPH oxidasa o peroxidases; Suhita et al 2004).

Els estudis duts a terme amb jasmonats i estrès oxidatiu són sovint contradictoris, doncs si bé l'aplicació externa de MeJA provoca l'augment de H₂O₂, tal com es va descriure en fulles de tomàquet (Orozco-Cárdenas et al. 1999, 2001), altres estudis mostren que l'aplicació externa de Me-JA induïx la síntesi d'AA, i altres enzims antioxidants, en cultius cel·lulars d'*A. thaliana* i tabac (Sasaki-Sekimoto et al. 2005; Wolucka et al. 2005).

Un dels punts tractats en aquesta tesi és la interacció Me-JA-H₂O₂-AA en condicions de dèficit hídric. L'experiment es va dur a terme amb la mesura endògena de tots els compostos, doncs l'aplicació externa pot induir a error, i alguns estudis suggereixen que la funció del MeJA varia depenent de l'estat de la planta o d'altres molècules implicades en la senyalització (Mur et al. 2006).

3. Regulació redox

Considerada a nivell bàsic, la paraula “redox” simplement significa que hi ha reducció i oxidació de substàncies o, en altres paraules, que hi substàncies que guanyen i perden electrons. Clàssicament l'estudi de les reaccions metabòliques redox girava al voltant de la producció d'energia en cadenes de transport d'electrons, doncs la majoria de les reaccions metabòliques crucials per la vida estan basades en reaccions redox (Noctor 2006; Hancock 2008). Així doncs, l'entorn redox de la cèl·lula és un paràmetre decisiu que està estretament regulat donada la seva importància per un creixement i un desenvolupament òptims (May 1998; Schafer i Buettner 2001).

La interrelació entre l'entorn redox de la cèl·lula, l'estat redox de les proteïnes i la funció de les proteïnes dibuixen un interruptor redox que controla un gran nombre de funcions (Dietz 2008), com la transcripció, la traducció, la degradació de proteïnes i senyalització cel·lular (Buchanan i Balmer 2005; Meyer et al. 2005; Rouhier et al. 2005).

Exceptuant el $^1\text{O}_2$, les EAOs són producte de reaccions redox i, donada la seva naturalesa oxidant, poden afectar, també a través de reaccions redox, els processos de desenvolupament i de defensa de les plantes. Una de les principals dianes de les EAOs és el grup tiol de l'aminoàcid cisteïna. L'oxidació simple d'un grup tiol que sigui proper a un altre grup tiol pot portar a la formació d'un pont disulfur (Hancock 2008, Desikan 2005). Els ponts disulfur es poden formar entre aminoàcids d'una mateixa proteïna, provocant-li canvis conformacionals i funcionals, o formar-se entre aminoàcids de proteïnes i altres compostos (Buchanan i Balmer 2005), com el glutatió, que també actua en l'activació d'un rang molt ampli de proteïnes (Dixon et al. 2005).

Apart d'oxidar directament els grups tiol, la producció d'EAOs pot afectar l'estat redox del pool de compostos redox-actius, com tioredoxines, NADPH, ascorbat, el glutatió, que al seu torn poden afectar l'estat d'oxidació dels grups tiol de les cisteïnes contingudes en enzims (Noctor 2006).

Així, la regulació redox es basa en la oxidació i reducció reversible de grups tiol de proteïnes dels diferents compartiments cel·lulars. L'estudi de la regulació redox en plantes va començar amb el descobriment de la funció reguladora de la tioredoxina i el glutatió sobre els enzims del cicle de Calvin (Wolosiuk i Buchanan 1977).

Dins la cèl·lula vegetal hi ha diferents molècules que regulen l'estat d'oxidació del grups tiol que poden interactuar de forma directa o indirecta amb ells.

3.1. Proteïnes reguladores de l'estat redox

En totes les cèl·lules vives, amb algunes excepcions, hi ha proteïnes de baix pes molecular que formen i trenquen ponts disulfur, les més importants són les tioredoxines, les glutaredoxines, les proteïnes disulfur isomerasas i altres proteïnes semblants a tioredoxines.

Les tioredoxines es van descobrir inicialment al cloroplast (Wolosiuk i Buchanan 1977) on es trobaven regulant l'activitat d'enzims del cicle de Calvin mitjançant la reducció/oxidació de ponts disulfur. Més endavant s'ha descobert que hi ha un gran nombre de tioredoxines a les plantes (Balmer i Buchanan 2002), i a la resta d'organismes vius però amb menys diversitat, que regulen molts processos cel·lulars, tant els implicats en el metabolisme normal de les cèl·lules vegetals com en processos metabòlics implicats en la defensa de les cèl·lules vegetals contra l'estrès, incloent-hi activació d'enzims, modificacions en l'expressió de gens i en cascades de transducció de senyals. El reciclatge, o re-reducció, d'aquestes proteïnes depèn del NADPH via l'enzim NTR (NADPH tioredoxina reductasa; Balmer i Buchanan 2005)

Les glutaredoxines són proteïnes molt similars a les tioredoxines interactuen amb peroxiredoxines, que s'encarreguen d'eliminar H_2O_2 , i una de les funcions proposades per aquestes proteïnes és la de participar en el trencament de ponts disulfur formats entre proteïnes o de proteïnes amb glutatió. El reciclatge d'aquestes proteïnes es troba regulat per tioredoxines i per GSH (Rouhier et al. 2005).

Les proteïnes disulfur isomerases funcionen bàsicament com ditiol oxidases en el plegament de proteïnes. L'estat redox del *pool* de proteïnes reguladores dels ponts disulfur és un important regulador de molts processos fisiològics a l'interior de les cèl·lules vegetals (Balmer i Buchanan 2005).

3.2. Molècules no proteiques: parelles redox

L'estat redox de les proteïnes reguladores dels ponts disulfur a la seva vegada es troba regulat per altres molècules formadores de parelles redox que s'encarreguen de la seva re-reducció o reciclatge. Les més importants per la seva abundància són NADPH/NAPD⁺, NADH/NAD⁺, GSH/GSSG, AA/DHA (Noctor 2006).

Les parelles redox NADPH/NAPD⁺, NADH/NAD⁺ estan involucrades en gairebé totes les rutes metabòliques de les cèl·lules vegetals i són altament sensibles a l'estat redox de cadenes de transport d'electrons com la de la fotosíntesi i la respiració. El NADPH s'encarrega del reciclatge de les tioredoxines, de l'AA i del GSH (Balmer i Buchanan 2005; Noctor 2006).

La parella redox GSH/GSSG és un dels principals tampons de l'estat redox del compartiments intracel·lulars i el seu estat redox i la seva disponibilitat regula processos tan importants com mort cel·lular, divisió cel·lular durant el desenvolupament de l'arrel, senescència, resistència a patògens i regulació enzimàtica. En molts casos la relació GSH/GSSG permet una aproximació a l'estat redox de la cèl·lula, sobretot de cèl·lules animals (Wormuth et al. 2007).

L'estat redox de l'AA domina el metabolisme redox de les plantes, doncs mentre l'estat redox de l'AA pot canviar, el del GSH sol mantenir-se estable (Baier et al. 2000, Veljovic-Jovanovic et al. 2001).

3.3. Proteïnes roGFP: un nou mètode per mesurar l'estat redox *in vivo*

3.3.1. Proteïnes GFP

La proteïna GFP (Green Fluorescent Protein) va ser descoberta l'any 1962 per Shimomura et al a *Aequorea aequorea* (o *Aequorea victoria* o *Aequorea forskalea*), una espècie de medusa que té la capacitat de produir fluorescència de color verd. L'any 1992 es va clonar i seqüenciar el gen d'aquesta proteïna per primer cop (Prasher et al 1992), i l'any 1994 es va expressar en un organisme diferent a *Aequorea* amb el resultat que la proteïna expressada en un altre organisme també és fluorescent (Chalfie et al 1994, Inouye i Tsuji 1994). Per tant, el gen que codifica per aquesta proteïna conté tota la informació necessària per a la síntesi post-translacional del cromòfor, sense haver-hi d'afegir enzims de medusa (Tsien 1998). L'estructura de les proteïnes GFP consisteix en 238 aminoàcids plegats en onze làmines β que formen una estructura en forma de barril al voltant d'una hèlix α irregular. A l'interior d'aquesta hèlix α hi ha el cromòfor (Ormo et al 1996, Yang et al 1996). La mutagènesi de la seqüència del cromòfor ha resultat en variants que han alterat de forma significativa els espectres d'excitació i emissió (Tsien 1998; Zimmer 2001).

Les proteïnes GFP s'han convertit en una eina molt utilitzada pel marcatge molecular *in vivo*, doncs apart de la de la seva fluorescència brillant i visible, les proteïnes GFP tenen una sèrie de qualitats que la fan atractiva per a aquesta aplicació. És químicament inerta i no interfereix amb els processos cel·lulars, no conté ponts disulfur, i es pot dirigir específicament a compartiments subcel·lulars com el reticle endoplasmàtic, mitocondri i l'espai periplàsmic dels bacteris (De Giorgi et al 1999).

Generalment, les proteïnes GFP s'han utilitzat com a marcadors passius d'expressió de gens i per localitzar proteïnes, però a finals de la dècada de 1990 i a principis de la del 2000, es van començar a construir variants que actuen com a indicadors intracel·lulars de pH (Kneen *et al.* 1998; Llopis *et al.* 1998; Miesebock *et al.* 1998; Hanson *et al.* 2002), ions de calci (Nagai *et al.* 2001), anions halògens (Jayaraman *et al.* 2000) i l'estat redox del compartiment en el qual s'expressen (Østergaard *et al.* 2001; Dooley *et al.* 2004; Hanson *et al.* 2004; Cannon i Remington 2006; Lohman i Remington 2008).

3.3.2. Proteïnes roGFP

Des de l'any 2001 hi ha hagut un interès creixent cap a la monitorització de l'estat redox *in vivo* utilitzant aquestes proteïnes com a marcador. En primer lloc es van insertar parells de cisteïnes al cromòfor d'una variant groga de GFP (YFP, yellow fluorescent protein), de manera que eren capaces de notar els canvis de l'estat d'oxidació de l'entorn, en aquest cas en el citoplasma d'*Escherichia coli* (Østergaard et al 2001), tot i que és difícil de calibrar per realitzar mesures acurades dels diferents compartiments cel·lulars. Més endavant es va desenvolupar una proteïna sensible a l'estat redox del seu entorn i amb dos màxims d'excitació, dels quals la seva amplitud relativa depèn de l'estat d'oxidació de la proteïna (Hanson et al. 2004). La mesura de les

amplituds d'aquests dos pics es poden utilitzar per elaborar un índex i així mesurar-ne l'estat d'oxidació. D'aquesta manera s'elimina la dependència de la mesura de la concentració de la proteïna, canvis en la intensitat de la il·luminació o gruix cel·lular (Cannon i Remington 2006). Aquesta proteïna, roGFP (redox-oxidation Green Fluorescence Protein), té un espectre d'excitació tipificat a 400 nm i a 475 nm (per roGFP1) ó 490 (per roGFP2). Si a roGFP1 se li afegeix una solució oxidant, l'espectre d'excitació a 400 nm augmenta, i el de 475 nm disminueix; la proteïna roGFP2 actua de forma similar però justament a la inversa. Aquestes proteïnes es van expressar inicialment en cèl·lules de mamífers i en mitocondris d'aquestes cèl·lules (Hanson et al 2004, Dooley et al 2004) però recentment s'han expressat en cèl·lules vegetals, concretament en plantes d'*A. thaliana* (Jiang et al 2006) de manera que els canvis redox produïts pels canvis ambientals ja es poden monitoritzar en una planta viva.

3.3.3. Proteïnes roGFP en plantes

En el treball dut a terme per part de Jiang i col·laboradors (2006) es va demostrar que la roGFP1 expressada al citoplasma o al mitocondri, era sensible al H₂O₂ i al DTT en reaccions d'oxidació o reducció reversibles, i per tant actua com un sensor capaç de monitoritzar en temps real canvis dinàmics en l'estat redox *in vivo*. En aquest experiment es va trobar que el potencial redox en repòs del citoplasma és de -318 ± 13 mV, un valor significativament més alt que en mitocondris (-362 ± 10 mV). Valors pràcticament idèntics als que es van trobar en cèl·lules de mamífer HeLa: -360 mV als mitocondris (Hanson et al. 2004) i -315 mV al citoplasma (Dooley et al. 2004).

Per una altra banda, les proteïnes roGFP1 i roGFP2 s'han expressat al citoplasma, mitocondri, cloroplast, reticle endoplasmàtic i peroxisomes en fulles de tabac i d'*A. thaliana* per determinar-ne els canvis redox (Schwarzländer et al. 2008).

Recentment, es va suggerir que la roGFP2 expressada al citoplasma d'arrels d'*A. thaliana* és un biosensor quantitatiu del potencial redox del sistema tampó GSH/GSSG, i va mostrar sensibilitat a ferida (Meyer et al. 2007). Altres estudis mostren que tant la GFP1 com la GFP2 són sensors del tampó glutatió en fulles (Meyer 2008; Schwarzländer et al. 2008). En aquests treballs, la resposta del sensor depenia de les glutaredoxines per percebre el *pool* de GSH.

4. Elecció del model de planta adequat

Les plantes naturals del clima mediterrani estan adaptades als períodes de sequera periòdics típics d'aquest clima que queden reflectits en els mecanismes tan complets de defensa i d'aclimatació que presenten davant la sequera estival. Els arbusts són la forma vegetal més abundant en aquest clima, entre els quals *Cistus albidus* és un dels arbusts amb una distribució més extensa i abundant; amb molt poques exigències a nivell de sòl. A més, la seva resposta a la sequera és molt característica (veure annex 1); les seves fulles són fàcils de manipular; permeten obtenir-ne molt material; és altament resistent a la sequera d'estiu i es recupera molt ràpidament. El fet que sigui un arbust escleròfil permet fer experiments de sequera gradual, doncs el seu cicle vital és mes llarg de 7 anys. Els dos períodes a l'any que té de creixement (primavera i tardor) permet tenir fulles joves i abundants de manera periòdica. Aquestes qualitats converteix a aquesta planta en un model de planta resistent a la sequera altament adequat per estudiar algunes respostes bioquímiques com la producció de H_2O_2 en relació a hormones, ascorbat i lignificació.

Arabidopsis thaliana està a l'altre extrem com a planta model, doncs és sensible a la sequera i se'n pot treure poc material per planta. A canvi, té molt avantatges, doncs el seu cicle vital és molt curt, per tant permet realitzar experiments curts en un espai reduït; existeixen molts estudis bioquímics d'aquesta planta i a més té el genoma seqüenciat, és molt fàcil de transformar i per tant existeixen molts transgènics, i també mutants. L'existència de tants transgènics i tants mutants permet a la comunitat de biòlegs vegetals l'estudi de gran nombre de gens i els seus productes en relació a gran nombre de situacions ambientals; des de diferents estressos biòtics i abiòtics, com l'aplicació externa de diferents productes químics o estudis d'ontogènia.

Objectius

L'objectiu principal d'aquesta tesi era aprofundir el coneixement de la relació estrès hídric-estrès oxidatiu. Partint d'aquest objectiu es va incidir en dos sub-objectius:

1. Conèixer la funció del peròxid d'hidrogen en l'acimatació al dèficit hídric en una espècie mediterrània arbustiva com a model de planta resistent a la sequera d'estiu
2. Estudiar els canvis en l'estat redox del citoplasma de les cèl·lules foliars de plantes d'*A. thaliana* transformades amb proteïnes c-roGFP1, com a mesura directa de la relació estrès hídric-estrès oxidatiu

Per assolir el primer sub-objectiu es va incidir en:

1. **Estudi de la temporalitat de l'acumulació de H₂O₂ en tres espècies mediterrànies amb graus de resistència diferents.** Per determinar si hi ha producció de H₂O₂ durant la sequera estival típica de la conca mediterrània, i triar l'espècie utilitzada com a model
2. **Caracteritzar la producció i acumulació de peròxid d'hidrogen en plantes de *C. albidus* crescudes al camp i**
 - 2.1. Determinar les concentracions de peròxid d'hidrogen i la seva localització durant un cicle anual
 - 2.2. Determinar si és el dèficit hídric el factor de la sequera estival que produeix les fluctuacions, si n'hi ha, de peròxid d'hidrogen
3. **Estudiar el significat fisiològic del peròxid d'hidrogen durant la sequera estival,** comparant els valors de concentració de peròxid d'hidrogen obtinguts amb:
 - 3.1. concentracions endògenes d'ascorbat i dehidroascorbat
 - 3.2. concentracions endògenes d'àcid abscísic
 - 3.3. concentracions endògenes de metil jasmonat
 - 3.4. concentracions endògenes de lignina
 - 3.5. paràmetres d'estrès

Per assolir el segon sub-objectiu es va incidir en:

1. **Caracteritzar l'efecte de l'estrès gradual en plantes d'*Arabidopsis thaliana* transformades amb c-roGFP1**
2. **Determinació de l'estat redox del citoplasma de plantes d'*Arabidopsis thaliana* transformades amb proteïna c-roGFP1**

**Informe dels directors de la tesi del factor d'impacte dels articles publicats
i participació de la doctoranda**

El Dr. Sergi Munné Bosch i la Dra. Leonor Alegre Batlle, com a directors de la tesi que porta per títol: **“Funció del peròxid d’hidrogen en l’acimatació de *Cistus albidus* L. al dèficit hídric en condicions de camp. Relació estrès hídric-estrès oxidatiu”** que ha dut a terme la doctoranda Tana Jubany Marí,

Informen sobre la participació de la doctoranda en cadascun dels articles inclosos en la memòria de l’esmentada Tesi.

Capítol 1. Article: **“Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences in chloroplasts”**, publicat a la revista *Plant, Cell and Environment*, índex d’impacte (2007) 4.497. En aquest estudi es va avaluar la relació entre la sequera i l’estrès oxidatiu a les plantes de *Salvia officinalis* crescudes en condicions ambientals. Va ser el primer treball en el que la doctoranda va posar a punt la tècnica de la localització cel·lular de H₂O₂ mitjançant la formació de dipòsits electrodensos de perhidròxid de ceri i posterior observació al microscopi electrònic de transmissió. Així mateix va iniciar els estudis sobre la possible funció del H₂O₂ a les plantes. Ha participat en el disseny de l’experiment i en la discussió dels resultats obtinguts, així com en la redacció del article. A destacar l’interès que la doctoranda ha presentat per tota la temàtica objecte d’estudi.

Capítol 2. Article: **“Enhanced photo- and antioxidative protection, and hydrogen peroxide accumulation in drought-stressed *Cistus clusii* and *Cistus albidus* plants”**, publicat a la revista *Tree Physiology*, índex d’impacte (2007) 2.141. Com a continuació de la línia d’investigació del capítol 1, aquí s’estudien alguns dels mecanismes de resistència a la sequera a *Cistus clusii* i *Cistus albidus*. En aquest treball destaca la contribució de la doctoranda en la localització cel·lular de H₂O₂, a més es va dur a terme un estudi semiquantitatiu de les variacions diürnes i estacionals de H₂O₂, observant una relació entre la localització de H₂O₂ i les relacions hídriques de la planta. A més va iniciar els estudis sobre la possible funció estructural del H₂O₂ a les plantes. Ha participat en el disseny de l’experiment i en la discussió dels resultats obtinguts, així com en la redacció del article.

Capítol 3. Article: **“Hydrogen peroxide is involved in the acclimation of the Mediterranean shrub, *Cistus albidus* L., to summer drought”**, publicat a la revista *Journal of Experimental Botany*, índex d’impacte (2007) 3.917. En aquest article la doctoranda ja signa com a primera autora donat al seu elevat grau de participació i responsabilitat en el treball realitzat. Ha realitzat la monitorització dels paràmetres ambientals, cultiu de les plantes, i mesura de les variacions anuals de (i) les relacions hídriques de les plantes i del sòl, (ii) localització i concentracions endògenes de H₂O₂, (iii) estat redox de l’ascorbat, (iv) estimació de la peroxidació lipídica, i (v) concentracions endògenes de lignina. Ha participat també en el disseny de l’experiment i en la discussió dels resultats obtinguts, així com en gran part en la redacció de l’article.

Capítol 4. Article: “**The timing of methyl jasmonate, H₂O₂ and ascorbate accumulation during water deficit and subsequent recovery in the Mediterranean shrub *Cistus albidus* L.**”, no publicat. A destacar l’elevat grau de participació de la doctoranda que figura com a primera autora. A més d’analitzar tots els paràmetres indicats en el Capítol 3 però en aquest cas en un disseny experimental completament diferent, ha realitzat també l’anàlisi de metil jasmonat que ha dut a terme al laboratori del Departament de Biologia de la Universitat d’Anvers (Bèlgica) sota la direcció de la Dra. Els Prinsen. El disseny d’aquest estudi ens a permès identificar quins dels factor ambientals era el més decisiu per l’acumulació de H₂O₂ a les plantes de *C. albidus*. Ha participat en el disseny de l’experiment i en la discussió dels resultats obtinguts, així com gran part en la redacció de l’article.

Capítol 5. Article: “**Use of a redox-sensing GFP (c-roGFP1) for real time monitoring of redox status in water-stressed *Arabidopsis thaliana* plants**”, no publicat. La doctoranda signa com a primera autora. L’estudi s’ha realitzat a la Universitat de Califòrnia, Berkeley sota la direcció del professor Lewis Feldman i la col·laboració de la Dra. Keni Jiang. En aquest treball la doctoranda ha realitzar un estudi de la relació estrès hídric-estrès oxidatiu en plantes de *A.thaliana* transformades amb c-roGFP. Cal remarcar que és el primer estudi que s’ha portat a terme a nivell internacional de la utilització de les roGFP per a la detecció del potencial redox del citoplasma de les en plantes sotmeses a un estrès hídric gradual. La participació de la doctoranda ha sigut: (i) cultiu de les plantes d’*A.thaliana*, (ii) determinació de les relacions hídriques de les plantes i substrat, (iii) mesures ratiomètriques de la fluorescència de les roGFP1. Ha participat en el disseny de l’experiment i en la discussió dels resultats obtinguts, així com gran part en la redacció de l’article.

I per que consti als efectes oportuns,

Dr. Sergi Munné Bosch

Dra. Leonor Alegre

Barcelona, **5 de febrer del 2009**

Taula dels experiments realitzats

Nom de l'experiment	Tipus d'experiment	Tipus de cultiu	Espècies	Període	Anàlisis realitzades
<i>Estudi inicial I</i>	estrès hídric	camp	<i>Salvia officinalis</i>	Primavera Estiu	H ₂ O ₂ localització MDA
<i>Estudi inicial II</i>	condicions naturals		<i>C. clusii</i>		<i>C. albidus</i>
<i>Variació anual</i>	estrès hídric + recuperació	camp	<i>C. albidus</i>	Tardor Hivern Primavera Estiu Tardor	H ₂ O ₂ localització, quantificació Fv/Fm MDA AA DHA lignina ABA
	condicions naturals				
<i>Estiu-tardor</i>	estrès hídric + recuperació	camp	<i>C. albidus</i>	Estiu Tardor	H ₂ O ₂ localització, quantificació Fv/Fm MDA AA DHA lignina MeJA
	regades vs no regades				
<i>GFP</i>	estrès hídric + recuperació	test + hivernacle	<i>A. thaliana</i>	Condicions Controlades	Mesura de l'estat redox del citoplasma
	regades vs no regades				

Estudis *inicials I*. Localització de H_2O_2 en una planta sensible a la sequera: H_2O_2 i senescència.

Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences in chloroplasts

S. Munné-Bosch, T. Jubany-Marí and L. Alegre

*Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona,
Avinguda Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain*

Plant, Cell and Environment. 2001. 24: 1319-1327

RESUM

La relació entre la sequera, l'estrès oxidatiu i la senescència foliar es va avaluar en plantes de sàlvia crecudes en condicions de camp (*Salvia officinalis* L.), una espècie susceptible a la sequera que presenta símptomes de senescència quan s'exposa a condicions d'estrès. Tot i la fotoprotecció conferida pel cicle de les xantofil·les, les fulles exposades a la sequera que mostraven senescència van mostrar un augment en la peroxidació lipídica, pèrdua de clorofil·la, reducció d'activitat fotosintètica i fortes reduccions de les defenses antioxidants lligades a membranes tilacoidals (com β -carotè i α -tocoferol), indicadors d'estrès oxidatiu als cloroplasts. A les fulles senescents exposades a la sequera es va produir acumulació de H_2O_2 . Els estudis de localització subcel·lular mostraven que el H_2O_2 s'acumulava primer als vasos xilemàtics i a la paret cel·lular, i més tard a la membrana plasmàtica de les cèl·lules del mesòfil però no a cloroplasts, indicant que les espècies reactives de l'oxigen responsables de l'estrès oxidatiu als cloroplasts eren diferents al H_2O_2 . La forta degradació de β -carotè i α -tocoferol suggereixen l'increment en la formació del singlet d'oxigen és el possible responsable de l'estrès oxidatiu detectat en els cloroplasts senescents. Aquest estudi mostra que l'estrès oxidatiu intervé en la senescència induïda per la sequera a la sàlvia crecuda al camp en condicions de clima mediterrani.

ABSTRACT

The relationship between drought, oxidative stress and leaf senescence was evaluated in field-grown sage (*Salvia officinalis* L.), a drought-susceptible species that shows symptoms of senescence when exposed to stress. Despite the photoprotection conferred by the xanthophyll cycle, drought-stressed senescing leaves showed enhanced lipid peroxidation, chlorophyll loss, reduced photosynthetic activity, and strong reductions of membrane-bound chloroplastic antioxidant defences (i.e. β -carotene and α -tocopherol), which is indicative of oxidative stress in chloroplasts. H_2O_2 accumulated in drought-stressed senescing leaves. Subcellular localization studies showed that H_2O_2 accumulated first in xylem vessels, and in the cell wall and later in plasma membrane of mesophyll cells, but not in chloroplasts, indicating reactive oxygen species other than H_2O_2 as direct responsible for the oxidative stress observed in the chloroplasts of drought-stressed senescing leaves. The strong degradation of β -carotene and α -tocopherol suggests an enhanced formation of singlet oxygen as the putative reactive oxygen species responsible for oxidative stress to senescing chloroplasts. This study demonstrates that oxidative stress in chloroplasts mediates drought-induced leaf senescence in sage growing in Mediterranean field conditions.

Key-words: Hydrogen peroxide; oxidative stress; photoprotection, sage (*Salvia officinalis*)

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-3040.2001.00794.x/pdf>

Resultats - Capítol 2
Estudis *Inicials II*. Localització de H₂O₂ en dues plantes mediterrànies resistents a la sequera

Enhanced photo- and antioxidative protection, and H₂O₂ accumulation in drought-stressed *Cistus clusii* and *Cistus albidus* plants

Sergi Munné-Bosch, Tana Jubany-Marí and Leonor Alegre

Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona,
Avinguda Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain

Tree Physiology. 2003. 23: 1-12

Resum

Es van estudiar els mecanismes de resistència a l'estrès a *Cistus clusii* Dunal i *Cistus albidus* L., dos espècies arbustives natives del Mediterrani que poden suportar sequera estival severa. Mentre al camp, des de l'hivern fins a l'estiu, el dèficit hídric, la radiació solar i la temperatura augmentaven, *C. clusii* i *C. albidus* disminuïen l'àrea foliar, augmentaven la massa radicular per àrea foliar, i mostraven canvis diürns en la conductància estomàtica per minimitzar la pèrdua d'aigua. En ambdues espècies, les conseqüents reduccions en l'assimilació de CO₂ van ser acompanyades per la reducció en l'eficiència del fotosistema II; i la protecció contra l'estrès oxidatiu es va aconseguir mitjançant la de-epoxidació de la violaxantina al cicle de les xantofil·les i els increments en α -tocoferol i β -carotè. A més, es va observar acumulació de peròxid d'hidrogen (H₂O₂) a les parets cel·lulars de les cèl·lules del mesòfil d'ambdues espècies durant els primers estadis de la sequera, tot i que no es va observar acumulació de H₂O₂ en cloroplasts o altres orgànuls durant l'estudi. Tot i aquestes respostes comunes, *C. albidus* i *C. clusii* van mostrar diferències en la protecció fotooxidativa i antioxidant. En resposta a la sequera, *C. clusii* va mostrar un estat de de-epoxidació del cicle de xantofil·les més elevat, així com en les concentracions d' α -tocoferol i β -carotè, que *C. albidus*. En conclusió, els responsables de la resistència a l'estrès de *C. clusii* i *C. albidus* són mecanismes bioquímics i estructurals, i són indicadors dels seus diferents graus de resistència.

Summary

Mechanisms of stress resistance were studied in *Cistus clusii* Dunal and *Cistus albidus* L., two native Mediterranean shrubs that can withstand severe summer drought. While water deficit, solar radiation and temperature increased from winter to summer in the field, *C. clusii* and *C. albidus* reduced leaf area, increased the root mass per leaf area, and showed diurnal changes in stomatal conductance to minimize water loss. In both species, the consequent reductions in CO₂ assimilation were accompanied by reduced efficiencies of photosystem II photochemistry, and protection against stress was afforded by enhanced de-epoxidation of violaxanthin in the xanthophyll cycle, and increases in α -tocopherol and β -carotene. In addition, H₂O₂ accumulation was observed in mesophyll cell walls of both species at the first stages of drought, although no accumulation of H₂O₂ was observed in chloroplasts and other organelles during the study. Despite these common responses, *C. clusii* and *C. albidus* differed in the extent of photo- and antioxidative protection. In response to drought, *C. clusii* showed a higher de-epoxidation state of the xanthophyll cycle, and higher α -tocopherol and β -carotene concentrations than *C. albidus*. We conclude that structural and biochemical mechanisms to be responsible for stress resistance in *C. clusii* and *C. albidus*, and are indicative of the different degrees of stress resistance of these shrubs.

Keywords: antioxidants, hydrogen peroxide, oxidative stress, photoprotection, photosynthesis.

<http://treephys.oxfordjournals.org/content/23/1/1.full.pdf+html>

Resultats - Capítol 3

Experiment *Variació anual*. El peròxid d'hidrogen està involucrat en l'acimatació de l'arbust mediterrani *Cistus albidus* L. a la sequera d'estiu

Hydrogen peroxide is involved in the acclimation of the Mediterranean shrub, *Cistus albidus* L. to summer drought

Tana Jubany-Marí, Sergi Munné-Bosch, Marta López-Carbonell, Leonor Alegre

Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona,
Avinguda Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

Resum

En aquest estudi es va avaluar la possible funció del peròxid d'hidrogen (H_2O_2) en l'aclimatació a la sequera d'estiu d'un arbust mediterrani, *Cistus albidus* L., crescut en condicions de camp en clima mediterrani. Per a aquest propòsit, es van analitzar els canvis en la concentració de H_2O_2 i la seva localització durant un any. Es van investigar els canvis de H_2O_2 en resposta a les condicions ambientals, en paral·lel als canvis en àcid abscísic (ABA) i marcadors d'estrès oxidatiu, juntament amb l'acumulació de lignina, diferenciació de xilema i esclerènquima, i l'àrea foliar. Durant la sequera d'estiu, el H_2O_2 foliar va augmentar 11 vegades, arribant a valors de $10 \mu\text{mol g}^{-1}$ PS. Aquest increment va ocórrer majoritàriament en les parets de les cèl·lules del mesòfil, vasos xilemàtics i cèl·lules de l'esclerènquima en estat de diferenciació. L'increment d'ABA va precedir el de H_2O_2 , però ambdós van arribar al màxim al mateix temps, en condicions d'estrès prolongat. Les plantes de *C. albidus* van tolerar concentracions altes de H_2O_2 donada la seva localització a l'apoplast de cèl·lules del mesòfil, vasos xilemàtics i en cèl·lules esclerenquimàtiques en diferenciació. L'increment en ABA, i en conseqüència el de H_2O_2 , en plantes sotmeses a estrès hídric podria haver produït un increment 3.5 vegades en l'àcid ascòrbic (AA), que va mantenir i fins i tot va disminuir el seu estat d'oxidació, protegint les plantes del dany oxidatiu. Després de la recuperació de la sequera que va seguir a les pluges de finals d'estiu i de la tardor, es va observar una disminució en els nivells d'ABA, H_2O_2 i AA fins a nivells basals ($\sim 60 \text{ pmol g}^{-1}$ PS, $\sim 1 \mu\text{mol g}^{-1}$ PS i $\sim 20 \mu\text{mol g}^{-1}$ PS).

Abstract

This study evaluated the possible role of hydrogen peroxide (H_2O_2) in the acclimation of a Mediterranean shrub, *Cistus albidus* L, to summer drought growing under Mediterranean field conditions. For this purpose, changes in H_2O_2 concentrations and localization throughout a year were analyzed. There were also investigated H_2O_2 changes in response to environmental conditions in parallel with changes in abscisic acid (ABA) and oxidative stress markers, together with lignin accumulation, xylem and sclerenchyma differentiation and leaf area. During the summer drought, leaf H_2O_2 concentrations increased 11-fold, reaching values of $10 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW. This increase occurred mainly in mesophyll cell walls, xylem vessels and sclerenchyma cells in the differentiation stage. An increase in ABA levels preceded that of H_2O_2 , but both peaked at the same time in conditions of prolonged stress. *C. albidus* plants tolerated high concentrations of H_2O_2 because of its localization in the apoplast of mesophyll cells, xylem vessels and in differentiating sclerenchyma cells. The increase in ABA and consequently of H_2O_2 in plants subjected to drought stress might induce a 3.5-fold increase in ascorbate (AA), which maintained and even decreased its oxidative status, thus protecting plants from oxidative damage. After recovery from drought following late-summer and autumn rainfall, a decrease in ABA, H_2O_2 and AA to their basal levels (*ca.* 60 pmol g^{-1} DW, *ca.* $1 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW and *ca.* $20 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW) was observed.

<http://jxb.oxfordjournals.org/content/60/1/107.full.pdf+html>

Resultats - Capítol 4

Experiment *Estiu-tardor*: La coordinació de l'acumulació de metil jasmonat, H₂O₂ i ascorbat durant el dèficit hídric i la recuperació en l'arbust mediterrani *Cistus albidus* L.

The timing of methyl jasmonate, H₂O₂ and ascorbate accumulation during water deficit and later recovery in the Mediterranean shrub *Cistus albidus* L.

Tana Jubany-Mari^a, Els Prinsen^b, Sergi Munné-Bosch^a, Leonor Alegre^a

¹*Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 645, 08028 Barcelona, Spain.*

²*Department of Biology, University of Antwerp, Groenenborgerlaan 171, B-2020 Antwerpen, Belgium*

Resum

Vam examinar la contribució del metil jasmonat (MeJA) en l'aclimatació de l'arbust mediterrani, *Cistus albidus* L., a l'estrès hídric en condicions climàtiques naturals. Amb aquest propòsit, es van monitoritzar els canvis en MeJA, peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i ascorbat (AA) en fulles joves de plantes ben regades i en plantes exposades a estrès hídric, i durant la seva posterior recuperació. També vam estimar les relacions hídriques de les plantes, el seu creixement i l'eficiència màxima del fotosistema II (F_v/F_m). L'acumulació de MeJA en plantes sotmeses a estrès hídric van mostrar un increment màxim després d'11 setmanes d'estrès hídric. Després d'aquest període, la concentració d'aquesta hormona va disminuir, tornant a concentracions basals un cop la planta es va recuperar. Els increments de H_2O_2 i AA van precedir el de MeJA i van seguir patrons diferents. Les variacions de H_2O_2 van mostrar un patró de variació bifàsic en el transcurs del temps, el primer pic va arribar amb l'estrès moderat i el segon pic, més alt que el primer, durant la recuperació de les plantes. L'acumulació de H_2O_2 no es va associar amb estrès oxidatiu. La concentració d'AA va començar a augmentar al principi de l'estrès i es va estabilitzar en un màxim que es va mantenir al llarg del tractament d'estrès hídric. En base a aquests resultats, concloem que el MeJA i l'AA estan involucrats en els mecanismes de resistència de les plantes a l'estrès, on MeJA atura el creixement de les fulles joves i l'AA prevé el dany oxidatiu.

Abstract

Here we examined the contribution of methyl jasmonate (MeJA) to the acclimation of a Mediterranean shrub, *Cistus albidus* L., to water stress under natural climatic conditions. For this purpose, changes in MeJA, hydrogen peroxide (H₂O₂) and ascorbate (AA) were monitored in young leaves of well-watered plants and of plants exposed to water stress and during subsequent recovery. We also estimated plant water relations, plant growth and the maximum efficiency of PSII photochemistry (Fv/Fm ratio). MeJA accumulation in water-stressed plants showed a maximum increase after 11 weeks of water stress. After this period, the concentration of this hormone decreased, attaining basal concentrations once recovered. The increases in H₂O₂ and AA preceded that of MeJA and followed distinct patterns. H₂O₂ variations showed a biphasic time course, reaching the first peak under mild water stress and a second, much larger peak during plant recovery. H₂O₂ accumulation was not associated with oxidative damage. AA concentrations started to increase at the beginning of water stress and reached steady maximum which was maintained during the water stress treatment. On the basis of these results, we conclude that MeJA and AA are involved in the mechanisms of plant resistance to water stress where MeJA arrests the growth of young leaves and AA prevents oxidative damage.

Abbreviations – AA, ascorbate; DHA, dehydroascorbic acid; Fv/Fm, maximum efficiency of PSII; ; H₂O₂, hydrogen peroxide; H, hydration; JA, jasmonic acid; MeJA, methyl jasmonate; RWC relative water content; VPD, vapour pressure deficit; WS, water-stressed; WW, well watered.

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T66-4YC80T1-2-F&_cdi=5022&_user=145085&_pii=S0098847210000274&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_coverDate=09%2F30%2F2010&_sk=999309998&wchp=dGLbVzb-zSkzV&md5=f35856b55dc78c642f7b1be65f3105b8&ie=/sdarticle.pdf

Resultats - Capítol 5

Relació estrès hídric-estrès oxidatiu: Utilització de la proteïna redox sensible roGFP1 per la monitorització a temps real de l'estat redox en plantes d'*Arabidopsis thaliana* sotmeses a estrès hídric

Use of redox-sensing GFP (c-roGFP1) for real-time monitoring of redox status in
water stressed *Arabidopsis thaliana* plants

T. Jubany-Mari¹, L. Alegre Batlle¹, K. Jiang², L. Feldman²

¹Department de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona,
Barcelona, Spain ²Dept. of Plant and Microbial Biology, Univ. of California, Berkeley,
CA

FEBS letters. 2010. 584 (5): 889-897

Resum

En aquest treball es presenta la utilització d'una proteïna GFP sensible a l'estat redox expressada al citosol de les cèl·lules de plantes d'*Arabidopsis thaliana* crescudes sota condicions d'estrès hídric. Els experiments van permetre confirmar *in vivo* els efectes de l'estrès hídric en l'estat redox de les cèl·lules foliars. Amb aquest objectiu es va determinar l'estat hídric de les plantes, expressat com contingut hídric (%), CHR) i la hidratació (H), així com paràmetres de creixement, expressats com àrea foliar i biomassa de la roseta. Simultàniament, es van dur a terme mesures "ratiomètriques" amb la fluorescència de la roGFP. Quan es va aplicar l'estrès hídric (per falta de rec), el RWC i la H de les fulles va disminuir fins a un 69.42 % i 4.74 g H₂O g DW⁻¹, respectivament. Al mateix temps, el potencial redox de les fulles estressades va esdevenir menys negatiu (des d'uns -312 mV a aprox. -302 mV). Després de la rehidratació (després d'11 dies de dèficit hídric) l'estat hídric de les plantes es va recuperar immediatament, tot i que aquestes es van mantenir a un estat redox més oxidat un dia més. Al cap d'un dia (dia 14) l'estat redox de les plantes rehidratades va retornar a valors similars als de l'inici de l'experiment (-312 mV vs. -308 mV). Al cap de 6 dies més, l'estat redox de les plantes recuperades es va estabilitzar a nivells similars als de pre-estrès. L'estrès hídric va ser sever a l'hora d'induir estrès oxidatiu. A més, encara que les plantes es van recuperar un cop van ser regades, aquestes no van recuperar els valors pre-estrès de hidratació ni de l'estat redox. La utilització de plantes d'*Arabidopsis* transformades amb proteïnes GFP sensibles a l'estat redox, proporciona la primera evidència de la utilització d'aquest tipus de proteïna per mesures en temps real de l'estat redox en plantes sota estrès hídric.

Abstract

Here we report the use of a redox-sensing GFP targeted in the cytosol (c-roGFP1) as a real time redox reporter in transformed *Arabidopsis thaliana* plants growing under water stress conditions. The experiments allowed us to confirm *in vivo* the effects of water stress in the redox state of leaf cells. For this purpose plant water state, expressed as relative water content (% RWC) and hydration (H), as well as growth parameters given by leaf area and rosette biomass were determined. Simultaneously, ratiometric - roGFP fluorescence measurements were carried out. When water stress (withholding water) was applied, the leaf RWC and H decreased from 96.12 to 69.42 % and from 10.01 to 4.74 g H₂O g DW⁻¹, respectively. Simultaneously, the redox potential of stressed leaves became less negative (from about -312 mV to approx. -302 mV). Immediately following re-watering (after 11 days of water stress) plant water state recovered but the plants remained at a more oxidized redox state for one day. But with the passage of one additional day (day 14) the redox state of the re-watered plants returned to near the starting point of the experiment (-312 mV vs. -308 mV). With the passage of 6 more days the redox state of the re-watered plants stabilized at levels similar to pre-stress. Water stress was severe inducing transient oxidative stress. Besides, although water stress was relieved after re-watering, plants did not fully recover either the hydration or the redox state of pre-stress values.

By using *Arabidopsis* plants transformed with a redox-reporting GFP we provide the first evidence of the utility of using a redox-sensing GFP for real-time measurements of redox state in water-stressed plants.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, c-roGFP, ratiometric measurements, recovery, redox state, water stress

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T36-4Y5GY1Y-2-K&_cdi=4938&_user=145085&_pii=S0014579310000335&_origin=search&_coverDate=03%2F05%2F2010&_sk=994159994&view=c&wchp=dGLzVzb-zSkWA&md5=ab5cd7cd26ecc87509615035eef6b16d&ie=/sdarticle.pdf

1. El H₂O₂ en l'acimatació de *Cistus albidus* a la sequera

La formació de H₂O₂ té diferents funcions a la cèl·lula vegetal, des de l'alleujament de cadenes de transport d'electrons sobrecarregades (Perl-Treves i Perl 2002); la lignificació i diferenciació del xilema (Ros-Barceló 2005); l'activació de la mort cel·lular programada (Levine et al. 1994); o la transducció de senyals com a segon missatger d'hormones (Kwak et al. 2006), activant canals de calci (Sagi i Fluhr 2001), MAP quinases (Kotvun et al. 2000) i la transcripció de gran quantitat de gens (Desikan et al. 2000). D'acord amb Desikan i col·laboradors (2005) i Hancock (2008), el H₂O₂ presenta totes les qualitats per ser una molècula-senyal com ara el seu pes molecular baix; la seva capacitat per travessar membranes i que es destrueix ràpidament.

El H₂O₂ augmenta en resposta a diferents estressos, tant biòtics com abiòtics (Apel i Hirt 2004), si bé generalment els experiments que s'han efectuat per estudiar la funció d'aquesta molècula s'han dut a terme *in vitro*, en plantes cultivades en cambres de cultiu, en testos o en altres sistemes. Tot i que tots aquests experiments han contribuït enormement al coneixement de la funció d'aquesta molècula, manquen estudis sobre plantes desenvolupant-se sota les seves condicions naturals de creixement (Mittler 2006). Per tant en aquesta tesi s'ha volgut profunditzar en l'estudi de la possible funció del H₂O₂ en l'acimatació de *C. albidus* a la sequera d'estiu en condicions de camp i en la relació estrès hídric-estrès oxidatiu.

1.1. Estudis inicials

Els primers experiments duts a terme en aquesta tesi foren per determinar: (i) si el H₂O₂ s'acumula en resposta a la sequera d'estiu; (ii) la localització subcel·lular del H₂O₂ en el cas que s'acumuli en resposta a la sequera, i (iii) les fluctuacions diürnes i estacionals del H₂O₂.

1.1.1. El H₂O₂ s'acumula en resposta a la sequera

L'acumulació de H₂O₂ es va determinar mitjançant la tècnica descrita per Bestwick et al. (1997). Aquesta tècnica s'utilitza per localitzar el H₂O₂ a nivell subcel·lular mitjançant microscopia electrònica de transmissió (MET); s'emprà CeCl₃ que reacciona amb el H₂O₂ per formar dipòsits electrodensos de perhidròxid de ceri que es poden observar mitjançant MET.

Els resultats obtinguts en els capítols 1 i 2 dels Resultats, mostren que el H₂O₂ s'acumula amb l'establiment de l'estrès en les tres espècies estudiades: *Salvia officinalis*, *Cistus albidus* i *Cistus clusii*.

1.1.1.1. Localització de H₂O₂ a tres espècies mediterrànies arbustives amb diferents sensibilitats a la sequera

S. officinalis es va comportar com una planta sensible a la sequera i va presentar símptomes de senescència en una situació d'estrès. En aquest assaig es va estudiar simultàniament la relació entre sequera, estrès oxidatiu i senescència a les fulles, completament expandides i de la mateixa edat, de plantes de *S. officinalis* crescudes al camp en condicions de clima mediterrani. Els símptomes de senescència de les fulles es mostren en primer lloc als cloroplasts (Smart 1994),

tal com es mostra a *S. officinalis*, on, a més, es va observar una acumulació de plastoglòbuls a l'estroma; distorsió de les membranes tilacoidals; disminució de les piles de tilacoids granals i altres processos associats a la degradació de membranes com la formació de membranes en forma d'espivals. Simultàniament, a nivell del nucli, es va observar condensació de cromatina.

Paral·lelament es va observar un increment de malondialdehid (MDA), indicant un increment de l'oxidació lipídica en una situació de sequera que indica, al seu torn, la possibilitat d'una relació entre sequera i espècies actives d'oxigen (EAO). La EAO escollida fou el H_2O_2 i es va examinar la possible relació entre la seva acumulació i els símptomes de senescència observats als cloroplasts. Els estudis es van basar en la localització subcel·lular de H_2O_2 . Els resultats obtinguts mostren que quan les plantes estaven ben regades (el mes de gener) no hi havia acumulació de H_2O_2 en cap compartiment cel·lular, però amb l'establiment de l'estrès es podien observar clarament dipòsits electrodensos de perhidròxid de ceri. Les primeres acumulacions de H_2O_2 es van localitzar als engruiximents dels vasos del xilema i a la part més externa de les parets cel·lulars de les cèl·lules del mesòfil i posteriorment, també al plasmalema de les cèl·lules del mesòfil de les fulles que es trobaven en situació d'estrès. En cap moment es va observar acumulació de H_2O_2 als cloroplasts de les cèl·lules del mesòfil de les fulles de les plantes estresades tot i que en algunes ocasions els cloroplasts estaven seriosament danyats.

Aquests resultats suggereixen que l'acumulació de H_2O_2 , localitzada a la paret cel·lular, és induïda per estrès i pot estar associada amb canvis en l'estructura de la paret cel·lular durant l'estrès (Hohl et al. 1995; Scandalios et al., 1997) i, donat que el H_2O_2 és utilitzat per la peroxidasa que regula la polimerització oxidativa dels alcohols p-cumaril, coniferil i sinapil necessaris per la formació de lignina, podria contribuir a la formació dels anells en forma d'espivals de la cara interna del xilema (Ros-Barceló 1997). Posteriorment, en aquesta tesi (Capítol 3 dels Resultats), s'ha demostrat la funció estructural del H_2O_2 , doncs intervé en la formació d'esclerènquima que dona resistència mecànica a les fulles i de nou s'observa la presència de H_2O_2 als anells del xilema indicant una relació entre H_2O_2 i síntesi de lignina. Així mateix, simultàniament amb la localització de H_2O_2 a *S. officinalis*, s'assenyala l'existència de diversos sistemes enzimàtics implicats en la producció de H_2O_2 a nivell del plasmalema i acumulació a la paret cel·lular (Neill et al., 1999; Lüthje et al., 2000), enzims que s'han identificat com NADPH oxidases i peroxidases (Desikan et al., 1996). A més donat que el H_2O_2 també es va localitzar a nivell del plasmalema al mateix temps que s'enregistrava un augment progressiu de malondialdehid, indicador de peroxidació lipídica (Hodges et al. 1999), no es pot descartar la seva participació en l'oxidació lipídica ocasionant dany oxidatiu, tant de forma directa o com a precursor de $OH\cdot$ en la reacció de Fenton (Halliwell i Gutteridge 1989).

Generalment es considera que gran part de la síntesi de H_2O_2 té lloc en els cloroplasts, mitocondris i peroxisomes. Però en una situació d'estrès, tant abiòtic com biòtic, l'increment més elevat de H_2O_2 es localitza en el plasmalema i s'acumula a nivell de la paret cel·lular per

l'activitat de NADPH oxidases i peroxidases (Frahry i Schopfer 1998; Bolwell et al. 2002; Almagro et al., 2008). Per tant els nostres resultats, pel que fa a la localització i acumulació de H₂O₂ a la paret cel·lular, s'ajusten als observats per altres autors, encara que la seva ràpida difusió fora dels cloroplasts no es pot excloure.

Pel que fa a l'absència de H₂O₂ als cloroplasts, no es pot descartar que la metodologia utilitzada no sigui prou sensible per a detectar l'acumulació de H₂O₂ als cloroplasts on les concentracions de H₂O₂ podrien ser menors que en la paret cel·lular (Queval et al., 2008), tot i que s'ha localitzat la producció de H₂O₂ en aquests orgànuls induïda per exposició a paraquat (Hu et al. 2005). Així doncs, tot i que en situacions d'estrès sever els cloroplasts estaven seriosament danyats i els valors de MDA eren alts, els resultats obtinguts a *S. officinalis* suggereixen que el H₂O₂ no és l'EAO directament responsable de la desorganització de la ultraestructura dels cloroplasts de les cèl·lules del mesòfil de les fulles de les plantes sotmeses a dèficit hídric. La disminució del valor d' α -tocoferol, que apart d'altres funcions s'encarrega de segrestar el ¹O₂, és indicador que probablement aquesta EAO és la responsable del desestructurament dels cloroplasts. Recentment aquesta hipòtesi ha estat confirmada per Triantaphylidès i col·laboradors (2008), que han demostrat que el ¹O₂ és l'EAO més activa implicada en processos de dany fotooxidatiu a les plantes.

A *C. clusii* i *C. albidus* es va examinar la localització del H₂O₂ a les cèl·lules del mesòfil de les fulles. Es va comprovar que el H₂O₂ s'acumulava a nivell de paret cel·lular i no a l'interior de les cèl·lules, que conservaven intacta la seva ultraestructura. A l'apartat següent es descriu la temporalitat de l'acumulació en ambdues espècies i les diferències que hi va haver entre elles.

1.1.1.2. Quantificació de H₂O₂ amb una tècnica semi-quantitativa: variacions diürnes i estacionals a *C. clusii* i *C. albidus*

En aquest apartat es va estudiar tant la localització subcel·lular de H₂O₂ com el seu patró d'acumulació estacional i diürn; simultàniament amb les relacions hídriques de les plantes a *C. albidus* i *C. clusii* al llarg d'un període de 6 mesos, de gener a principis de juliol

Pel que fa a les relacions hídriques d'aquestes espècies es va observar una reducció de la hidratació de les plantes al llarg de l'assaig. En el cas de *C. albidus* la reducció de la hidratació (H) i la del CHR de les plantes va ser progressiva, doncs el mes de març es va observar un descens del 13 % en la hidratació i del 16% en el CHR respecte al mes de gener; i el mes de juliol el descens era del 39 i el 30 %, respectivament. A les plantes de *C. clusii*, en canvi, a l'inici de l'experiment les relacions hídriques de les plantes es van mantenir més constants fins al mes de maig i va ser al mes de juliol on es va observar una davallada 30 % en la hidratació de les plantes i del 18% en el CHR.

En l'estudi del patró d'acumulació del H₂O₂ s'ajusta a un model en el qual l'acumulació de H₂O₂ és màxima amb l'establiment del dèficit hídric a les plantes. L'acumulació de H₂O₂ en ambdues espècies va augmentar a l'inici de la disminució de les relacions hídriques (mes de

març a *C. albidus* i mes de juliol a *C. clusii*) i es va localitzar a les parets de les cèl·lules del mesòfil. El màxim d'acumulació es va mostrar sempre al migdia quan hi ha el pic de llum, temperatura i dèficit de pressió de vapor, tot i que el progrés en l'acumulació fou diferent entre les dues espècies.

A *C. albidus* l'acumulació de H_2O_2 a la paret de les cèl·lules del mesòfil es va mostrar discontinua, i el màxim d'acumulació fou el migdia del mes de març, just quan les plantes començaven a disminuir la seva hidratació a causa d'un final d'hivern molt sec. En aquest punt, el 90 % de les cèl·lules observades mostraven un marcatge discontinu però dens a les seves parets. El marcatge va disminuir a un 60 % el mes de maig, i a principis del mes de juliol pràcticament no es va observar acumulacions de perhidròxid de ceri a les fulles d'aquesta espècie.

A *C. clusii*, en canvi, el màxim d'acumulació de H_2O_2 no va ser patent fins el migdia del mes de juliol, coincidint amb el descens de les relacions hídriques de les plantes. En aquest punt el 98% de les cèl·lules mostraven un marcatge de H_2O_2 dens i fluid i el CHR havia disminuït un 18%.

Així doncs en aquest estudi es va arribar a la conclusió de que per una banda hi havia un cicle diürn d'acumulació de H_2O_2 a la paret cel·lular de les cèl·lules del mesòfil el qual s'acumulava al migdia i que podria ser el resultat d'una interacció d'estressos (dèficit hídric, temperatura elevada i alta radiació). Encara que també es pot apuntar la inactivació per la llum d'enzims responsables de l'eliminació del H_2O_2 (Ning Shao et al., 2008).

L'acumulació de H_2O_2 a l'inici de l'estrès podria estar associada amb la seva funció com a molècula senyal (Bray, 1993; Doke, 1997; Foyer i Noctor, 1999; Dat et al., 2000; Desikan et al., 2000; Neale et al. 2000) i tal com s'ha dit per *S. officinalis*, en modificacions a nivell de la paret cel·lular. En aquest estudi no es va observar acumulació de H_2O_2 ni en els cloroplasts ni en els mitocondris o peroxisomes de *C. albidus* i *C. clusii*, resultats que concorden amb el manteniment de la integritat de la membrana (Jiménez et al 1998; Asada 1999).

A partir d'aquest estudi ens vam plantejar aprofundir en la funció del H_2O_2 com molècula senyal i la seva possible funció en la regulació de la síntesi d'antioxidants i amb aquesta finalitat ens vam centrar en una sola espècie resistent a la sequera: *C. albidus*.

1.2. Estudi del H_2O_2 en plantes de *C. albidus* crescudes en condicions de camp

Donat que els estudis inicials mostraven que el H_2O_2 sí que s'acumula en resposta a la sequera estival, es van determinar concentracions endògenes d'aquesta EAO mitjançant anàlisis bioquímiques realitzades en extractes de fulles i complementades amb estudis de localització subcel·lular en dos models d'experiment:

(i) *Variacions anuals*: experiment realitzat de Novembre (2004) a Octubre (2005), on mensualment es prenen mostres de plantes crescudes en condicions de camp essent l'aigua de la pluja l'únic aportament d'aigua que rebien. Es considera el control (plantes regades) com el

punt de l'any amb les relacions hídriques més elevades (Desembre), i l'estrès (plantes no regades) com els mesos de la sequera d'estiu (Juny, Juliol i Agost). Les mostres es van prendre al migdia, donat que era en aquest punt on prèviament s'havia observat la màxima acumulació de H_2O_2 , tal com s'ha vist a l'*Estudi inicial I*.

(ii) *Estiu-tardor*: experiment realitzat durant els mesos d'estiu i tardor el mateix any que es du a terme l'experiment de les *Variació anual*, s'inicia el 8 de juny i acaba el 2 de novembre. En aquest cas es pretén separar el factor dèficit hídric de la resta de factors presents a la sequera d'estiu com són la temperatura elevada i l'alta radiació, per tant es prenen mostres de dues poblacions diferents: plantes regades (WW) i plantes no regades (WS) i posterior recuperació hídrica. Les plantes WW es regaven a capacitat de camp cada dos dies; les plantes WS no van rebre aigua durant un període de 16 setmanes i van créixer sota un túnel de polivinil que permetria cobrir les plantes en cas de pluja. Les mostres es prenen un cop cada tres setmanes sempre que la climatologia ho permetia i també es recol·lectaven al migdia. Els 2 tipus d'estudi van permetre així mateix estudiar la resposta de les plantes a la recuperació hídrica ja fos per les pluges de final d'estiu inici de tardor en el cas de les *Variació anual* o per l'aplicació de rec i pluja en el cas de l'experiment *Estiu-tardor*.

A partir dels resultats obtinguts en aquests experiments es discuteix la relació entre localització i contingut total de H_2O_2 , grau d'estrès i possible funció tant des del punt de molècula senyal com estructural les plantes de *C.albidus*.

1.2.1. Respostes de *C. albidus* a la sequera d'estiu

Per establir el període de sequera i determinar l'entorn en el que es desenvolupaven les plantes en les que es realitzaven els experiments, es van mesurar les condicions climàtiques. Els resultats mostren que les plantes van créixer en condicions típiques del clima mediterrani: hiverns amb temperatures suaus, primavera i tardor plujoses, estiu sec. S'ha d'aclarir que el principi de primavera fou sec, però la irregularitat de les pluges també és una característica del clima mediterrani (Pereira i Chaves 1993).

1.2.1.1. Relacions hídriques

En tots dos experiments, *Variació anual* i *Estiu-tardor*, el CHR i la hidratació de les fulles de *C. albidus* van disminuir en resposta a la disminució dels continguts hídrics del sòl i DPV, però les plantes de l'experiment *Variació anual* eren la segona generació de plantes aclimatades a la sequera mentre que les plantes de l'experiment *Estiu-tardor* havien estat desenvolupades a partir d'esqueix en un hivernacle amb condicions hídriques més elevades. Probablement per aquesta raó, els valors d'hidratació (H) màxims assolits per les plantes pertanyents a les *Variació anual* foren un 31.6% més baixos que els assolits per les plantes pertanyents a l'experiment *Estiu-tardor*, tot i que els continguts hídrics relatius (CHR) foren sempre els mateixos entre ambdues poblacions. Per un CHR del 86% la hidratació a la població *Estiu-tardor* fou de $2.85 \text{ g } H_2O \text{ g}^{-1} \text{ PS}$, mentre que a la població *Variació anual* fou de $1.95 \text{ g } H_2O \text{ g}^{-1} \text{ PS}$. Els valors mínims, en

canvi, foren els mateixos tant pel CHR com per la H, dels voltants del 45% i de 0.7 g H₂O g⁻¹ PS respectivament. A la població de plantes ben regades de l'experiment *Estiu-tardor*, el CHR i la H es van mantenir al voltant del 70% i els 1.3 g H₂O g⁻¹ PS, respectivament. Després de les pluges de la tardor, en el cas de l'experiment de *Variació anual* i de la recuperació i, plantes ben regades de l'experiment *Estiu-tardor*, el CHR va augmentar fins assolir els valors més alts del 85%. Les plantes estresades de l'experiment *Estiu-tardor* van ser regades a l'inici de la tardor, el 24 de setembre, quan ja feia 16 setmanes des de l'últim rec. Al cap de dues setmanes de la rehidratació la H havia augmentat fins 1.17 g H₂O g⁻¹ PS, així com el CHR, fins el 71%. Al final de l'experiment, sis setmanes després de la rehidratació, les plantes que havien estat estresades, tal i com s'ha dit abans, tenien els mateixos valors d'H i CHR, i fins i tot més alts, que les plantes ben regades i els mateixos que les plantes de les *Variació anual*.

La davallada de les relacions hídriques en ambdós experiments mostren que les plantes estaven sotmeses a dèficit hídic (Bray 1997), el manteniment de la hidratació i el contingut hídic relatiu en valors baixos fins la rehidratació demostra que *C. albidus* és capaç d'aclimatar-se a la sequera, i la completa recuperació dels paràmetres hídrics als nivells pre-estrès mostra que les plantes no estaven sotmeses a estrès hídic sever, àdhuc es diria que existeix enduriment, doncs els valors obtinguts en les plantes WS recuperades són més alts que els valors de les plantes WW.

1.2.1.2. Paràmetres de creixement

Els paràmetres de creixement s'han de tenir en compte en l'aclimatació de les plantes a la sequera, doncs el creixement és el primer paràmetre que es veu afectat per l'estrès hídic (Spollen 1983), sobretot en plantes crescudes en condicions naturals i sotmeses a una sequera gradual (Pereira i Chaves 1993, 1995). En el cas de la població de plantes de les *Variació anual*, com a paràmetre de creixement es va utilitzar l'àrea de les fulles, doncs la plasticitat foliar és un aspecte molt conspicu en la resposta de *C. albidus* a la sequera (Grant et al. 2005). En la població *Estiu-tardor*, a més de l'àrea de les fulles, es va utilitzar l'increment de la longitud de les branques.

L'àrea foliar va reflectir l'estat hídic de les plantes especialment a les plantes de l'experiment *Variació anual*, doncs es podien comparar les fulles d'estiu (1 cm² durant els mesos de juny, juliol i agost) amb les fulles d'hivern (3 cm² el mes de desembre). A més, en aquesta població l'establiment de la sequera fou més lent que a la població en la que es va realitzar l'experiment *Estiu-tardor* i va donar temps a les plantes per respondre a la sequera.

En l'experiment *Estiu-tardor* les plantes havien estat regades a capacitat de camp des que havien estat trasplantades, el febrer d'aquell mateix any, fins el dia de l'inici de l'experiment, el 8 de juny de 2004 que es van deixar de regar i no van rebre aigua durant un període de 16 setmanes. Aquestes condicions van permetre tenir controlat el règim hídic i poder separar el dèficit hídic de la resta de factors ambientals que es donen simultàniament a la sequera estival

del clima mediterrani. Així, la diferència més gran que hi va haver entre l'àrea de les plantes WW i les plantes WS fou d'un 28% que tot i que es significativa, no és el 67% de diferència entre les fulles d'estiu i d'hivern de la població *Variacions anuals*. Però si en l'experiment *Estiu-tardor* es comparen tant els valors de la població de *C. albidus* WW com la WS amb els valors del final de l'experiment, aquests són 2 vegades i tres vegades més grans, respectivament. En aquest cas, com en l'hydratació, la població WW superava a la població WS. Al final de l'experiment les condicions eren plenament favorables a l'expansió foliar: llum i temperatura però no en excés, aigua en abundància i DPV baix. Cal remarcar la diferència d'àrea que hi ha entre les poblacions dels dos experiments, les fulles en les que es va realitzar l'experiment *Estiu-tardor* a la tardor eren sis vegades més grans que les fulles mesurades a la tardor de l'experiment *Variacions anuals*.

Pel que fa al creixement de les branques, les branques de les plantes ben regades van mostrar una taxa de creixement general de $\alpha = 0.215$, mentre que la taxa de creixement de les plantes estresades durant el període de dèficit hídric fou $\alpha = 0.009$. Després de les pluges de la tardor, en el cas de les WW, i després de la rehidratació, en el cas de les WS, les taxes en ambdues poblacions van assolir la mateixa taxa de creixement, $\alpha = 0.37$.

Els resultats obtinguts mostren que la sequera influeix en el creixement de *C. albidus*, i una vegada més mostra que l'estrès fou moderat per a aquestes plantes. Els valors de l'àrea foliar al final dels dos experiments van tornar a superar els valors dels valors pre-estrès, per tant també es podria parlar d'enduriment en aquest paràmetre.

1.2.1.2.1. Caiguda de fulles

La caiguda de fulles durant la sequera d'estiu defineix *C. albidus* com una planta semi-decídua doncs perd gran part de les seves fulles en resposta al dèficit hídric que es dona a la majoria dels estius mediterranis. També presenta erectofília, orientació vertical de les fulles (Grant i Incoll 2005, Grant et al 2005), durant els mesos d'estiu evitant que les altes radiacions típiques d'aquest període incideixin de forma perpendicular a les seves fulles (Werner et al. 1999) i evitant que les fulles assoleixin temperatures massa elevades (Grant et al 2005).

En ambdós experiments, les plantes van presentar aquesta resposta al dèficit hídric, tot i que només es van comptar les fulles de les plantes al final del període de sequera de l'experiment *Estiu-tardor*. Cada branca de les plantes WW presentava una mitjana de 16 fulles verdes i ben desenvolupades, la majoria de les quals es disposaven de manera perpendicular a la tija (fulles paraheliotrópiques). Les plantes WS, en canvi, mostraven la caiguda de fulles madures provocada per la sequera. Les plantes estresades abans de ser regades tenien 5 fulles per branca (un 69% menys que les WW), les quals mostraven un angle molt menor que les plantes WW, especialment les més properes a l'àpex caulinar les quals estaven tancades al seu voltant, protegint-lo dels factors ambientals. Un cop les plantes es van recuperar, l'angle d'inserció de

les fulles d'aquestes plantes va canviar un altre cop i es van tornar a disposar perpendiculars a la tija.

Tant la caiguda de fulles com l'aturada del creixement són mecanismes utilitzats per *C. albidus* per evitar pèrdues d'aigua a través de la transpiració i per disminuir la quantitat de radiació interceptada (Pereira i Chaves 1993; Tardieu *et al.* 1999).

1.2.1.3. Fluctuacions en les concentracions endògenes de H₂O₂ induïdes pel dèficit hídric

El H₂O₂ va augmentar en resposta al dèficit hídric en plantes de *C. albidus* crescudes en condicions de camp. En els dos experiments en els que es va realitzar la quantificació de H₂O₂, no hi va haver una diferència significativa en l'augment de H₂O₂ fins passades, com a mínim, quatre setmanes des de l'establiment del dèficit hídric. Tot i que en l'experiment *Estiu-tardor* el H₂O₂ va augmentar de 0.7 µmol g⁻¹ PS a 3.6 µmol g⁻¹ PS quan la hidratació i el contingut hídric relatiu van disminuir fins a valors de 0.66 g H₂O g⁻¹ PS i 46 %, respectivament.

En l'experiment *Variació anual* va passar quelcom semblant els mesos d'abril i juny, per això es va realitzar un anàlisi estadístic obviant els dos mesos en que els valors de H₂O₂ més alts, corresponents als mesos de juliol (10.14 µmol H₂O₂ g⁻¹ PS) i agost (7.89 µmol H₂O₂ g⁻¹ PS). L'anàlisi estadístic resultant indica que en aquest dos mesos en que hi va haver una davallada important de l'estat hídric, abril (0.97 g H₂O g⁻¹ PS; 55.67 % de CHR) i juny (0.82 g H₂O g⁻¹ PS; 52.33 % de CHR), els canvis en la concentració de peròxid d'hidrogen tenen una certa significació estadística. A l'abril, el valor de concentració endògena de H₂O₂ (1.8 µmol g⁻¹ PS) era dues vegades més alt que l'obtingut el mes de desembre (0.96 µmol g⁻¹ PS) i l'anàlisi estadístic mostra una tendència a augmentar; però el mes de juny, amb valors gairebé tres vegades més alts (2.25 µmol H₂O₂ g⁻¹ PS) és significativament diferent a la resta de punts en que l'estat hídric de la planta es corresponia amb el d'una planta ben hidratada.

El valor de H₂O₂ del mes de juny de l'experiment *Variació anual* probablement és més elevat que el del més d'abril perquè el mes de juny ja s'inclou dins els mesos d'estiu i, apart de la baixa disponibilitat d'aigua al sòl (3.94 % a 0-20 cm de profunditat; 11.25 % entre 40-60 cm), la temperatura i el dèficit de pressió de vapor eren més elevats. A les plantes WW de l'experiment de l'estiu-tardor també s'aprecia un augment, en alguns punts notable (fins a 4.39 µmol g⁻¹ PS), dels valors endògens de H₂O₂. Aquests augments poden ser provocats per altres factors com la radiació, la llum, la temperatura o el dèficit de pressió de vapor (Chaparzadeh *et al.*, 2004; Verslues *et al.*, 2007).

Els valors de H₂O₂ assolits en els dos experiments són molt similars i les variacions es repeteixen en circumstàncies pràcticament idèntiques, de manera que es pot concloure que del conjunt de factors de la sequera estival, el factor responsable de l'augment de H₂O₂ a *C. albidus* crescut en condicions de camp és el dèficit hídric.

En l'experiment *Variació anual* la recuperació dels nivells inicials, o fins i tot més baixos, de H₂O₂ un cop es va deixar d'aplicar l'estrès hídric és indicatiu que per a aquesta espècie el H₂O₂

no representa un dany, tot i que es pot mostrar com un estrès oxidatiu moderat, doncs un cop superat el període d'estrès les plantes recuperen totes les seves funcions vitals (Lichtenthaler 1996) i el H_2O_2 torna a nivells basals.

1.2.1.3.1. L'increment de H_2O_2 durant la recuperació de les plantes WS

Una setmana després de la rehidratació de les plantes WS de l'experiment *Estiu-tardor* es va enregistrar un pic de H_2O_2 que no s'explica per dèficit hídric. Aquest pic va ser el pic més alt enregistrarat en els dos experiments ($12 \mu\text{mol } H_2O_2 \text{ g}^{-1} \text{ PS}$), i al cap de 5 setmanes els valors de H_2O_2 havien tornat als nivells basals ($0.22 \mu\text{mol } H_2O_2 \text{ g}^{-1} \text{ PS}$). Resultats semblants s'havien obtingut en molses (Mayaba et al. 2002) i líquens (Weissman et al. 2005), on es mostrava un patró d'acumulació de H_2O_2 similar: un pic just després de la rehidratació dels espècimens deshidratats que després disminuïa i tornava a concentracions basals. En l'experiment *Variació anual* aquest augment no es va enregistrar al final de l'experiment, quan el final del dèficit hídric fou una conseqüència natural de les pluges del final de l'estiu i de l'inici de la tardor. De manera que no es pot descartar que aquest increment del H_2O_2 fos simplement una conseqüència del xoc causat per canvis ràpids en la hidratació dels teixits. Tot i que a l'inici de la recuperació d'un estrès sever, tots els éssers vius pateixen més estrès que durant l'imposició d'aquest.

1.2.1.4. Localització de H_2O_2 i ultraestructura

El H_2O_2 localitzat mitjançant la tècnica descrita per Bestwick et al (1997) a *C. albidus* sempre va mostrar els mateixos resultats: el H_2O_2 s'acumula a l'apoplast i a altres teixits estructurals de les fulles d'aquesta planta mediterrània arbustiva.

A l'apoplast el H_2O_2 té tendència a acumular-se encarat als espais intercel·lulars, com els cloroplasts quan estan exposats a la sequera (Larcher 2003), i se sol presentar com una capa contínua que, en funció de la concentració de H_2O_2 , pot presentar diferents gruixos.

Pel que fa a altres teixits estructurals, el H_2O_2 s'ha trobat a l'engruiximent del xilema i a l'esclerènquima en formació. Aquest aspecte es discuteix a l'apartat 1.3.2. d'aquesta Discussió.

L'ultraestructura de les cèl·lules del mesòfil es va mantenir intacta, exceptuant la formació d'esclerènquima, fins i tot en les èpoques d'estrès més sever.

1.3. Funció del H_2O_2 a fulles de *C. albidus* durant la sequera d'estiu

A partir dels resultats de localització de H_2O_2 obtinguts a *C. albidus* en l'experiment preliminar i de la informació obtinguda de les imatges de microscopia obtingudes amb el MET d'aquests experiment es van crear les hipòtesis que (i) el H_2O_2 no és dany per les cèl·lules de *C. albidus* i que (ii) el H_2O_2 pot tenir una funció estructural en aquesta espècie quan es troba sotmesa a la sequera estival.

Un cop realitzades les quantificacions endògenes de H_2O_2 i completat l'estudi de l'ultraestructura en la deposició de H_2O_2 als teixits de les fulles de *C. albidus*, a fi de caracteritzar millor el comportament d'aquesta EAO en una planta mediterrània crescuda en condicions de camp es va

procedir a investigar en la possible funció que el H₂O₂ pot tenir en l'aclimatació de *C. albidus* a la sequera.

En diverses publicacions es relacionava el H₂O₂ amb diverses hormones (Desikan et al. 2005; Kwak et al. 2006; Gapper i Dolan 2006). Amb l'objectiu de comprovar aquestes dades en condicions de camp i amb la sequera, es va incloure la hipòtesi que (iii) el H₂O₂ actua com a transductor de senyal de dues hormones involucrades en l'estrès: l'àcid abscísic i el metil jasmonat.

Per tant es van dur a terme anàlisis complertes del H₂O₂ en fulles de *C. albidus*, al mateix temps que es mesuraven les relacions hídriques, paràmetres de creixement i factors ambientals. Les dades obtingudes es van comparar amb (i) mesures d'estrès general i d'estrès oxidatiu per determinar la possibilitat del H₂O₂ com a dany oxidatiu; (ii) la localització de dipòsits de perhidròxid de ceri en teixits estructurals de les fulles i les concentracions endògenes de lignina per determinar la funció estructural del H₂O₂; (iii) mesures endògenes d'àcid abscísic i metil jasmonat per determinar la funció del H₂O₂ en la transducció del senyal hormonal.

1.3.1. Efecte del H₂O₂ a *C. albidus*: marcadors d'estrès

Com a marcadors d'estrès es va utilitzar un paràmetre d'estrès general i dos paràmetres d'estrès oxidatiu. La Fv/Fm fou el paràmetre utilitzat com a marcador d'estrès general, doncs la fotoinhibició irreversible del fotosistema II és un símptoma clar d'estrès, o més aviat de dany provocat per qualsevol tipus d'estrès.

Entre els paràmetres d'estrès oxidatiu, la concentració d'ascorbat (AA) i el seu estat oxidatiu van ser utilitzats com a marcadors de l'estat de l'equilibri que hi ha entre aquest antioxidant i el H₂O₂ (Alegre i Munné-Bosch 2006), doncs és un dels antioxidants més abundant a la cèl·lula vegetal, constituint un 10 % del contingut de carbohidrats solubles en aquestes (Smirnoff i Pallanca 1996) i el més important a l'hora d'eliminar el H₂O₂ (Noctor i Foyer 1998). El desequilibri entre H₂O₂ i AA conduiria a estrès oxidatiu, i en les conseqüències més greus portarien al dany oxidatiu. La concentració endògena de malondialdehid (MDA) es va usar per valorar el dany oxidatiu provocat tant pel H₂O₂ com per una altra EAO, doncs el MDA és un marcador de peroxidació lipídica (Hodges et al. 1999). Un augment de MDA acompanyat d'un augment de DHA serien indicadors que el H₂O₂ provoca estrès oxidatiu, que al seu torn provocaria dany a nivell de membranes.

Les imatges de microscopia ens van permetre detectar si hi havia desorganització d'òrgans i altres sistemes endomembranosos.

Els resultats obtinguts indiquen que les cèl·lules de les fulles de *C. albidus* no patien dany. Així, l'augment de H₂O₂ no provoca dany oxidatiu en aquesta espècie mediterrània i probablement actua com a senyal i/o és una conseqüència dels canvis metabòlics provocats per l'estrès hídric.

1.3.1.1. El H₂O₂ no origina dany oxidatiu a *C. albidus*

Els resultats obtinguts de Fv/Fm, MDA i ultraestructura indiquen que no hi havia dany oxidatiu. Els valors de Fv/Fm no van baixar de 0.760 en cap dels dos experiments, indicant que no hi havia dany oxidatiu, tot i que sí que hi havia una petita disminució en l'eficiència del fotosistema II especialment quan l'estrès era més sever, el mes de juliol en l'experiment *Variació anual* i l'últim punt del període de sequera de les plantes WS a l'experiment *Estiu-tardor*.

Els valors de MDA es van mantenir constants al llarg de l'experiment *Variació anual* (al voltant dels 10 nmol g⁻¹ PS), amb una tendència a la baixa els mesos d'estiu. Aquests valors també indiquen que no hi va haver dany oxidatiu i que existia un procés d'enduriment a nivell de metabolisme oxidatiu.

1.3.1.2. H₂O₂ i estat d'oxidació de l'ascorbat

L'ascorbat va augmentar durant el període de sequera, tant en les plantes de l'experiment *Variació anual* com en les plantes WS de l'experiment *Estiu-tardor*, en ambdós casos fou un augment gradual i, tot i que van arribar a valors similars i van seguir patrons semblants, hi va haver petites diferències en els valors màxims (117.76 μmol g⁻¹ PS per l'estudi *Variació anual*; 137.27 μmol g⁻¹ PS per l'estudi *Estiu-tardor*). En el cas de l'experiment realitzat en condicions naturals, a l'abril hi va haver un lleuger augment d'ascorbat (22% respecte el mes de desembre) simultàniament amb la petita davallada de les relacions hídriques que va succeir aquest mes (0.97 g H₂O g⁻¹ PS; 56% CHR), provocada per la manca de precipitacions a la primavera. Després de les pluges de maig hi va haver una recuperació en tots els paràmetres, però al juny, coincidint amb una altra davallada en les relacions hídriques, l'augment d'AA va ser dues vegades superior al de maig i desembre. El mes de juliol, quan les plantes continuaven amb valors baixos de CHR i H (57.8 % i 0.76 g H₂O g⁻¹ PS) i coincidint amb el pic de H₂O₂, l'AA va augmentar per arribar a valors tres vegades més alts que els de les plantes ben hidratades. Les plantes estressades de l'experiment *Estiu-tardor* van seguir el mateix patró: primer els valors van augmentar en el mateix ordre que les plantes en la mateixa situació que a l'experiment *Variació anual*, i van arribar a ser tres vegades més alts que en les plantes ben regades, coincidint amb el pic de H₂O₂. Aquesta situació, AA elevat i H₂O₂ elevat, es va mantenir fins que les plantes, en tots dos experiments, va ser rehidratades. Els valors en ambdós experiments, eren una vegada més, inferiors en plantes recuperades, al voltant dels 20 μmol AA g⁻¹ PS, que en plantes pre-estrès, aproximadament 50 μmol AA g⁻¹ PS.

Aquests valors mostren que *C. albidus* manté l'equilibri oxidatiu respecte al H₂O₂ (Alegre i Munné-Bosch 2006). És possible que l'augment d'AA fos causat, com a mínim parcialment, per l'augment de H₂O₂, doncs s'ha comprovat en altres experiments d'estrès hídric que el H₂O₂ provoca l'augment d'AA (Jiang i Zhang, 2002; Rizhsky et al 2004).

Els valors obtinguts amb l'àcid dehidroascòrbic mostren que la quantitat d'AA era suficient per regular el H₂O₂, o que al trobar-se en compartiments no interaccionaven de manera que el DHA

es va mantenir en nivells molt més baixos respecte al seu equivalent reduït. Una altre hipòtesi per aquesta diferència en la compartimentació, és que l'AA manté el H_2O_2 a l'exterior de la cèl·lula. Els valors es van mantenir de l'ordre de 1:10 (DHA:AA) en la majoria de punts de mostreig, a excepció feta del punt anterior a la rehidratació de les plantes WS, que van mostrar una certa tendència a augmentar el seu estat oxidat, tot i que es va recuperar a les dues setmanes d'haver estat regades.

De les imatges de microscòpia obtingudes tant en l'experiment *Variació anual* com en l'*Estiu-tardor* es podria deduir la funció de l'AA en la protecció de les cèl·lules al dany oxidatiu, doncs mantien la seva ultraestructura intacta, tot i estar envoltades de H_2O_2 . Les imatges mostren que l'AA confinava el H_2O_2 a l'apoplast, on la concentració d'AA és molt més baixa que al simplast; l'apoplast conté el 5-10 % d'AA de la cèl·lula (Sanmartín *et al.* 2003).

La ràpida recuperació de les plantes d'ambdós experiments és una altra prova que les cèl·lules estaven protegides contra l'estrès oxidatiu i altres danys. Això també es va comprovar en plantes de *Myrothamnus flabellifolia*, una planta capaç de sobreviure a la dessecació, on es va trobar que l'AA és troba implicat en la seva recuperació (Kranter *et al.* 2002).

1.3.2. Funció estructural del H_2O_2

El H_2O_2 a l'apoplast no sol causar dany, ans al contrari, pot tenir una funció important, tant en l'enduriment (Hohl *et al.* 1995; Ros-Barceló *et al.* 2002) com en l'afluixament de la paret cel·lular (Fry 1998) i, a més, és necessari per a la formació de lignina (Ros-Barceló 1997). Així doncs, es va suggerir que l'acumulació de H_2O_2 induïda per estrès hídric i localitzada a la paret cel·lular podria estar associada amb canvis en l'estructura de la paret cel·lular (Hohl *et al.* 1995; Scandalios *et al.* 1997) com l'entrelligament de proteïnes de paret (Brisson *et al.* 1994) i en la deposició de fibres de cel·lulosa durant la formació de la paret secundària (Pothika *et al.* 1999) i, a més, el H_2O_2 és utilitzat per la peroxidasa que regula la polimerització oxidativa dels alcohols p-cumaril, coniferil i sinapil necessaris per la formació de lignina (Ros-Barceló 1997). La deposició de lignina i l'entrelligament de fibres contribueixen a l'enduriment de la paret, que al seu torn contribueix a l'aturada del creixement i l'expansió de les fulles (Spollen *et al.* 1993).

Donats els canvis de creixement que es van donar a les plantes durant la sequera d'estiu, es van comparar els valors totals de H_2O_2 i la seva localització amb els obtinguts en les mesures endògenes de lignina, amb l'objectiu de dilucidar si el paper del H_2O_2 durant l'aclimatació de *C. albidus* a la sequera és estructural.

1.3.2.1. H_2O_2 , lignina i creixement

Els resultats obtinguts mostren que, efectivament hi havia un augment de lignina (de 16.79 mg a 25.68 mg g⁻¹ PS), però aquest augment es va detectar des del mes de maig fins el mes d'agost, abans que hi hagués un augment significatiu del H_2O_2 i la davallada de l'àrea foliar (apartat 1.2.1.2. de la Discussió). Tot i que en estudis anteriors es mostrava que l'ABA induïa tant

l'increment de H_2O_2 com de l'activitat peroxidasa en arrels (Lin i Kao 2001), els resultats obtinguts mostren que si l'increment de lignina està relacionat amb la producció de H_2O_2 , només són necessaris els petits increments que aquesta EAO i l'ABA van experimentar el mes d'abril per estimular la polimerització oxidativa de lignina i augmentar-ne el seu contingut un 34.6 %. De totes maneres, la reducció de l'àrea no sembla relacionada amb l'augment de la concentració de lignina, doncs segurament es troba més relacionada amb la diferenciació del xilema i l'esclerènquima. Tot i aquesta conclusió, els nivells de lignina van baixar significativament després de les pluges de la tardor, coincidint amb l'inici de l'increment de l'àrea foliar: 1.93 cm^2 per fulla al setembre i 3.97 cm^2 a l'octubre, comparats amb els 0.97 cm^2 per fulla de l'agost.

1.3.2.2. H_2O_2 i formació d'esclerènquima

L'esclerènquima és un teixit de sosteniment que es troba generalment envoltant els vasos conductors de les plantes. Està format per cèl·lules amb parets secundàries gruixudes que normalment estan lignificades i no contenen un protoplast viu quan són madures. En els casos en que es troben cèl·lules a l'interior són elements morts (Dickison 2000). *C. albidus*, com la majoria de les plantes arbustives que viuen al clima mediterrani, es una planta esclerofíl·la, que es caracteritza, entre altres aspectes, per l'abundància d'esclerènquima a les seves fulles (Gibson 1994).

Les imatges de microscopia electrònica de transmissió obtingudes durant l'observació de les cèl·lules foliars de *C. albidus* mostren que el H_2O_2 està involucrat en la formació d'esclerènquima. A la Figura 5 del capítol 3 de resultats, es mostra una seqüència de diferents moments en la formació de l'esclerènquima. En primer lloc s'observa una cèl·lula amb parets gruixudes amb H_2O_2 al seu plasmalema i el nucli mostra la cromatina condensada (síntoma de mort cel·lular programada); a la següent imatge s'observa una altra cèl·lula totalment desorganitzada i pràcticament morta, on hi ha restes de cloroplasts (membranes i dos grans de midó) i es pot apreciar que està morta o gairebé morta; la tercera imatge mostra una vista més general d'una porció de l'esclerènquima ja format amb H_2O_2 al seu interior. Aquesta seqüència suggereix que el H_2O_2 provoca la mort cel·lular programada a cèl·lules proto-esclerènquimàtiques al mateix temps que contribueix a la lignificació de les parets que formen part de l'esclerènquima madur, tal com succeeix durant la formació de xilema al panís (Ros Barceló 2005).

Aquestes imatges es van observar tant en les plantes de l'experiment *Variació anual* com a les de l'experiment *Estiu-tardor* (no es mostren les dades) i són indicadores que en resposta a la sequera hi ha formació de teixit de suport mecànic al voltant dels vasos conductors de les fulles i que el H_2O_2 intervé en aquest procés.

És el primer cop, segons el nostre coneixement, que es relaciona directament el H_2O_2 amb la formació d'esclerènquima. L'esclerènquima sol estar format de lignina, per tant la seva

formació pot implicar l'acumulació de lignina a les fulles. És probable que la formació de lignina estigui més implicada en la formació de xilema i esclerènquima que en l'aturada del creixement, i al formar-se més teixits de suport, la proporció superfície/teixit conductor disminueix en fulles que amb la superfície foliar disminuïda (Larcher 2003).

1.3.3. H₂O₂ com a transductor de senyals

Per determinar si el H₂O₂ està implicat en la senyalització durant la resistència de *C. albidus* a la sequera es van mesurar les concentracions endògenes d'àcid abscísic i metil jasmonat. L'àcid abscísic perquè és una hormona relacionada directament amb l'estrès hídric (Bray 1997, 2000, 2008; Shinozaki et al. 2003; Bartels i Sunkar 2005; Nambara i Marion-Polle 2005), i el metil jasmonat perquè és una hormona que encara s'està caracteritzant (Lorenzo i Solano 2005; Wasternack 2007; Balbi i Devoto 2008) i se l'ha relacionada amb diferents tipus d'estrès, incloent-hi l'estrès hídric (Creelman i Mullet 1995; Wang 1999; Pedranzani et al. 2007; Mahouachi et al. 2007).

1.3.3.1. H₂O₂ i ABA

La relació entre ABA i H₂O₂ s'ha demostrat a les cèl·lules de guarda d'*Arabidopsis thaliana* i *Vicia faba* (Zhang et al. 2001; Kwak et al. 2003; Desikan et al. 2004; Ann et al. 2008; Neill et al. 2008). També s'ha demostrat l'acumulació de H₂O₂ induïda per ABA en fulles de panís tallades i sotmeses a estrès osmòtic induït per polietilen glicol (Jiang i Zhang 2002), tractament amb ABA (Hu et al. 2005), i en cultius de cèl·lules de tabac BY-2 (Hao et al. 2008). Al llarg d'aquesta tesi s'han realitzat experiments en condicions de camp sota condicions climàtiques naturals per entendre els esdeveniments que es donen en la inducció de H₂O₂ induïda per ABA. A plantes de *C. albidus* sotmeses a la sequera d'estiu, l'ABA i el H₂O₂ van augmentar per arribar al màxim els mes de juliol, quan les plantes havien estat a la sequera durant un període prolongat, com a mínim un mes. L'increment d'ABA va ser anterior al de H₂O₂, i els esdeveniments van ser diferent entre ambdues molècules: l'inici en l'increment d'ABA es va donar el mes d'abril, conjuntament amb un decreixement significatiu del 30 % en el CHR i un 37 % en la H. Després d'una disminució momentània, lligada a un increment de les relacions hídriques el mes de maig, el contingut d'ABA va continuar augmentant a mesura que la sequera progressava. Tot i que el mes de juny, tal com s'ha dit a l'apartat 1.2.1.3. d'aquesta Discussió, es va observar un increment dues vegades més alt en el contingut de H₂O₂ (significativament diferent respecte al valor de les plantes ben regades, d'acord amb el test d'Student, $p = 0.0062$), quan els valors d'ABA eren també el doble de l'assolit per les plantes el mes de desembre. Aquests resultats suggereixen que, a *C. albidus*, l'ABA indueix l'acumulació de H₂O₂, tot i que es necessita arribar a un cert llindar de concentració d'aquesta hormona per induir un pic en les concentracions endògenes de H₂O₂.

El final del període de sequera va conduir a una reducció d'ABA i H₂O₂, tal com s'havia descrit anteriorment (Nambara and Maion-Polle 2005; Selote *et al.* 2006), però amb una taxa de reducció diferent, essent la resposta dels nivells de H₂O₂ molt més lenta que els d'ABA.

Aquest resultat demostra que l'augment d'ABA provocat per la sequera estival induïx l'acumulació de H₂O₂, però que la disminució de H₂O₂ un cop acabat el període de sequera no depèn de la disminució d'ABA.

1.3.3.2. H₂O₂ i MeJA

Tal com s'acaba de discutir, s'havia demostrat una estreta relació entre l'increment d'ABA i H₂O₂ en les respostes d'aclimatació de *C. albidus* a la sequera d'estiu. Una altra hipòtesi de treball era la possible participació del MeJA en la inducció de H₂O₂, tal com s'havia demostrat en altres experiments realitzats en sistemes vegetals diferents (Orozco-Cárdenas i Ryan 1999; Maksymieck i Krupa 2002; Wang i Wu 2005; Hung *et al.* 2006; Hung i Kao 2007). En aquest estudi, realitzat en les plantes *Estiu-tardor*, es volia concretar l'efecte del dèficit hídric separant-lo de la resta de factors ambientals en plantes de *C. albidus* crescudes en condicions de camp. Tot i que el MeJA, i els jasmonats en general, és una hormona que s'han relacionat amb l'estrès (Creelman i Mullet 1997; Berger 2002; Devoto i Turner, 2003; Howe 2004; Lorenzo i Solano 2005; Balbi i Devoto 2008), hi ha pocs estudis de dèficit hídric (Creelman i Mullet 1997; Gapper *et al.* 2002; Mahouachi *et al.* 2007; Pedranzani *et al.* 2007).

Els resultats obtinguts en plantes de *C. albidus* sotmeses a estrès hídric mostren que el dèficit hídric induïx la síntesi de MeJA. A diferència de les plantes regades, on els nivells d'aquesta hormona es van mantenir baixos durant tot l'experiment, les plantes WS van experimentar un increment de MeJA a partir de la setena setmana de l'experiment, quan les plantes mostraven valors de CHR del 58.03 %, i 0.74 g H₂O g⁻¹ PS d'hidratació. Aquest augment, tot i que no fou estadísticament significatiu, era 10 vegades més alt que el valor obtingut en les plantes WW, mostrava una tendència. Els nivells més alts de MeJA (140 pmol g⁻¹ PS) es van donar 11 setmanes després de l'últim rec, quan ja feia 8 setmanes que les plantes estaven sotmeses a dèficit hídric. L'estrès hídric va induir l'acumulació progressiva i augment de MeJA en les fulles fins que es va arribar al pic de la onzena setmana, seguit d'una disminució progressiva fins que les plantes WS van estar completament recuperades de l'estrès, la setmana 21 de l'experiment. Aquest patró d'acumulació és compatible amb la hipòtesi del MeJA com a senyal en el dèficit hídric (Mahouachi *et al.* 2007).

Encara que el MeJA va augmentar en resposta al dèficit hídric, l'augment de H₂O₂ no va ser conseqüència de l'augment d'aquesta hormona, confirmant que és l'ABA el que produeix aquest augment. Aquest resultat no coincideix amb els resultats obtinguts en alguns experiments que relacionen H₂O₂ i MeJA, en els es va trobar que l'aplicació externa de MeJA provocava l'augment de H₂O₂ (Orozco-Cárdenas i Ryan 1999; Maksymieck i Krupa 2002; Wang i Wu 2005; Hung *et al.* 2006; Hung i Kao 2007). S'ha de considerar que, mentre la

majoria d'aquests resultats estan basats en aplicacions externes de MeJA, l'estudi dut a terme en aquesta tesi es mesuren concentracions endògenes de MeJA i H₂O₂, de manera que es mostra la coordinació entre aquestes dues molècules senyal. D'aquesta manera es van evitar artefactes provocats per l'exposició externa de MeJA de cèl·lules que normalment no hi estan exposades, originant respostes que naturalment no es donen; i no arribaria a cèl·lules en les que la producció endògena sí que té una funció (Desikan *et al.* 2005).

L'increment inicial de MeJA va coincidir amb el primer pic de H₂O₂, 7 setmanes des de l'inici del període de dèficit hídric. El pic d'aquesta hormona va coincidir amb una disminució del 33 % de la concentració foliar de H₂O₂. Aquest resultat suggereix que, en el cas de plantes de *C. albidus* sotmeses a la sequera estival, el MeJA podria regular els nivells de H₂O₂. Aquest resultat són similar al que es va donar en plantes de *A. thaliana* i suspensions de cèl·lules de tabac BY-2 tractades amb MeJA abans de ser exposades a ozó. En aquests experiments l'aplicació de MeJA va evitar la mort cel·lular, al mateix temps que es va reduir la formació de H₂O₂ (Rao *et al.* 2000; Andi *et al.* 2001).

Cal destacar que el MeJA i el H₂O₂ van disminuir al final del període de recuperació de les plantes WS de l'experiment *Estiu-tardor*, el que pot significar que el MeJA estigui implicat en la disminució de H₂O₂.

1.3.4. AA en relació a H₂O₂, ABA i MeJA

S'ha descrit que el H₂O₂ induït per ABA activa la biosíntesi d'ascorbat, així com la d'altres sistemes antioxidants, enzimàtics i no enzimàtics (Jiang i Zhang 2001, 2002; Zhang *et al.* 2006). A més, s'ha trobat que la MDHAR s'indueix en mutants d'*A. thaliana* deficients en APX i CAT (Rizhsky *et al.* 2002). L'increment significatiu d'aproximadament de 3 vegades experimentat per les concentracions endògenes d'AA a fulles de *C. albidus*, tant en l'experiment *Variació anual* com en l'experiment *Estiu-tardor*, podria haver estat induït pel H₂O₂ induït per ABA, dons en ambdós experiments l'inici de l'augment del H₂O₂ coincideix amb l'increment gradual de l'AA. Donat que l'increment d'AA va provocar la disminució de l'estat oxidatiu de l'ascorbat, es pot afirmar que la interacció sequera – ABA – H₂O₂ protegeix les fulles de *C. albidus* del dany oxidatiu permetent que les plantes sobrevisquin a la sequera d'estiu.

Pel que fa al MeJA, tot i que s'ha descrit la producció d'AA després d'aplicacions externes d'aquesta hormona (Wang 1999; Wolucka *et al.* 2005; Sasaki-Sekimoto *et al.* 2005), i tal com passa amb el H₂O₂, i es descriu en l'apartat 1.2.3. d'aquesta discussió, l'augment d'AA va ser anterior al de MeJA. Per tant es dedueix que, en el cas de plantes de *C. albidus* sotmeses sotmeses a dèficit hídric a l'experiment *Estiu-tardor*, l'augment d'AA en les plantes no va ser induït per MeJA. L'augment d'AA és més probable que fos induït per la interacció ABA – H₂O₂, tal com s'ha comprovat en aquesta mateixa espècie i en plantes de panís (apartat 1.2.2. de la Discussió; Jiang i Zhang 2001, 2002; Zhang *et al.* 2006).

1.4. Esquema general dels resultats obtinguts

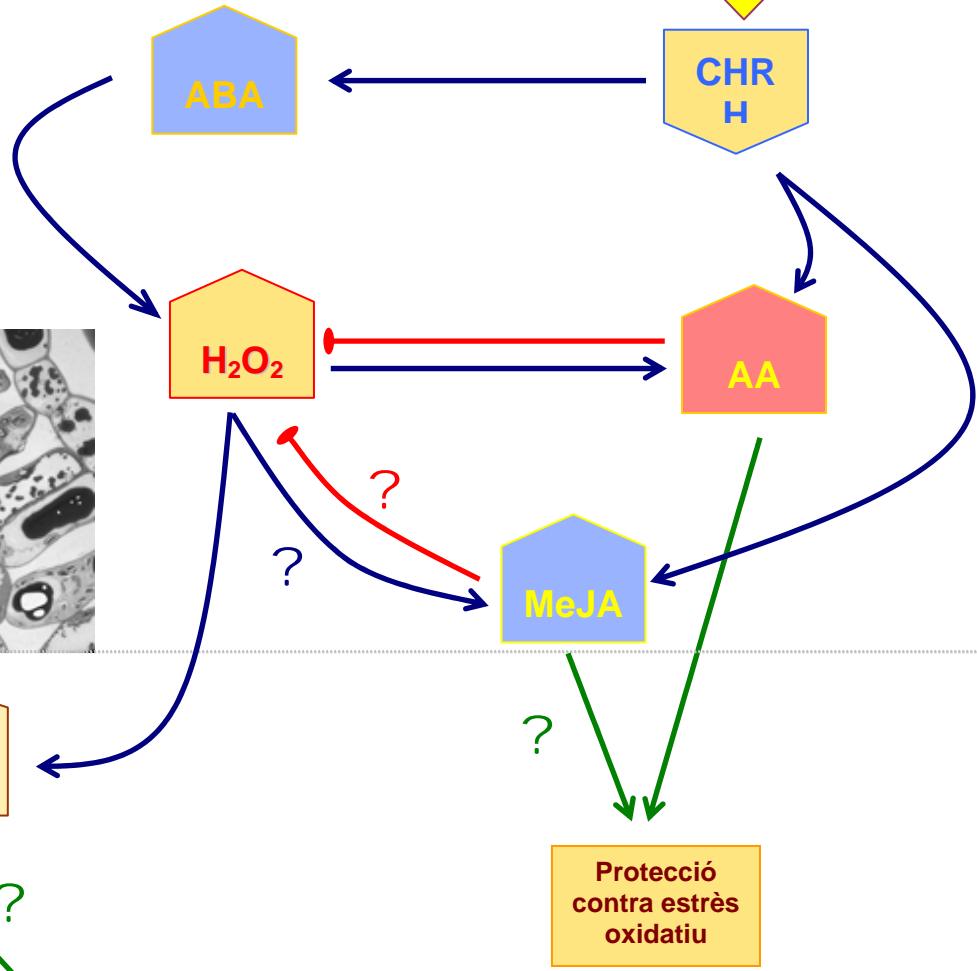
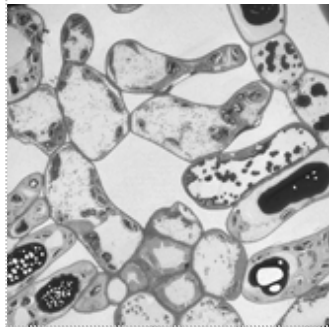
Els experiments realitzats en aquesta tesi han servit per caracteritzar millor la seqüència d'alguns dels esdeveniments que se succeeixen a les fulles de *C. albidus* durant la seva aclimatació a la sequera. En aquests esdeveniments s'hi troben implicats el H_2O_2 , l'AA, l'ABA i el MeJA. És molt possible que el H_2O_2 actuï com a transductor de senyal de l'ABA i provoqui així l'augment d'AA, tot i que no és l'únic responsable de l'augment d'aquest antioxidant en condicions de sequera estival. A més, el H_2O_2 intervé en la formació de xilema, esclerènquima i, probablement, en la formació de lignina, contribuint a la resistència mecànica de *C. albidus* a la sequera i, probablement, a l'aturada del creixement de fulles. Els resultats també suggereixen que en aquesta seqüència l'augment de MeJA estigui provocat pel H_2O_2 , reguli la producció d'aquesta EAO, i intervingui en l'aturada del creixement de les fulles sotmeses a sequera.

Figura 4. Esquema general dels resultats obtinguts a *C. albidus*. Les poques precipitacions enregistrades durant els mesos d'estiu, sumades a l'elevada radiació, les altes temperatures i l'alt DPV condueixen les plantes al dèficit hídric. Les relacions hídriques (CHR, H) disminueixen i es produeix un augment de H_2O_2 , que al seu torn condueix a un increment d'AA, a la producció de nou esclerènquima i xilema i probablement condueix a un augment de lignina, i de MeJA. L'augment d'AA, i probablement el MeJA, regula les concentracions de H_2O_2 . Les conseqüències fisiològiques d'aquests canvis bioquímics a l'interior de les cèl·lules foliars condueix a la supervivència i posterior recuperació de les plantes sotmeses a dèficit hídric. Entre els canvis fisiològics hi ha l'aturada del creixement foliar i la resistència mecànica conferida per l'augment en l'esclerofil·lia i la protecció contra l'estrès oxidatiu. Les fletxes blaves indiquen canvis bioquímics; les verdes indiquen canvis fisiològics; ratlles vermelles indiquen regulació o inhibició. Les fletxes en bloc grogues indiquen una conseqüència.



- Poca precipitació
- Elevada radiació
- Elevada temperatura
- Alt DPV

Dèficit hídric



**Lignina
Esclerênquima
Xilema**

**Resistència
mecànica**

**Aturada
creixement**

**Protecció
contra estrès
oxidatiu**



**Supervivència
Recuperació**



2. Relació estrès hídric-estrès oxidatiu a la planta model *A. thaliana*

El metabolisme oxidatiu és una part de la regulació redox (Buchanan and Balmer 2005), i dins aquest tipus de metabolisme, el H_2O_2 regula el *pool* d'AA i GSH (Noctor i Foyer 1998), dues de les molècules més importants en la regulació de l'estat redox de les cèl·lules vegetals, a més del NADPH (Noctor 2006), així com l'estat redox de proteïnes com les peroxidases i les tioredoxines (Rouhier et al. 2005; 2008).

L'estat redox d'aquests compostos regula, al seu torn, l'estat redox de proteïnes capaces de crear ponts disulfur, de manera que poden provocar canvis conformationals i reguladors en les proteïnes en les que es troben (Buchanan i Balmer 2005) i, per tant, l'estat d'oxidació dels grups tiol d'aquestes proteïnes afecta el funcionament del metabolisme cel·lular. Normalment, l'estat redox de les cèl·lules vegetals s'ha mesurat utilitzant el *pool* i l'estat redox de l'AA i/o del GSH, que si bé donen molta informació, l'estudi de la seva compartimentació és complicat i, normalment, requereix molt material vegetal del qual, en algun tipus d'experiments, és difícil de disposar-ne.

Els darrers anys s'han desenvolupat proteïnes GFP sensibles a l'estat redox del seu entorn (Hanson et al. 2002) i s'han expressat al citoplasma, mitocondri, cloroplast, reticle endoplasmàtic i peroxisomes de fulles d'*A. thaliana* i *Nicotiana tabaccum* (Jiang et al. 2006; Schwarzländer et al. 2008). S'ha suggerit que aquestes proteïnes expressades al citoplasma, roGFP1 i roGFP2, són indicadors de l'estat redox del també GSH/GSSG de les cèl·lules (Meyer et al 2007; Schwarzländer et al. 2008); i s'ha mostrat que davant ferida el potencial redox de la proteïna roGFP2 es torna més oxidat. Tot i això encara manquen estudis realitzats en condicions d'estrès per valorar si el potencial redox mesurat amb aquest tipus de marcador varia.

2.1. Canvis en l'estat redox del citoplasma de cèl·lules foliars de plantes d'*A. thaliana* sotmeses a sequera gradual

Seguint la línia d'aquesta tesi i donat que l'equilibri oxidatiu entre H_2O_2 i AA, entre altres molècules redox actives, es troba afectat per la sequera, es van dur a terme mesures del potencial redox del citoplasma de fulles d'*A. thaliana* roGFP1 sotmeses a dèficit hídric. Donat que els estudis duts a terme en aquesta tesi han estat al camp i per tant són exemples de dèficit hídric gradual (Pereira i Chaves 1993, 1995), es va voler fer un experiment similar, dins les possibilitats d'una planta d'aquestes característiques.

La fluorescència de les plantes roGFP1 comença a disminuir a partir de la seva sisena setmana de vida, de manera que, per aprofitar la fluorescència, l'experiment es va iniciar quan les plantes tenien tres setmanes.

La primera resposta, i la més sensible, de les plantes al dèficit hídric és la reducció del creixement (Pereira i Chaves 1993, 1995, Westgate i Boyer 1985, Sharp et al 1988, Nonami i Boyer 1990, Spollen et al 1993). L'efecte de l'estrès hídric sobre el creixement depèn de l'estat del desenvolupament en que es troba la fulla quan se li aplica el dèficit hídric (Randall et al. 1988), de manera que els paràmetres de creixement es poden utilitzar per calibrar la sensibilitat de les plantes a l'estrès gradual, especialment en aquest experiment en que les plantes no estaven completament desenvolupades.

Els resultats obtinguts en la taxa de creixement de les rosetes de les plantes d'*A. thaliana* i de l'àrea foliar mostren que les plantes van notar el dèficit hídric a partir del sisè dia de l'inici d'aquest. En aquest moment, quan el contingut hídric del substrat era del 24.5 % i el CHR de les fulles havia disminuït un 13.6 % i la H un 26.7 %, l'àrea de les fulles de les plantes no regades (WS) era un 62 % més petita que a les plantes ben regades (WW); confirmant que la primera resposta de les plantes al dèficit hídric és la reducció del creixement.

Tot i que les plantes van mostrar la seva sensibilitat a l'estrès hídric des del sisè dia de l'experiment, els canvis al citoplasma de les fulles d'*A. thaliana* no es va manifestar fins 11 dies després de l'últim rec de les plantes WS, quan el CHR del substrat era del 8 %, el de la fulla era del 69 %, i la H contenia 4.7 g H₂O g⁻¹ DW. Les mesures mostraven que el citoplasma estava més oxidat que al principi de l'experiment i que el citoplasma de les plantes WW: -302.3 mV comparat amb els aproximadament -312 mV de l'inici. Aquests resultats demostren que l'estrès oxidatiu no és la primera manifestació de les plantes a l'estrès hídric, d'una manera similar als resultats obtinguts en l'experiment *Variació anual* i *Estiu-tardor* realitzat a *C. albidus*, on el canvi redox apareixia quan l'estrès hídric perdurava en el temps.

Les relacions hídriques de les fulles de les plantes WS van començar a augmentar immediatament un cop van ser regades després del període d'estrès hídric, a diferència del potencial redox del citoplasma que es va mantenir un dia més en valors més oxidats que les plantes WW. Quan el potencial redox del citoplasma de les plantes WS va esdevenir més reductor, -308 mV dos dies després de la recuperació i -309 mV nou dies més tard, no va tornar als nivells pre-estrès, indicant que l'estrès oxidatiu havia estat sever. Segons Lichtenthaler (1996) la severitat de l'estrès ve determinada per l'habilitat de les plantes a recuperar-se, de manera que quan l'estrès deixa d'aplicar-se la planta torna als nivells previs a l'aplicació d'aquest estrès. Si la planta no és capaç de recuperar els valors pre-estrès és un indicador que hi ha hagut dany (Levitt 1980). Els resultats obtinguts tant en la hidratació de les fulles com en el potencial redox del citoplasma suggereixen la possibilitat que existís dany oxidatiu a les fulles d'*A. thaliana* sotmeses a dèficit hídric sever.

Per tant encara que a *C. albidus* l'estrès hídric no va implicar dany oxidatiu a les cèl.lules del mesòfil, sí que es va observar canvis en el potencial redox de les cèl.lules del mesòfil en plantes d'*A. thaliana* sotmeses a estrès hídric gradual.

Conclusions

1. El H_2O_2 incrementa en resposta a la sequera estival en plantes de *Cistus albidus*, *Cistus clusii* i *Salvia officinalis*
2. El dèficit hídric és el factor ambiental més decisiu per l'increment de H_2O_2 a *C. albidus*
3. El H_2O_2 a nivell cel·lular s'ha trobat principalment a nivell d'apoplast, xilema i esclerènquima, tot i que en alguns casos, en que s'ha detectat dany oxidatiu, s'ha trobat al plasmalema i al cloroplast
4. El H_2O_2 contribueix a la formació d'esclerènquima, localitzant-se al plasmalema i a cloroplasts de les cèl·lules proto-esclerenquimàtiques
5. L'ABA incrementa les concentracions de H_2O_2 i AA en plantes de *C. albidus* sotmeses a la sequera
6. El MeJA es troba induït pel dèficit hídric i pot contribuir a la recuperació de les plantes, mitjançant la regulació les concentracions endògenes de H_2O_2 , així com el creixement de les plantes
7. L'estrès hídric incrementa les concentracions endògenes d'AA, que manté el seu estat redox, mostrant que les cèl·lules de *C. albidus* estan protegides contra l'estrès oxidatiu
8. El H_2O_2 a baixes concentracions pot estar relacionat amb la formació de lignina
9. La lignina no provoca l'aturada de l'expansió foliar, però les concentracions de lignina disminueixen al mateix temps que les plantes es recuperen de la sequera i augmenten la seva àrea
10. L'acumulació de H_2O_2 no provoca dany oxidatiu en plantes de *C. albidus* sotmeses a dèficit hídric
11. La proteïna roGFP1 expressada al citoplasma detecta canvis en l'estat redox de fulles d'*Arabidopsis thaliana* sotmeses a dèficit hídric gradual
12. El citoplasma de les cèl·lules foliars d'*A. thaliana* esdevé més oxidat sota dèficit hídric gradual
13. La inducció d'estrès oxidatiu per estrès hídric a *A. thaliana* es posterior a la limitació del creixement de la planta

Agius SC, Bykoba NV, Igamberdiev AU, Møller IM. 1998. The internal rotenone-insensitive NADPH dehydrogenase contributes to malate oxidation by potato tuber and pea leaf mitochondria. *Physiologia Plantarum* **104**: 329-336

Alegre L, Munné-Bosch S. 2006. Role of ascorbate in cellular signalling in plants. In: *Vitamin C: New Research* (T Peel, ed.), pp: 121-139

Almagro L, Gómez Ros L V, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barceló A, Pedreño MA. 2008. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany* doi:10.1093/jxb/ern277

Andi S, Taguchi F, Toyoda K, Shiraisi T, Ichinose Y. 2001. Effect of methyl jasmonate on harpin-induced hypersensitive cell death, generation of hydrogen peroxide and expression of PAL mRNA in tobacco suspension cultured BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology* **42**: 446-449

Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology* **55**: 373-399.

Asada K, Kiso K, Yoshikawa K. 1974. Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination. *The Journal of Biological Chemistry* **249**: 2175-2181

Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology* **50**: 601-639.

Babior B. 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**: 1464-1476.

Baier M, Dietz KJ. 1996. Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases. *Plant Molecular Biology* **31**: 553-564.

Baier M, Noctor G, Foyer CH, Dietz KJ. 2000. Antisense suppression of 2-cysteine peroxiredoxin in *Arabidopsis* specifically enhances the activities and expression of enzymes associated with ascorbate metabolism but no glutathione metabolism. *Plant Physiology* **124**: 826-832

Balbi V, Devoto A. 2008. Jasmonate signaling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytologist* **177**: 301-318

Balmer Y, Buchanan B. 2002. Yet another plant thioredoxin. *Trends in Plant Science* **7**: 191-193

Bandurska H, Stroiński A, Kubiś J. 2003. The effect of jasmonic acid on the accumulation of ABA, proline and spermidine and its influence on membrane injury under water deficit in two barley genotypes. *Acta Physiologiae Plantarum* **25**: 279-285.

Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. 1987. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* **22**: 111-180.

Bartels D, Sunkar R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plants Sciences* **24**, 23-58.

Beck EH, Fetting S, Knake C, Hartig K, Bhattarai T. 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences* **32**: 501-510.

Bestwick C, Brown IR, Bennet HR, Mansfield WJ. 1997. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*. *The Plant Cell* **9**: 209-221.

BIBLIOGRAFIA

Blödner C, Majcherczyk A, Kües U, Polle A. 2007. Early drought-induced changes to the needle proteome of Norway spruce. *Tree Physiology* **21**: 1423-1431.

Bolwell GP Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F. 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1367-1376.

Bolwell GP, Butt VS, Davies DR, Zimmerlin A. 1995. The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radical Research* **23**: 517-532

Bolwell GP, Butt VS, Davies DR, Zimmerlin A. 1995. The origin of oxidative burst in plants. *Free Radical Research* **23**: 517-532

Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E. 2000. Responses to abiotic stress. In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. BB Buchanan, W Gruissem, R Jones (eds.) American Society of Plant Biologists. Rockville, MD, pp: 1158-1203

Bray EA. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* **2**: 48-54.

Bray, E.A. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* **103**: 1035-1040

Brisson LF, Tenhaken R, Lamb C. 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* **6**: 1703-1712

Buchanan BB, Balmer Y. 2005. Redox regulation: a broadening horizon. *Annual Review of Plant Physiology* **56**: 187-220

Cannon MB, Remington J. 2006. Re-engineering redox-sensitive green fluorescent protein for improved response rate. *Protein Science* **15**: 45-47

Carreras J. 1988. Les dil·lènides. In: *Història Natural dels Països Catalans. Plantes Superiors. Vol. 6* (R Folch, ed.), Fundació Enciclopèdia Catalana, Barcelona, pp: 157 -193

Chae HZ, Robison K, Pooleo LB, Church G, Storz G, Rhee SG. 1994. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: Alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**: 7017-7021.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805

- Chaparzadeh N, D'Amico ML, Khavari-Nejad RA, Izzo R, Navari-Izzo F.** 2004. Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 695-701.
- Chen Z, Silva H, Klessig DF.** 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* **262**: 1883-1886.
- Coelho SM, Taylor AR, Ryan KP, Sousa-Pinto I, Brown MT, Brownlee C.** 2002. Spatiotemporal patterning of reactive oxygen production and Ca²⁺ wave propagation in *Fucus* rhizoid cells. *The Plant Cell* **14**: 2369-2381
- Cooper CE, Patel RP, Brookes PS, Darley-Usmar VM.** 2002. Nanotransducers in cellular redox signalling: modifications of thiols by reactive oxygen and nitrogen species. *Trends in Biochemical Sciences* **27**: 489-492
- Cornic G, Massacci A.** 1996. Leaf photosynthesis under drought stress. *In: Photosynthesis and the Environment* (Baker NR, ed.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp: 347-366
- Creelman RA, Mullet JE.** 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**: 4114-4119
- Creissen GP, Mullineaux PM.** 2002. The molecular biology of the ascorbate-glutathione cycle higher plants. *In: Oxidative Stress in Plants.* (D Inzé and M Van Montagu, eds.) Taylor and Francis, London, pp: 247-270
- Criterio S, Sgorbati S, Scipa S, Sparvoli E.** 1994. Ascorbic acid effect on the onset of cell proliferation in pea root. *Physiologia Plantarum* **92**: 601-607
- D'Haeze W, De Rycke R, Mathis R, Goormachtig S, Pagnotta S, Verplancke C, Capoen W, Holsters M.** 2003. Reactive oxygen species and ethylene play a positive role in lateral root base nodulation of a semiaquatic legume. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **100**: 11789-11794
- Danon A.** 2002. Redox reactions of regulatory proteins: do kinetics promote specificity? *Trends in Biochemical Sciences* **27**: 197-203
- Dat JF, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, VanBreusegem F.** 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**: 779-795
- Davey MW, Van Montagu M, Inze D.** 2002. Ascorbate metabolism and stress. *In: Oxidative Stress in Plants* (D Inzé, M Van Montagu, eds.) Taylor and Francis, London, pp: 271-295.

Davies WJ, Pereira JS. 1992. Plant growth and water use efficiency. *In: Crop Photosynthesis: Spatial and Temporal Determinants* (NR Baker H Thomas, eds.) Elsevier Scientific Publications BV, Amsterdam, pp: 213-233

de Bolòs O, Vigo J. 1990. Gènere 226 (1) *Cistus* L., estepa. *In: Flora dels Països Catalans* (O de Bolòs, J Vigo, eds.), Editorial Barcino, Barcelona, pp: 188-194

De Cabo RC, González-Reyes JA, Córdoba F, Navas P. 1996. Rooting hastened in onions by ascorbate and ascorbate free radicals. *Journal of Plant Growth Regulation* **15**: 53-56

De Gara L, De Pinto MC, Arrigoni O. 1997. Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiologia Plantarum* **100**: 894-900.

De Giorgi F, Brini M, Bastianutto C, Marsault R, Montero M, Pizzo P, Rossi R, Rizzuto R. 1996. Targeting aequorin and green fluorescent protein to intracellular organelles. *Gene* **173**:113-17

De Tullio MC, Arrigoni O. 2004. Hopes, disillusion and more hopes from vitamin C. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**: 209-219

del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, JB Barroso. 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* **141**: 330-335

Desikan R, Hancock J, Neill S. 2005. Reactive oxygen species as signalling molecules. *In: Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants* (N Smirnov, Ed) Blackwell publishing, Oxford UK, pp: 169-191.

Desikan R, Hancock JT, Ichimura K, Shinozaki K, Neill SJ. 2001. Harpin induces activation of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiology* **126**: 1579-1587

Desikan R, Neill SJ, Hancock JT. 2000. Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free Radical Biology and Medicine* **28**: 773-778

Desikan R, Clarke A, Hancock JT, Neill SJ. 1999. H₂O₂ activates a MAP kinase-like enzyme *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1863-1866

Desikan, R, Hancock, JT, Coffey, MJ, Neill, SJ. 1996. Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Letters* **382**: 213 – 217

Dickison WC. Origin and structure of the primary plant body. *In: Integrative plant anatomy* (WC Dickison, ed.) Harcourt Academic Press. San Diego, CA, pp: 51-120

Dietz KJ, Horling F, König J, Baier M. 2002. The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1321-1329

Dietz KJ, Jacob S, Oelze M-L, Laxa M, Tognetti V, de Miranda SMN, Baier M, Finkemeier I. 2006. The function of peroxiredoxins in plant organelle metabolism. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1697-1709.

Dietz, KJ. 2008. Redox signal integration: from stimulus to network and genes. *Physiologia Plantarum* **133**: 459-468.

Doke, N. 1997. The oxidative burst: role in signal transduction and plant stress. In *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Ed. J.G. Scandalios. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp 785-813.

Dooley CT, Dore TM, Hanson GT, Jackson C, Remington SJ, Tsien RY. 2004. Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 22284-22293

Elstner EF, Heupel A. 1976. Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia latifolia* Gilib.) *Planta* **130**: 175-180.

Elstner EF, Heupel A. 1976. Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia latifolia* Gilib.). *Planta* **130**: 175-180

Fath A, Bëthke PC, Jones RL. 2001. Enzymes that scavenge reactive oxygen species are down-regulated prior to gibberelic acid-induced programmed cell death in barley aleurone. *Plant Physiology* **126**: 156-166

Feierabend J. 2005. Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defence. In: *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants* (N Smirnov, ed.) Oxford, UK, pp: 101-140

Finch-Savage WE, Blake PS, Clay HA. 1996. Deseccation stress in recalcitrant *Quercus robur* L. seeds results in lipid peroxidation and increased synthesis of jasmonates and abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* **298**: 661-667

Folch R, Franquesa T. 1986. Els ambients mediterranis i submediterranis. In: *Història Natural dels Països Catalans. Vegetació. Vol. 7* (R Folch, ed.) Fundació Enciclopedia Catalana, Barcelona, pp: 72-123

Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG, Davies JM, Dolan L. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**: 442-446

Foyer CH, Halliwell B. 1976. The presence of glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**: 21-25

- Foyer CH, Harbinson J.** 1994. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron flow. In: *Causes of Oxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants* (CH Foyer and PM Mullineaux, eds.) CRC Press, Boca Raton, pp: 1-42
- Foyer CH, Noctor G.** 1999. Leaves in the dark see the light. *Science* **284**: 599-601.
- Frahry G, Schopfer P.** 1998. Hydrogen peroxide production by roots and its stimulation by exogenous NADPH. *Physiologia Plantarum* **103**: 395-404
- Fry SC.** 1998. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemical Journal* **332**: 507-515
- Fukuda H, Komamine A.** 1982. Lignin synthesis and its related enzymes as markers of tracheary-element differentiation in single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Planta* **155**: 423-430
- Gapper C, Dolan L.** 2006. Control of plant development by reactive oxygen species *Plant Physiology* **141**: 341-345
- Getzoff ED, Cabelli DE, Fisher CL, Parge HE, Viezzoli MS, Banci L, Halliwell RA.** 1992. Faster superoxide dismutase mutants designed by enhancing electrostatic guidance. *Nature* **358**: 347-351
- Gibson AC.** 1996. Origins of desert structural adaptations. In: *Structure-function relations of warm desert plants* (Gibson AC, ed.) Springer, Berlin, pp: 23-41
- González-Reyes JA, Alcain FJ, Caler JA, Serrano A, Córdoba F, Navas P.** 1994. Relationship between apoplastic ascorbate regeneration and the stimulation of root growth in *Allium cepa* L. *Plant Science* **100**: 23-29
- Gowing DJG, Davies WJ, Jones HG.** 1990. A positive root-sourced signal as an indicator of soil drying in apple, *Malus x domestica*, Borkh. *Journal of Experimental Botany* **41**: 1535-1540
- Grant OM, Incoll LD, McNelly T.** 2005. Variation in growth responses to availability of water in *Cistus albidus* populations from different habitats. *Functional Plant Biology* **32**: 817-829
- Grant OM, Incoll LD.** 2005. Photochemical efficiency is an important component of ecophysiological variation in *Cistus albidus* between habitats in south-east Spain. *Functional Plant Biology* **32**: 107-115
- Gupta R, Luan S.** 2003. Redox control of protein tyrosine phosphatases and mitogen activated protein kinases in plants. *Plant Physiology* **132**: 1149-1152
- Halliwell B, Gutteridge JMC.** 1989. In: *Free Radicals in Biology and Medicine 2nd edn.* (B Halliwell, JMC Gutteridge, eds.) Clarendon Press Oxford. New York, USA.
- Halliwell B, Gutteridge JMC.** 1999. In: *Free Radicals in Biology and Medicine* (B Halliwell, JMC Gutteridge, eds.) Oxford University Press. Oxford, U.K.

Halliwell B, Whiteman M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what the results mean?. *British Journal of Pharmacology* **142**: 231-255

Hancock JT. 2008. The role of redox in signal transduction. *In: Redox-Mediated Signal Transduction. Methods and Protocols* (JT Hancock, ed.). *Methods in Molecular Biology* **476** (JM Walker, ed) Humana Press, New York, NY, pp: 1-10.

Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldo RA, Tsien RY, Remington SJ. 2004. Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 13044-13053

Hanson GT, McAnaney TB, Park ES, Rendell MP, Yarbrough DK, Chu S, Xi L, Boxer SG, Montrose MH, Remington SJ. 2002. Green fluorescent protein variants as ratiometric dual emission pH sensors. 1. Structural characterization and preliminary application. *Biochemistry* **41**: 15477-15488

Hassan HM. 1989. Microbial superoxide dismutases. *Advances in Genetics* **26**: 65-97

Heber U, Egneus H, Hach Jensen M, Köster S. 1978. Regulation of photosynthetic electron transport and photophosphorylation in intact chloroplasts of *Spinacia oleracea* L. *Planta* **143**: 41-49

Hernández I, Alegre L, Van Breusegem F, Munné-Bosch S. 2009. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science*, in press.

Hidalgo A, González-Reyes JA, Navas P. 1989. Ascorbate free radical enhances vacuolization on onion root meristem. *Plant, Cell and Environment* **12**: 455-460

Hodges MD, DeLong JM, Forney CF, Prange RK. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **207**: 604-611

Hohl M, Greiner H, Schopfer P. 1995. The cryptic growth response of maize coleoptiles and its relationship to H₂O₂ dependent cell wall stiffening. *Physiologia Plantarum* **94**: 491-498

Hormann H, Neubauer C, Asada K, Schreiber U. 1993. Intact chloroplasts display pH 5 optimum of O₂ reduction in the absence of methyl viologen: indirect evidence for a regulatory role of superoxide protonation. *Photosynthesis Research* **37**: 69-80

Hossain MA, Nakano Y, Asada K. 1984. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant and Cell Physiology* **25**: 385-395

Hu X, Jiang M, Zhang A, Lu J. 2005. Abscisic acid-induced apoplastic H₂O₂ accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves *Planta* **223**: 57-68.

Hu X, Jiang M, Zhang A, Lu J. 2005. Abscisic acid-induced apoplastic H₂O₂ accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. *Planta* **223**: 57-68

Hung KT, Hsu YT, Kao CH. 2006. Hydrogen peroxide is involved in methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves. *Physiologia Plantarum* **127**: 293-303

Hung KT, Kao CH. 2007. The participation of hydrogen peroxide in methyl jasmonate-induced NH₄⁺ accumulation in rice leaves. *Journal of Plant Physiology* **164**: 1469-1479

Inouye S, Tsuji FI. 1994. Aequorea green fluorescent protein: expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Letters* **341**: 277-80

Jiang K., Schwarzer L., Lally E., Zhang S., Ruzin S., Machen T., Remington SJ., Feldman L. 2006. Expression and characterization of a redox-sensing green fluorescent protein (Reduction-oxidation-sensitive green fluorescent protein) in Arabidopsis. *Plant Physiology* **141**: 1-7

Jiang M, Zhang J. 2002. Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Planta* **215**, 1022-1030

Jiang M, Zhang J. 2002. Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Planta* **215**: 1022-1030

Jiang M, Zhang J. 2002. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany* **53**: 2401-2410

Jiménez A, Hernández JA, del Río LA, 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, Hernández JA, Pastori G, del Río LA, Sevilla F. 1998. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiology* **118**: 1327-1335

Jones HG, Sutherland RA. 1991. Stomatal control and xylem embolism. *Plant, Cell & Environment* **14**: 607-612

Jones MA, Smirnov N. 2005. Reactive oxygen species in plant development and pathogen defence. *In: Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants* (N Smirnov, ed.) Oxford, UK, pp: 169-191.

Joo JH, Bae YS, Lee JS. 2001. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiology* **126**: 1055-1060

Kaiser WM. 1979. Reversible inhibition of the Calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide. *Planta* **145**: 377-382

Keller T, Damude HG, Werner D, Doerner P, Dixon RA, Lamb C. 1998. A plant homolog for the neutrophil NADPH oxidase gp91-phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *The Plant Cell* **10**: 255-266

Kieffer F, Simon-Plas F, Maume BF, Blein J-P. 1997. Tobacco cells contain a protein, immunologically related to the neutrophil small G protein Rac2 and involved in elicitor-induced oxidative burst. *FEBS Letters* **403**: 149-153

Kitagawa Y, Tanaka N, Hata Y, Kusunoki M, Lee GP, Katsube Y, Asada K, Aibara S, Morita Y. 1991. Three-dimensional structure of Cu, Zn-superoxide dismutase from spinach at 2.0 Å resolution. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* **109**: 477-485

Körner C. 2002. La vegetación de la Tierra, *In: Strasburger. Tratado de Botánica. 35ª edición* (P Sitte, EW Weiler, JW Kadereit, A Bresinsky, C Körner, eds.) Omega, Barcelona, pp: 1003-1044

Kovtun Y, Chiu W-L, Tena G, Sheen J. 2000. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**: 2940-2945

Kramell R, Aztorn R, Schneider G, Miersch O, Bruckner C, Schmidt J, Sembdner G, Parthier B. 1995. Occurrence and identification of jasmonic acid and its amino-acid conjugates induced by osmotic-stress in barley leaf tissue. *Journal of Plant Growth Regulation* **14**: 29-36

Kranner I, Beckett RP, Wornik S, Zorn M, Pfeifhofer HW. 2002. Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. *Plant Journal* **31**: 13-24

Kuang JB, Turner NC, Henson IE. 1990. Influence of xylem water potential on leaf elongation and osmotic adjustment of wheat and lupin. *Journal of Experimental Botany* **41**: 217-221

Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL. 2003. NADPH oxidase AtbohD and AtbohF genes function in ROS-dependent ABA signalling in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* **22**: 2623-2633

Kwak JM, Nguyen V, Schroeder JI. 2006. The role of reactive oxygen species in hormonal responses. *Plant Physiology* **141**: 323-329.

- Lane BG, Dunwell JM, Ray JA, Schmitt MR, Cumming AC.** 1993. Germin, a protein marker of the early plant development, is an oxalate oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 12239-12242
- Larcher W.** 2002. Ecophysiology and stress Physiology of Functional Groups. In: *Physiological Plant Ecology* (W. Larcher, ed.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp: 401-416.
- Lehman J, Atzorn R, Bruckner C, Reinbothe S, Leopold J, Wasternack C, Pathier B.** 1995. Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed barley leaf segments. *Planta* **197**: 156-162
- Levine A, Tenhaken R, Dixon RA, Lamb C.** 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593
- Levitt J.** 1980. Responses of Plant to Environmental Stresses. Vol 1, Academic Press, New York.
- Lewis NG, Yamamoto E.** 1990. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**: 455-496
- Li L, van Staden, Pager AK.** 1998. Effect of plant growth regulators on the antioxidant system in seedling of two maize cultivars subjected to water stress. *Plant Growth Regulation* **25**: 81-87
- Lichtenthaler HK.** 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology* **148**: 4-14
- Lim YS, Cha MK, Yun CH, Kim HK, Kim KW, Kim IH.** 1994. Purification and characterization of thiol-specific antioxidant protein from human red blood cell: a new type of antioxidant protein. *Biochemical and Biophysical research Communications* **199**: 199-206.
- Lin CC, Kao CH.** 2001. Abscisic acid induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. *Plant Science* **160**: 323- 329.
- Liso R, Innocenti AM, Bitoni MB, Arrigoni O.** 1988. Ascorbic acid-induced progression of quiescent center cells from G1 to S phase. *New Phytologist* **110**: 469-471
- Liszkay A, van der Zalm E, Schopfer P.** 2004. Production of reactive oxygen intermediates O₂⁻, H₂O₂, and OH by Maite roots and their role on wall loosening and elongation growth. *Plant Physiology* **136**: 3114-3123
- Lledías F, Rangel P, Hansberg W.** 1998. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 10630-10637
- Lohman JR, Remington SJ.** 2008. Development of a family of redox-sensitive green fluorescent protein indicators for use in relatively oxidizing environments. *Biochemistry* **47**: 8678-8688

- López G.** 2007. Familia XLV. Cistaceae Juss., nom. Cons (cistáceas). *In: Guía de los árboles y arbustos de la Península Ibérica y Baleares* (G López, ed.) Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp: 583-595
- Lorenzo O, Solano R.** 2005. Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 532-540
- Luna C, Pastori GM, Driscoll S, Groten K, Bernard S, Foyer CH.** 2005. Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Journal of Experimental Botany* **56**: 417-423
- Lüthje S, Böttger M, Döring O.** 2000. Are plants stacked neutrophyles? Comparison of pathogen induced oxidative burst in plants and mammals. *In: Progress in Botany*, Vol 61 (K Esser, JW Kadereit, U Lütge, M Runge) Springer, Berlin, pp: 187-222
- Mahouhachi J, Arbona V, Gómez-Cadenas, A.** 2007 Hormonal changes in papaya seedlings subjected to progressive water stress and re-watering. *Plant Growth Regulation* **53**: 43-51
- Maksymiec W, Krupa Z.** 2002. The *in vivo* and *in vitro* influence of methyl jasmonate on oxidative processes in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Acta Physiologiae Plantarum* **24**: 351-357
- Mason HS, Mullet JE.** 1990. Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wounding, and jasmonic acid. *Plant Cell* **2**: 569-579
- May MJ, Vernoux T, Leaver C, Van Montagu M, Inze D.** 1998. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany* **49**: 649-667.
- Mayaba N, Minibayeva F, Beckett RP.** 2002. An oxidative burst of hydrogen peroxide during rehydration following desiccation in the moss *Atrichm androgynum*. *New Phytologist* **155**: 275-283
- McCord JM, Fridovich I.** 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *Journal of Biological Chemistry* **244**: 6049-6055
- Mehler AH, Brown AH.** 1952. Studies on reactions of illuminated chloroplasts III. Simultaneous photoproduction and consumption of oxygen studied with oxygen isotopes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **38**: 365-370
- Mehler AH.** 1951. Studies on reactions of illuminated chloroplasts I. Mechanisms of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **33**: 65-77
- Meinhard M, Grill E.** 2001. Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from *Arabidopsis*. *FEBS Letters* **508**: 443-446

- Meinhard M, Rodriguez PL, Grill E.** 2002. The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links de abscisic acid-response regulador to redox signalling. *Planta* **214**: 775-782
- Meyer A., Brach T., Marty L., Kreye S., Rouhier N., Jacquot JP., Hell R.** 2007. redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant Journal* **52**: 973-86
- Meyer AJ.** 2008. The integration of glutathione homeostasis and redox signalling. *Journal of Plant Physiology* **165**: 1390-1403
- Meyer Y, Reicheld JP, Vignols F.** 2005. Thioredoxins in Arabidopsis and other plants. *Photosynthesis Research* **86**: 419-433
- Miller G, Mittler R.** 2006. Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants?. *Annals of Botany* **98**: 279-288
- Mittler R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**: 405-410
- Mittler R.** 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* **11**, 15-19.
- Miyake C, Asada K.** 1994. Ferredoxin-dependent photoreduction of the monodehydroascorbate radical in spinach thylakoids. *Plant Cell Physiol* **35**: 539-549
- Mohanty JG, Jaffe JS, Schulman ES, Raible DG, Hahnemann MP.** 1997. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *Journal of Immunological Methods* **202**: 133-141
- Møller IM, McPherson MJ.** 1998. Developmental expression and biochemical analysis of the *Arabidopsis* atao 1 gene encoding an H₂O₂-generating diamine oxidase. *The Plant Journal* **13**: 781-791
- Møller IM.** 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 561-591
- Moreno JM, Oechel WC.** 1995. Preface. In: *Global Cahnge and Mediterranean-Type Ecosystems. Ecological Studies 117* (JM Moreno, WC Oechel, ed.) Springer-Verlag, Berlin, pp: v-vii
- Mori LC, Schroeder JL.** 2004. reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels. A signalling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signalling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physisology* **135**: 702-708
- Munné-Bosch S, Alegre L.** 2004. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology* **31**: 203-216
- Mur LAJ, Kenton P, Rainer A, Miersch O, Wasternack C.** 2006. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate include synergy, antagonism and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology* **140**: 249-262

- Murata Y, Pei Z-M, Mori IC, 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**: 2513-2523
- Nambara E, Marion-Poll A.** 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 165-185
- Neale AD, Blomstedt CK, Bronson P, Le T, Guthridge K, Evans J, Gaff DF, Hamill JD.** 2000. The isolation of genes from the resurrection grass *Sporolobus stapfianus* which are induced during severe drought stress. *Plant, Cell & Environment* **23**:265-277
- Neill S, Desikan R, Clarke A, Hancock J.** 1999. H_2O_2 signalling in plant cells. In: *Plant Responses to Environmental Stress* (eds M.F. Smallwood, C.M. Calvert & D.J. Bowles) Bios Scientific Publishers, Oxford, pp 59-64
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT.** 2002. Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 388-395
- Nicholls P, Fita I and Loewen PC.** 2001. Enzymology and structure of catalases. *Advances in Inorganic Chemistry* **51**, pp. 51–106
- Nicholls P, Fita I, Loewen P.** 2001. Enzymology and structure of catalases. *Advances in Inorganic Chemistry* **51**: 51-106
- Noctor G, Foyer CH.** 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249-279
- Noctor G, Veljovic-Jovanovic S, Driscoll LN, Foyer CH.** 2002. Drought and oxidative load in the leaves of C_3 plants: a predominant role for photorespiration? *Annals of Botany* **89**: 841-850
- Noctor G.** 2006. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell & Environment* **29**: 409-425
- Nonami H, Boyer JS.** 1990. Primary events regulating stem growth at low water potentials. *Plant Physiology* **94**: 1601-1609
- Ogren WL.** 1984. Photorespiration: Pathways, regulation and modification. *Annual Reviews of Plant Physiology* **35**: 415-442
- Ormö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ.** 1996. Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. *Science* **273**: 1392–1395
- Orozco-Cárdenas M, Narváez-Vásquez J, Ryan CA.** 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* **13**: 179-191

Orozco-Cárdenas M, Ryan CA. 1999. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**: 6553-6557

Østergaard H, Henriksen A, Hansen FG, Winther JR. 2001. Shedding light in disulfide bond formation: engineering a redox switch in green fluorescent protein. *The EMBO Journal* **20**: 5853-5862

Otter T, Polle A. 1994. The influence of apoplastic ascorbate on the activities of cell wall-associated peroxidase and NADH oxidase in needles of Norway spruce (*Picea abies* L). *Plant and Cell Physiology* **35**: 1231-1238

Palmer JM. 1976. The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. *Annual Review of Plant Physiology* **27**: 133-157

Passioura JB. 1988. Root signals control leaf expansion in wheat seedlings growing in drying soil. *Australian Journal of Plant Physiology* **15**:687-693

Pedranzani H, Sierra-de-Grado R. 2007. Cold and water stresses produce changes in endogenous jasmonates in two populations of *Pinus pinaster* Ait. *Plant Growth Regulation* **52**: 111-116

Pei Z-M, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI. 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**: 731-734

Pereira JS, Chaves MM. 1993. Plant water deficits in Mediterranean ecosystems. *In: Water Deficits, Plant Responses from Cell to Community.* (JAC Smith, H Griffiths, eds.) (Bios Scientific Publishers, WJ Davies) pp: 237-248

Pereira JS, Chaves MM. 1995. Plant responses to drought under climate in Mediterranean-type ecosystems. *In: Global Change and Mediterranean-Type Ecosystems* (JM Moreno, WC Oechel, eds) Ecological studies 117. Springer-Verlag. New York. Pp: 140 - 160

Perl-Treves R and Perl A. 2002. Oxidative stress: an introduction. *In: Oxidative stress in plants.* D Inzé and M Van Montagu (Eds) Taylor and Francis (London and New York). Pp: 1-32.

Pignocchi C, Fletcher JM, Wilkinson JE, Barnes JD, Foyer CH. 2003. The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiology* **132**: 1631-1641

Potikha TS, Collins CC, Johnson DI, Delmer DP, Levine A. 1999. The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. *Plant Physiology* **119**: 849-858

- Potters G, De Gara L, Asard H, Horemans N.** 2002. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime?. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 537-548
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward W W, Prendergast FG, Cormier MJ.** 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**:229–33
- Purvis AC, Shewfelt RL.** 1993. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues?. *Physiologia Plantarum* **88**: 712-718
- Queval G, Hager J, Gakière B, Noctor G.** 2008. Why are literature data for H₂O₂ contents so variable?. A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extracts. *Journal of Experimental Botany* **59**: 135-146
- Rabinowitch HD, Fridovich I.** 1983. Superoxide radicals, superoxide dismutases and oxygen toxicity in plants. *Photochemistry and Photobiology* **37**: 679-690
- Randall HC., Sinclair TR.** 1988. Sensitivity of soybean leaf development to water deficits. *Plant, cell & Environment* **11**: 835-839
- Rao MV, Lee HI, Creelman R, Mullet J., Davis KR.** 2000. Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell* **12**:1633-1646
- Rao MV, Lee HI, Creelman RA, Mullet JE, Davis KR.** 2000. Jasmonic acid signalling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *The Plant Cell* **12**: 1633-1646
- Reid ME.** 1941. Relation of vitamin C to cell size in the growing region of the primary root of cowpea seedlings. *American Journal of Botany* **28**: 410-415
- Rhee SG, Bae YS, Lee RS, Kwon.** 2000. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. Science's STKE http://syke.sciencemag.org/cgi/content/full/OC_sigtrans;2000/53/pe1
- Rizhsky L, Hallak-Herr E, Van Breusegem F, Rachmilevitch S, Barr JE, Rodermel S, Inzé D, Mittler R.** 2002. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase. *The Plant Journal* **32**, 329-342
- Ros Barceló A.** 1997. Lignification in plant cell walls. *International Review of Cytology* **176**: 87-132
- Ros Barceló A.** 1998. The generation of H₂O₂ in the xylem of *Zinnia elegans* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *Planta* **207**: 207-216
- Ros-Barceló A, Pomar F, López-Serrano M, Martínez P, Pedreño MA.** 2002. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 325-332
- Rouhier N, Koh CS, Gelhaye E, Corbier C, Favier F, Didierjan, Jaquot J-P.** 2008. Redox based anti-oxidant system in plants: Biochemical and structural analyses. *Biochimica et Biophysica Acta* **1780**: 1249-1260.

- Rouhier N, Villarejo A, Srivastava M, Gelhaye E, keech O, Droux M, Finkemeier I, Sanuelsson G, Dietz KJ, Jacquot JP, Wingsle G.** 2005. Identification of plant glutaredoxin targets. *Antioxidants & Redox Signaling* **7**: 919-929
- Sagi M, Fluhr R.** 2001. Superoxide production by plant homologues of the gp91^{phox} NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology* **126**: 1281-1290
- Sagi M, Fluhr R.** 2006. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology* **141**: 336-340
- Sairam RK, Srivastava GC.** 2001. Water stress tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.): variations in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotypes. *Journal of Agronomy & Crop Science* **186**: 63-70
- Salguero J, Böttger M.** 1995. Secreted catalase activity from roots of developing maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Protoplasma* **184**: 72-78
- Salin ML.** 1987 Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiologia Plantarum* **72**: 681-689
- Sandalio LM, Del Río LA.** 1988. Intraorganellar distribution of superoxide dismutase in plant peroxisomes. *Plant Physiology* **88**: 1215-1218
- Sanmartín M, Drogoudi PD, Lyons T, Pateraki I, Barnes J, Kanellis AK.** 2003. Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta* **216**: 918-928.
- Sasaki-Sekimoto Y, Taki N, Obayashi T, Aono M, Matsumoto F, Sakurai N, Suzuki H, Hirai MY, Noji M, Saito K, Masuda T, Takamiya K, Shibata D, Ohta H.** 2005. Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Journal* **44**: 653-668
- Scandalios JC.** 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* **101**: 7-12
- Scandalios JG, Guan L, Polidoros AN.** 1997. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses* (JG Scandalios ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York pp: 343-398
- Scandalios JG, Tong WF, Roupakias DG.** 1980. Cat3, a third gene locus coding for a tissue specific catalase in maize: genetics, intracellular location and some biochemical properties. *Molecular and General Genetics* **179**: 33-41

Schafer FQ, Buettner GR. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine* **30**: 1191-1212

Schinkel H, Streller S, Wingsle AS. 1998. Multiple forms of extra cellular superoxide dismutase in needles, stem tissue and seedlings of Scots pine. *Journal of Experimental Botany* **49**: 931-936

Schopfer P. 1996. Hydrogen peroxide-mediated cell-wall stiffening in vitro in maize coleoptiles. *Planta* **214**: 821-828

Schulze ED, Beck E, Müller-Hohenstein K. (eds.). 2005. Environment as a stress factor: stress physiology of plants. In: *Plant Ecology*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp: 7-21

Schulze E-D, Hall AE. 1982. Stomatal responses, water loss and CO₂ assimilation rates of plants in contrasting environments. In: *Physiological Plant Ecology. II. Water relations and Carbon Assimilation* (OL Lange, PS Nobel, CB Osmond, and H Ziegler). *Encyclopedia of Plant Physiology Series, Vol 12 B*. Springer-Verlag, Berlin, pp: 181-229

Schwarzländer M, Ficker MD, Müller C, Marty L, Brach T, Novak J, Sweetlove LJ, Hell R, Meyer AJ. 2008. Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *Journal of Microscopy* **231**: 299-316

Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K. 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 296-302

Selote DS, Khanna-Chopra R. 2006. Drought acclimation confers oxidative stress tolerance by inducing co-ordinated antioxidant defense at cellular and subcellular level in leaves of wheat seedlings. *Physiologia Plantarum* **127**: 494-506

Selye H. 1936. A syndrome produced by various nocuous agents. *Nature* **138**: 32-34

Sharp RE, Hsiao TC, Silk WK. 1988. Growth of the maize primary root at low water potentials. I. Spatial distribution of expansive growth. *Plant Physiology* **87**: 50-57

Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **59**: 223-39

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 410-417

Siedow JN, Day DA. 2000. Respiration and photorespiration. In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. (B. Buchanan, W Gruissem, R Jones, eds.) American Society of Plant Biologists. Rockville, MD, pp: 676-728

Sies H. 1991. *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants* (Sies H, ed.) Academic Press, London.

- Smart CM.** 1994. Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist* **126**: 418-449
- Smirnoff N, Pallanca JE.** 1996. Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* **24**: 472-478
- Smirnoff N.** 2005. Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. *In: Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants* (N Smirnoff, ed) Blackwell Publishing, Oxford, UK pp: 53-86
- Sofa A, Tuzio AC, Dichio B, Xiloyannis C.** 2005. Influence of water deficit and rewatering on the components of the ascorbate-glutathione cycle in four interspecific *Prunus* hybrids. *Plant Science* **169**: 403-412
- Spollen WG, Sharp RE, Saab IN, Wu Y.** 1993. Regulation of cell expansion in roots and shoots at low water potentials. *In: Water Deficits: Plant Responses from Cell to Community.* (JAC Smith, H Griffiths, eds.) BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp: 37-52
- Stacy RAP, Munthe E, Steinum T, Sharma B, Aalen RB.** 1996. A peroxiredoxin antioxidant is encoded by a dormancy-related gene. Per-1, expressed during late development in the aleurone and embryo of barley grains. *Plant Molecular Biology* **31**: 1205-1216
- Suhita D, Agepati S, Raghavendra J, Kwak JM, Vavasseur A.** 2004. Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiology* **134**: 1536-1545
- Takahama U.** 1993. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics by ascorbic acid-different effects of ascorbic-acid on the oxidation of coniferyl alcohols by the apoplastic soluble and cell wall-bound peroxidase from epicotyls of *Vigna angularis*. *Plant and Cell Physiology* **34**: 809-817
- Tardieu F, Granier C, Muller B.** 1999. Modelling leaf expansion in a fluctuating environment: are changes in specific leaf area a consequence of changes in expansion rate?. *New Phytologist* **143**: 33-44
- Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB.** 2004. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **286**: R431-R444
- Tolbert NE.** 1980. Photorespiration. *In: The Biochemistry of Plants. A comprehensive treatise* (PK Stumpf and EE Conn, eds.) Volume 2. *Metabolism and Respiration* (DD Davies, ed.) Academic Press, New York, pp: 488-525
- Torres MA, Dangl JL, Jones JGD.** 2002. *Arabidopsis* gp91phox homologues ArtbohD and ArtbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 517-522

Torres MA, Jones JD, Dangl JL. 2005. Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* **37**: 1130-1134

Triantaphylidès C, Krischke M, Hoeberichts FA, Ksas B, Gresser G, Havaux M, Van Breusegem F, Mueller MJ. 2008. Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photo-oxidative damage to plants. *Plant Physiology* **148**: 960-968

Tsien RY. 1998. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* **67**: 509-544

Turner S, Gallois P, Brown D. 2007. Tracheary element differentiation. *Annual Reviews of Plant Biology* **58**: 407-433

Veljovic-Jovanovic S.D, Pignocchi C, Noctor G, Foyer CH, 2001. Low ascorbic acid in the *vtc1* mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiology* **127**: 426-435

Verslues PE, Kim YS, Zhu JK. 2007. Altered ABA, proline and hydrogen peroxide in an *Arabidopsis* glutamate:glyoxylate aminotransferase mutant. *Plant Molecular Biology*. **64**: 205-217

Wang JW, Wu JY. 2005. Nitric oxide is involved in methyl jasmonate-induced defense responses and secondary metabolism activities of *Taxus* cells. *Plant and Cell Physiology* **46**: 923-930

Wang SY. 1999. Methyl jasmonate reduces water stress in strawberry. *Journal of Plant Growth Regulation* **18**: 127-134

Wasternack C. 2007. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* **100**: 681-697

Weissman L, Garty J, Hochman A. 2005. Characterization of enzymatic antioxidants in the lichen *Ramalina lacer* and their response to rehydration. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 6508-6514

Werner C, Correia O, Beyschlag W. 1999. Two different strategies of Mediterranean macchia plants to avoid photoinhibitory damage by excessive radiation levels during summer drought. *Acta Oecologica* **20**: 15-23

Westgate ME, Boyer JS. 1985. Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize. *Planta* **164**: 540-549.

Wolosiuk RA; Buchanan BB. 1977. Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. *Nature* **266**: 565-567

Wolucka BA, Goossens A, Inzé D. 2005. Methyl jasmonates stimulates the de novo biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. *Journal of Experimental Botany* **56**: 2527-2538

Wu J, Neimanis S, Heber U. 1991. Photorespiration is more effective than the Mehler reaction in protecting the photosynthetic apparatus against photoinhibition. *Botanica Acta* **104**: 283-291

Xing T, Higgins VJ, Blumwald E. 1997. Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells. *Plant Cell* **9**: 249-259

Yahraus T, Chandra S, Legendre L, Low PS. 1995. Evidence for a mechanically induced oxidative burst. *Plant Physiology* **109**: 1259-1266

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2005. Organization of *cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science* **10**: 88-94

Yang F, Moss LG, Phillips GN Jr. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **14**: 1246-51

Yesbergenova Z, Yang G, Oron E, Soffer D, Fluhr R, Sagi M. 2005. The plant Mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid. *The Plant Journal* **42**: 862-867

Zhang A, Jiang M, Zhang J, Tan M, Hu X. 2006. Mitogen-activated protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants. *Plant Physiology* **141**: 475-487

Zhang X, Zhang L, Dong F, Gao J, Galbraith DW, Song CP. 2001. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiology* **126**: 1438-1448

Zimmer M. 2002. Green fluorescent protein: application, structure, and related photophysical behaviour. *Chemical Reviews* **102**: 759-781

1. Mesura de l'estat hídric de la planta

Per mesurar la existència de dèficit hídric a les plantes hi ha diversos mètodes que donen una idea de l'estat hídric de la planta, el més usats són el potencial hídric (Ψ), el contingut hídric relatiu (CHR o RWC) i la hidratació (H). Les mesures utilitzades en aquesta tesi foren les dues darreres.

1.1. Potencial hídric

El potencial hídric (Ψ) és un concepte termodinàmic que té en compte que l'aigua dins les plantes està constantment en moviment, ja sigui en reaccions bioquímiques, en la dissolució de soluts o circulant entre les diferents parts de la planta. Així, l'aigua a l'interior de les plantes està constantment realitzant un treball, i Ψ és en essència la mesura de l'energia lliure de l'aigua a l'interior de la planta. Normalment Ψ es mesura en unitats de pressió (MPa), doncs l'energia lliure associada a l'aigua es mesura en relació a les unitats de volum, el treball dividit per unitats de volum és la pressió.

Els valors del potencial hídric determinen la direccionalitat de la circulació d'aigua, doncs quan hi ha diferències de Ψ entre dos compartiments, per exemple des de l'arrel a la fulla, la circulació de l'aigua es produeix de més a menys potencial hídric

Tot i que el potencial hídric és un concepte que ajuda a entendre millor els moviments d'aigua a l'interior de la planta i la seva importància, la seva utilitat per mesurar l'estat hídric d'una planta és qüestionable, doncs és una mesura de la tensió de l'aigua al xilema i els canvis fisiològics i metabòlics en una planta amb dèficit hídric no sempre es correlacionen amb canvis al potencial hídric per exemple les plantes que presenten ajust osmòtic la disminució del seu potencial hídric no es reflexa en la disminució del seu contingut hídric relatiu (Bray 2000)

Així mateix, es poden utilitzar altres mètodes més senzills i que donen la informació real sobre la quantitat d'aigua que hi ha a l'interior dels òrgans sobre els qual es realitzen les mesures.

1.2. Contingut hídric relatiu (CHR)

El contingut hídric relatiu (CHR, %) informa de la quantitat d'aigua dels teixits respecte a la quantitat màxima que podrien contenir. EL CHR s'obté aplicant la següent fórmula: $CHR (\%) = 100((PF-PS)/(PT-PS))$

On PF és el pes fresc de la fulla, o un altre òrgan; s'obté pesant l'òrgan o teixit a estudiar immediatament després de ser recol·lectat. També es coneix com el pes actual. PT és el pes a màxima turgència o pes turgent; s'obté després d'haver tingut durant 24 hores la fulla en aigua destil·lada, en la foscor i a 4 ° C. Les fulles es mantenen a 4 ° C i en la foscor per evitar el creixement que es podria donar en presència de llum i la pèrdua de pes per respiració, condicions que podrien portar a artefactes en la mesura del pes de turgència. La finalitat de la mesura del PT és mesurar la quantitat màxima d'aigua que un òrgan o teixit pot acumular al seu interior. El PS expressa just el contrari que el PT, doncs és la mesura del pes de l'òrgan en

l'absència d'aigua. S'obté a partir d'assecar la mateixa fulla, seguint amb l'exemple, de la que s'ha obtingut el PF i el PT, a 60 ° C fins que el pes sigui constant.

La mesura del CHR és senzilla d'obtenir i dona informació útil per conèixer l'estat hídric de la planta. Tot i això l'obtenció del PT pot donar dificultats i condueix a una sobreestima d'aquest pes dificultant la interpretació d'aquest paràmetre. Per a una millor comprensió de l'estat hídric de la planta, s'acompanya aquest paràmetre amb els valors d'hidratació.

Es considera que els valors de CHR en una planta ben hidratada estan entre el 85 i el 95%, i quan disminueix a valors inferiors del 50% l'estat hídric de la planta és crític (Cornic and Massacci, 1996). Encara que en algunes espècies es poden mantenir valors al voltant del 50% en fulla durant mesos i després recuperar-se sense conseqüències.

1.3. Hidratació (H)

La hidratació ($\text{g H}_2\text{O} \cdot \text{g PS}^{-1}$) informa sobre la quantitat d'aigua que hi ha a l'òrgan o teixit on s'està mesurant per quantitat de pes sec. Per calcular-la s'utilitza la següent fórmula: $H = (\text{PF} - \text{PS})/\text{PS}$

La hidratació, donat que és fàcil de mesurar, és un bon paràmetre per conèixer l'estat hídric d'una planta, tot i que és recomanable combinar-la amb valors de CHR, ja que si bé és més exacte que aquest paràmetre, la H varia molt entre espècies. Si es compara la hidratació màxima de *C. albidus* amb la d'*A. thaliana*; s'observa que a la primera espècie un CHR del 90 % es correspon amb $2\text{-}3 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ PS}$, depenent de la població (veure Resultats 3 i Resultats 4), Els valors d'H per als valors més alts de CHR arriba als $10 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ PS}$.

Aquesta diferència de valors màxims d'hidratació es pot utilitzar com un indicador d'una espècie a la falta d'aigua als seus teixits. *C. albidus* és una planta molt més tolerant al dèficit hídric que *A. thaliana*, tal com s'ha mostrat al llarg d'aquesta tesi. A més, en plantes tolerants a l'estrès hídric, quan aquest s'estableix, disminueix i es manté en valors baixos fins que les plantes poden rehidratar-se.

2. Clima mediterrani i plantes mediterrànies

2.1. Clima mediterrani

El clima mediterrani es caracteritza pels hiverns suaus i el estius calorosos i secs. Els hiverns, amb temperatures mitjanes més baixes de 5°C, duren un màxim de tres mesos i difícilment baixen dels 0°C. A l'estiu, en canvi, les temperatures assoleixen i superen els 20°C durant un període de dos a quatre mesos. Durant aquesta època hi ha molt poques precipitacions, que en aquest clima es concentren a la primavera i, sobretot, a la tardor. Les pluges anuals oscil·len entre els 400-600 mm depenent de l'any i de la part de la regió, la seva incidència sol ser irregular.

La coincidència durant els mesos d'estiu de les màximes temperatures i les mínimes precipitacions genera un període àrid (Folch i Franquesa 1986).

El clima mediterrani pot ser considerat semiàrid o subàrid (Larcher 2003, Pereira i Chaves 1993, Harley 1993), al mateix temps que pertany a la zona bioclimàtica subtropical subhúmida, a la frontera entre la zona de clima temperat i la subtropical (Körner 2002), a la qual pertanyen altres climatologies anàlogues al clima mediterrani que es troben al nord i al centre de Califòrnia, a la costa Xilena, a la zona de Ciutat del Cap i al sud d' Austràlia (Folch i Franquesa 1986, Körner 2002, Larcher 2003). La conca mediterrània queda supeditada a les costes de la mar Mediterrània: nord d'Àfrica, Orient Mitjà i sud d'Europa.

L'establiment del dèficit hídric en el clima mediterrani és gradual: sol començar a la primavera o a principis d'estiu com a resultat de l'esgotament de la humitat del sòl, alentit per pluges intermitents (Pereira i Chaves 1993, Larcher 2003).

2.2. La vegetació mediterrània

Exceptuant la vegetació de ribera, totes les plantes que viuen al Mediterrani han de fer front a la sequera, de manera que les plantes natives d'aquest clima són plantes C_3 evitadores del dèficit hídric, on s'hi poden trobar des de plantes anuals d'hivern, que completen el seu cicle abans que arribi l'època seca, a plantes perennes d'arrels profundes o arbustos de fulles decidúes d'estiu (Pereira and Chaves 1993, 1995), passant per mates que perden la seva part aèria com a conseqüència de la sequera estival però mantenen òrgans subterranis per rebrotar quan arribi l'època de pluges. Així, donat que la falta d'aigua és el principal factor desfavorable al que les plantes del Mediterrani s'enfronten, la vegetació dominant de la regió mediterrània són els boscos i les poblacions d'arbusts esclerofil·les i prats de secà (Folch i Franquesa 1986, Körner 2002, Schulze et al. 2002, Larcher 2003). La característica principal que defineix les fulles esclerofil·les és la presència d'esclerènquima al seu interior conferint-los resistència mecànica a la deshidratació (Gibson 1994). Les fulles esclerofil·les són dures i de vida llarga o perennes (Körner 2002), amb cobertes cèries o piloses, sovint rebolutes i de tamany reduït de manera que són idònies per evitar grans pèrdues d'aigua a través de la seva superfície (Larcher 2003). El fet que siguin perennes no permeten el dispendi de la total renovació foliar anual que la majoria plantes d'altres regions amb més disponibilitat d'aigua sí que es poden permetre (Folch i Franquesa 1986). D'altres, en canvi, presenten malacofil·lia, que es dona en fulles blanques que poden marcir-se de forma reversible durant els períodes àrids (Carreras 1988), tot i que la senescència i abscisió de fulles és un procés que es du a terme en diverses plantes mediterrànies, sobretot quan el dèficit hídric esdevé sever (Pereira i Chaves 1993). La pèrdua de fulles permet mantenir la planta viva, doncs disminueix la superfície de transpiració, la planta reabsorbeix els nutrients de les fulles que es perden i el metabolisme es pot aturar (Munné-Bosch i Alegre 2004).

Pel que fa a la fesomia de la vegetació, per protegir-se contra l'aridesa i la insolació típica de l'estiu mediterrani, les plantes natives d'aquesta regió solen agrupar-se en masses atapeïdes i compactes, de manera que les formacions boscoses i arbustives d'aquestes característiques. Dins

les agrupacions d'arbusts s'hi troben màquies, brolles, garrigues, timonedes i espinars, que caracteritzen en gran mesura el paisatge mediterrani.

La vegetació de tipus mediterrani és, després de la vegetació tropical, de les més diverses del món (Moreno i Oechel 1995).

2.2.1. *Cistus albidus*

2.2.1.1. Característiques florístiques

És una espècie pròpia de les regions mediterrània i macaronèsica (illes properes a l'Àfrica atlàntica), des del nivell del mar, d'on és més típic, fins els 1200-1400 m en les zones més meridionals. Les fulles són ovato-oblongues o el·líptico-oblongues i sèssils. Són grises a anvers i revers perquè es troben densament cobertes de pèls estelats curts que li donen aspecte de feltre, els nervis del revers estan molt marcats. Les flors són d'un rosa purpuri, agrupades en una cima umbel·lifforme terminal formada de entre 3 i 8 flors. Floreix de març a juny, tot i que de forma més excepcional pot florir al gener-febrer o a juliol, depenent de la temperatura i la pluviositat. És una mata o petit arbust (de 40 a 120 cm, menys sovint 150 cm) que forma part de brolles i garrigues que substitueixen l'alzinar, erms terofítics i de vegades és dominant en llocs secs de vegetació molt degradada, sovint incendiats (De Bolòs et al. 1990, López 2007), doncs sol ser una de les espècies amb més recobriment després d'un incendi donat que és un piròfit reconegut. Se'l troba en associacions del tipus *Thero-brachypodion*, *Quercetum cocciferae*, *Rosmarino-Ericion*, *Cistion*, *Cisto-Sarothamnetum catalaunici*, *Pteridio-Lavanduletum pedunculatae* (De Bolòs et al. 1990, Folch i Franquesa 1986). Tot i que prefereix sòls calcaris, pot viure en tot tipus de sòls (López 2007).

2.2.1.2. Característiques fisiològiques. Respostes a la sequera

Les característiques fisiològiques de *C. albidus* queden emmarcades en la seva manera d'afrontar el dèficit hídric, doncs és una espècie que es troba entre els típics arbusts esclerofíl·les i perennes de la conca Mediterrània, donat que disminueix el seu creixement davant la sequera (Grant et al 2005); s'ha demostrat la seva capacitat de regular el tancament estomàtic davant el dèficit hídric perquè disminueix la conductància estomàtica durant els mesos més àrids i la augmenta de forma notòria quan el sòl es troba hidratat i les condicions de creixement són favorables (Grant i Incoll 2005, Grant et al 2005); i a més és capaç de resistir la deshidratació de les seves fulles, que es rehidraten quan hi ha aigua disponible al sòl (és una espècie malacofíl·la, Carreras 1988). També és una espècie semi-decídua, (Grant et al 2005), de les que perden les fulles, però no totes, en resposta als dèficits hídrics severos (Grant i Incoll 2005, Grant et al. 2005) que es donen a la majoria dels estius mediterranis. Presenta erectofília, orientació vertical de les fulles (Grant i Incoll 2005, Grant et al 2005), durant els mesos d'estiu evitant que les altes radiacions típiques d'aquest període incideixin de forma perpendicular a les seves fulles (Werner et al. 1999) i disminuint-ne la capa límit de manera que les fulles no assoleixin temperatures letals durant les hores de més calor (Grant et al 2005).

En resum, *C. albidus* és una planta que evita l'estrès (aturada del creixement, tancament estomàtic, caiguda de fulles, erectofil·lia) i al mateix temps el tolera (malacofil·lia, baixos potencials hídrics, baixos contingut hídrics i baixa hidratació).

3. Mesures de peròxid d'hidrogen: posada a punt del mètode

3.1. Localització

La localització intracel·lular de peròxid d'hidrogen en basa en la reacció entre el clorur de ceri i el peròxid d'hidrogen, que reaccionen formant perhidròxid ceri (Bestwick et al. 1997). El perhidròxid de ceri és un compost que és altament electrodens, de manera que la producció de peròxid d'hidrogen es pot detectar mitjançant el microscopi electrònic de transmissió.

Aquesta tècnica de detecció consta de quatre parts importants: i) marcatge, ii) fixació i inclusió, iii) microtomia, iv) observació.

i) Marcatge

El marcatge es realitza just després de la recollida de les fulles, es tallen amb un bisturí en talls d'un màxim de 5 mm d'amplada i 2 mm de gruix, i s'infiltra amb una solució de CeCl_3 5 mM dissolt en una solució d'àcid 3-(N-morpholino)propanosulfònic (Mops) 50 mM a pH 6.5-7.0 i es deixa reposar una hora.

La infiltració dels talls es fa mitjançant el buit i es pot dur a terme de dues maneres : i) amb una bomba de buit ó ii) amb una xeringa. Amb la bomba de buit la infiltració és molt més lenta (pot arribar a trigar dies); en canvi amb la xeringa la infiltració és molt més ràpida.

La infiltració amb xeringa pot ser més heterogènia, sobre tot en peces grosses. En el nostre cas el material és de tamany reduït i ens interessa fer la infiltració el més ràpid possible, doncs sotmetre els talls a una pressió continuada massa temps pot portar a les cèl·lules a produir peròxid d'hidrogen *de novo* i conduir a una sobreestimació de la producció de peròxid d'hidrogen.

ii) Fixació i inclusió

La fixació es du a terme just després del marcatge i consisteix en infiltrar el material amb una solució 2.5 % paraformaldehid i 2.0% glutaraldehid dissolts en una solució de tampó cacodilat 50 mM. La infiltració es du a terme primer amb xeringa i per completar la fixació es fa amb una bomba de buit una nit sencera.

Inicialment la concentració de fixador d'ambdós compostos era d'1.25% (Bestwick et al. 1997), però com *Cistus albidus* és un material vegetal més dur que *Lactuca sativa*, es va comprovar que amb una concentració més alta de fixador, la qualitat de les imatges és millor.

La resta de passos de la fixació i la inclusió es van dur a terme als Servei de Microscopia Electrònica de les Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

iii) Microtomia

La microtomia consisteix en la realització de talls aptes per a la seva observació amb el microscopi electrònic de transmissió i és la part més “artesanal” d’aquest procés. Actualment a la Universitat de Barcelona només el duen a terme tècnics especialitzats, doncs es treballa amb material molt delicat i car, com ara ganivetes de diamant. Com es tracta de talls de gruix molt petit, s’ha de treballar amb material dur, per això les mostres s’inclouen en resina Spurr. Per a obtenir talls ultra-fins es realitzen diversos passos: i) talls semi-fins; ii) orientació dels talls semi-fins; iii) talls ultra-fins

Talls semi-fins - Els talls semifins es realitzen amb ganivetes de vidre acabades de preparar en blocs *piramidats*. En aquestes ganivetes s’ha de muntar un pouet ple d’aigua realitzat amb cinta metàl·lica impermeable i parafina, de manera que a mida que els talls es vagin fent amb el micròtom quedin surant a l’aigua.

Els talls es recullen amb un pinzell d’un sol pèl (aquest pèl ha de ser de gos dàlmata o de pestanya humana) i es dipositen en un porta-objectes. S’assequen en una placa calefactora i es tenyeixen el temps adequat amb blau de metilè.

Piramidació – Consisteix en reduir al màxim l’àrea de tall del bloc, de manera que la ganiveta només talli la zona on hi ha mostra. Després d’aquest processat, l’extrem del bloc on es troba el tall queda en forma de piràmide truncada, d’aquí el nom *piramidació*. El piramitotom és l’aparell amb el que es realitza aquesta feina.

Orientació – S’observen els talls semi-fins en un microscopi òptic i es tria la zona que més interressi per a la observació amb el microscopi electrònic. La millor manera d’orientar els talls és dibuixar-los de la forma més detallada possible i marcar la zona que interessa. D’aquesta manera, a l’hora de fer els talls ultra-fins és molt senzill. Cal remarcar que dibuixar l’interior de tall és del tot inútil, doncs al bloc només es pot apreciar la seva silueta.

Talls ultra-fins (50-60 nm) – Els talls ultra-fins s’obtenen després de re-piramidar el bloc (fer una piràmide més petita que la primera) de manera que només quedi per tallar la zona que s’ha triat durant la orientació. La producció de talls es du a terme mitjançant ganivetes de diamant que ja porten el seu pouet incorporat. Aquesta part del procés és molt delicada i és precís dur-la a terme en una cambra sense corrents d’aire ni vibracions.

Un cop s’aconsegueix fer talls del gruix desitjat (1µm, que es detecta pel color del tall); es posa la ganiveta en automàtic per evitar les vibracions que la presència d’una persona pot provocar. Quan l’ultramicrotòtom ha acabat de fer els talls, es recullen amb reixetes de coure o d’or. Les reixetes d’or solen portar adherida una membrana amb l’objectiu d’augmentar la resistència dels talls ultra-fins. Els talls es contrasten amb acetat d’uranil i citrat de plom.

iv) Observació

L’observació es duia a terme en un Microscopi Jeol JEM 1010, a 80 KV d’acceleració i les imatges foren obtingudes amb una càmera Bioscan 812 de Gatan. Les micrografies s’emmagatzemaven en format .tiff fins a la seva observació en un PC.

3.2. Quantificació

La tècnica es basa en la reacció del reactiu Amplex[®] Red (Molecular Probes, Invitrogen Detection Technologies, Leiden, The Netherlands) que en presència d'una peroxidasa és modificat pel peròxid d'hidrogen. Aquest reactiu és el component principal d'un *kit* comercial especialment dedicat a la quantificació de peròxid d'hidrogen (*Amplex[®] Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit*); és incolor, i un cop oxidat es converteix en un compost altament fluorescent: la resorufina (Mohanty et al. 1997).

3.2.1. Extracció i purificació

Les fulles es recollien al migdia; immediatament s'ultracongelaven en nitrogen líquid, i emmagatzemaven a -80 °C fins el moment de l'anàlisi. En el moment de l'anàlisi es pulveritzaven 0.13-0.18 g de mostra en un morter de porcellana amb nitrogen líquid. El pulveritzat es dipositava en un tub de centrífuga en gel i fosc, on s'hi afegien 5 ml d'àcid perclòric (HClO₄) 0.2 M. Amb l'ajuda d'un sonicador Vibra Cell (Sonics & Materials, Inc., Connecticut, USA) es procedia a l'homogenització de la mostra (20 polsos per minut). L'homogenat es centrifugava a 4000 rpm durant 10 minuts a 4°C. El sobrenedant es recollia per depositar-lo en un altre tub de centrífuga. L'extracció es repetia dues vegades amb un volum de 2 ml cada reextracció. Els sobrenedants resultants de les tres re-extraccions s'afegien al primer sobrenedant. Es carregaven 500 µl del sobrenedant total (resultat de l'extracció i les dues reextraccions) en una columna de bescanvi iònic (AG[®] 1-X8 Resin 200-400 mesh chloride form, 0.8 x 4 cm, Bio Rad Laboratories, Inc, California, USA) prèviament calibrada amb 6 ml d'àcid perclòric i es deixaven infiltrar per gravetat. L'extracte s'eluïa amb 3 ml d'aigua bidestil·lada i es recollia en un tub *falcon*. L'extracte purificat (3.5 ml), es neutralitzava amb el volum adient d'hidròxid d'amoni (NH₄OH) 0.2 M (1.4-1.5 ml) per arribar al pH òptim de treball de la HRP (7-7.4).

3.2.2. Determinació

L'aparell utilitzat per a la quantificació de peròxid d'hidrogen és un fluorímetre Fluostar Optima (BMG Labtechnologies, Alemanya) que llegeix en plaques de 96 pouets. En aquest cas es van utilitzar plaques opaques i negres, de fons opac (Fluoronunc plate black 96, Nunc). A cada pouet es dipositaven 50 µl de l'extracte purificat i neutralitzat, i 50 µL de la solució de treball d'Amplex[®] Red (Amplex Red[®] 100 µM; HRP 0.2 U/ml). Després de 15 minuts d'incubació, s'introduïa la placa al fluorímetre. Abans de realitzar cada lectura, el fluorímetre calculava el *gain* de la placa i la sacsejava durant dos segons. El resultat de la lectura es descarrega directament en format Excel (Microsoft, EUA) a un PC connectat directament a l'aparell.

La concentració de peròxid d'hidrogen es calculava a partir dels resultats de la lectura de fluorescència, expressada en unitats arbitràries, mitjançant una recta patró realitzada a partir de dos bancs de dilucions diferents de concentracions conegudes de peròxid d'hidrogen.

3.2.3. Posada a punt del mètode

3.2.3.1. Mètode d'extracció: ultrasons, reextraccions i volums

El mètode d'extracció és una adaptació dels mètodes explicats per Rao i col·laboradors (2000) i Orozco-Cárdenas i col·laboradors (2001), dels quals el darrer és una adaptació del primer sense gairebé cap modificació. El material vegetal utilitzat en ambdues publicacions és material tou: *Arabidopsis thaliana* al primer, i *Lycopersicon esculentum* al segon, per tant l'extracció de peròxid d'hidrogen és més fàcil en aqueixos materials vegetals que en una planta coriàcia com *Cistus albidus*.

En l'adaptació del mètode d'extracció a *Cistus albidus*, s'han realitzat modificacions en els següents punts de l'extracció: homogenització, volum d'extracció i nombre d'extraccions. Les modificacions no s'enumeren per ordre d'importància, doncs tots els punts són importants i estan lligats entre ells.

Homogenització – El peròxid d'hidrogen es produeix en més o menys quantitat en gairebé tots el compartiments cel·lulars, així és important assegurar la ruptura de totes les membranes que es troben delimitant o a l'interior de la cèl·lula. Els ultrasons són una eina molt eficaç per aquesta tasca. Per això es va utilitzar un sonicador per homogenitzar el material vegetal amb l'àcid perclòric.

Volum d'extracció - El volum és una part important en un mètode d'extracció, doncs com més volum de dissolvent (o de medi d'extracció) es faci servir més quantitat de, en aquest cas, peròxid d'hidrogen s'extraurà. Així, en un mètode d'extracció s'ha d'arribar a un equilibri entre la quantitat de medi d'extracció i el límit de detecció del mètode de quantificació. En aquest cas, el volum final havia de ser com màxim de 9 ml de medi d'extracció per 0.15 g de mostra.

Cal remarcar que es necessita un mínim de 2 ml de volum per poder sonicar els homogenats sense perdre mostra.

Nombre d'extraccions – Per assegurar la completa extracció d'un compost a partir de material vegetal, és recomanable realitzar reextraccions després d'una primera extracció. Sobre tot en material tan coriàcia com les fulles de *Cistus albidus*. En la posada a punt d'aquest mètode es va poder observar que realitzant una extracció de 5 ml i dues reextraccions de 2 ml s'extreia el 98% de peròxid d'hidrogen (Fig. 1) dins els límits de detecció del mètode.

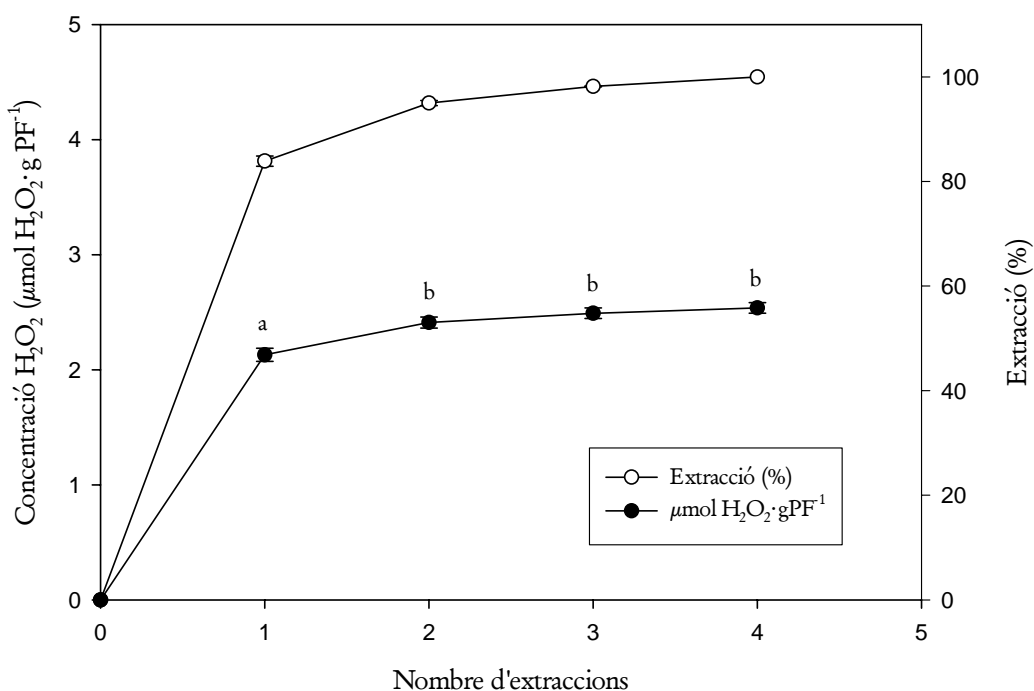


Fig.1. Relació entre el Nombre d'extraccions i concentració de peròxid d'hidrogen (Negre) extret. Les rodones blanques representen el % d'Extracció corresponent a la Concentració i al nombre d'extracció (el 100% es pren com la concentració de peròxid d'hidrogen a la 4^a extracció)

Tots els punts són mitjanes \pm ES. Les lletres indiquen diferències entre grups de Concentració de peròxid d'hidrogen segons la T d'Student.

Tal com s'observa a la Fig. 1, la segona extracció i la quarta (o la primera reextracció i la tercera), no difereixen de forma significativa. Per això es va decidir fer un extracció i dues reextraccions: per assegurar el percentatge d'extracció de peròxid d'hidrogen, però no augmentar en excés el factor de dilució

3.2.3.2. Neutralització

El control del pH de l'extracte pren un protagonisme insòlit en aquest mètode, doncs el medi d'extracció és altament àcid i el mètode de detecció requereix pH neutre. El fet que el medi d'extracció no sigui una solució mínimament tamponadora fa que s'hagi de prendre determinades mesures a l'hora de neutralitzar l'extracte.

Moment de neutralització: abans o després de la purificació?

L'observació que el pH de l'extracte neutralitzat tornava al seu pH original (pH 1-2) després del seu pas per la columna, va ser determinant per decidir el moment de la seva neutralització.

L'extracte es neutralitzaria després de la seva purificació.

Volum de base (hidròxid d'amoni)

El volum necessari d'hidròxid d'amoni s'establia abans de realitzar els extractes. Cada cop que es preparava medi d'extracció nou, es realitzava un assaig previ. Aquest assaig consistia en els següents passos:

1. Realització de tres extractes
2. Purificació dels extractes mitjançant la columna
3. Afegir 1400 µl d' NH_4OH
4. Afegir 4900µl de tampó fosfat del *kit*
5. Mesurar pH

Si el pH es trobava en el rang de pH 7-7.4 un cop afegit el tampó fosfat, el volum de neutralització es donava per vàlid. Si era molt més baix, s'afegia hidròxid d'amoni i tampó fosfat (1:1, (v/v)) fins arribar al pH desitjat. Si era més alt es provava d'afegir menys volum de base en un altre dels extractes purificats, afegint sempre el mateix volum de tampó fosfat que del volum resultant d'afegir la base.

El volum que s'establia era el volum que s'utilitzaria en la neutralització dels extractes realitzats amb el medi d'extracció preparat.

És molt important no superar un determinat pH quan es treballa amb peroxidases mesurant peròxid d'hidrogen. La peroxidasa del rave a pH 8.5-9.0 produeix peròxid d'hidrogen (Eltner i Heupel 1976, Bolwell et al. 1995).

A pH àcid el color de l'extracte abans de ser purificat és incolor (com el de l'extracte purificat) però quan arriba a valors de neutralitat o més alts vira a un color verd marronós.

3.2.3.3. Recuperació del mètode

La recuperació del mètode en assaigs previs a l'extracció de peròxid d'hidrogen en mostra congelada era certament variable. Així que es va decidir calcular la recuperació cada tres rèpliques.

Per calcular la recuperació del mètode es van realitzar extraccions de peròxid d'hidrogen amb una concentració coneguda de peròxid d'hidrogen al medi de la primera extracció.

Resum de l'assaig de recuperació:

1. Pulveritzar mostra
2. Afegir 5 ml de H_2O_2 20 µM dissolt en HClO_4 0.2 M
3. Centrifugar i recollir sobrenedant
4. Afegir 2 ml HClO_4 0.2 M
5. Repetició 3 i 4
6. Purificació i neutralització
7. Lectura
8. Càlcul de la concentració i la recuperació de peròxid d'hidrogen

Recuperació

Per a cada tractament es va realitzar la mitjana de totes les recuperacions i es va aplicar als resultats de concentració de peròxid d'hidrogen del seu tractament respectiu.

Observacions

Els resultats de la recuperació d'aquest mètode ens indiquen que el peròxid d'hidrogen és una molècula força estable, sempre i quan l'anàlisi es faci el mateix dia de l'extracció i no es guardi l'extracte congelat.

També ens indica que l'àcid perclòric atura de forma eficient el metabolisme, doncs en cap cas es troba formació de peròxid d'hidrogen durant la seva extracció.

3.2.3.4. Recta patró

Cada dia que es feia lectura de concentracions endògenes de peròxid d'hidrogen es feien dues rectes patró per validar el bon funcionament del fluorímetre.

Les concentracions per la realització de les rectes patró es feien a partir d'una solució mare de peròxid d'hidrogen 20 mM. A partir d'aquesta solució mare es realitzaven dilucions en àcid perclòric 0.027 M neutralitzat, per obtenir els punts de concentració de la recta patró.

A continuació es mostren els valors de concentració relacionats amb les unitats arbitràries de fluorescència (Taula 1), i la recta patró mitjana (Fig. 2), realitzada amb totes les rectes patró que es van obtenir en els anàlisis realitzats a *Cistus albidus*.

Concentració H ₂ O ₂ (µM)	Fluorescència mitjana (unitats arbitràries)	± SE
0 µM	257,72	13,62
1 µM	3610,11	94,88
2,5 µM	9245,54	129,9
5 µM	1784,75	24,17
10 µM	32821,57	365,75
20 µM	55919,67	235,17

Taula 1. Valors mitjans de fluorescència mitjana (unitats arbitràries) de tots els patrons realitzats ± SE, per a les concentracions conegudes de peròxid d'hidrogen (µM H₂O₂).

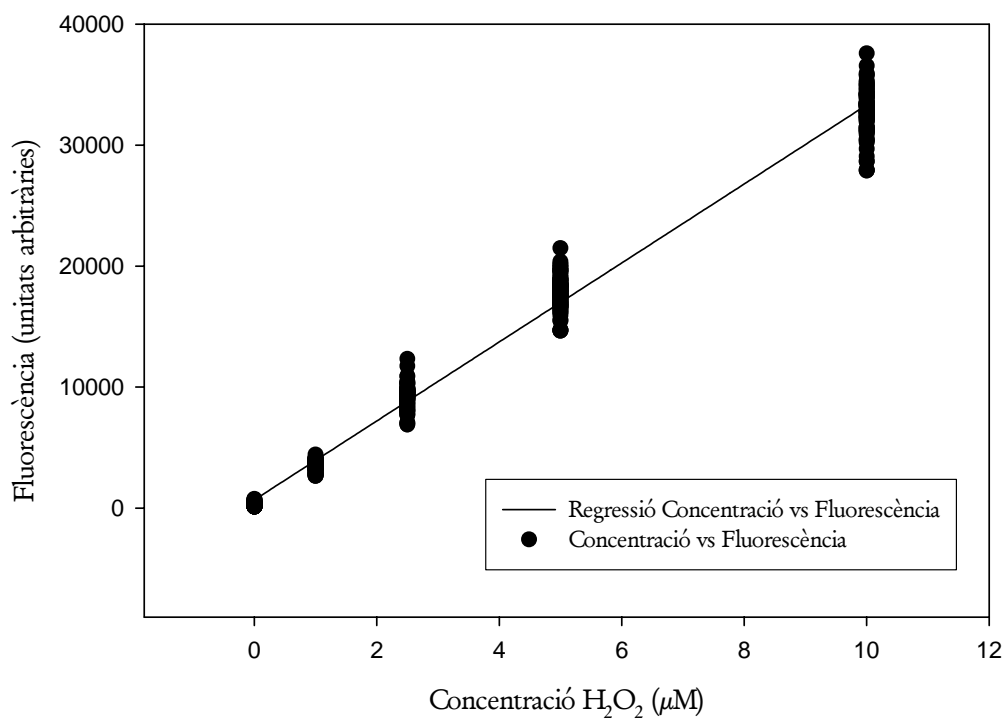


Fig 2. Recta de regressió de tots els patrons realitzats. Relaciona els diferents valors de Concentració de H₂O₂ (µM) i els seus valors respectius de Fluorescència (unitats arbitràries).
 $v_0 = 678.22$; $a = 3263.78$; $R = 0.9945$; $R^2 = 0.989$

Normalment s'agafaven els valors de 0 a 10 µM per a fer la recta de regressió, però la presència de la concentració 20 µM no allargava el protocol, i en concentracions de mostra molt elevades podria ser necessària. I així va ser, tal com s'observa als resultats.

