

MONOGRAFÍA

EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS PLANTAS. CAUSAS, EFECTOS Y MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

**Autores: MSc. Leticia Fuentes Alfonso
Dra. Amalia Domínguez Suárez
MSc. Silvia Alema García
Lic. Yunel Pérez Hernández***

**Facultad de Agronomía, Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”,
CP. 44740.**

Email: yunel.perez@umcc.cu

INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo tanto en plantas como en animales ha recibido una gran atención en los últimos tiempos, a partir de las implicaciones en el orden fisiológico que tienen las especies reactivas del oxígeno (ERO) para el buen desarrollo y funcionamiento de los organismos en general.

Las ERO como el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) son producidos durante procesos celulares aeróbicos normales de la células, como en la cadena de transporte electrónico en cloroplasto y mitocondria, la oxidación del glicolato en el proceso de fotorrespiración, y por transformaciones metabólicas de determinados compuestos como la xantina y la glucosa. Los niveles de las ERO son también incrementados debido a cambios estresantes en el medio (Arora, et al., 2002), como el aumento de la concentración de sales, estrés hídrico, fluctuaciones extremas de temperatura, así como el estrés biótico causado por la interacción planta-patógeno.

Para contrarrestar el efecto nocivo del estrés oxidativo, las plantas poseen sistemas enzimáticos y compuestos antioxidantes de naturaleza no proteica eficientes, que contribuyen de forma sinérgica a mantener la concentración de las ERO en niveles no tóxico. Como respuesta adaptativa en el transcurso de la evolución, se han desarrollado finos mecanismos a nivel metabólico para elevar la concentración de tales compuestos, ya sean no enzimáticos como el ascorbato, el tocoferol y los pigmentos carotenoides; así como una variedad de enzimas distribuidas en diferentes compartimentos celulares, entre las que se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, las peroxidasas y las del ciclo ascorbato-glutatión.

La presente monografía tiene como objetivo analizar desde el punto de vista bioquímico y fisiológico las causas, el efecto y la respuesta a nivel molecular del estrés oxidativo en diferentes especies de plantas.

DESARROLLO

I. Especies radicales del oxígeno. Rutas de producción y eliminación

El surgimiento de las especies reactivas del oxígeno se remonta a aproximadamente 2000 millones de años atrás, cuando las cianobacterias anaeróbicas que poblaban los mares y océanos primitivos desarrollaron la base fotoelectroquímica de dos procesos biológicos esenciales: la fotosíntesis y la respiración, que durante la evolución permitieron el origen de formas de vidas más complejas. Tanto la fotosíntesis como la llamada fotorespiración tienen efectos positivos y negativos.

El oxígeno molecular se produce como resultante de la fotólisis del agua y actúa como aceptor final de la cadena transportadora de electrones, propiciando la formación de las ERO, las cuales pueden llegar a provocar estrés oxidativo cuando la formación de ellas prevalece sobre los mecanismos de defensa antioxidante, ocurriendo un desbalance redox (Elstner, 1982; Shalata y Tal, 1998).

El oxígeno es además asimilado durante el proceso de fotorespiración produciendo fosfoglicolato (Arora et al. 2002). El radical superóxido producido por el transporte de electrones hasta el oxígeno no es compatible con el metabolismo celular y debe ser eliminado por el sistema antioxidante, mientras que la transformación del fosfoglicolato a fosfoglicerato implica una reducción considerable en la asimilación del carbono. Por otra parte, la oxidación del glicolato aumenta considerablemente los niveles de H_2O_2 en los peroxisomas y aunque una cantidad considerable de este compuesto es eliminado por acción de la catalasa, los restos del mismo pueden provocar la descarboxilación química de cetoácidos (Zelitch, 1992).

1.1 Formación de las especies reactivas del oxígeno. El oxígeno singlete (1O_2).

El oxígeno singlete es un radical altamente destructivo capaz de reaccionar con la mayoría de las moléculas biológicas en las células (Knox, y Dodge, 1985, Cadenas, 1989). La fuente primaria de su producción es a nivel de los pigmentos clorofílicos asociados al sistema de transporte electrónico en cloroplastos (Figura 1), aunque también se pueden elevar los niveles de 1O_2 como un subproducto de la actividad lipooxigenasa (Arora et al., 2002).

El estado de singlete excitado de la clorofila utilizada para la transferencia de energía (electrones), posee un tiempo de vida media corto dentro de los fotosistemas, aunque varía en dependencia de las condiciones fisiológicas. Por otra parte, existen otras dos rutas para lograr la desexcitación: la fluorescencia y la conversión al estado de triplete de la clorofila, este último interactúa con el oxígeno produciendo el radical 1O_2 (oxígeno singlete).

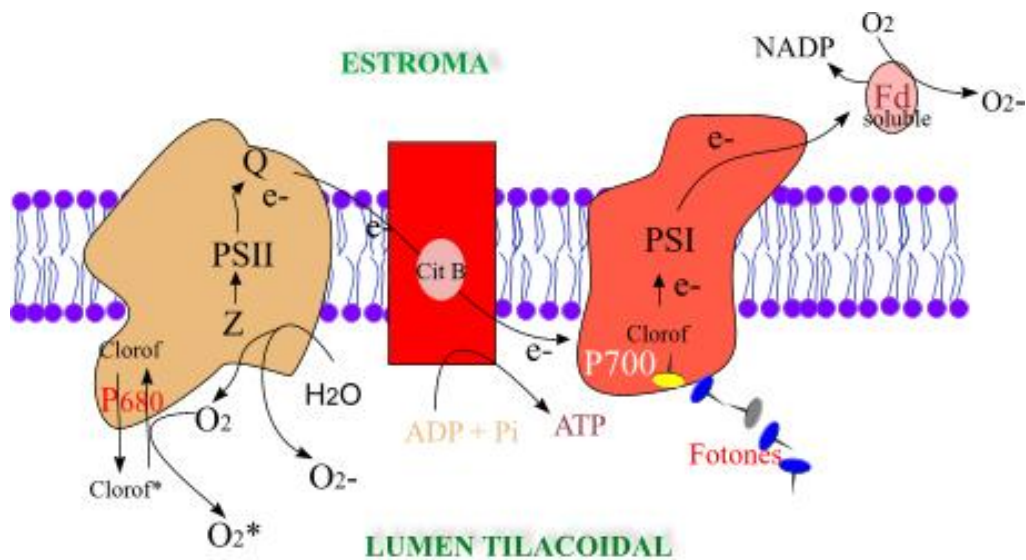


Figura 1. Producción de los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y oxígeno singlete (O_2^*) en los cloroplastos a nivel del fotosistema I (FSI) y II (FSII).

De manera general existen dos estrategias fundamentales para contrarrestar el aumento de los niveles de 1O_2 en las membranas de los tilacoides. La primera está relacionada con la regulación de la biosíntesis del aparato colector de luz, para minimizar la formación del estado de triplete de la clorofila. La segunda estrategia implica una rápida desexcitación (quenching, en Inglés) del estado triplete de la clorofila y del oxígeno singlete a través de los elementos desexcitadores (quencher, en Inglés) unidos a membrana (Arora et al., 2002). Se plantean dos procesos fundamentales que disminuyen el tiempo de vida medio del estado excitado de la clorofila: la fotoquímica y el transporte electrónico en los centros de reacción, y un segundo proceso que involucra la disipación térmica del exceso de energía de excitación, que transforma el estado excitado de la clorofila a su estado basal. La disipación de la energía térmica desempeña un papel importante en la fotoprotección ya que ésta limita la velocidad de reducción del primer aceptor estable de electrones del fotosistema II (Arora et al., 2002).

1.2 Formación del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en cloroplasto y mitocondria

El control del flujo electrónico entre el fotosistema II (PSII) y I (PSI) regula el estado reductor de los aceptores del PSI. Esto implica que el estado redox de los aceptores del PSI no limita significativamente el transporte electrónico (Harbinson y Hedley, 1993). La activación regulada del ciclo de Benson-Calvin y el control de la velocidad del flujo electrónico son factores importantes que determinan el estado redox del pool de ferredoxina (Foyer, et al., 1990). Esto es importante ya que la ferredoxina y los transportadores de electrones en el sitio reductor del PSI tienen suficiente potencial electroquímico negativo para donar electrones al O_2 provocando la formación del radical superóxido (Figura 1).

Existen dos sitios de producción de $O_2^{\cdot -}$ en el sitio reductor del fotosistema I (PSI) (Mehlar, 1951, Badger, 1985). La mayor parte de la reducción del oxígeno *in vivo* se cree sea realizado por la vía de la ferredoxina reducida, la cual reduce el oxígeno molecular a superóxido, quedando la misma en su estado oxidado. Dada la incompatibilidad de esta radical, es dismutado a H_2O_2 y O_2 por la enzima superóxido dismutasa (SOD) a una gran velocidad, aunque este proceso de dismutación también puede ocurrir espontáneamente (Arora et al., 2002).

A nivel de mitocondria existen varias rutas de consumo del oxígeno, las cuales están vinculadas a la producción de radicales superóxido. Entre las rutas más importantes se encuentra el consumo de oxígeno por medio de la citocromo oxidasa produciendo agua. Durante este proceso tiene lugar el consumo del 95% del oxígeno en mitocondrias normales (Arora et al., 2002). Otra ruta importante considera la reducción directa de oxígeno a aniones superóxido en la región de flavoproteínas del segmento donde interviene la enzima NADH deshidrogenasa en la cadena respiratoria. El componente responsable de la reducción es probable que sean las flavoproteínas (ya sea de la deshidrogenasa interna como la externa) o quizá un centro hierro-azufre (Figura 2) (Arora et al., 2002).

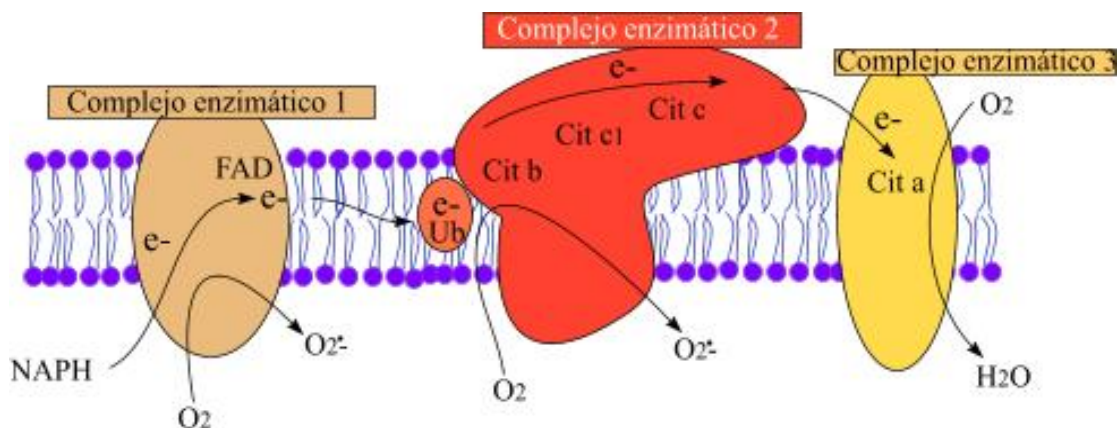


Figura 2. Sitios de producción del radical superóxido en la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

1.3 Formación y eliminación del peróxido de hidrógeno

El H_2O_2 es producido por la dismutación del radical superóxido, reacción que es generalmente catalizada por la SOD (Asada, et al., 1974). El H_2O_2 en los cloroplastos es eliminado por acción de peroxidasas que utilizan los fotoreductores producidos en los tilacoides como donantes de electrones (Nakano y Asada, 1981, Asada y Badger, 1984). El ascorbato ha sido identificado como donante de electrones para la reacción de la peroxidasa (Foyer y Halliwell, 1976). De esta manera, es poco probable que ocurra la difusión del H_2O_2 de los cloroplastos hasta los peroxisomas y su eliminación por la catalasa, otra de las enzimas fundamentales que participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno en las células (Fig. 3). En las células de las hojas, la enzima catalasa es localizada exclusivamente en los peroxisomas y no ha sido encontrada en cloroplastos (Arora et al., 2002).

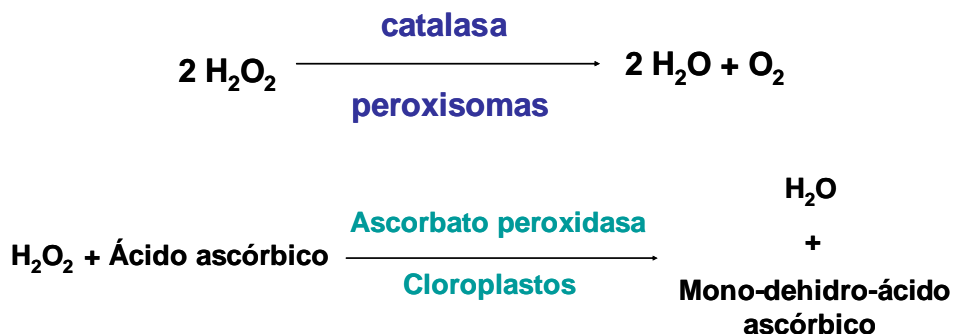


Figura 3. Vías fundamentales para la eliminación del peróxido de hidrógeno.

El H_2O_2 modula la expresión de varios genes, incluyendo los que codifican para enzimas antioxidantes y moduladores de la expresión de H_2O_2 (Nelly et al., 2002), aunque aun no se tiene un mapa metabólico bioquímico completo de cómo se relaciona el H_2O_2 con la expresión de los genes que codifican para el sistema antioxidante en plantas cuando son sometidas a diferentes tipos de estreses ambientales.

1.4 El radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)

Tanto el peróxido de hidrógeno como el radical superóxido por sí mismos no constituyen radicales altamente dañinos, sin embargo estas especies reactivas pueden participar en la formación directa del $\cdot\text{OH}$ el cual posee una elevada reactividad en presencia de sales ferrosas (reacción de Fenton) (Arora et al., 2002).

El radical hidroxilo es capaz de atacar macromoléculas como el ADN, proteínas y compuestos orgánicos de bajo peso molecular así como iniciar la peroxidación lipídica (Arora et al., 2002). La reacción química que resume la producción del radical hidroxilo se describe en la figura 4.

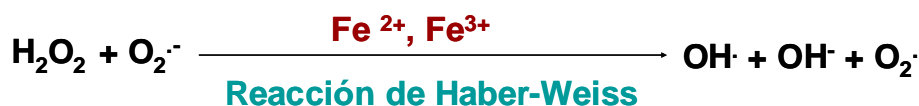


Figura 4. Reacción química que resume las etapas químicas de la generación del radical hidroxilo a partir de H_2O_2 en presencia de Fe^{2+} o Fe^{3+} .

El H_2O_2 reacciona con el ion ferroso reducido para originar primariamente $\text{Fe}^{3+} + \text{OH}\cdot + \text{OH}^-$. En un segundo paso el ion férrico es reciclado a Fe^{2+} , por reacción del Fe^{3+} con $\text{O}_2^{\cdot-}$ con la consiguiente liberación de O_2 . Otros iones metálicos como el Cu^+ y Cu^{2+} pueden reemplazar a los iones Fe^{2+} y Fe^{3+} en estas reacciones (Arora et al., 2002).

1.4.1 Oxidación de substratos orgánicos por el radical hidroxilo

La oxidación de substratos orgánicos puede suceder por dos tipos de reacciones: (1) La adición de radicales $\text{OH}\cdot$ a una molécula orgánica, o (2) la substracción de un átomo de hidrógeno de este compuesto (Arora et al., 2002).

En la reacción de adición, el OH^\cdot se adiciona al sustrato orgánico formando un producto hidroxilado el cual es posteriormente oxidado por el ion Fe^{3+} , el O_2 u otro agente a un producto oxidado estable. El producto hidroxilado puede también disputar para formar productos entrecruzados.

En la reacción de substracción, el radical OH^\cdot oxida los sustratos orgánicos para formar agua y un radical orgánico, el cual presenta un electrón no apareado que puede reaccionar con el oxígeno en un estado basal de triplete. La adición del oxígeno triplete a un radical orgánico puede provocar la formación de un segundo radical. Esta reacción en cadena es más dañina que cualquier otra catalizada por especies reactivas del oxígeno (Arora et al., 2002).

1.5. Señales moleculares del estrés

Independientemente de que las ERO sean moléculas reactivas que tienen una elevada afinidad por las membranas, ADN o proteínas en las células de las plantas, y por esta razón sean consideradas como especies tóxicas, disruptores del metabolismo celular; se han encontrado evidencias de que las ERO también funcionan como señales moleculares que median respuestas a varios estímulos (Desikan et al., 2004).

Entre las especies reactivas del oxígeno, el H_2O_2 parece ser quien desempeña el papel más importante en la señalización de los cambios estresantes, debido a su elevada estabilidad y largo tiempo de vida media (Hung, et al., 2005). Si el H_2O_2 sirve como señal al estrés, las fluctuaciones de H_2O_2 en plantas podrían reflejar cambios espaciales y temporales en el ambiente (Hung, et al., 2005). En apoyo a esta idea, un aumento brusco del estado oxidativo es una respuesta común a estreses abióticos y bióticos (Desikan et al., 2003). Estos estreses incluyen patógenos, elicitores, daños mecánicos en el vegetal, calor, bajas temperaturas, luz UV y ozono. Por ejemplo, en invierno el descenso hasta 4°C causó en las hojas de *Triticum aestivum* un aumento en los niveles de H_2O_2 de 3 veces en comparación con el control durante un minuto de ensayo (Okuda et al., 1991). De manera similar, los niveles de las ERO aumentaron bruscamente por el enfriamiento durante la germinación de plantas de maíz no aclimatizadas.

Por otra parte, las plántulas germinadas de maíz pretratadas con H_2O_2 o menadiona (compuesto generador de O_2^\cdot) adquirieron una tolerancia adicional frente al enfriamiento respecto a las plantas control (Prasad et al., 1994). Esto sugiere que las ERO inducidas por enfriamiento aparecen como mensajeros para inducir el sistema antioxidante a nivel celular.

Sin embargo, el peróxido de hidrógeno parece ser un mensajero secundario universal, actuando como señal en células de mamíferos, mediando la activación de activadores de la transcripción de los factores nucleares KB (NF-KB) (Schreck, et al., 1991) y AP-1 (activador de la proteína 1, un complejo formado por los productos de los genes jun y fos) (Rao et al., 1996).

Para que el H_2O_2 funcione como molécula específicamente señalizadora, debe existir un mecanismo que reconozca el incremento en los niveles de esta especie. En este sentido el H_2O_2 puede interactuar con residuos de cisteína dentro de la proteína. La modulación redox de proteínas podría potencialmente alterar la conformación proteica, afectando la actividad de las mismas y por tanto iniciar subsecuentes respuestas celulares (Hung, et al., 2005).

Evidencias sobre este mecanismo han sido descritas por Coleman et al., (1999), quienes utilizaron la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo

para explorar la respuesta eucariótica al estrés oxidativo. Estos autores demostraron que los cambios conformacionales del factor de transcripción positivo YAP1, por modificación de los residuos tiólicos constituye una etapa importante en la inducción a la tolerancia al estrés oxidativo.

En plantas ha quedado también claramente demostrado que el H₂O₂ desempeña un papel predominante en la transducción de las señales de ABA en *Arabidopsis* (Mienhard et al., 2001, 2002) a través de la regulación de la actividad fosfatasa. En esta ruta, las enzimas ABI1 y ABI2 (fosfatasas 2C) se desempeñan como blancos directos de la acción del H₂O₂ quien modifica los residuos de cisteína *in vitro*, (estas enzimas constituyen proteínas fosfatasa serinas/treoninas tipo 2C, las cuales son reguladas negativamente por ABA. Los resultados indican que ABI1 y ABI2 son probablemente receptores del H₂O₂ en las plantas superiores (Hung, et al., 2005).

Es importante señalar que el calcio también tiene una función importante como segundo mensajero y constituye uno de los factores principales en las rutas de señalización celular en muchos organismos (Sanders et al., 1999). Muchos estudios han revelado que fluctuaciones transcientes de Ca²⁺ citosólico son esenciales en la respuesta a numerosos estreses (Sanders, et al., 1999; Monroy y Dhindsa, 1995).

Pei et al., (2000) han demostrado que tanto el ABA como el H₂O₂ se hayan involucrados en la cascada de señalización para el cierre estomático en *Arabidopsis*. En estos estudios, canales de Ca²⁺ activados por H₂O₂ median tanto el influjo de este ión en el protoplasto y el incremento de la concentración citosólica en las células intactas de la guarda (Pei et al., 2000). Yang y Poovaich, (2002) mostraron otras evidencias sobre la estrecha interacción entre el H₂O₂ intracelular y el Ca²⁺ citosólico en respuesta a estreses bióticos y abióticos.

Estos estudios demostraron además, que un incremento en el Ca²⁺ citosólico estimula considerablemente la generación de H₂O₂. Esta elevación en la concentración de Ca²⁺ citosólico activa los sensores de calcio tipo calmodulina y subsecuentemente desarrolla un a cascada de reacciones que regulan los niveles de H₂O₂ por activación de la actividad catalasa.

1.5.1 Papel de las quinasas y las fosfatasas en la cascada de señales del H₂O₂

La fosforilación y desfosforilación reversible de proteínas, catalizadas por proteínas quinasas y proteínas fosfatasas (PTPs), respectivamente, constituyen un mecanismo molecular que transmite información a las células (Rudd y Franklin-Tong, 1999).

Estudios con proteínas quinasas inducidas por mitógeno (MAPKs) han mostrado que estas son activadas por H₂O₂ tanto en plantas como en animales, lo que puede constituir una vía para la una modulación de la expresión genética (Zerger y hirt, 2001; Torres y Forman, 2003); aunque todavía no está esclarecido si el H₂O₂ tiene un efecto directo sobre las proteínas quinasas activadas por mitógeno o sobre efectores que activan cascadas arriba (Hancock et al., 2001).

El H₂O₂ además de activar las MAPK, inhibe la actividad fosfatasa, probablemente por la oxidación directa de cisteínas en el sitio activo de estas enzimas.

En la cascada MAPK, las proteínas quinasas activadas por mitógeno son los receptores primarios de la señal, activadas por fosforilación por medio de proteínas quinasas (quinasa activada por mitógeno) (MAPKKs). Recientemente, varios grupos han demostrado que el H₂O₂ es capaz de activar la cascada MAPK en plantas y así proveer una relación entre una cascada de genes (Koutun et al., 2000). La activación de MAPKs por el H₂O₂ es un paso clave en la mediación de una respuesta celular a múltiple estreses (Koutun et al., 2000).

La acumulación de H₂O₂ generado por diferentes tipos de estreses induce la cascada MAPK que subsecuentemente estimula la expresión de genes antioxidantes, reduciendo los niveles de H₂O₂ y restaurando la homeostasia celular (Hung et al., 2005).

II. Daños moleculares, celulares y fisiológicos causados por las ERO

Las ERO, en especial el radical hidroxilo, reaccionan con un gran número de macromoléculas como el ADN, proteínas, lípidos, carbohidratos y compuestos de bajo peso molecular, y se considera que sean la causa de los daños celulares causados por distintos estreses (Hariyadi y Parkin, 1993; O'Kane et al., 1996).

2.1 Daño oxidativo al ADN

Las especies activas del oxígeno inducen numerosas lesiones en la molécula de ADN provocando deleciones, mutaciones y otros efectos genéticos letales. La caracterización de tales daños al material hereditario ha indicado que tanto el azúcar como las bases nitrogenadas son susceptibles a procesos de oxidación, causando la degradación de la base, rupturas en las cadenas simples y entrecruzamiento con proteínas (Imlay y Linn, 1986). La degradación de las bases nitrogenadas libera numerosos productos como la 8-hidroxiguanina, hidroximetilurea, urea, tiamina, anillos abiertos de adenina y productos saturados.

La causa principal de la ruptura en las cadenas simples de ADN es la oxidación de la desoxirribosa por el radical hidroxilo. En condiciones *in vitro*, ni el H₂O₂ ni el radical superóxido provocan la ruptura en las cadenas simples de ADN, por tanto, la toxicidad de estos radicales activos del oxígeno es probablemente el resultado de las reacciones de tipo Fenton con metales catalíticos.

Estudios en mutantes de *Escherichia coli* han permitido concluir que los metales activos que participan en la reacción de Fenton pueden unirse al ADN probablemente por una quelatación al enlace fosfodiéster. Si los metales unidos al ADN son reducidos por moléculas de bajo peso molecular, como el NAD(P)H o el radical superóxido, éste reaccionará con el peróxido de hidrógeno para formar el radical hidroxilo (Imlay y Linn, 1986), el cual aún cuando posee un corto tiempo de vida media es capaz de oxidar azúcares o bases nitrogenadas adyacentes provocando la ruptura de las cadenas de ADN. El entrecruzamiento entre ADN y proteínas es otra consecuencia del ataque del radical hidroxilo sobre el ADN y las proteínas asociadas (Oleinick et al., 1986). Las modificaciones químicas en estas moléculas pueden originar agregados por uniones covalentes entre tiaminas y residuos de cisteína. Aunque los entrecruzamientos ADN-proteínas son menos abundantes que las rupturas en las cadenas de ADN, éstos no son fáciles de reparar y pueden ser letales si

persisten durante los procesos de replicación y transcripción del material genético.

El ADN constituye *per se* un punto sensible en la habilidad que puedan desarrollar las plantas frente al estrés oxidativo. Este hecho constituye una de las razones por lo cual los organismos eucariota han compartimentalizado esta molécula en una doble membrana nuclear, lejos de los sitios donde tienen lugar reacciones redox y donde existen elevadas concentraciones de NAD(P)H y otros agentes reductores, con el objetivo de evitar las consecuencias del daño oxidativo sobre esta molécula.

2.2 Daño oxidativo a proteínas

El radical hidroxilo provoca modificaciones sitio específicas en aminoácidos con el consecuente cambio en la estructura tridimensional de proteínas y enzimas, que genera desnaturalización e inactivación de las mismas y una mayor susceptibilidad a la degradación proteolítica, fragmentación de la cadena polipeptídica, agregados como producto de reacciones de entrecruzamiento de los residuos modificados y cambios en las cargas eléctricas de las proteínas (Vicedo y Vicedo, 2000).

Los distintos aminoácidos en las cadenas polipeptídicas difieren en cuanto a susceptibilidad a ser atacados por parte de las especies altamente reactivas. Por otro lado, las diferentes formas activas del oxígeno también difieren en sus potenciales de reactividad. Las diferentes estructuras proteicas (primaria, secundaria y terciaria) pueden alterar la relativa susceptibilidad de ciertos aminoácidos. A pesar de esta complejidad se pueden realizar generalizaciones al respecto.

El ataque de las ERO a las proteínas puede provocar cambios irreversibles. Por ejemplo, la oxidación de centros que contienen hierro-azufre por acción del radical superóxido destruye la función enzimática (Gardner y Fridovich, 1991).

Por otra parte, muchos aminoácidos experimentan modificaciones específicas irreversibles cuando la proteína es oxidada, por ejemplo, el triptófano es rápidamente entrecruzado formando productos denominados bitirosinas (Davies, 1987), en cambio los aminoácidos histidina, lisina, arginina y serina forman grupos carbonilos cuando son oxidados (Stadtman, 1986).

La degradación oxidativa de proteínas es incrementada con la presencia de cofactores metálicos que pueden participar en el ciclo redox, tales como el hierro. En estos casos, el metal se une a un sitio de unión de cationes divalentes en la proteína, el metal reacciona entonces con el peróxido de hidrógeno en la reacción tipo Fenton para formar un radical hidroxilo que rápidamente oxida un residuo aminoacídico, ya sea en el mismo sitio de unión al catión o en una región cercana al mismo (Stadtman, 1986). Esta alteración sitio específica de un aminoácido usualmente inactiva a la enzima debido a que destruye el sitio de unión a cationes, al mismo tiempo que se considera un marcaje para que la degradación proteolítica actúe sobre la proteína alterada (Stadtman, 1986).

Según Tappel (1964) y Green (1966), los peróxidos acumulados en las membranas liposomales pueden destruir este orgánulo provocando la salida hacia el citosol de enzimas hidrolíticas que intensifican drásticamente los procesos hidrolíticos y la autólisis de los tejidos. De esta manera, un exceso en los niveles estándar de peróxidos en las células vegetales, provoca la acumulación de derivados tales como aldehídos lipídicos, cetonas y epóxidos,

los cuales unidos a toxinas de naturaleza no lipídica como las especies altamente reactivas de quinonas, causan la intoxicación general de las células. Los peróxidos pueden además inactivar los grupos tioles de las enzimas y oxidar grupos SH de aminoácidos y proteínas (Wills, 1966).

III. Factores abióticos y bióticos que incrementan las concentraciones de las especies reactivas del oxígeno

Los estreses ambientales como la salinidad, la sequía, la temperatura, la contaminación aérea, los metales pesados, los pesticidas y el pH del suelo representan los mayores factores que limitan la producción de las cosechas (Prasad *et al.*, 1994; Zhang y Kirkham, 1996; Badiani *et al.*, 1993; Gossett *et al.*, 1996), debido a que estos estreses afectan casi todas las funciones de las plantas (Hernández, *et al.*, 2001).

Las plantas que son expuestas a estrés severo han mostrado una incrementada susceptibilidad a la fotoinhibición con el subsecuente desarrollo de la clorosis (Wise y Taylor, 1987). Los daños fotooxidativos son exacerbados por contaminantes atmosféricos, herbicidas, metales pesados y compuestos naturales como la cercosporina producida por hongos del género *Cercospora* (Arora *et al.*, 2002).

3.1. La salinidad

Diversos estreses ambientales frecuentemente inducen similares tipos de daños celulares (Hamilton y Heckathorn, 2001), por ejemplo cambios extremos de temperatura, la salinidad y la sequía, inducen daños oxidativos y desnaturalización de proteínas (Vierling, 1991; Bowler *et al.*, 1992; Parsell y Lindquist, 1994; Navari-Izzo *et al.*, 1996; Waters *et al.*, 1996; Noctor and Foyer, 1998). Como una consecuencia, diversos estreses frecuentemente desarrollan similares respuestas adaptativas a nivel celular, tales como la producción de proteínas antiestrés, la síntesis de protectores del estrés oxidativo y la acumulación de solutos protectores (Navari-Izzo *et al.*, 1996; Hare *et al.*, 1998; Noctor and Foyer, 1998; McNeil *et al.*, 1999; Hamilton *et al.*, 2001).

De manera general la salinización de los suelos afecta adversamente la calidad y la productividad de las cosechas (Chinnusamy y Zhu, 2003), y aunque el sodio es un micronutriente esencial para algunas de las plantas C₄, (Ohnishi *et al.* 1990), la salinidad provoca un detrimento en el crecimiento de las plantas debido a que causa restricciones en la toma de nutrientes como el fósforo, potasio, nitratos y calcio; citotoxicidad debido principalmente a la presencia de iones Na⁺ y Cl⁻ además del ión SO₄; así como el estrés osmótico (Zhu, 2002).

Bajo estrés salino, los iones como el Na⁺ y el Cl⁻ penetran la concha de hidratación de las proteínas interfiriendo con las interacciones no covalentes entre los aminoácidos de las proteínas. Esto a su vez, provoca cambios conformacionales y pérdida de las funciones biológicas de estas macromoléculas. La toxicidad por iones, el estrés osmótico y las deficiencias nutricionales por efecto de la salinidad puede producir trastornos metabólicos que originan el estrés oxidativo (Xiong y Zhu, 2002; Salama y El-Fouly, 2001, Zhu, 2001).

Los mecanismos implicados en la tolerancia a salinidad pueden ser agrupados en tres tipos fundamentales: 1) la homeostasis celular, que incluye la homeostasis iónica y el ajuste osmótico, 2) la detoxificación y 3) la regulación del crecimiento (Zhu, 2001).

En condiciones de estrés salino se elevan los niveles de ácido abscísico (ABA) que provoca el cierre estomático, esto reduce la relación CO_2/O_2 en las hojas de las plantas, inhibiendo la fijación del CO_2 . Bajo estas condiciones se incrementan la formación de las ERO debido a que aumenta el número de electrones que escapan de la cadena transportadora y reaccionan con el oxígeno en los cloroplastos y mitocondrias (El-baky, et al., 2003), originando las especies activas del oxígeno.

Por otra parte, la peroxidación intensiva de los lípidos de membrana y la ruptura de las moléculas de ATP en condiciones de estrés salino provoca la degradación de sistemas sofisticados de las plantas, como la separación de los complejos ribosomas-membranas del Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) y como resultado una afectación en la biosíntesis de proteínas. Por otra parte, para que este proceso celular se desarrolle es necesaria la preactivación de los aminoácidos, para la unión de los mismos durante la síntesis proteica, siendo el ATP el activador directo de los mismos. La reducción de la biosíntesis de proteínas así como el incremento en el contenido de aminoácidos libre bajo estrés salino constituyen respuestas fisiológicas que han sido referidas por varios autores (Kahane y Poljakoff-Mayber, 1968; Udovenko, 1972).

En correspondencia a lo antes descrito, Rausell et al., (2003), plantean que el factor de iniciación de la traducción en eucariontes conocido como eIF1A pudiera ser uno de los blancos sensibles de la toxicidad producida por sales. Este factor posee funciones esenciales como la de unir el complejo Met-tRNA a la subunidad 40S ribosomal, para prevenir la asociación prematura con la subunidad ribosomal 60S (Battiste et al., 2000). Este factor es además requerido para la localización del codón de iniciación AUG en el ARNm (Pestova et al., 2001).

3.2. Sequía

Las plantas sometidas al estrés por déficit de agua responden de diferentes formas. Una vía antiestrés común a numerosas especies está relacionada con la síntesis de poliaminas y proteínas cuyas funciones aun se encuentra en investigación (Caplan, et al., 1990). La sequía como la salinidad incrementa la diferencia del potencial de agua entre el exterior y el interior de la planta. Como respuesta, se elevan las concentraciones del ácido abscísico el cual estimula el cierre de los estomas para evitar la pérdida de agua. El aumento en las concentraciones de ABA, como sucede en el caso de las plantas sometidas a estrés por salinidad, incrementa indirectamente los niveles de las ERO en las células vegetales.

3.3. Contaminantes atmosféricos

Los contaminantes atmosféricos como el ozono (O_3) y el dióxido de azufre (SO_2) están relacionados con la formación de radicales libres (Pell, et al., 1997) y son considerados entre los factores más importantes que influyen en el deterioro de los bosques. El ozono originado de la degradación fotoquímica de los óxidos de nitrógeno (NO_x), parece tener un efecto tóxico mayor que el SO_2 en las plantas (Arora et al., 2002). La fototoxicidad del ozono pudiera, debido al potencial oxidativo del mismo y la consecuente formación de radicales libres, inducir la producción en cadena de las ERO (Arora et al., 2002). A pesar de que la concentración de O_3 en los espacios aéreos de las hojas es casi nulo (Laisk, 1989), lo cual hace improbable que alcance los cloroplastos, es capaz

de provocar despigmentación y peroxidación lipídica (Heath, 1987). Ha sido demostrado que el O₃ disminuye la actividad y cantidad de la Rubisco, además de estimular la síntesis y degradación de proteínas del PSII-D1 (Arora et al., 2002).

El SO₂ por su parte provoca daños tisulares y libera etileno en los tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos (Peiser y Yang, 1985). La fumigación con SO₂ provoca cambios en el pH citoplasmático, lo que repercute en el metabolismo de la célula, ya que la concentración de protones en el citoplasma es uno de los factores más importantes que regula la actividad celular (Arora et al., 2002). Cuando las células son expuestas al SO₂, tiene lugar una apreciable acidificación del citoplasma, debido a que este gas reacciona con el H₂O formando ácido sulfuroso el cual puede ser convertido en ácido sulfúrico (Laisk, et al., 1988). La oxidación del sulfito es iniciado por la presencia de luz y es mediado por el transporte electrónico durante la fotosíntesis. Esto provoca una pérdida en la función fotosintética debido a una inhibición en la actividad de proteínas que contienen puentes disulfuros (Covello, et al., 1989).

3.4. Hipoxia

La ausencia de oxígeno o anoxia es un reto ambiental común que las plantas tienen que enfrentar durante toda su vida (Bokhina et al., 2002). La imbibición de las semillas, las lluvias torrenciales, las inundaciones durante la primavera, y el agua en forma de hielo durante el invierno, constituyen ejemplos de condiciones naturales que generan condiciones de hipoxia o anoxia en las raíces de las plantas (Bokhina et al., 2002).

Las concentraciones bajas de oxígeno puede ser también una condición natural para el habitat de numerosas plantas. Las especies que habitan en los humedales y las plantas acuáticas han desarrollado características estructurales y metabólicas adaptativas para combatir el déficit de oxígeno (Bokhina et al., 2002). Una disminución en la carga energética de adenilatos, la acidificación citoplasmática, la fermentación anaeróbica, la elevación en la concentración de Ca²⁺ citosólico, cambios en el estado redox y una disminución en la función selectiva de la membrana son las características fundamentales que derivan de la ausencia de oxígeno en el medio (Richard *et al.*, 1994, Ratcliffe, 1995, Crawford y Braendle, 1996, Drew, 1997, Vartapetian y Jackson, 1997, Tadege *et al.*, 1999).

Bajo condiciones naturales, el estrés por hipoxia incluye varios estados transitorios (hipoxia, anoxia y reoxigenación) caracterizados por diferentes concentraciones de O₂ en el medio. La excesiva generación de las ERO bajo condiciones de estrés oxidativo es una parte integral de muchas situaciones de estrés como en la hipoxia. Por ejemplo, la acumulación de H₂O₂ bajo condiciones de hipoxia ha sido demostrada en raíces y hojas de *Hordeum vulgare* (Kalashnikov et al., 1994) y en raíces de trigo (Biemelt et al., 2000). Mediante microscopía electrónica de transmisión se ha podido visualizar este compuesto en el apoplasto y en asociación con la membrana plasmática de cuatro especies de plantas (Bokhina et al., 2001).

En estos experimentos el H₂O₂ fue probablemente originado por vía enzimática considerando la baja concentración de oxígeno en el sistema y el efecto positivo de varios inhibidores de enzimas productoras de H₂O₂. También se tienen evidencias indirectas de la formación de las ERO como productos de la peroxidación lipídica en condiciones de baja concentración de O₂ (Hunter et al.,

1983, Crawford et al., 1994, Yan et al., 1996, Chirkova et al., 1998, Blokhina et al., 1999).

3.5. Herbicidas

Numerosos herbicidas generan especies activas del oxígeno ya sea por unión directa o por inhibición de rutas biosintéticas. Herbicidas como la bupiridinina y el paraquat generan radicales del oxígeno en presencia de luz, induciendo daños oxidativos en las plantas (Arora et al., 2002). La reducción del paraquat dicatiónico (por medio del PSI) provoca la formación de un radical monocatiónico, el cual reacciona con el oxígeno molecular para producir O_2^- con la subsecuente producción de otras especies tóxicas como el H_2O_2 y $OH\cdot$ (Elstner, et al., 1988).

Los éteres difenólicos, las imidas cíclicas y los derivados de lutidina actúan inhibiendo rutas biosintéticas que provocan la acumulación de intermediarios reactivos formadores de radicales (Arora et al., 2002). El modo de acción de estos herbicidas está basado en la capacidad de inducir la acumulación de tetrapirroles fotosintetizadores anormales, específicamente protoporfirinas (Matringe y Scalla, 1988).

Otros compuestos como el diurón bloquean la cadena transportadora de electrones fotosintética, incrementando la transferencia de la energía de excitación de la clorofila en estado de triplete hacia el O_2 . Otros herbicidas como el norflurazón inhiben la biosíntesis de pigmentos carotenoides lo cual elimina la formación de importantes disipadores de energía de la clorofila en su estado de triplete excitado y 1O_2 .

3.6. Metales

Los metales pesados constituyen componentes integrados de la biosfera que son liberados a través de diversas actividades antropogénicas como efluentes y desechos industriales y urbanos, desechos tóxicos, tratamiento de las plantas con aguas residuales, procesos agroquímicos, y operaciones de la industria minera; las cuales han afectado progresivamente los ecosistemas (Pinto et al., 2004).

La rápida industrialización como resultado del avance de la ciencia y la técnica, ha conllevado a la acumulación de contaminantes atmosféricos como SO_x , NO_x , CO_2 , metales iónicos, plásticos, pesticidas, desinfectantes, entre otros, lo que se ha convertido en un problema global (Choudhury y Pandal, 2004).

Entre los metales, el hierro, el molibdeno y el manganeso son importantes como micronutrientes, mientras que el zinc, el níquel, el cobre, el cobalto, y el cromo son elementos tóxicos que se encuentran en muy baja concentración en el suelo. Otros metales como: Ag, As, Hg, Cd, Pb and Sb no poseen función conocida como nutrientes y pueden ser más o menos tóxicos para las plantas y los microorganismos (Niess, 1999).

Los metales pesados son conocidos por causar daños oxidativos y bioquímicos en las células vegetales (Panda y Patra, 1997). La toxicidad por metales pesados en las plantas induce la acumulación de prolina y cambios en las actividades de numerosas enzimas (Schat et al., 1997, Panda et al., 2003). Por otra parte, los iones metálicos inducen alteraciones en la biosíntesis de la clorofila y en la actividad del transporte electrónico, así como en otras enzimas del proceso fotosintético. Estudios *in vitro* sobre la entrada de metales pesados a las plantas demuestran que los mismos interfieren en el crecimiento y el

metabolismo celular, debido a respuestas secundarias como el daño oxidativo (Choudhury y Pandal, 2004). De manera general, la desintegración de biomembranas por la peroxidación lipídica constituye un mecanismo de la respuesta inducida por estrés en los sistemas vivos, con la generación de las ERO como los radicales OH^- y O_2^- (Panda et al., 2003). Estas especies son mucho más activas en ambientes hidrofóbicos que en sistemas acuosos hidrofílicos (Choudhury y Pandal, 2004).

El plomo y el arsénico son dos metales pesados de gran toxicidad que pueden producir daños oxidativos en las plantas. La toxicidad por plomo en muchas especies ha estado relacionada con la inhibición del crecimiento, cambios en las actividades enzimáticas y la clorosis de las hojas (Johnson et al., 1977, Mishra, y Choudhuri, 1996, Verma y Dubey, 2003), la reducción en la actividad fotosintética y también inhibición en la elongación de las raíces (Lane y Martin, 1980, Azzaz et al., 1992). El plomo es considerado una de las principales fuentes de contaminación ambiental. Este metal además ha sido correlacionado con la inhibición de procesos metabólicos tales como la asimilación de nitrógeno, fotosíntesis, respiración, la toma de H_2O por la planta y la transcripción (Burzynski, 1988; Krupa, et al., 1993; Kurepa, et al., 1997; Boussama, et al., 1999).

El plomo causa de manera general dos tipos de procesos que afectan negativamente los sistemas biológicos. Primero, inactiva numerosas enzimas por unión a grupos SH (Rausser, 1995). Segundo, los iones Pb^{2+} , de manera similar a otros metales pesados, pueden intensificar los procesos de producción de las ERO que provocan el estrés oxidativo (Prasad, et al., 1999; Clijsters, et al., 1999; Cuypers, et al., 1999). Estos procesos, los cuales afectan el metabolismo y la estructura celular, están conectadas mutuamente estimulándose ambas vías, una a la otra, lo cual provoca una disminución en la eficiencia de las enzimas de oxidación-reducción o el sistema de transporte electrónico, acelerando la rápida producción de las ERO en las células (Stroinski y Kozłowska, 1997).

El plomo puede unirse a los ácidos nucleicos, causando la agregación y condensación de la cromatina, así como la estabilización de la doble hélice de ADN inhibiendo los procesos de replicación y transcripción (Kurepa, et al., 1997; Valle y Ulmer, 1972).

El plomo como otros metales pesados y factores abióticos como radiaciones electromagnéticas, salinidad, sequía, pueden causar el estrés oxidativo en plantas con el aumento en la producción de las ERO (Mañecka, 2001). En casos extremos, cuando los niveles de ERO exceden la capacidad de los mecanismos de defensa celulares, ocurren daños estructurales y funcionales que conllevan a la muerte celular (Raha y Robinson, 2000). Los sitios principales de producción de las ERO son los cloroplastos, peroxisomas y la mitocondria. Uno de los efectos más dañinos del estrés oxidativo en las mitocondrias, es la permeabilidad inespecífica de la membrana mitocondrial interna lo que provoca la formación de canales y la peroxidación de los lípidos de membrana (Pompella, et al., 1996). Como resultado la síntesis de ATP se afecta, mientras que aumenta el flujo de salida de iones, nucleótidos, glutatión y algunas proteínas mitocondriales afectando directamente procesos vitales en las células de las plantas (Inoue, et al., 1993).

Los radicales aniónicos superóxido producidos en los diferentes compartimentos de la planta son rápidamente convertidos en H_2O_2 en una

reacción catalizada por la SOD (Gupta, et al., 1999). Ha sido ampliamente estudiando la producción de radicales OH^\cdot a partir del $\text{O}_2^{\cdot-}$ con la participación de metales pesados de transición como el Cu y el Fe (reacción de Fenton).

El metal arsénico se encuentra presente principalmente en los suelos y en aguas subterráneas. Este metal puede inducir síntomas fitotóxicos pudiendo generar también elevadas concentraciones de las ERO. Otros metales como el cromo pueden inhibir la germinación de las semillas, el crecimiento, e inducir el daño oxidativo y otros trastornos bioquímicos (Panda y Patra, 1997).

La acumulación de metales fitotóxicos como el zinc, el cobre y el cadmio como resultado de la actividad industrial y agrícola provocan en las plantas la detención del crecimiento, la clorosis y necrosis (Pirson y Zimmermann, 1983).

El ion Cu^{2+} induce la peroxidación lipídica mediada por la luz, despigmentación y una reducción en los niveles endógenos de catalasa (Streb, et al., 1993). El ion Cu^{2+} también participa en la catálisis de la reacción de tipo Fenton produciendo radicales OH^\cdot (Eltner, et al., 1988).

El Cd es liberado al ambiente por sistemas de calentamiento, industrias que utilizan metales y tráfico urbano. Es ampliamente usado en electrochapado, pigmentos, estabilizadores plásticos y baterías níquel-cadmio.

El cadmio es reconocido como un significativo contaminante debido a su alta toxicidad y gran solubilidad en agua (Pinto et al., 2004). De hecho, los efectos tóxicos de este metal en la fisiología de las plantas han sido ampliamente documentados por varios autores (Das et al., 1997; Vassilev y Yordanov, 1997). El cadmio tiene su acción tóxica en diversos sitios de las células vegetales; éste puede alterar la estructura y actividad de las enzimas (Clijsters y Van Assche, 1990; Lagriffoul et al., 1998); puede provocar la ruptura de las membranas biológicas (Vangronsveld y Clijsters, 1994), peroxidación lipídica (Sandalo et al., 2001), etc.

Los metales pesados como el cadmio pueden inducir la deficiencia de nutrientes esenciales y disminuir la concentración de muchos macronutrientes a las plantas (Siedleska, 1995).

El impacto negativo del cadmio sobre el estado redox de las células ya ha sido estudiado y se explica por la elevada afinidad de los iones Cd a grupos SH de proteínas, lo cual puede afectar las propiedades funcionales de las mismas (Vangronsveld y Clijsters, 1994). Cuando las plantas no son capaces de mantener niveles bajos de iones Cd libres en el citosol, por medio de mecanismos eficientes de detoxificación, esto puede conllevar a afectaciones en la red de defensa metabólica y como consecuencia de esto aparece el daño oxidativo en importantes biomoléculas (Vassilev y Yordanov, 1997).

El hierro desempeña un papel importante en el balance de radicales libres en todos los organismos. En su forma libre participa en las reacciones de Fenton y cataliza la generación del radical hidroxilo y otras especies tóxicas del oxígeno (Arora et al., 2002). Por otra parte, es un constituyente de enzimas antioxidantes como la catalasa, ascorbato peroxidasa, guaiacol-peroxidasa y ferro-Superóxido dismutasa. Cuando las plantas son expuestas a diversos tipos de condiciones adversas como elevada intensidad de la luz, sequía y paraquat, el estrés oxidativo es generado primariamente debido a una disminución de las defensas antioxidantes pero también por un incremento en la producción de radicales libres mediado por el hierro catalítico (Arora et al., 2002).

El aluminio es el tercer elemento más abundante en la corteza terrestre (Panda et al., 2003). La toxicidad por aluminio es el factor primario que limita la

productividad de las cosechas en los suelos ácidos, los cuales comprenden vastas extensiones de tierra por todo el mundo, particularmente en las áreas tropicales y subtropicales (Foy et al., 1978, Foy et al., 1984). Por lo cual este metal constituye un importante factor limitante para la producción de alimentos en muchos países desarrollados. Cuando la acidez de los suelos se incrementa, las formas fitotóxicas del aluminio son liberadas al suelo a niveles que afectan el sistema radical de las plantas, el crecimiento y la producción de semillas (Panda et al., 2003).

Evidencias directas han demostrado que el ápice de las raíces son los sitios primarios donde se produce una inhibición del crecimiento de estos órganos. Este metal puede además interactuar con numerosas sustancias intra y extracelulares, con la pared celular, puede ocasionar la ruptura de las membranas biológicas y el sistema de transporte membranoso intracelular, e interactuar con constituyentes del simplasto como las calmodulinas etc. (Kochian, 1995).

El aluminio como otros muchos metales induce la peroxidación lipídica y daños oxidativos en varios sistemas de plantas y actúa como un catalizador en la producción de las ERO (Aust, 1989; Cakmak y Horst, 1991; Luna et al., 1994; Gallego et al., 1996, Weckx y Clijsters, 1997; Subrahmanyam, 1998; Dietz et al., 1999; Piexoto et al., 1999; Panda and Patra, 2000; Shah et al., 2001).

3.7. Factores bióticos

Entre los diversos factores estresantes que las plantas deben enfrentar durante todo su ciclo de vida, las infecciones por hongos patógenos, bacterias y virus, así como el ataque de un grupo numeroso de animales entre estos los herbívoros, están catalogados entre los peligros más importantes para las plantas (Wojtazsek, 1997).

El hongo *Cercospora* provoca una amplia destrucción de importantes cultivos como el maíz, el tabaco, el café, la soya y bananos (Arora et al., 2002). La cercosporina es un metabolito secundario perilenoquinónico de color rojo, producido por muchas especies de este género. Las toxinas naturales que provocan sensibilidad a la luz inducen daño oxidativo en presencia de luz y causan reacciones fitotóxicas. Entre estos compuestos el mejor caracterizado es la cercosporina (Daub y Ehrenshaft, 1993). Cuando este compuesto es activado por la luz reacciona con el oxígeno formando el radical $^1\text{O}_2$ (Daub y Hangartner, 1983). Este ion puede atravesar las membranas debido a los cambios en la composición de las mismas por la peroxidación (Daub, 1982). Los daños causados a las membranas por efecto de la cercosporina, provee de nutrientes a este hongo permitiendo su crecimiento y la esporulación en el hospedero (Arora et al., 2002).

Una vez que la planta detecta un microorganismo invasor, ésta puede inducir de forma coordinada varios mecanismos de defensa para restringir el crecimiento de patógeno y/o destruirlo (Dixon, et al., 1994, Benhamou, 1996). Las reacciones de defensa general, tales como el reforzamiento de la pared celular, la producción de fitoalexinas y la acumulación de proteínas antimicrobianas son empleadas en caso de daño por patógenos y las regulaciones temporales y espaciales son decisivas ya que confieren características a la planta de sensibilidad o resistencia ante el patógeno (Van de Rhee, 1994).

Las numerosas interacciones de incompatibilidad están frecuentemente asociadas con la muerte de un número pequeño de células en el sitio de infección, lo cual se conoce como respuesta hipersensible (Jones y Dangl, 1996; Hammond-Kosack y Jones, 1996; Dang et al., 1996).

Para que la planta inicie una respuesta de resistencia frente al organismo invasor, se requiere de la percepción del patógeno a través de señales moleculares, ya sean sintetizadas por el organismo invasor o liberadas de las paredes celulares de la planta. Estas moléculas que actúan como señales han sido denominadas en general como elicitores, pero sólo algunas de éstas han sido definidas a nivel molecular como oligosacáridos, glicoproteínas y glicopéptidos (Ebel y Cosio, 1994). Los elicitores pueden ser específicos para una parte en particular de la planta o ser moléculas muy generales como por ejemplo, componentes de la pared celular del microorganismo invasor (Ebel y Cosio, 1994).

Muchos de los aspectos de la respuesta temprana microorganismo-hospedero han sido revelados utilizando mezclas de moléculas elicitoras y elicitores purificados, para inducir reacciones de defensa en cultivos de células vegetales. Entre los eventos que suceden en las primeras etapas de la invasión se incluyen respuestas rápidas y transcientes que ocurren fundamentalmente en la superficie de la pared celular de la planta, las cuales se basan en la activación de componentes que ya existen en la misma, más que en la activación de la maquinaria biosintética a nivel intracelular. Entre las reacciones que fueron identificadas se destacan la liberación exacerbada de especies activas del oxígeno (Mehdy, 1994, Baker y Orlando, 1995, Low y Merida, 1996), cambios en el pH extracelular y en el potencial de membrana (Bolwell, et al., 1995), el flujo de iones (Hahlbrock, 1995), cambios en los patrones de fosforilación en las proteínas (Felix et al., 1991) y la inmovilización oxidativa de las proteínas de la pared celular de las plantas (Wojtaszek et al., 1995).

Se plantea en general que la producción elevada de las ERO en las plantas puede servir no sólo como agente protector frente al ataque del patógeno, sino también como señales de activación de reacciones posteriores de defensa que incluyen la respuesta de hipersensibilidad en las células afectadas (Tenhaken et al., 1995).

Las células de las plantas son capaces de producir especies activas del oxígeno, especialmente el H_2O_2 de manera constitutiva en cantidades significativas. Esta producción está asociada fundamentalmente a compartimentos extracelulares (matriz extracelular), y es regulada por factores del desarrollo como hormonas, la luz y cortes en la superficie del vegetal (Wojtaszek, 1997). El peróxido de hidrógeno es principalmente detectado en células que experimentan lignificación como las fibras floemáticas y elementos traqueales y en algunas células epidérmicas (Olson y Varner, 1993). Por otra parte, la producción intensiva del H_2O_2 puede ser observada en células dañadas o sometidas a estrés mecánico (Olson y Varner, 1993).

El primer reporte de la producción inmediata de las ERO en una interacción planta-patógeno, fue dado por Doke en 1983. Los experimentos realizados por este investigador mostraron una generación de radicales O_2^- en discos de tubérculos de *Solanum tuberosum* inoculados con *Phytophthora infestans* o componentes de la paredes de las hifas.

El estrés oxidativo es considerado uno de los eventos tempranos que ocurren luego de la elicitación. La generación exacerbada de las ERO ha sido

observada en plantas que han sido enfrentadas a hongos, bacterias y virus, así como en cultivos celulares tratados con preparaciones que contienen elicitores, patógenos o fragmentos de las paredes celulares de las plantas o en respuesta a estreses mecánicos (Wojtaszek, 1997). La mayoría de los datos parecen indicar que el H_2O_2 es el componente entre las ERO que se produce en mayor proporción, con la posible participación del $\cdot O_2^-$ (Wojtaszek, 1997); sin embargo, a veces se hace difícil afirmar este hecho debido a la estrecha relación que existe en la generación de ambas especies (Wojtaszek, 1997).

En estudios con suspensiones celulares de tomate (*Lycopersicon esculentum*) infectadas con *Cladosporium sp.* como sistema elicitor, se observó la producción tanto de H_2O_2 como de $\cdot O_2^-$ (Vera-Estrella, 1992), mientras que en hipocótilos de tomate sólo se detectó la presencia de $\cdot O_2^-$ (May, et al., 1996).

IV. Sistemas antioxidantes en las plantas

Las plantas poseen un sistema antioxidante eficiente que provee de protección a las mismas frente a los daños provocados por las especies reactivas del oxígeno. Estas defensas no están restringidas a compartimentos intracelulares, sino que también se localizan aunque de manera limitada, en el apoplasto.

4.1. Sistema antioxidante enzimático

Las enzimas antioxidantes constituyen un grupo de enzimas antiestrés que intervienen en la eliminación de las especies reactivas del oxígeno. Entre ellas se encuentran: Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POX), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (Asada, 1992, Scandalias, 1990). Otras enzimas de este grupo que desempeñan un papel importante en la detoxificación celular son: la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y la glutatión peroxidasa (GPX) (Arora et al., 2002).

4.1.1. Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa constituye una familia de metaloenzimas que cataliza la dismutación del radical superóxido a H_2O_2 y O_2 (Scandalios, 1993). Esta reacción es 10 000 veces más rápida que la dismutación espontánea del anión superóxido (Bowler et al., 1992).

Esta enzima elimina el $\cdot O_2^-$ y por tanto disminuye el riesgo de formación del radical hidroxilo vía reacción de Haber-Weiss. Han sido reportadas 3 isoenzimas nombradas Mn-SOD, Cu-Zn-SOD y Fe-SOD en varias especies. Aunque recientemente se descubrió en *Streptomyces* otro tipo de SOD con níquel en su centro activo (Kim et al., 1996).

La Mn-SOD se encuentra principalmente en mitocondria (Hernandez, et al., 1999) y peroxisomas (Sandalio, et al., 1987, Corpas, et al., 1998), aunque también ha sido localizada en forma soluble en la fracción citosólica (Hernández et al., 2000). Se ha encontrado además en organismos procariontas (Blokhina et al., 2002). La Cu-Zn-SOD ha sido localizada tanto en la fracción citosólica (Hernandez et al., 1999) como en cloroplastos, mitocondria y también en bacterias gram negativas (Blokhina, et al., 2002). De igual forma, la Fe-SOD aunque es detectada predominantemente en los cloroplastos (Gomez et al., 1999), ha sido reportada en el citosol (Becana et al., 1986), mitocondria (Salin, 1988) y peroxisomas (Droillard y Paulin, 1989), así como en organismos

procariotas (Blokhina et al., 2002). Estas isoenzimas se diferencian teniendo en cuenta la sensibilidad al H_2O_2 y al KCN (Bannister *et al.*, 1987). Todas las SOD son expresadas en el núcleo, y los genes que codifican para las mismas han mostrado sensibilidad a estreses ambientales, debido probablemente al incremento en las concentraciones de las ERO (Blokhina, et al., 2002).

4.1.2. El ácido ascórbico y la ascorbato peroxidasa

Un sistema eficiente en las plantas lo constituye el sistema ácido ascórbico y la enzima ascorbato peroxidasa. El ascorbato se encuentra presente en cloroplasto, citosol, vacuola y el espacio apoplástico de las células de las hojas en elevada concentración (Foyer et al., 1991). Este sistema antioxidante es quizá el más importante en las plantas, con la función fundamental de eliminar el H_2O_2 (Foyer, 1993). La oxidación del ascorbato se produce en dos etapas secuenciales, primariamente se produce el compuesto mono-dehidroascorbato, el cual si no es rápidamente vuelto a reducir a ascorbato, es transformado a ascorbato y dehidroascorbato (Figura 5).

La actividad ascorbato peroxidasa ha sido reportada principalmente en cloroplasto y citosol (Arora et al., 2002). Sin embargo, estudios recientes han demostrado la presencia de esta enzima en mitocondria (Gomez et al., 1999, Anderson, et al., 1995). En los cloroplastos, la SOD y la enzima ascorbato peroxidasa se presentan en forma soluble y unida a los tilacoides.

El superóxido generado en la superficie de la membrana es atrapado y convertido inmediatamente a H_2O_2 para ser posteriormente eliminado por la ascorbato peroxidasa unida a membrana (Neubauer et al., 1989, Nakano y Asada, 1980).

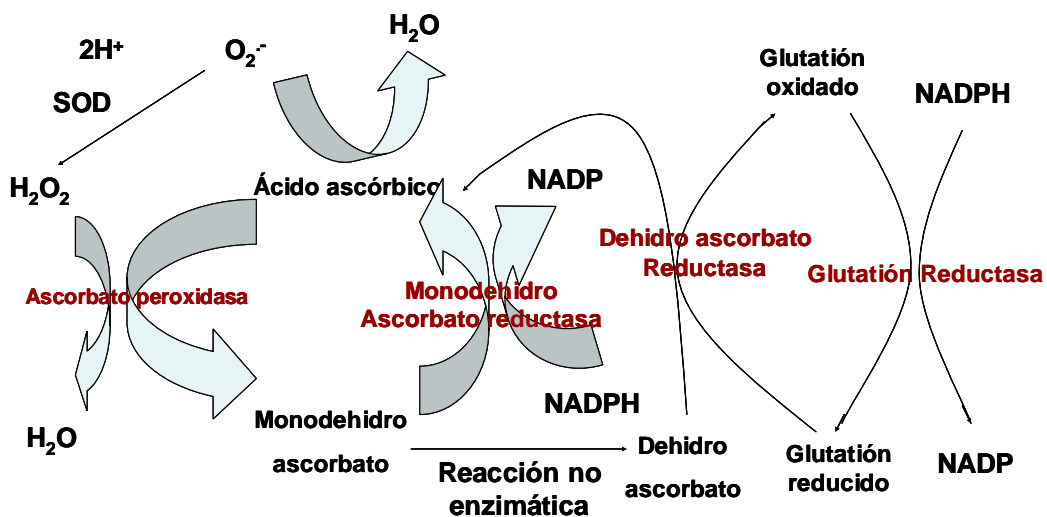
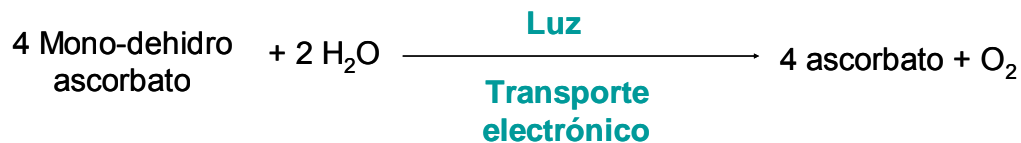


Figura 5. Ruta de Asada-Halliwel para la eliminación del H_2O_2 la regeneración del ácido ascórbico donde participan varias enzimas (Arora, 2002).

Estudios realizados con cloroplastos aislados, evidenciaron la metabolización rápida del H_2O_2 adicionado de manera exógena (Neubauer, et al., 1989, Nakano y Asada, 1980) demostrando que de manera *in situ*, los cloroplastos intactos pueden eliminar el H_2O_2 generado tanto interna como externamente.

Una vez que el ascorbato es oxidado, éste es nuevamente reducido, participando en este proceso dos enzimas, la mono-dehidroascorbato reductasa (E.C. 1.6.5.4), la cual utiliza NADP(H) directamente para reciclar el ascorbato y la dehidroascorbato reductasa. Por otra parte, el compuesto mono-dehidroascorbato es por sí mismo un eficiente aceptor de electrones (Foyer y Lelandais, 1993). Este compuesto es reducido a ascorbato utilizando electrones derivados de la cadena de transporte electrónico fotosintética según la reacción:



4.1.3. Glutación y glutatión reductasa

El glutatión actúa como un reductor para proteger los grupos tioles de enzimas, para regenerar el ascorbato y reacciona con el oxígeno singlete y radicales hidroxilos (Arora et al., 2002). En algunas plantas como las leguminosas el glutatión es parcial o totalmente reemplazado por el compuesto homoglutatión (glutamil cisteinil alanina) (Klapheck, 1988). Este actúa como una proteína reductora con puente disulfuro en su estructura, detoxificando herbicidas por conjugación, ya sea espontáneamente o por la actividad de una de las varias glutatión-S-transferasas que existen y regula la expresión de genes en respuesta a estreses ambientales y al ataque de patógenos (Anderson, et al., 1983). También participa en la regeneración del ascorbato a partir del compuesto dehidroascorbato por medio de la enzima dehidroascorbato reductasa (E.C. 7.8.5.1) (Arora et al., 2002). En esta reacción el glutatión (GSH) es oxidado a glutatión bisulfato (GSSG). El glutatión es regenerado por la enzima glutatión reductasa (GR) en una reacción dependiente de NADPH. Creissen et al., (1996) han reportado la presencia de esta última enzima en cloroplastos, mitocondria y la fracción citosólica (Hernandez et al., 2000).

4.1.4 Catalasa

La catalasa es una enzima que contiene hierro en su estructura y cataliza la dismutación del H₂O₂ en agua y oxígeno molecular (Arora et al., 2002). Esta enzima se encuentra en todos los organismos eucariota aeróbicos y constituye un mecanismo esencial para la eliminación del H₂O₂ generado en los peroxisomas por oxidasas que participan en la β-oxidación de ácidos grasos, la fotorespiración y el catabolismo de las purinas. La catalasa fue una de las primeras enzimas en ser aislada y obtenida con un alto grado de pureza. Todas las formas enzimáticas de la catalasa son tetraméricas con pesos moleculares de aproximadamente 220 KDa. Múltiples formas de la catalasa han sido descritas en numerosas plantas. Estas formas han sido clonadas de maíz (Redinbaugh et al., 1988; Sandalias, 1990) y genes homólogos que han sido clonados a partir de otro grupo de plantas. En maíz se encuentran tres isoformas denominadas CAT-1, CAT-2 y CAT-3, cuyos genes se encuentran localizados en diferentes cromosomas y son expresados y regulados de manera diferente e independiente (Scandalios, 1990).

CAT-1 y CAT-2 están localizados en peroxisomas y en el citosol, mientras que CAT-3 se encuentra en mitocondria. Estudios detallados de la estructura de la

catalasa extraída de hígado de ganado vacuno ha mostrado cuatro sitios de unión al NADPH por cada unidad tetramérica (Fita y Rossmann, 1985), pero estos sitios no están en estrecha asociación con el centro activo involucrado en la degradación del H_2O_2 ; sino que el NADPH funciona en la catalasa animal protegiendo a la enzima frente a la inactivación por H_2O_2 (Kirkman et al., 1987). Sin embargo, la catalasa extraída de plantas de *Solanum tuberosum* no contienen NADPH en su estructura (Beaumont et al., 1990).

4.2. Sistema antioxidante no enzimático

Las plantas producen cantidades considerables de compuestos de naturaleza no proteica que participan activamente en la eliminación de las ERO y ayudan a mantener el balance redox esencial para el buen funcionamiento del metabolismos celular. Entre estos antioxidantes se encuentra el glutatión, el ácido ascórbico, el tocoferol, entre otros, de los cuales se describen a continuación algunos aspectos importantes de la estructura y función de los mismos.

4.2.1. El glutatión (GSH)

El glutatión (γ -glutamilcisteinil glicina), es un compuesto abundante en los tejidos de las plantas. Se encuentra virtualmente en todos los compartimentos celulares: citosol, retículo endoplasmático, vacuola y mitocondria (Jimenez et al., 1998), donde el mismo desempeña múltiples funciones. El glutatión constituye el mayor reservorio de grupos SH en las células y actúa como un potencial detoxificador de formas xenobióticas a través de la conjugación GSH- y puede servir como un precursor de poliquelantes (Noctor et al., 1998, May et al., 1998).

El glutatión junto a su forma oxidada (GSSG) mantiene un balance redox en los compartimentos celulares. A este compuesto se le ha dado una última propiedad de gran importancia biológica, como agente antioxidante frente a diversos estreses, y provee la base para la señalización molecular del estrés. De hecho, la función del GSH en la regulación redox de la expresión de genes ha sido reportada en numerosos trabajos (Wingate et al., 1988, Alscher, 1989). Debido a las propiedades redox del par GSH/GSSG y los grupos reducidos del GSH, este puede participar en la regulación del ciclo celular (Sanchez-Fernandez et al., 1997).

La función del GSH como agente antioxidante bajo condiciones de estrés oxidativo ha recibido mucha atención durante la última década. Estudios de la estructura química de este compuesto ha revelado un núcleo central nucleofílico con un residuo de cisteína responsable del alto potencial reductivo de esta especie (Blokhina et al., 2002). Este compuesto elimina el H_2O_2 citosólico y reacciona por vía no enzimática con otras ERO como el oxígeno singlete, el radical superóxido y el radical hidroxilo (Larson, 1988). El papel esencial del GSH en la defensa antioxidante se debe a la capacidad que tiene este compuesto de regenerar otro poderoso antioxidante soluble en agua, el ácido ascórbico a través del ciclo ascorbato-glutatión (Foyer y Halliwell, 1976; Noctor y Foyer, 1998).

4.2.2. El ácido ascórbico

El ácido ascórbico es uno de los antioxidante no enzimáticos más poderosos y mejor estudiado (Smirnov, 1996; Noctor y Foyer, 1998, Arrigoni y de Tullio, 2000, Horemans *et al.*, 2000, Smirnov, 2000). Ha sido detectado en la mayoría de células vegetales, organelos y en el apoplasto (Blokina *et al.*, 2002). Bajo condiciones fisiológicas el ácido ascórbico se encuentra en su forma reducida (lo que representa 90% del ascorbato total) en hojas y cloroplastos (Smirnov, 2000). La concentración intracelular de este compuesto se encuentra en el rango de los milimoles (20 mM en el citosol, y entre 20 y 300 mM en el estroma del cloroplasto) (Foyer y Lelandais, 1996).

La capacidad de este compuesto para donar electrones en un amplio rango de reacciones enzimáticas y no enzimáticas convierte al ácido ascórbico en el principal compuesto detoxificador de las ERO en la fase acuosa (Blokina *et al.*, 2002). El ácido ascórbico puede directamente eliminar el radical superóxido, los radicales hidroxilos, el oxígeno singlete y reducir el H₂O₂ a H₂O mediante la reacción ascorbato peroxidasa (Noctor y Foyer, 1998).

En los cloroplastos, el ácido ascórbico actúa como un cofactor de la enzima violaxantina de-epoxidasa, contribuyendo así la disipación del exceso de la energía de excitación (Smirnov, 2000). El ácido ascórbico puede además regenerar el tocoferol a partir del radical tocoferoxil confiriendo por esta vía protección a las membranas biológicas (Thomas *et al.*, 1992).

Por otra parte este compuesto lleva a cabo otras funciones no oxidantes en la célula. Por ejemplo ha sido implicado en la regulación de la división celular y la progresión del ciclo celular de la Fase G1 a la S (Liso *et al.*, 1988, Smirnov, 1996) y en la elongación celular (De Tullio *et al.*, 1999).

4.2.3. El tocoferol

Los tocoferoles y los tocotrienoles son componentes esenciales de las membranas biológicas donde desempeñan funciones antioxidante y no antioxidante (Kagan, 1989). Existen cuatro isómeros del tocoferol y del tocotrienol (α -, β -, γ -, δ -), los cuales desde el punto de vista estructural consisten en un grupo cromático y una cadena lateral que confiere un carácter anfipático a estos compuestos (Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996).

La actividad antioxidante relativa de los isómeros del tocoferol *in vivo* es la siguiente: $\alpha > \beta > \gamma > \delta$, lo cual está relacionado con los patrones de metilación y la cantidad de grupos metilos unidos al anillo fenólico de la estructura polar de la molécula. El α -tocopherol con tres grupos metilos posee la mayor actividad antioxidante de todos los tocoferoles (Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996).

Aunque la actividad antioxidante de los tocotrienoles en relación con los tocoferoles ha sido menos estudiada, el α -tocotrienol ha demostrado tener una mayor actividad antioxidante que el α -tocopherol alrededor de las membranas (Packer *et al.*, 2001).

Los tocoferoles son sintetizados solamente en las plantas y las algas, y han sido localizados en todas las partes del vegetal (Janiszowska y Pennock, 1976). Las membranas de los cloroplastos en las plantas superiores contienen α -tocopherol como el isómero predominante de este grupo, el cual confiere protección frente a daños fotooxidativos (Fryer, 1992). También existe evidencia de que el compuesto α -tocopherol quinona, localizado exclusivamente en las membranas cloroplastídicas, posee propiedades antioxidantes similar al α -tocopherol (Kruk *et al.*, 1997).

La vitamina E es un compuesto antioxidante capaz de reparar radicales oxidados de forma directa, previniendo la reacción en cadena durante la autooxidación lipídica (Serbinova y Packer, 1994). También reacciona con radicales alcoxilos ($LO\cdot$), el radical lipídico peroxil ($LOO\cdot$) y con radicales alquilos ($L\cdot$), derivados de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996; Buettner, 1993).

La reacción entre la vitamina E (derivado del tocoferol) y los radicales lipídicos tiene lugar en la interfase agua-membrana donde la vitamina E dona un ion (hidrógeno) al radical lipídico con la consecuente generación de radical tocoferoxil ($TOH\cdot$) (Buettner, 1993). El radical $TOH\cdot$ vuelve a tomar su forma reducida por acción de la vitamina C (ascorbato), el glutatión reducido (Fryer, 1992) o la coenzima Q (Kagan *et al.*, 2000). Además, los tocoferoles actúan como eliminadores químicos de radicales del oxígeno, especialmente el oxígeno singlete (por la vía de la oxidación irreversible del tocoferol), y como un desactivador físico del oxígeno singlete por un mecanismo de transferencia de carga (Fryer, 1992).

Se ha sugerido que los tocoferoles pueden estabilizar estructuras de membranas (Bokhina, et al., 2002). Estudios en la década del 90 mostraron que el α -tocoferol puede modular la fluidez de la membrana de forma similar al colesterol y también la permeabilidad de la membrana a pequeños iones y moléculas (Fryer, 1992). Estudios recientes demostraron que el α -tocoferol puede disminuir la permeabilidad de vesículas de digalactosildiacil glicerol a glucosa y protones (Berglund *et al.*, 1999). También se ha demostrado que existe interacción entre el PS II con el α -tocoferol quinona y α -tocotrienol quinona (Kruk *et al.*, 2000). Por otra parte, los complejos formados entre el tocoferol con ácidos grasos libre y lisofosfolípidos protegen las estructuras de membranas contra efectos deletéreos (Bokhina, et al., 2002). Este hecho presenta una gran relevancia fisiológica, debido a que los productos de la hidrólisis de los fosfolípidos son característicos de eventos patológicos tales como la hipoxia, isquemia o daños por otros estreses (Kagan, 1989).

Existen por otro lado, otras funciones no antioxidantes del α -tocoferol tales como la inhibición de la proteína quinasa C y inhibición de la proliferación celular (Azzi and Stocker, 2000).

4.2.4. Los compuestos fenólicos como antioxidantes

Los fenoles están conformados por diversos metabolitos secundarios que incluyen flavonoides, taninos, ésteres hidroxicinamato y lignina, los cuales se encuentran de forma abundante en los tejidos de las plantas (Grace y Logan, 2000).

Los fenoles poseen una estructura química ideal para eliminar los radicales libres. Los fenoles han mostrado ser compuestos antioxidantes más efectivos que los tocoferoles y el ascorbato en condiciones *in vitro* (Bokhina, et al., 2002). Las propiedades antioxidantes de los fenoles vienen de sus elevadas reactividades como donores de hidrógeno o electrones, de la capacidad que tienen los radicales derivados de polifenoles para estabilizar y deslocalizar un electrón no apareado y de la capacidad que tienen los mismos para quelatar metales de transición (Rice-Evans *et al.*, 1997).

Otro mecanismo que propicia la actividad antioxidante de los fenoles es el hecho de que éstos puedan alterar la cinética de la reacción de peroxidación, por modificación en el empaquetamiento de los lípidos, disminuyendo consigo

la fluidez de las membranas (Arora *et al.*, 2000). Estos cambios pudieran por efecto estérico obstaculizar la difusión de los radicales libres y restringir la reacción de peroxidación (Bokhina, *et al.*, 2002). Además, los compuestos fenólicos pudieran estar relacionados con la cascada de eliminación del H₂O₂ en las células de las plantas según estudios realizados por Takahama y Oniki, 1997.

V. Respuesta antioxidante de las plantas frente a los estreses

Un mecanismo evolutivo desarrollado por las plantas para mantener niveles no tóxicos de las especies radicalias del oxígeno, en respuesta a incrementos por diferentes estreses ambientales, ha sido en general el aumento en la síntesis de compuestos proteicos y no proteicos con propiedades antioxidantes.

5.1 Respuesta antioxidante frente al estrés salino

Estudios realizados por El-baky *et al.* (2003) con cuatro variedades de *Allium cepa* L. reportaron incrementos en la peroxidación lipídica (medida por el incremento en el contenido de malonaldehído) en aquellas plantas sometidas a estrés salino. Los niveles de glutatión aumentaron a más del doble en todas las variedades bajo condiciones estresantes. Por otra parte, los niveles en las actividades enzimáticas de la guaiacol peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa encontradas en las plantas estresadas también aumentaron en relación al control.

Las actividades SOD, APX, CAT y GR también mostraron incrementos en plantas de trigo tolerantes a salinidad, en diferentes estudios realizados por Sairam, *et al.*, (1997, 1998, 2000, 2001).

Similares resultados se obtuvieron en evaluaciones realizadas en cotiledones de plántulas de soya (Chen *et al.*, 1997), en cítrico (Gueta-Dahan, *et al.*, 1997), en *Pisum sativum* (Gomez, *et al.*, 1999, Hernández *et al.*, 1999, Hernandez, *et al.*, 2000) y en la especie *Setaria italica* (Sreenivasulu, *et al.*, 2000).

Sairam y Srivastova, (2002) reportaron de manera comparativa elevadas actividades de cu-Zn-SOD, Fe-SOD, APX y GR en la fracción cloroplastídica y Mn-SOD en la fracción mitocondrial en genotipo tolerantes de trigo bajo condiciones salinas.

Por otra parte, estudios realizados por Hernandez *et al.*, (2000) con plantas tolerantes de *Pisum sativum* cv Granada reportaron un aumento en la expresión de ARNm y la actividad de enzimas Mn-SOD, APX y GR y monodehidroascorbato reductasa, mientras que la variedad Chillis sensible a elevadas concentraciones de sales no mostró cambios significativos en los niveles de expresión.

Plántulas de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 germinadas en concentraciones de NaCl entre 0 y 100 mM, mostraron también incrementos significativos en la actividad guaiacol peroxidasa a concentraciones superiores a 40 mM (Fuentes *et al.*, 2006).

5.2 Respuesta antioxidante frente al estrés por hipoxia

De manera general las plantas sometidas a condiciones de baja concentración de oxígeno, responden de manera similar como sucede frente a otros estreses para lograr un balance redox en las células. Las variaciones en la respuesta

antioxidante para este estrés, está en relación a la tolerancia que muestre la especie, así como el tiempo de exposición y el grado de privación de O₂.

En experimentos con plantas de trigo y raíces de arroz sometidas a la privación de O₂, la actividad SOD fue determinada inmediatamente culminado el tratamiento. Como un resultado de este experimento después de tres días de sometidas las plantas a anoxia, la actividad SOD aumentó en un 65% el valor mostrado por las raíces control. Sin embargo, en el arroz, una especie más tolerante a la privación del O₂, este estrés no afectó la actividad de esta enzima (Chirkova et al., 1998).

En cereales se ha encontrado una disminución de la actividad SOD en dependencia del período de duración del tratamiento por anoxia, mientras que en *Iris pseudacorus* se encontró un aumento en 14 veces durante el período de reoxigenación (Monk et al., 1989). Biemelt et al., (2000) reportaron un incremento en la actividad total de la SOD en raíces de trigo tratadas bajo anoxia, pero no se encontró aumento en dicha actividad en condiciones de hipoxia. Los valores de incremento en la actividad SOD están correlacionados positivamente con el período de tratamiento (Biemelt et al., 2000).

Por otra parte, Kalashnikov et al., 1994, reportaron la inducción de la actividad SOD en raíces y hojas de *Hordeum vulgare* bajo condiciones de hipoxia.

Otro sistema enzimático antioxidante estudiado bajo estas condiciones han sido las enzimas peroxidasa y catalasa. Bajo condiciones de anoxia los sistemas peroxidasa responden de manera diferente, hecho que ha sido observado en cotiledones y raíces de plántulas de arroz (Lee y Lin, 1995). Estos investigadores encontraron decrementos en la actividad guaiacol peroxidasa unida a pared celular, mientras que la peroxidasa soluble no resultó afectada en cotiledones. En contraste, las raíces crecidas en condiciones de anoxia mostraron incrementos en la peroxidasa unidas a la pared celular. La aclimatización a este estrés por la planta parece depender al menos parcialmente, de actividad peroxidasa, la cual es regulada por esta condición (Amor et al., 2000). En plántulas de arroz la actividad catalasa aumentó luego de una reoxigenación posterior a la privación de O₂ (Ushimaru et al., 1999).

5.3 Respuesta antioxidante frente a los metales

Las plantas que son expuestas a la acumulación de metales pesados producen numerosos tipos de metabolitos. El efecto estresante de los metales Cd, Cu, Ni y el Zn inducen la acumulación de metabolitos que contienen nitrógeno en su estructura, en especial, la prolina ha sido estudiada por varios autores, pero también otros aminoácidos y oligopéptidos, así como poliaminas y micotianamina. En general, las moléculas sintetizadas bajo estreses como metales pesados, salinidad, temperatura, etc. tiene funciones fundamentales: unirse a los metales, defensa antioxidante y como señalizadores del estrés. En este sentido existen fuertes evidencias en experimentos con algas y plantas transgénicas que correlacionan la prolina como una defensa antiestrés por la presencia de metales. La histidina es considerada un fitoquelante y el glutatión desempeña un papel importante por unirse a metales, mientras que las poliaminas cumplen funciones como señales moleculares y antioxidantes.

Estudios realizados por Panda y Khan, (2004) revelaron cambios significativos en la actividad SOD en *Hydrilla verticillata* L. bajo condiciones de estrés abiótico por metales pesados, como cromo, zinc, cobre y cadmio, temperatura, salinidad inducida por cloruro de sodio y el estrés hídrico inducido por PEG.

En estos estudios la actividad SOD aumentó de manera uniforme en las plantas tratadas con soluciones de Cd y Cu en la medida que aumentaban las concentraciones; sin embargo, en las plantas tratadas con Zn y Cr se observó un decrecimiento uniforme cuando las concentraciones de estos metales aumentaron en el medio, en comparación al control. La disminución en la actividad de esta enzima bajo el tratamiento con Cr y Zn pudiera estar asociado con la producción de las ERO que pueden provocar la inactivación de esta enzima (Gallego, et al., 1996).

Sin embargo, los tratamientos con Cu y Cd mostraron un aumento en la actividad SOD. Resultados similares fueron obtenidos por Chongpraditnum et al., (1992) los cuales reportaron una inducción en la actividad de la SOD citosólica de raíces de *Glycine soja* (soya), lo cual fue relacionado con un incremento en los niveles de radicales superóxido. Sin embargo, Gallego, et al., (1996) reportaron una disminución en la actividad SOD bajo tratamiento con Cd, mientras que Dixit, et al., (2001) encontraron aumentos en la actividad de esta enzima en hojas de *Pisum sativum*.

5.3.1 El plomo

Las plantas responden al estrés por la presencia de iones metálicos de diferentes formas; las cuales incluyen la exclusión, quelación, compartimentalización y la expresión de genes que codifican para proteínas antiestrés (Ma³ecka, 2001).

Un aumento en las concentraciones citosólicas de iones de metales pesados induce la síntesis de péptidos de baja masa molecular con alto contenido de grupos SH, denominados poliquelantes (Prasad, et al., 1999; Grill, et al., 1985; Zenk, 1996). La principal función de esas proteínas llamadas metalotioninas clase III, es mantener la homeostasis de los metales en las plantas, por ejemplo mantener las concentraciones de Cobre y Zinc a niveles óptimos, así como regular la concentración de otros metales como el Cd y Pb por debajo de niveles tóxicos (Rauser, 1995).

Los mecanismos moleculares de la toxicidad del Pb y el Cd han sido pobremente elucidados. La función protectora de la catalasa es limitada debido a su localización principalmente en los peroxisomas (Foyer, et al., 1994).

En plantas de *Pisum sativum* expuestas a 1 mM de Pb(NO₃)₂ durante varios días se observó un aumento significativo en los niveles del anión superóxido luego de 2 h de tratamiento, manteniéndose estos niveles hasta 48 h, disminuyendo posteriormente a este tiempo. Como respuesta a este estrés, la actividad SOD aumentó progresivamente en el tiempo hasta alcanzar valores de 3 veces la actividad en relación al control hasta las 24 h, dicha actividad se mantuvo hasta las 96 horas (Ma³ecka, 2001).

Por otra parte la actividad catalasa medida en este experimento mostró aumentos de 6 veces el valor del control hasta las 72 horas en las plantas tratadas, cayendo en las próximas 24 h a un 33 %.

Los efectos destructivos del Pb son visibles a nivel molecular, celular, así como en toda la planta (Przymusinski, et al., 1991; Wozny y Jerczynska, 1991).

Las raíces constituyen el órgano primariamente dañado debido a que el mismo es el que establece el primer contacto con el metal y además es donde es acumulado en porcentajes entre un 70 y un 95 % del mismo (Piechalak, et al., 2002).

Maacka, et al., 2001, encontraron el *P. sativum* sometido al efecto tóxico del Pb la presencia de gránulos densos y una reducción en el número de crestas mitocondriales en comparación con las plantas control. Similares granos han sido analizados mediante rayos X por Samardakiewicz (2000) determinándose que los mismos eran gránulos de sales de Pb; resultados similares fueron encontrados en raíces de maíz tratados con Pb^{2+} por (Bittel, et al., 1974).

El incremento en las concentraciones de radical superóxido probablemente intensifica la actividad del sistema antioxidativo. El incremento en las concentraciones de las ERO en otras plantas expuestas a metales pesados ha sido observada en tubérculos de *Solanum tuberosum* sometidos al efecto del Cd (Stroinski y Zielezinska, 1997), en raíces de plántulas de *Lupinus polyphyllus* tratadas con Cu^{2+} , Cd^{2+} o Pb^{2+} (Rucinska, 1997) y en *Brassica juncea* tratadas con iones Zn^{2+} (Prasad, et al., 1999).

Las raíces de *P. sativum* contienen cantidades endógenas de compuestos tales como cisteína, glutatión y homoglutatión los cuales tienen la capacidad de quelatar el Pb y a su vez constituyen antioxidantes de bajo peso molecular en las células vegetales (Noctor, et al., 1998).

Los niveles de compuestos como la cisteína y el glutatión son incrementados durante el período inicial de exposición frente al Pb; sin embargo, períodos largos de tratamiento con este metal disminuye significativamente los niveles de ambos antioxidantes. Este hecho, unido a los incrementos sostenidos de las ERO trae consigo condiciones de estrés oxidativo en las plantas (Maacka, 2001).

Los niveles de actividad enzimática dependen en general de la especie en cuestión y el tipo de metal (Maacka, 2001). En experimentos de exposición de plantas frente a diferentes metales pesados durante tiempos prolongados mostraron distintos comportamiento en la actividad SOD. En plantas tales como *Lupinus polyphyllus*, *Glycine max* L. y *Pisum sativum*, muchos autores han observado incrementos en la actividad de esta enzima luego de 48 h de tratamiento con Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} y Pb^{2+} (Przymusinski, et al., 1995; Rio, et al., 1985; Cakmak y Horst, 1991). Sin embargo, otros autores han observado decrementos en la actividad de esta enzima durante las primeras 10 horas de estrés, en tejidos de tubérculos de papa tratados con Cd^{2+} , seguido de un incremento en la actividad de la misma posterior a este tiempo (Stroinski y Kozłowska, 1997).

5.3.2 El aluminio

Estudios realizados por Panda et al., 2003 sobre el efecto fitotóxico del aluminio en *Vigna radiata* mostraron aumentos significativos en las concentraciones de peróxidos producidos por esta planta a 1 mM de $AlCl_3$, así como daños sustanciales en las membranas biológicas a igual concentración en comparación al control (0 mM).

Los niveles en la actividad enzimática de las enzimas superóxido dismutasa, peroxidasa y glutatión reductasa aumentaron progresivamente con el aumento de la concentración de este metal hasta 1 mM, mientras que la actividad catalasa decreció uniformemente con el aumento de la concentración. La disminución en la actividad de esta enzima fue observada también bajo el efecto estresante de otros metales como el cobre en hojas de frijol (Maksymiec and Baszynski, 1996), mercurio y cadmio en experimentos realizados con

Phaseolus aureus (Shaw and Rout, 1998), y por efecto del zinc en *Brassica juncea* (Prasad et al., 1999).

Los niveles de antioxidantes no proteicos como el ascorbato y el glutatión también disminuyeron con el incremento de este ión tóxico en el medio. Este hecho indica la capacidad detoxificante de estos antioxidantes no proteicos sobre los radicales libres del oxígeno (Rennenberg, 1982; Gallego et al., 1996).

5.3.3. El cadmio

El Cd, al igual que los demás metales pesados, induce estrés oxidativo por estar involucrado en diferentes tipos de mecanismos de generación de las ERO (Stohs y Bagchi, 1995; Gallego et al., 1996; Benavides et al., 2005, Gratao et al., 2005).

En estudios realizados por Balestrasse et al., 2001 en *Glycine max* L., quedó demostrado que el Cd disminuía el contenido de GSH, y disminuía o aumentaba las enzimas antioxidantes SOD, CAT, APOX, GR y DHAR, dependiendo de la concentración de Cd, el órgano usado y la edad de las plantas. También en trabajos con plantas de esta misma especie se encontró que el Cd afectaba el metabolismo del nitrógeno (Balestrasse et al. 2003, 2005) y que podía acelerar la senescencia en nódulos y raíces de soya, hecho que fue atribuido al estrés oxidativo generado por este ión metálico (Balestrasse et al., 2004).

Estudios de estrés oxidativo por acción del cadmio realizados en trigo y girasol, mostraron que las poliaminas desempeñaban un papel fundamental en la defensa antioxidante frente a este estrés en hojas de estas especies (Groppa et al., 2001, 2003). En otros experimentos realizados con hojas de girasol, se encontró un efecto protector por parte del óxido nítrico en estos órganos al ser sometidos a estrés oxidativo en presencia de este metal (Laspina et al., 2005).

VI. Conclusiones

La aparición del oxígeno en la atmósfera terrestre a partir de la actividad de microorganismos primitivos, no sólo permitió el desarrollo de nuevas formas de vida, sino que también impuso nuevos retos debido al carácter oxidante de este compuesto.

Como proceso adaptativo a estas nuevas condiciones, surgen mecanismos moleculares, celulares y fisiológicos que permitieron contrarrestar los efectos nocivos de las especies reactivas del oxígeno (superóxido, peróxido de hidrógeno, hidroxilo) que se generan de forma natural durante varios procesos celulares como la fotosíntesis, la fotorespiración, la respiración, etc., y por efecto de cambios estresantes en el medio ambiente.

La producción de compuestos antioxidantes enzimáticos como la SOD, catalasa, peroxidasas, glutatión reductasa, entre otras, y no proteicos como el tocoferol, el ácido ascórbico, compuestos aminados, etc., permiten a las plantas mantener un balance redox necesarios para el buen funcionamiento metabólico en las células.

VII. Recomendaciones

Los avances científico técnicos y la industrialización de la era moderna, han conllevado a cambios en las condiciones de vida de las plantas, por lo que

factores como la salinización de los suelos, los contaminantes atmosféricos, las fluctuaciones extremas de temperatura, le imponen condiciones estresantes a los organismos vivos, lo que obliga a continuar el estudio de sus mecanismos de defensa, así como la posibilidad de obtener especies mejor adaptadas.

Bibliografía:

- Alscher, R.G. 1989. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiologia Plantarum* 77: 457–464.
- Amor, Y., Chevion, M. & Levine, A. 2000. Anoxia pretreatment protects soybean cells against H₂O₂-induced cell death: possible involvement of peroxidases and of alternative oxidase. *FEBS Letters* 477: 175–180.
- Anderson, J.W., Foyer, C.H. & Walker, D.A. 1983. Light-dependent reduction of hydrogen peroxide by intact spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 724: 69-74.
- Anderson, M. D., Prasad, T. K. & Stewart, C. R., 1995. Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol RG - *Plant Physiol.* 1995 Dec; 109(4):1247–1257.
- Arora, A., Byrem, T.M., Nair, M.G. & Strasburg, G.M. 2000. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373: 102–109.
- Arora, A., Sairam, R.K. & Srisvastava, G.C. 2002. Oxidative stress and antioxidant system in plants. Review article. *Current Science*, 82, 1227-1238.
- Arrigoni, O. & De Tullio, M.C. 2000. The role of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions. *Journal of Plant Physiology* 157: 481–488.
- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85 : 235–241.
- Asada, K. & Badger, M.R. 1984. Chloroplasts: formation of active oxygen and its scavenging. *Methods Enzymol. Plant Cell Physiol.* 25:1169–1179.
- Asada, K., Kiso, K. & Yoshikawa, K. 1974. Univalent reduction of molecular oxygen by spinach. chloroplast. *J. Biol. Chem* 249: 2175.
- Aust, S., 1989. Metal ions, oxygen radicals and tissue damage. *Bibl. Nutr. Dieta.*, 43, 266–277.
- Badger, M. R. 1985. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 27–53.
- Badiani, M., G. Schenone, A.R. Paolacci & I. Fumagalli. 1993. Daily fluctuations of antioxidants in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves as affected by the presence of ambient air pollutants. *Plant Cell Physiol*, 34: 271-279.
- Baker, C.J. & Orlandi, E. W. 1995. Active oxygen species in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33: 299-321.
- Balestrasse, K.B. Gardey, L., Gallego, S.M. & Tomaro M.L. 2001. Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. *Aust. J. Plant Physiol.* 28:497-504.
- Balestrasse, K.B., Benavides, M.P., Gallego, S.M. & Tomaro M.L. 2003. Effect on cadmium stress on nitrogen metabolism in nodules and roots of soybean plants. *Func. Plant Biol.* 30:57-64.
- Balestrasse, K.B., Gallego, S.M. & Tomaro, M.L. 2004. Cadmium induced senescence in nodules of soybean (*Glycine max* L.) plants. *Plant Soil* 262:373-381.

- Balestrasse, K.B., Gallego, S.M., Benavides, M.P. & Tomaro, M.L. 2005. Polyamines and proline are affected by cadmium stress in nodules and roots of soybean. *Plant Soil*. 270: 343-353.
- Bannister, J.V., Bannister, W.H., Rotilio, G. 1987. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *Critical Reviews in Biochemistry* 22: 111–180.
- Battiste, J.L., Pestova, T.V., Hellen, C.U. & Wagner, G. 2000. The eIF1A solution structure reveals a large RNA-binding surface important for scanning function. *Mol. Cell*, 5: 109-119.
- Bazzaz, F. A., Rolfe, G. L. & Carlson, R. W. 1992. Effect of lead on photosynthesis and transpiration of excised leaves of corn and sunflower. *Physiol. Plant.*, 32, 373–377.
- Becana, M., Aparicio, T. P., Irigoyen, J. J. & Sanchez, D. M., *ibid*, 1986, 82, 1169–1171.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M. & Tomaro M.L. 2005. Cadmium toxicity in plants Braz. *J. Plant Physiol.* 17: 131-136.
- Benhamou, N. 1996. *Trends Plant Sci.* 1, 233±240.
- Berglund, A.H., Nilsson, R. & Liljenberg, C. 1999. Permeability of large unilamellar digalactosyldiacylglycerol vesicles for protons and glucose—influence of α -tocopherol, β -carotene, zeaxanthin and cholesterol. *Plant Physiology and Biochemistry* 37: 179–186.
- Biemelt, S., Keetman, U., Mock, H-P. & Grimm, B. 2000. Expression and activity of isoenzymes of superoxide dismutase in wheat roots in response to hypoxia and anoxia. *Plant Cell and Environment* 23: 135–144.
- Bittel, J.E., Koeppe, D.E. & Miller, R.J. 1974. Sorption of heavy metal cations by corn mitochondria and the effects on electron and energy transfer reactions. *Physiol. Plant.* 30, 226-230.
- Blokhina, O.B., Chirkova, T.V. & Fagerstedt, K.V. 2001. Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. *Journal of Experimental Botany* 52: 1–12.
- Blokhina, O.B., Fagerstedt, K.V. & Chirkova, T.V. 1999. Relationships between lipid peroxidation and anoxia tolerance in a range of species during post-anoxic reaeration. *Physiologia Plantarum* 105: 625–632.
- Blokhina, O., Virolainen, E. & Fagerstedt, K.V. 2002. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany* 91: 179-194.
- Bolwell, G.P., Butt, V.S., Davies, D.R. & Zimmerlin, A. 1995. The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radic Res.* 23: 517–532.
- Boussama, N., Ouariti, A., Suzuki, A. & Ghorbal, M.H. 1999. Cd-stress on nitrogen assimilation. *J. Plant Physiol.* 155, 310-317.
- Bowler, C., Montague, M.V. & Oxborough, K. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 83–116.
- Buettner, G.R. 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300: 535–543.
- Burzynski, M. 1988. The uptake and accumulation of phosphorus and nitrates and the activity of nitrate reductase in cucumber seedlings. *Acta Soc. Bot. Pol.* 57, 349-359.

- Cadenas, E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* 58, 79-110.
- Cakmak, I. & W. J. Horst., 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, Superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.*, 83, 463–468.
- Caplan, A., Claes, B., Dekeyser, R. & Van Montagu, M., in *The Impact of Biotechnology in Agriculture* (eds Sangwan, R. S. and Sangwan-Norreel, B. S.), Kluwer Academic, Dordrecht, 1990, vol. 8, pp. 391–402.
- Chen, Y. W., Shao, G. H. & Chang, R. Z. 1997. The effect of salt stress on superoxide dismutase in various organelles of cotyledons of soybean seedlings. *Acta Agron. Sin.* 23: 214–219.
- Chinnusamy, V. & Zhu, J.K. 2003. Plant salt tolerance. ISBN: 978-3-540-20037-6. Volume 4: 241-270.
- Chirkova, T.V., Novitskaya, L.O. & Blokhina, O.B. 1998. Lipid peroxidation and antioxidant systems under anoxia in plants differing in their tolerance to oxygen deficiency. *Russian Journal of Plant Physiology* 45: 55–62.
- Chongpraditnum, P., Mori, S. & Chino, M. 1992. Excess copper induce a cytosolic Cu, Zn superoxide dismutase in soybean root. *Plant Cell Physiol.* 33:239-244.
- Choudhury, S & Panda, S. K. 2004. Induction of oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. Under lead and arsenic phytotoxicity. *Current Science*. Vol. 87, No. 3. 342-348.
- Clijsters, A., Cuypers, A. & Vangronsveld, J. 1999. Physiological responses to heavy metals in higher plants. Defence against oxidative stress. *Z. Naturforsch.* 54c, 730-734.
- Clijsters, H. & Van Assche, F. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants, *Plant, Cell and Environ.* 13: 195-206.
- Coleman, S.T., Epping, E.A., Steggerda, S.M. & Moye-Rowley, W.S. 1999. Yap1p activates gene transcription in an oxidant-specific fashion. *Mol. Cell. Biol.* 19: 8302-8313.
- Corpas, F. J., Sandalio, L. M., del Rio, L. A. & Trelease, R. N., *New Phytol.*, 1998, 11138, 307–314.
- Covello, P. S., Chang, A., Dambroff, E. B. & Thompson, J. E. 1989. *Plant Physiol.*, 90, 1492–1497.
- Crawford, R.M.M, Walton, J.C. & Wollenweber-Ratzer, B. 1994. Similarities between post-ischaemic injury to animal tissues and post anoxic injury in plants. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 102B, 325–332.
- Crawford, R.M.M. & Braendle, R. 1996. Oxygen deprivation stress in a changing environment. *Journal of Experimental Botany* 47: 145–159.
- Creissen, G., Reynolds, H., Xue, Y. B. & Mullineaux, P. 1996. *Plant J.* 8: 167–175.
- Cuypers, A., Vangronsveld, J. & Clijsters, H. 1999. The chemical behaviour of heavy metals plays a prominent role in the induction of oxidative stress. *Free Radical Res.* 31, 539-543.
- Dangl, J. L., Dietrich, R. A. & Richberg, M. H. 1996. *Plant Cell* 8, 1793±1807.
- Das, P., Samantaray, S. & Rout G. R. 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ. Poll.* 98: (1) 29-36.
- Daub, M. E. & Hangartner, R. P. 1983. *Plant Physiol.* 73: 856–857.

- Daub, M. E., *ibid.* 1982, *Plant Physiol.* 69, 1361–1364.
- Daub, M.E. & Ehrenshaft, M. 1993. The photoactivated toxin cer-. cosporin as a tool in fungal photobiology. *Physiol Plant* 89:227±. 236.
- Davies, K.J.A. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I General aspects. *J. Biol. Chem.* 162:9895-9901.
- De Tullio, M.C., Paciolla, C., Dalla Vecchia, F., Rascio, N., D'Emérico, S., De Gara, L., Liso, R. & Arrigoni, O. 1999. Changes in onion root development induced by the inhibition of peptidyl-prolyl hydroxylase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. *Planta* 209: 424–434.
- Desikan, R., Cheung, M.K., Clarke, A., Golding, S. Sagi, M., Fluhr, R., Rock, C., Hancock, J. & Neill, S. 2004. Hydrogen peroxide is a common signal for darkness- and ABA-induced stomatal closure in *Pisum sativum*. *Funct. Plant Biol.* 31: 913-920.
- Desikan, R., Hancock, J.T. & Neill, S.J. 2003. Oxidative stress signaling. In H. Hirt and K. Shinozaki (eds.), *Plant responses to abiotic stress: topic in current genetics*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 121-148.
- Dietz, K. J., Bair, M. & Kramer, U. 1999. Free radical and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: *Heavy Metal Stress in Plants from Molecules to Ecosystems*, Eds. M.N.V. Prasad, J. Hagemeyer, Spinger-Verlag, Berlin, 73–79.
- Dixit, V., Pandey, V. & Shyam, R. 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *J. Exp. Bot.* 52:1101-1109.
- Dixon, R. A., Harrison, M. J. & Lamb, C. J. 1994. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 479±501.
- Dodge, A.D. 1971. Mode of action of the bipyridylum herbicides, paraquat and diquat. *Endeavour.* 30: 130-135.
- Doke, N.1983. *Physiol. Plant Pathol.* 23, 345±357.
- Drew, M.C. 1997. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 223–250.
- Droillard, M. J. & Paulin, A. 1989. Isozymes of Superoxide Dismutase in Mitochondria and Peroxisomes Isolated from Petals of Carnation. *Plant Physiol.* 89(3):728–731.
- Ebel, J. & Cosio, E.G. 1994. Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 148: 1-36.
- El-baky, A., Hanaa, H.; Amal, M.A. & Hussein, M.M. 2003. Influence of Salinity on Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzymes and Electrophoretic Patterns of Protein and Isoenzymes in Leaves of Some Onion Cultivars. *Asian Journal of Plant Sciences.* 2 (8): 633-638.
- Elstner, E.F. 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 33: 73-96.
- Elstner, E.F., Wagner, G.A. & Schutz, W. 1988. Activated oxygen in. green plants in relation to stress situations. *Curr. Topics. Plant Biochem. Physiol.* 7: 159-187, 1988.
- Felix, G., Grosskopf, D. G., Regenass, M. & Boller, T. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 8831±8834.

- Foy, C. D., 1984. Physiological effects of hydrogen, aluminum and manganese toxicities in acid soil. In: Soil Acidity and Limiting, Ed. F. Adams, Madison: *Am. Soc. Agron*, 57–97.
- Foy, C.D., Chaney R. L., & M. C. White, 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 29, 511–566.
- Foyer, C. H. & Lelandais, M. 1993. In: *Photosynthetic Responses to the Environment* (ed. Yamamoto, H. Y.), *Am. Soc. Plant Physiologists*, Rockville, MD, 8, 88–101.
- Foyer, C. H. 1993. In *Antioxidants in Higher Plants* (eds Alscher, R. G. and Hess, J. L.), CRC Press, Boca Raton, FL, , pp. 31–58.
- Foyer, C. H., Lelandais, M., Edwards, E. A. & Mullineaux, P. M., in *Active Oxygen, Oxidative Stress and Plant Metabolism: Current Topics in Plant Physiology* (eds Pell, E. and Steffen, K.), *Am. Soc. Plant Physiologists*, Rockville, MD, 1991, pp. 131–144.
- Foyer, C.H. & Halliwell, B. 1976. The presence of glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133:21–25.
- Foyer, C.H. & Lelandais, M.A. 1996. A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasmalemma membranes of pea leaves mesophyll cells. *Journal of Plant Physiology* 148: 391–398.
- Foyer, C.H., Descourvieres, P. & Kunert, K.J. 1994. Protection against oxygen radicals: An important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17, 507-523.
- Foyer, C.H. & Halliwell, B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21–25.
- Foyer, CH, Furbank, RT, Harbinson, J & Horton, P. 1990. The mechanisms contributing to photosynthetic control of electron transport by carbon assimilation in leaves. *Photosynth. Res.* 25: 83-100.
- Fryer, M.J. 1992. The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol). *Plant Cell and Environment* 15: 381–392.
- Fuentes, L., Sosa, M., & Pérez, Y. 2006. Aspectos fisiológicos & bioquímicos del estrés salino en plantas. CD-ROM. ISBN: 959 - 16 - 0490 - 4.
- Gallego, S. M., Benavides, M. P. & Tomaro, M. L. 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves, evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci.*, 121, 151–159.
- Gallego, S.M., Benavides, M.P. & Tomaro, M.L. 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci.* 121:151-159.
- Gallego, S.M., Benavides, M.P. & Tomaro, M.L. 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci.* 121:151-159.
- Gardner, P.R. & Fridovich, I. 1991. Superoxide sensitivity of *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *J. Biol. Chem.* 266:1478-1483.
- Gomez, J. M., Hernandez, J. A., Jimenez, A., del Rio, L. A. & Sevilla, F., Free. 1999, *Rad. Res. Suppl.*, 31, 11–18.
- Gomez, J. M., Hernandez, J. A., Jimenez, A., del Rio, L. A. & Sevilla, F. 1999. Differential response of antioxidative systems of chloroplasts and

- mitochondria to long term NaCl stress of pea plant. *Free Radical Res. (Suppl.)*, 31: 11–18.
- Gossett, D.R., S.W., Banks, E.P. Millhollon & C. Lucas. 1996. Antioxidant response to NaCl stress in a control and an NaCl-tolerant cotton cell line grown in the presence of paraquat, buthionine sulfoximine and exogenous glutathione. *Plant Physiol.*, 112: 803-809.
- Grace, S. & Logan, B.A. 2000. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 355: 1499–1510.
- Gratao, P.L., Polle, A. Lea, P.J. & Azevedo, R.A. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biol.* 32: 481-494.
- Green, F. A. 1966. To lipid metabolism - a fundamental feature in tummer - hostü relationship, *J. Theor. Biol.*, II, 213.
- Grill, E., Winnacker, E.L. & Zenk, M.H. 1985. Phytochelatins: The principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230, 674-676.
- Groppa, M.D., Benavides, M.P. & Tomaro, M.L. 2003. Polyamine metabolism in sunflower and wheat leaf discs under cadmium or copper stress. *Plant Sci.* 164:293-299.
- Groppa, M.D., Tomaro, M.L. & Benavides, M.P. 2001. Polyamines as protectors against cadmium or copperinduced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Sci.* 161:481-488.
- Gueta-Dahan, Y., Yaniv, Z., Zilinskas, B. A. & Ben-Hayyin, G. 1997. Salt and oxidative stress: Similar and specific response and their relation to salt tolerance in citrus. *Planta.* 203: 460–469.
- Gupta, M., Cuypers, A., Vangronsveld, J. & Clijsters, H. 1999. Copper affects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* 106, 262-267.
- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nuremberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W. R. & Schmelzer, E. 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 4150±4157
- Hamilton III, E.W., McNaughton, S.J. & Coleman, J.S. 2001. Soil Na stress: molecular, physiological and growth responses in Serengeti C4 grasses. *Am J Bot.*, 88: 1069–1076.
- Hamilton, E. W. & Heckathorn, S. A. 2001. Mitochondrial Adaptations to NaCl. Complex I Is Protected by Anti-Oxidants and Small Heat Shock Proteins, Whereas Complex II Is Protected by Proline and Betaine1. *Plant Physiology.* 2001, 126, 1266–1274.
- Hancock, J.T., Desikan, R. & Neill, S.J. 2001. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem. Soc. Trans.* 29: 345-350.
- Harbinson, J. & Hedley, C. L. 1993. Changes in P-700 Oxidation during the Early Stages of the Induction of Photosynthesis. *Plant Physiol.* 103: 649-660.
- Hare, P.D., Cress, W.A. & Van Staden, J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ* 21: 535–553.
- Hariyadi, P. & Parkin, K.L. 1993. Chilling-induced oxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. *Calypso*) seedlings. *J. Plant Physiol.* 141: 733-738.

- Heath, R.L. 1987. Biochemistry of ozone attack on the plasma membrane of plant cells. *Rec. Adv. in Phytochem.* 21: 29-54.
- Hernandez, J. A., Campillo, A., Jimenez, A., Alarcon, J. J. & Sevilla, F. 1999. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytol.* 141: 241– 251.
- Hernandez, J., Jimenez, A., Mullineaux, A., & Sevilla, P. F. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum*) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Biol.* 23: 853–862.
- Hernández, J.A., Jiménez, A., Mullineaux, P.M. & Sevilla, F. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ.* 23:853-862.
- Hernández, J. A., Campillo, A., Jiménez, A., Alarcón, J. J. & Sevilla, F. 1999. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New phytologist* . 141: 2, 241-251.
- Hernández, A.J., A.M. Ferrer, A. Jimenez, R.A. Barcel, and S. Francisca. 2001. Antioxidant system and O₂ /H₂O₂. Production in the apoplast of pea leaves. It relation with salt-induced necrotic lesions in minor viens. *Plant Physiol.*, 127: 817-831.
- Horemans, N., Foyer, C.H, Potters, G & Asard. H. 2000. Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 531–540.
- Hung, S.H., Yu, C.W & Lin, C.H. 2005. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46: 1-10.
- Hunter, M.I.S., Hetherington, A.M. & Crawford, R.M.M. 1983. Lipid peroxidation—a factor in anoxia intolerance in Iris species? *Phytochemistry* 22: 1145–1147.
- Imlay, J.A. & Linn, S. 1986. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240:1302-1309.
- Inoue, T., Yosida, Y., Nishimura, M., Kurosawa, K. & Tagawa, K. 1993. Ca²⁺-induced, phospholipase-independent injury during reoxygenation of anoxic mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1140, 313-320.
- Janiszowska, W. & Pennock, J.F. 1976. The biochemistry of vitamin E in plants. *Vitamins and Hormones* 34: 77–105.
- Jimenez, A., Hernandez, J.A., Pastori, G., del Rio, L.A. & Sevilla, F. 1998. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiology* 118: 1327–1335.
- Johnson, M. S., Mc Neily, T. & Putwain, P. O. 1977. Revegetation of metaliferous mine soil contaminated with lead and zinc. *Environ. Pollut.*, 12, 261–277.
- Jones, A.M & Dangl, J.L. 1996. Logjam at the styx: programmed cell death in plants. *Trends Plant Sci.* 1:114–119.
- Kagan, V.E. 1989. Tocopherol stabilizes membrane against phospholipase A, free fatty acids, and lysophospholipids. In: Diplock AT, Machlin J, Packer L, Pryor WA, eds. Vitamin E: biochemistry and health implications, Vol. 570. New York, NY: *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121–135.
- Kagan, V.E. 1989. Tocopherol stabilizes membrane against phospholipase A, free fatty acids, and lysophospholipids. In: Diplock AT, Machlin J, Packer L, Pryor WA, eds. Vitamin E: biochemistry and health

- implications, Vol. 570. New York, NY: *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121–135.
- Kagan, V.E. & Fabisiak, J.P. Quinn P.J. 2000. Coenzyme Q and vitamin E need each other as antioxidants. *Protoplasma* 214: 11–18.
- Kahane, J., Poljakoff-Mayber, 1968. Effect of substrate salinity on the ability for protein synthesis in pea roots, *Plant Physiol.*, 43, 7, 115-117,
- Kalashnikov, JuE., Balakhnina, T.I., Zakrzhevsky, D.A. 1994. Effect of soil hypoxia on activation of oxygen and the system of protection from oxidative destruction in roots and leaves of *Hordeum vulgare*. *Russian Journal of Plant Physiology* 41: 583–588.
- Kamal-Eldin, A, Appelqvist, L-Å. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31: 671–701.
- Kamal-Eldin, A, & Appelqvist L-Å. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31: 671–701.
- Kasumov, N. A., Abbasova, Z.I. & Gündüz, G. 1998. Effects of Salt Stress of the Respiratory Components of Some Plants. *Tr. J. of Botany* 22: 389-396.
- Kim, F.J., Kim, H.P., Hah, Y.C. & Roe, J.H. 1996. Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*. *European Journal of Biochemistry* 241: 178–185.
- Klapheck, S. 1988. Homoglutathione: isolation, quantification and occurrence in legumes. *Physiol Plant*.74:727–732.
- Knox, J.P. & Dodge, A. D.1985. *Phytochemistry*, 24, 889-896.
- Knox, J.P. & Dodge, A.D. 1985. Singlet oxygen and plants. REVIEW. *Phytochemistry* 24: 889-896 .
- Kochian, L. V., 1995. Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46, 237–260.
- Kovtun, Y., Chiu, W.-L. Tena, G. & Sheen, J. 2000. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 2940-2945.
- Kruk ,J. Jemiola-Rzeminska, M. & Strzalka, K. 1997. Plastoquinol and α -tocopherol quinol are more active than ubiquinol and α -tocopherol in inhibition of lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids* 87: 73–80.
- Krupa, Z., Quist, G. & Huner, N.P.A. 1993. The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* a fluorescence analysis. *Physiol. Plant*. 88, 626-630.
- Kurepa, J., Van Montagu, M. & Inze, D. 1997. Expression of sodCp and sodB genes in *Nicotiana tabacum*: Effects of light and copper excess. *J. Exp. Bot.* 48, 2007-2014.
- Lagriffoul, A., Mocquot, B., Mench M. & Vangronsveld J. 1998. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.), *Plant Soil* 200: 241-250.
- Laisk, A., Kull, O. & Moldau, H.1989. Ozone Concentration in Leaf Intercellular Air Spaces Is Close to Zero. *Plant Physiol.* 90: 1163-1167.
- Laisk, A., Pfan, H., Schramm, M.J. & Heber, U. 1988. Consequences of SO₂ uptake as revealed by computer-analysis." *Planta*. 173: 241 – 252.

- Lane, S. D. & Martin, E. S. 1980. Further observation on the distribution of lead in juvenile roots of *Raphanus sativus*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 97, 145–152.
- Larson, R.A. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27: 969–978.
- Laspina, N.V., Groppa, M.D., Tomaro, M.L. & Benavides, M.P. 2005. Nitric oxide protects sunflower leaves against cadmium-induced oxidative stress. *Plant Sci.* 169:323-330.
- Lee, T.M. & Lin, Y.N. 1995. Changes in soluble and cell wall-bound peroxidase activities with growth in anoxia-treated rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles and roots. *Plant Science* 106: 1–7.
- Liso, R., Innocenti, A.M., Bitonti, M.B. & Arrigoni, O. 1988. Ascorbic acid-induced progression of quiescent centre cells from G1 to S phase. *New Phytologist* 110: 469–471.
- Low, P.S. & Merida, J.R. 1996. The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiol Plant.* 96: 533–542.
- Luna, C. M., González, C. A., Trippi, V. S. 1994. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. *Plant Cell Physiol.*, 35, 11–15.
- Ma³ecka, A., Jarmuszkiewicz, W. & Tomaszewska, B. 2001. Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. *Acta Bioquimica Polonica*. Vol. 48, No. 3: 687–698.
- Maksymiec W. & Baszynski, T. 1996. Different susceptibility of runner bean plants to excess copper as a function of the growth system of primary leaves. *J. Plant Physiol.*, 149, 217–221.
- Matringe, M. & Scalla, R. 1988. Effects of acifluofen-methyl on cucumber cotyledons: porphyrin accumulation [J]. *Pestic Biochem Physiol.* 32(2):164-172.
- May, M. J., Hammond-Kosack, K. E. and Jones, J. D. G. (1996) *Plant Physiol.* 110, 1367±1379.
- May, M.J., 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.
- McNeil, S.D., Nuccio, M.L. & Hanson, A.D. 1999. Betaines and related osmoprotectants: targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol* 120: 945–949.
- Mehdy, M. C. 1994. Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiol.* 1994 105: 467-472.
- Mehlar, A. H., 1951. *Arch. Biochem. Biophys.*, 33, 65–77.
- Meinhard, M. & Grill, E. 2001. Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from Arabidopsis. *FEBS Lett.* 508: 443-446.
- Meinhard, M., Rodriguez, P.L. & Gill, E. 2002. The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links the abscisic acid response regulator to redox signaling. *Planta* 214: 775-782.
- Mishra, A. & Choudhuri, M. A. 1996. Possible implication of heavy metals (Pb⁺² and Hg⁺²) in free radical mediated membrane damage in two rice cultivars. *Indian J. Plant Physiol.* 1, 43–47.
- Monk, L.S., Fagerstedt ,K.V. & Crawford, R.M.M. 1989. Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiologia Plantarum* 76: 456–459.

- Monroy, A.F. & Dhindsa, R.S. 1995. Low temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25°C. *Plant Cell* 7: 321-331.
- Nakano, Y. & Asada, K. 1980. Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. *Plant Cell Physiol*, 21: 1295-1307.
- Nakano, Y. & Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22, 867-880.
- Navari-Izzo, F., Quartacci, M.F. & Sgherri, C.M.L. 1996. Superoxide generation in relation to dehydration and rehydration. *Biochem Soc Trans* 24: 447-451.
- Neill, S., Desikan, R. & Hancock, J. 2002. Hydrogen peroxide signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 388-395.
- Neubauer, C. & Schreiber, U., Z. & Naturforsch, C. 1989. Photochemical and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence induced by hydrogen peroxide. *Z Naturforsch* 44c : 262-270.
- Niess, D.H. 1999. Microbial heavy -metal resistance. *Applied Microbiol. Biotech.* 51:730-750.
- Noctor, G. & Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279.
- Noctor, G. & Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279.
- Noctor, G. & Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 49: 249-279.
- Noctor, G., Arisi, A.C.M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Rennenberg, H. & Foyer, C.H. 1998. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany* 49: 623-647.
- O'Kane, D., Gill, V. Boyd, P. & Burdon, R. 1996. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta*. 198: 371-377.
- Ohnishi, J., Flugge, U-I., Heldt, H.W. & Kanai, R. 1990. Involvement of Na⁺ in active uptake of pyruvate in mesophyll chloroplasts of some C4 plants: Na⁺/Pyruvate cotransport. *Plant Physiol* 94: 950-959.
- Okuda, T., Matsuda, Y., Yamanaka, A. & Sagisaka, S. 1991. Abrupt Increase in the Level of Hydrogen Peroxide in Leaves of Winter Wheat Is Caused by Cold Treatment. *Plant Physiol*. 97: 1256-1267.
- Oleinick, N.L., Chiu, S., Ramakrishnan N. & Xue, L. 1986. The formation, identification, and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Brit. J. Cancer* 55: Suppl. 8:135-140.
- Olson, P. D. and Varner, J. E. (1993) *Plant J.* 4, 887±892.
- Packer, L., Weber, S.U. & Rimbach, G. 2001. Molecular aspects of α -tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *Journal of Nutrition* 131: 369S-373S.
- Panda, S. K. & Patra, H. K. 2000. Does chromium(III) produce oxidative damage in excised wheat leaves? *J. Plant Biol.*, 27, 105-110.
- Panda, S. K. & Patra, S. K. 1997. Physiology of chromium toxicity in plants – a review. *Plant Physiol. Biochem.* 24 : 10-17.

Panda, S. K., Chaudhury, I. yKhan, M. H. 2003. Heavy metal induced lipid

- Przymusiński, R., Rucińska, R. & Gwozdz, E.A. 1995. The stress-stimulated 16 kDa polypeptide from lupin roots has properties of cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase. *Environ. Exp. Bot.* 35, 485-495.
- Przymusiński, R., Sychala, M. & Gwozdz, E.A. 1991. Inorganic lead changes growth and polypeptide pattern of lupin roots. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 187, 51-57.
- Raha, S. & Robinson, B.H. 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem. Sci.* 25, 502-508.
- Rao, G.N., Glasgow, W.C., Eling, T.E. & Runge, M.S. 1996. Role of hydroperoxyeicosatetraenoic acids in oxidative stress-induced activating protein 1 (AP-1) activity. *J. Biol. Chem.* 271: 27760-27764.
- Ratcliffe, R.G. 1995. Metabolic aspects of the anoxic response in plant tissue. In: Smirnoff N, ed. *Environment and plant metabolism: flexibility and acclimation*. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 111-127.
- Rausell, A., Kanhonou, R., Yenush, L., Serrano, R. & Ros, Roc. 2003. The translation initiation factor eIF1A is an important determinant in the tolerance to NaCl stress in yeast and plants. *The Plant Journal*. 34: 257-267.
- Rausser, W.R. 1995. Phytochelatins and related peptides, structure, biosynthesis and function. *Plant Physiol.* 109, 1141-1149.
- Rennenberg, H. 1982. Glutathione metabolism and possible role in higher plants. *Phytochemistry*, 21, 2771-2781.
- Richard, B., Couce, I., Raymond, P., Saglio, P.H., Saint-Ges, V. & Pradet, A. 1994. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. *Plant Physiology and Biochemistry* 32: 1-10.
- Rio, L.A. del, Sandalio, L.M., Yanez, J. & Gomez, M. 1985. Induction of a manganese-containing superoxide dismutase in leaves of *Pisum sativum* L. by high nutrient levels of zinc and manganese. *J.Inorg. Biochem.* 24, 25-34.
- Rucińska, R., Tukendorf, A., Stroinski, A. & Gwozdz, E.A. 1997. Phytochelatins and antioxidant enzymes in lupin roots exposed to heavy metals. *Biol. Bull.* 34, 50-51.
- Rudd, J.J. & Franklin-Tong, V.E. 1999. Calcium signaling in plants. *Cell Mol. Life. Sci.* 55: 214-232.
- Sairam, R. K. & Srivastava, G. C. 2002, Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long-term salt stress. *Plant Sci.* 162: 897-904.
- Sairam, R. K., Chandrasekhar, V. & Srivastava, G. C. 2001. Comparison of hexaploid and tetraploid wheat cultivars in their response to water stress. *Biol. Plant.* 44: 89-94.
- Sairam, R. K., Deshmukh, P. S. & Saxena, D. C. 1998. Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biol. Plant.* 41: 384-389.
- Sairam, R. K., Deshmukh, P. S. & Shukla, D. S. 1997. Tolerance to drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. *J. Agron. Crop Sci.* 178: 171-177.
- Sairam, R. K., Srivastava, G. C. & Saxena, D. C. 2000. Increased antioxidant activity under elevated temperature: a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. *Biol. Plant.* 43: 245-251.

- Salama, Z.A. & El-Fouly, M.M. 2001. Differential Responses of Two Tomato Cultivars (*Lycopersicon esculentum* L.) to NaCl Stress. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 4 (12): 1456-1459.
- Salin, M. L. 1988. Toxic oxygen species and protective systems. of the chloroplast. *Physiol. Plant*. 72: 681-689
- Samardakiewicz, S. 2000. Structural and functional effects of lead on plant roots. Ph.D.Dissertation, Adam Mickiewicz University in Poznan (in Polish).
- Sanchez-Fernandez, R., Fricker, M., Corben, L.B., White, N.S., Sheard, N., Leave, C.J., Van Montagu, M., Inze, D. & May, M.J. 1997. Cell proliferation and hair tip growth in the Arabidopsis root are under mechanistically different forms of redox control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94: 2745–50.
- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gomez M., Romero-Puertas M.C. & del Rio, L.A. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot*. 52: 2115-2126.
- Sandalio, L.M., Palmam J.M. & del Rio, L.A. 1987. Localization of manganese superoxide dismutase in peroxisomes isolated from *Pisum sativum* L. *Plant Science*. 51: 1-8.
- Sanders, D., Brownlee, C. & Harper, J.F. 1999. Communicating with calcium. *Plant Cell* 11: 691-706.
- Scandalias, J. G. 1990. Response of plant antioxidant defence genes to environmental stress. *Adv. Genet*. 28: 1–41.
- Scandalios, J. G.. 1993. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiol* 101: 7-12.
- Schat, H., Sharma, S. S. & Vooijs, R. 1997. Heavy metal induced accumulation of free proline in metal tolerant and non-tolerant ecotypes of *Silene vulgaris*. *Plant Physiol.*, , 101, 477–482.
- Schreck, R., Rieber, P. & Baeuerle, P.A. 1991. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J*. 10: 2247-2258.
- Serbinova, E.A. & Packer, L. 1994. Antioxidant properties of α -tocopherol and α -tocotrienol. *Methods in Enzymology* 234: 354–366.
- Shah, K., Kumar, R.Verma, S.G & Dubey, R. S. 2001. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Sci.*, 161, 1135–1144.
- Shalata, A. & Tal, M. 1998. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerative *Lycopersicon pennelli*. *Physiol. Plant*, 104: 169-174.
- Shaw, B. P. & Rout, N. P. 1998. Age dependent responses of *Phaseolus aureus* Roxb. to inorganic salts of mercury and cadmium. *Acta Physiol. Plant.*, 20, 85–90.
- Siedleska, A. 1995. Some aspects of interactions between heavy metals and plant mineral nutrients, *Acta Soc. Bot. Pol.* 64: (3) 265-272.
- Skoneczny, M. & Rytka, J. 2000. Oxygen and haem regulate the synthesis of peroxisomal proteins: catalase A, acyl-CoA oxidase and Pex 1p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; the regulation of these proteins by oxygen is not mediated by haem. *Biochemical Journal* 350: 313–319.

- Smirnoff, N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* 78: 661–669.
- Smirnoff, N. 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 229–235.
- Smirnoff, N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* 78: 661–669.
- Somashekaraiah, B.V., Padmaja, K. & Prasad, A.R.K. 1992. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*). Involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol. Plant.* 85, 85-89.
- Sreenivasulu, N., Grimm, B., Wobus, U. & Weschke, W. 2000. Differential response of antioxidant components to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). *Physiol. Plant.*, 109: 435–442.
- Stadtman, E.R. 1986. Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends Biochem. Sci.* 11:11-12.
- Stohs, S.J. & Bagchi, D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.* 18:321-336.
- Streb, P., Michael-Knauf, A. & Feierabend, J. 1993. Preferential photoinactivation of catalase and photoinhibition of photosystem II are common early symptoms under various osmotic and chemical stress conditions. *Physiol Plant* 88: 590-598.
- Stroinski, A. Kozłowska, M. 1997. Cadmium-induced oxidative stress in potato tuber. *Acta Soc.Bot. Pol.* 66, 189-195.
- Stroinski, A. & Kozłowska, M. 1997. Cadmium-induced oxidative stress in potato tuber. *Acta Soc. Bot. Pol.* 66, 189-195.
- Stroinski, A. & Zielezinska, M. 1997. Cadmium effect on hydrogen peroxide, glutathione and phytochelatin levels in potato tuber. *Acta Physiol. Plant.* 19, 127-136.
- Subrahmanyam, 1998. Effect of aluminium on growth, lipid peroxidation, superoxide dismutase and peroxidase activities in rice and French bean seedlings. *Indian J. Plant Physiol.*, 3, 240–242.
- Tadege, M., Dupuis I. & Kuhlemeier, C. 1999. Ethanol fermentation: new functions for an old pathway. *Trends in Plant Sciences* 4: 320–325.
- Takahama, U. & Oniki, T. 1997. A peroxide/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiologia Plantarum* 101: 845–852.
- Tappel, A. L. 1964. Free-radical lipid peroxidation damage and its inhibition by vitamin E and selenium, *Feeder Proc.*, 24.
- Tenhaken, R., Levine, A., Brisson, L. F., Dixon, R. A. & Lamb, C. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 4158±4163.
- Thomas, C.E., McLean, L.R., Parker, R.A. & Ohlweiler, D.F. 1992. Ascorbate and phenolic antioxidant interactions in prevention of liposomal oxidation. *Lipids* 27: 543–550.
- Torres, M. & Forman, H.J. 2003. Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors.* 17: 287-296.
- Udovenko, G. V. 1972. Possible inhibition of protein synthesis on plants under salination, 2nd All-Union Biochem. Congr., Tashkent, 28-29, (in Russian).

- Ushimaru, T., Kanematsu, S., Shibasaka, M. & Tsuji, H. 1999. Effect of hypoxia on the antioxidative enzymes in aerobically grown rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum* 107: 181–187.
- Valle, B.L. & Ulmer, D.D. 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Annu. Rev. Biochem.* 41, 91-129.
- Van de Rhee, M. D., Linthorst, H. J. M. & Bol, J. F. 1994. in Stress-Induced Gene Expression in Plants (Basra, A. S., ed.), pp. 249±284, Harwood Academic Publishers, Lausanne, New York, Philadelphia and Reading
- Vangronsveld, J. & Clijsters, H. 1994. Toxic effects of metals, In: Plants and the chemical elements. Biochemistry, uptake, tolerance and toxicity (Ed., Farago M.E.). VCH Publishers, Weinheim, Germany. 150-177.
- Vartapetian, B.B. & Jackson, M.B. 1997. Plant adaptations to anaerobic stress. *Annals of Botany* 79 (Suppl. A): 3–20.
- Vassilev, A. & Yordanov I. 1997. Reductive analysis of factors limiting growth of Cd-exposed plants: a review, *Bulg. J. Plant Physiol.* 23: 114-133.
- Vassilev, A., Berova, M., Stoeva N. & Zlatev, Z. 2005. Chronic Cd toxicity of bean plants can be partially reduced by supply of ammonium sulphate. *Journal of Central European Agriculture.* Vol 6. No 3: 389-395.
- Vera-Estrella, R., Blumwald, E. & Higgins, V. J. (1992) *Plant Physiol.* 99,
- Verma, S. & Dubey, R. S. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci.*, 164, 645–655.
- Vicedo, A., Vicedo, Y. 2000. Relaciones entre estrés oxidativo con el catabolismo de proteínas. *Rev. Cubana Invest Biomed.* 19: 206–12.
- Vierling, E. 1991. The role of heat shock proteins in plants. *Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 579–620.
- Waters, E.R., Lee, G.J. & Vierling, E. 1996. Evolution, structure and function of the small heat-shock proteins in plants. *J. Exp Bot* 47: 325–338.
- Weckx, J. E. & Clijsters, J., H. M. M. 1997. Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol. Biochem.*, 35, 405–410.
- Wills, E.O. 1966. Mechanism of Lipid peroxide formation in animal tissues, *Biochem. J.*, 99, 667.
- Wingate, V.P.M., Lawton, M.A. & Lamb, C.J. 1988. Glutathione causes a massive and selective induction of plant defence genes. *Plant Physiology* 87: 206–210.
- Wise, R.R. & Taylor, A.W. 1987. Chilling-Enhanced Photooxidation: Evidence for the Role of Singlet Oxygen and Superoxide in the Breakdown of Pigments and Endogenous Antioxidants. *Plant Physiology* 83:278-282.
- Wojtaszek, P. 1997. Oxidative burst : an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322, 681±692.
- Wojtaszek, P., Trethowan, J. & Bolwell, G. P. 1995. *Plant Mol. Biol.* 28, 1075±1087
- Woolhouse, H. W., in Encyclopedia of Plant Physiology (eds Pirson, A. & Zimmermann, M. H.), Springer-Verlag, Berlin, 1983, vol. 12C, pp. 245–300.
- Wozny, A. & Jerczynska, E. 1991. The effect of lead on early stages of *Phaseolus vulgaris* L. growth in in vitro conditions. *Biol. Plant.* 33, 32-39.

- Xiong, L. & Zhu, J.K. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment*. 25:131–139.
- Yan, B., Dai, Q., Liu, X., Huang, S. & Wang, Z. 1996. Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. *Plant and Soil* 179: 261–268.
- Yang, T. & Poovaiah, B.W. 2002. Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/ calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 4097-4102.
- Zelitch, I. 1990. In *Perspectives in Biochemical and Genetic Regulation of Photosynthesis* (ed. Zelitch, I.), Liss, Inc., New York, 1990, pp 239-252.
- Zelitch, I. 1992. Control of Plant Productivity by Regulation of Photorespiration. *BioScience*, Vol. 42, No. 7, pp. 510-516.
- Zenk, M.H. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants a review. *Gene* 179, 21-30.
- Zhang, J. & Kirkham, M.B. 1996. Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedling as affected by ascorbic acid, benzoic acid and propyl gallate. *J. Plant Physiol.*, 149: 489-493.
- Zhu, J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 53: 247-273.
- Zhu, J-K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* 6:66-71.
- Zwerger, K. & Hirt, H. 2001. Recent advances in plant MAP kinase signalling. *Biol Chem.* 382: 1123-1131.