

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL

EFFECTOS DEL OZONO TROPOSFÉRICO SOBRE EL  
CULTIVO DE PATATA EN CARCAIXENT (VALENCIA)

M<sup>a</sup> AMPARO ASENSI FABADO

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 20 de  
Decembre de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Carlos José Gómez García
- D. Manuel Agustí Fonfría
- D<sup>a</sup>. Esperanza Calvo Roselló
- D. José Reig Armiñana
- D. Pedro M. Carrasco Sorlí

Va ser dirigida per:  
D. Secundino del Valle Tascón

©Copyright: Servei de Publicacions  
M<sup>a</sup> Amparo Asensi Fabado

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7074-2

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115



 **Facultat de Ciències Biològiques**  
Departament de Biologia Vegetal

EFFECTOS DEL OZONO TROPOSFÉRICO  
SOBRE EL CULTIVO DE PATATA EN CARCAIXENT (VALENCIA)

Memoria presentada por M<sup>a</sup> Amparo Asensi Fabado  
para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas

Dirigida por el Dr. D. Secundino del Valle Tascón

Valencia, 2007





*A Óscar*

*Als meus pares i germans*



## AGRAÏMENTS

Esta tesi la dedique a Ana i Juan Antonio, els meus pares. Últimament hem viscut moments molt durs i ells han sigut per a mi tot un exemple de fortalesa, d'amor i bon humor. Gràcies per recolzar-me sempre, sou meravellosos.

I a Óscar. Podria plenar pàgines amb tot el que has fet per mi. Esta tesi es tan teua com meua, perquè no l'hagués acabat mai de no ser pel teu amor, paciència, comprensió i sentit comú. Gràcies per creure en mi més que jo mateixa.

Gràcies als meus germans, Ana i Juan Antonio, a Tami, Manoli i als nanos que estan a punt d'arribar, perquè sou part de mi i m'heu cuidat molt sempre.

Al meu director, Secundino del Valle, li agraixc els seus consells i ajuda. Són moltes les persones, família, amics, companys de departament i professors, que, durant aquest llarg camí no exent d'obstacles, m'han ajudat d'una manera o altra a superar-los, amb les seues paraules, implicació personal, fent-me somriure o fins i tot obrint-me les portes del seu laboratori. Cada vegada que ho pense, m'en surten més i més noms, així que no en diré cap, perquè no seria just oblidar-me d'algú. Tots els qui m'heu ajudat ho sabeu, perquè vos he dit gràcies més d'una vegada.

I gràcies a Evo, la perla de la casa, que ha estat literalment al meu costat durant l'escriptura de la tesi, i m'ha tret a passejar abans de que la pantalla de l'ordinador m'absorbira. Quina sort haver-te trobat!





# ÍNDICE

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>1</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>3</b>
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>5</b>
1. La contaminación por ozono.....	7
2. Formación del ozono.....	8
3. Absorción del ozono por las plantas.....	9
4. Efectos del ozono en las plantas.....	9
4.1- Estrés oxidativo.....	9
4.2- Síntomas visibles.....	12
4.3- Procesos fotosintéticos.....	13
4.4- Rendimiento agrícola.....	13
5. El ozono en la legislación.....	14
6. Superación de los niveles legales de ozono.....	15
7. El cultivo de la patata.....	16
<b>Capítulo 2. Materiales y métodos generales: Cultivo de las plantas en cámaras abiertas.....</b>	<b>17</b>
1. Introducción.....	19
2. Lugar experimental.....	19
3. Material vegetal y metodología de cultivo.....	19
4. Las cámaras abiertas.....	20
4.1.- Estructura de las cámaras abiertas.....	21
4.2.- Tratamientos.....	21
4.3.- Medida de contaminantes y variables climáticas.....	22
5. Procesado de los datos.....	24
6. Cálculo de AOT y nivel crítico para los cultivos.....	24
7. Condiciones meteorológicas y niveles de contaminantes durante los experimentos en cámaras abiertas.....	25
<b>Capítulo 3. Efecto del ozono sobre el rendimiento agrícola de la patata y aplicación de protectores químicos en condiciones de campo.....</b>	<b>33</b>
Resumen.....	35
Introducción.....	36

Materiales y Métodos.....	39
1. Lugar experimental.....	39
2. Cultivo de las plantas en cámaras abiertas.....	39
3. Cultivo de las plantas en campo y tratamientos con protectores químicos.....	39
4. Contaminantes atmosféricos y variables meteorológicas.....	40
5. Rendimiento agrícola.....	40
6. Parámetros bioquímicos.....	40
6.1- Actividad GPOD.....	41
6.2- Actividad GR.....	41
6.3- Clorofilas a y b.....	41
7. Análisis estadístico.....	42
Resultados.....	43
1. Datos ambientales.....	43
2. Concentración de clorofilas.....	45
3. Actividades enzimáticas.....	46
4. Rendimiento agrícola.....	48
4.1- Rendimiento agrícola en cámaras abiertas.....	48
4.2- Rendimiento agrícola en campo.....	50
Discusión.....	52
Conclusiones.....	57
<b>Capítulo 4. Efecto del ozono sobre el glutatión.....</b>	<b>59</b>
Resumen.....	61
Introducción.....	62
Materiales y métodos.....	65
1. Material vegetal.....	65
2. Determinación del contenido en glutatión por HPLC.....	65
3. Cuantificación de la expresión génica de la enzima $\gamma$ -GCS.....	66
4. Medida de la actividad enzimática glutatión reductasa.....	67
5. Análisis estadístico.....	67
Resultados.....	68
1. Niveles de glutatión.....	68
2. Expresión génica de la enzima $\gamma$ -GCS.....	69
3. Actividad enzimática glutatión reductasa.....	69

Discusión.....	70
Conclusiones.....	74

## **Capítulo 5. Detección de radicales libres mediante espectroscopía ESR en plantas**

<b>tratadas con ozono.....</b>	<b>75</b>
Resumen.....	77
Introducción.....	78
Materiales y métodos.....	80
1. Material vegetal.....	80
2. Preparación de las muestras para espectroscopía ESR.....	80
3. Espectroscopía ESR.....	80
4. Análisis de imagen.....	81
5. Análisis estadístico.....	82
Resultados.....	83
1. Exposición a ozono y daño visible.....	83
2. Señales paramagnéticas en banda X y banda Q: comparación.....	84
3. Daño visible y señal ESR.....	86
Discusión.....	90
Conclusiones.....	94

## **Capítulo 6. Alteraciones en la anatomía foliar y detección histoquímica de ROS en plantas**

<b>tratadas con ozono.....</b>	<b>95</b>
Resumen.....	97
Introducción.....	98
Materiales y métodos.....	100
1. Material vegetal.....	100
2. Métodos microscópicos.....	100
2.1- Análisis de la anatomía foliar y del contenido en almidón.....	100
2.2- Detección histoquímica de radicales superóxido.....	101
2.3- Localización subcelular de peróxido de hidrógeno.....	102
Resultados.....	105
1. Anatomía foliar.....	105
1.1- Efecto de la edad.....	105
1.2- Efecto del ozono.....	105
2. Contenido en almidón.....	107

3. Formación de radicales superóxido.....	120
4. Ultraestructura celular y localización subcelular de peróxido de hidrógeno.....	128
Discusión.....	134
Conclusiones.....	139
<b>Conclusiones finales.....</b>	<b>141</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>143</b>
Anexo 1. Protocolo para la determinación del contenido en glutatión por HPLC.....	145
Anexo 2. Protocolo para la cuantificación de la expresión génica de la enzima $\gamma$ -GCS.....	149
<b>Bibliografía.....</b>	<b>157</b>



## ABREVIATURAS

ACS: Senescencia celular acelerada (Accelerated cell senescence)

AOT40: Exposición acumulada sobre un umbral de 40 ppb de ozono (Accumulated exposure Over a Threshold of 40 ppb)

BPDS: Ácido batofenantrolinodisulfónico

cDNA: DNA copia

CET: Hora de Europa Central (Central European time)

CHES: Ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfónico

Chl: Clorofila

cv: Cultivar o variedad

DPA: Difenilamina

DPI: Cloruro de difenilen iodonio

DTPA: Ácido dietilen triaminopentaacético

$\epsilon$ : Coeficiente de extinción molar

EDU: Etilendiurea

EEA: Agencia Europea de Medio Ambiente (European Environment Agency)

EPA: Agencia de Protección Ambiental (Environmental Protection Agency)

ESR: Resonancia de spin electrónico

$\gamma$ -GCS:  $\gamma$ -Glutamylcistein sintetasa

GPOD: Guaiacol peroxidasa

GR: Glutación reductasa

GSTs: Glutación S-transferasas

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazín-etanosulfónico

HR: Respuesta hipersensitiva (Hypersensitive response)

MDHAR: Monodehidroascorbato reductasa

MOPS: Ácido (3-morfolino)propanosulfónico

mRNA: RNA mensajero

NBT: Azul de nitrotetrazolio

NEM: N-etilmaleimida

NOX: NAD(P)H-oxidasas

OTC: Cámaras de techo abierto (Open-top chambers)

PCA: Ácido perclórico

PSII: Fotosistema II

PVPP: Polivinil polipirrolidona

ROS: Especies reactivas del oxígeno (Reactive oxygen species)

UNECE: Comisión Económica para Europa de las Naciones Unidas

UTC: Tiempo universal coordinado

v: Versión (de un programa informático)

WHO: Organización Mundial de la Salud (World Health Organization)

## OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis doctoral es el estudio de los efectos de una exposición a ozono durante todo el período de cultivo en las plantas de patata variedad Agria. Los objetivos concretos son:

1. Análisis de los efectos del ozono sobre el rendimiento agrícola de la patata y sobre algunos indicadores fisiológicos como la concentración de clorofilas y la actividad enzimática antioxidante guaiacol peroxidasa.
2. Aplicación de difenilamina y citrulina en condiciones de campo y valoración de sus efectos protectores frente a los daños causados por el ozono ambiental en el cultivo.
3. Estudio del efecto del ozono sobre la concentración y biosíntesis de glutatión y consecuencias sobre su capacidad amortiguadora del estrés oxidativo.
4. Detección directa de radicales libres y estudio de la relación entre los radicales libres y los síntomas visibles inducidos por ozono
5. Estudio microscópico de las alteraciones anatómicas y celulares, y sobre el contenido en almidón, causadas por el ozono en las hojas. Detección histoquímica de las especies reactivas del oxígeno radical superóxido y peróxido de hidrógeno formadas por la exposición a ozono.



- CAPÍTULO 1 -

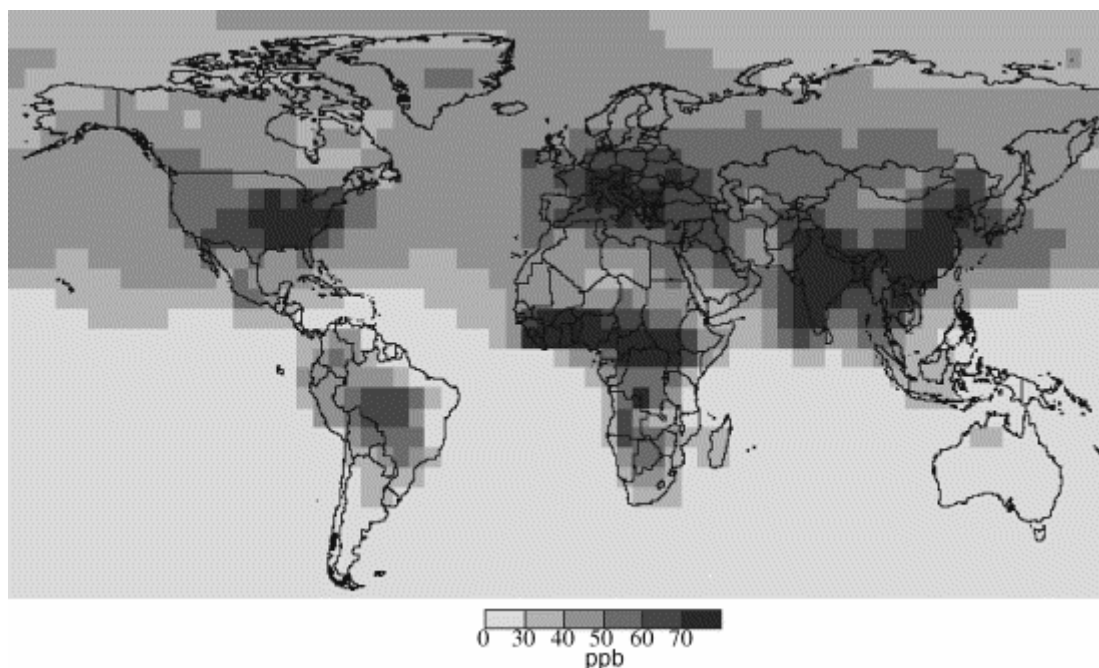
INTRODUCCIÓN



## 1. La contaminación por ozono

La capa de ozono ( $O_3$ ) situada en la estratosfera protege a los seres vivos de la radiación ultravioleta. En cambio, el  $O_3$  presente en la troposfera (capa más baja de la atmósfera en contacto con la superficie terrestre) está considerado como el contaminante atmosférico más fitotóxico conocido, debido a su capacidad oxidante. El  $O_3$  troposférico está presente en altas concentraciones en el hemisferio norte, incluida Europa, y causa más daños a cultivos y bosques que cualquier otro contaminante atmosférico conocido (Bowler *et al.*, 1992; Heath, 1994a). El  $O_3$  también afecta negativamente al sistema respiratorio de los animales, entre ellos los humanos (US EPA, 1998). Además, el  $O_3$  es el tercer gas invernadero más importante, por detrás del  $CO_2$  y el  $CH_4$ .

Las concentraciones de ozono ambiental se han duplicado desde la época pre-industrial, y en los últimos 30 años han aumentado a una tasa anual de 0.5-2% en las latitudes medias del hemisferio norte (Vingarzan, 2004). La contaminación por ozono es un problema global, ya que se ha demostrado que existe un transporte intercontinental de ozono (Derwent *et al.*, 2004). La concentración media global de ozono ambiental fue aproximadamente 50 ppb en el año 2000 (Fiscus *et al.*, 2005), y las predicciones más pesimistas sugieren futuros aumentos de hasta 80 ppb para el año 2100 (Prather *et al.*, 2001; Vingarzan, 2004). En la figura 1 se representan las concentraciones de ozono a escala mundial para el año 2030 calculadas mediante el modelo STOCHEM (Collins *et al.*, 2000).

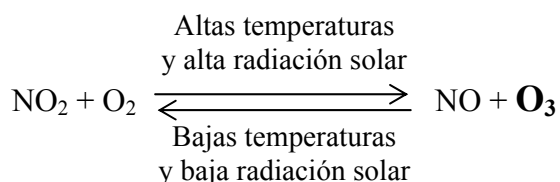


**Figura 1.** Concentraciones medias de ozono para el año 2030. Datos producidos por el modelo global de ozono STOCHEM (Collins *et al.*, 2000).

## 2. Formación del ozono

El ozono troposférico es un contaminante secundario que se produce principalmente por las reacciones fotoquímicas entre óxidos de nitrógeno, hidrocarburos volátiles (VOCs) y oxígeno (Seinfeld, 1989). Las mayores fuentes de contaminantes primarios son antropogénicas: los óxidos de nitrógeno se generan por la quema de combustible (vehículos motorizados, procesos industriales) y los VOCs son emitidos por vehículos, evaporación de disolventes y otros compuestos orgánicos.

Las reacciones de síntesis del ozono en el medio ambiente son muy complejas y dependen de un modo importante de las condiciones climáticas, como la temperatura e irradiancia (Sillman, 1999). El siguiente esquema es una simplificación de los procesos de formación y destrucción del ozono:



En la reacción anterior se observa que, en la presencia de concentraciones importantes de dióxido de nitrógeno en la atmósfera, junto con radiación solar y temperatura elevadas, facilita la formación de ozono. En presencia de concentraciones importantes de monóxido de nitrógeno, la concentración de ozono disminuye.

Esto explica el perfil diario típico del ozono en una zona urbana, que presenta un máximo centrado en las horas del mediodía y disminuye durante la noche. Las mayores concentraciones de NO<sub>2</sub> se observan durante las horas de tráfico más intenso, que suelen ser las primeras horas de la mañana y al final de la tarde (Finlayson-Pitts y Pitts, 1986). Los niveles de NO suelen ser bajos, excepto en episodios de carácter local o en zonas de tráfico intenso.

La contaminación atmosférica se origina fundamentalmente en zonas urbanas e industriales, pero los procesos de transporte de la atmósfera pueden dar lugar a un aumento de la concentración de los contaminantes en zonas alejadas de las áreas de inmisión o formación. Por este motivo, en una zona rural el perfil diario de ozono puede ser muy distinto al perfil típico de las zonas urbanas (Böhm *et al.*, 1991). Los perfiles de ozono observados tienen además un carácter claramente estacional, permaneciendo en niveles más altos en los meses de verano, cuando las altas temperaturas e irradiancia solar favorecen su formación. Las concentraciones de ozono troposférico dependen, además de la hora del día y de la estación, de la localización geográfica y de las



condiciones meteorológicas (US EPA, 1986). Por lo tanto, la relación exacta entre los niveles de sus precursores y las concentraciones de ozono es altamente compleja y su estudio se realiza mediante redes neuronales (Pastor-Bárceñas *et al.*, 2005).

Las condiciones geográficas y meteorológicas de la cuenca mediterránea favorecen una intensa actividad fotoquímica y la producción masiva de ozono (Millán *et al.*, 2000).

En la Comunidad Valenciana existe una red de estaciones de vigilancia medioambiental. Se trata de dispositivos automáticos pertenecientes a la Conselleria de Medio Ambiente ubicados en diversos puntos de la Comunidad, en los que se miden las concentraciones de contaminantes atmosféricos como el SO<sub>2</sub>, NO, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> y partículas en suspensión, así como diferentes variables meteorológicas, como la temperatura, humedad relativa, intensidad de la radiación solar y velocidad y dirección del viento. Se puede encontrar información sobre dicha red de estaciones en la página web [www.cma.gva.es/cidam/emedio/atmosfera](http://www.cma.gva.es/cidam/emedio/atmosfera). Además, se puede encontrar información sobre las concentraciones de ozono en la Comunidad Valenciana en <http://www.gva.es/ceam>.

### **3. Absorción del ozono por las plantas**

La principal vía de entrada del ozono en las plantas son los estomas abiertos (Runeckles, 1992). Por lo tanto, el número de estomas y el grado de apertura estomática son parámetros relevantes en relación a la dosis de ozono que penetra en la planta. Los factores que regulan la apertura estomática como el gradiente de CO<sub>2</sub>, humedad, luz, temperatura y velocidad del viento, controlarán la entrada del ozono en la planta. Se ha observado que la conductancia estomática suele disminuir tras la exposición al ozono (Mansfield y Pearson, 1996). Por otra parte, las concentraciones más altas de ozono tienen lugar en primavera y verano, cuando la resistencia estomática es alta y limita la entrada del ozono en las hojas. La regulación de la apertura estomática es muy compleja y una de las claves para estudiar la fitotoxicidad del ozono es conocer cuál es el flujo de este contaminante hacia el interior de las hojas.

### **4. Efectos del ozono en las plantas**

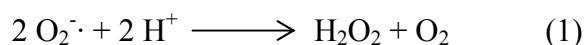
#### **4.1- Estrés oxidativo**

En el interior de la hoja, el ozono genera varias especies reactivas del oxígeno (ROS), tales como radical superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno y oxígeno singlete (Mudd, 1982; Malhotra y Khan, 1984; Heath, 1994b; Kanofsky y Sima, 1995; Mudd, 1996; Langebartels *et al.*, 2002a). Si los sistemas de detoxificación del apoplasto son insuficientes, los ROS generados a partir

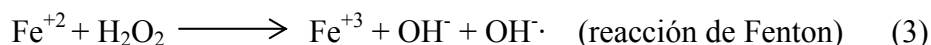
del ozono pueden penetrar en las células del mesofilo y reaccionar con las membranas y otros componentes celulares como las proteínas, causando cambios en la permeabilidad y fluidez de las membranas, daños a enzimas y un desequilibrio iónico y metabólico (Heath y Taylor, 1997). Este conjunto de daños se denomina estrés oxidativo.

El radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) es un oxidante muy potente y es una de las especies más reactivas que se conocen. Este radical es el responsable de una gran parte de la fitotoxicidad del ozono debido a que reacciona rápidamente con todo tipo de macromoléculas biológicas (Lamb y Dixon, 1997). El  $\text{OH}\cdot$  puede iniciar la peroxidación de lípidos a partir de la sustracción de un átomo de hidrógeno a los ácidos grasos insaturados; esto da lugar a una reacción en cadena que pasa por la formación de radicales peroxilo y finalmente conduce a la formación de hidroperóxidos lipídicos (LOOH); los dobles enlaces conjugados de los LOOH disminuyen la fluidez de las membranas (Schraudner *et al.*, 1997). El  $\text{OH}\cdot$  también puede modificar las proteínas haciéndolas más susceptibles al ataque de endopeptidasas específicas (Casano *et al.*, 1994) y dañar el ADN (Lamb y Dixon, 1997).

El radical superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) también puede iniciar la peroxidación de lípidos (Kangasjärvi *et al.*, 2005). El  $\text{O}_2\cdot^-$  sufre una dismutación espontánea que da lugar a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (reacción 1); la dismutación del  $\text{O}_2\cdot^-$  también la catalizan las enzimas superóxido dismutasas (SOD). Aunque la dismutación espontánea del superóxido a pH fisiológico es significativa (Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999), la velocidad de la reacción catalizada por las SOD es  $10^{10}$  veces mayor (Lamb y Dixon, 1997).



El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) es relativamente estable y menos reactivo que el  $\text{OH}\cdot$  y el  $\text{O}_2\cdot^-$ . El  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede inactivar enzimas que contienen grupos tiol, como enzimas modulados por tiorredoxina (por ejemplo fosfatasa del ciclo de Calvin) en el estroma del cloroplasto (Hagar *et al.*, 1996). Aunque el  $\text{O}_2\cdot^-$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  pueden causar daños en los componentes celulares directamente, su principal toxicidad reside en su conversión a  $\text{OH}\cdot$  en presencia de metales de transición por medio del ciclo de Haber-Weiss (reacciones 2 y 3):



El estrés oxidativo es una consecuencia inevitable de la vida aerobia, ya que las especies activadas de oxígeno se forman siempre que el oxígeno molecular oxida a transportadores de electrones (Asada, 1994). Es decir, durante el metabolismo normal de las células vegetales tiene lugar la formación de ROS y, en consecuencia, las células vegetales poseen sistemas antioxidantes para protegerse del daño causado por el estrés oxidativo.

Para limitar el daño a la membrana plasmática y componentes celulares, el O<sub>3</sub> y sus ROS derivados deben ser eliminados en el espacio apoplástico. El ácido ascórbico (AA) es el antioxidante más abundante en el apoplasto (Horemans *et al.*, 2000). El AA elimina radicales libres por medio de la donación de un electrón (Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999). También está implicado en la desactivación enzimática de los peróxidos generados en la descomposición del O<sub>3</sub> (Castillo y Greepin, 1988). Se ha encontrado una relación positiva entre los niveles de AA foliar y la resistencia al O<sub>3</sub> (Lee *et al.*, 1984), e hipersensibilidad a este contaminante del mutante de *Arabidopsis thaliana* deficiente en la biosíntesis de AA (Conklin *et al.*, 1997). Por todo esto se cree que el ascorbato tiene una función fundamental como primera línea de defensa frente al O<sub>3</sub>.

El glutatión (GSH) es otro importante antioxidante que se encuentra en el interior de las células (Noctor y Foyer, 1998). El GSH puede eliminar directamente radicales libres (Kalyanaraman *et al.*, 1996) o actuar como sustrato de las glutatión peroxidasas (GPX) y las glutatión S-transferasas (GSTs) para la detoxificación del peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos lipídicos (Ursini *et al.*, 1995).

El ascorbato y el glutatión también participan en la detoxificación del peróxido de hidrógeno a través del ciclo del ascorbato-glutatión, también conocido como ciclo de Halliwell-Asada (Halliwell y Gutteridge, 1989; Asada 1994); en este ciclo intervienen enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, monodehidroascorbato reductasa, dehidroascorbato reductasa y glutatión reductasa (el ciclo se describe con detalle en el Capítulo 4). La existencia del ciclo del ascorbato-glutatión en casi todos los compartimentos celulares (citosol, cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y apoplasto) pone de manifiesto su importancia en el control de las especies reactivas del oxígeno.

La enzima catalasa elimina el peróxido de hidrógeno formado en los peroxisomas y glioxisomas de manera muy eficiente (Willekens *et al.*, 1997). Se cree que la catalasa participa de manera significativa en la defensa frente al estrés por O<sub>3</sub> (Del Rio *et al.*, 2002). En chopos sometidos a una fumigación crónica con O<sub>3</sub> se encontró un aumento de la expresión génica para la catalasa en clones tolerantes al O<sub>3</sub>; este aumento no se observó en clones sensibles (Oksanen *et al.*, 2003).

Otras moléculas antioxidantes son la ergotioneína (una betaína natural), que elimina el peroxinitrito y el oxígeno singlete, y moléculas hidrofóbicas como el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y los carotenoides, que se encuentran en membranas y lipoproteínas. El  $\alpha$ -tocoferol es el eliminador más eficiente de los radicales peroxilo lipídicos formados en las membranas, interrumpiendo así la cadena de peroxidación de lípidos. Los carotenoides contienen muchos dobles enlaces conjugados; entre ellos se encuentran el licopeno,  $\beta$ -caroteno y xantofilas. La principal característica antioxidante de los carotenoides es que eliminan el oxígeno singlete (Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999).

Se ha demostrado que muchos compuestos fenólicos son antioxidantes más efectivos que el AA y el  $\alpha$ -tocoferol *in vitro* (Rice-Evans *et al.*, 1997). Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios, caracterizados por tener al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Entre los compuestos fenólicos se encuentran los ácidos hidroxicinámicos y los flavonoides, derivados de los anteriores. Los ácidos hidroxicinámicos son precursores de la biosíntesis de lignina en la pared celular. Se ha encontrado acumulación de sustancias fenólicas en las vacuolas de diferentes especies vegetales como respuesta al  $O_3$  (Vollenweider *et al.*, 2003; Reig-Armiñana *et al.*, 2004; Günthardt-Goerg y Vollenweider, 2007).

En conclusión, la capacidad oxidativa de los productos derivados del  $O_3$  dependerá del estado de los sistemas antioxidantes de la planta.

#### **4.2- Síntomas visibles**

El efecto más evidente del  $O_3$  en las plantas son los síntomas visibles en la superficie de las hojas. Los síntomas visibles de los daños producidos por  $O_3$  incluyen clorosis, un moteado de tono rojo, marrón o bronce y necrosis uni- o bifacial (Kley *et al.*, 1999). Las coníferas muestran necrosis en el extremo de las acículas. Los síntomas suelen aparecer en primer lugar en las hojas más viejas de la planta y ocupar los espacios entre las nervaduras (Bortier *et al.*, 2000; Calvo, 2003). Los síntomas visibles no son un marcador fiable del estrés por  $O_3$ : se ha observado disminución en la fotosíntesis sin que las hojas manifestaran síntomas visibles (Soja y Soja, 1995); se ha encontrado una disminución significativa del rendimiento agrícola en plantas que no muestran síntomas visibles (Davison y Barnes, 1998); tampoco se ha encontrado una correlación entre los daños visibles y la disminución del rendimiento en trigo (Decoteau *et al.*, 1986) ni en espinacas (Heagle *et al.*, 1979).

Se ha descrito la presencia de síntomas visibles causados por el  $O_3$  ambiental en 22 cultivos agrícolas de gran importancia económica (entre ellos trigo, maíz y uva) en Italia, Grecia y España. En cultivos cuya parte comercial son las hojas, como la lechuga, la espinaca, la acelga, la escarola o

el tabaco, la presencia de síntomas visibles en las hojas puede causar la depreciación del producto. Como ejemplo, después de un episodio de altas concentraciones de O<sub>3</sub> en 1998 en el norte de Atenas, la lechuga y la escarola presentaron tantos daños foliares que fue imposible su venta; las consecuencias en este caso fueron catastróficas para los agricultores (Velissariou, 1999).

#### **4.3- Procesos fotosintéticos**

El ozono produce un descenso en la asimilación neta de CO<sub>2</sub> (Heath, 1994a; Bortier *et al.* 2000). El ozono induce diversos procesos que explicarían esta disminución de la fotosíntesis: cierre de los estomas, y en consecuencia disminución en la fijación de CO<sub>2</sub>; disminución de la actividad y concentración de la enzima rubisco (Pell *et al.*, 1992); disminución en la eficiencia del transporte de electrones (Guidi *et al.*, 1997); fotoinhibición (Carrasco-Rodríguez y Del Valle-Tascón, 2001) disminución en la concentración de clorofilas (Lorenzini *et al.*, 1999; Bindi *et al.*, 2002); reducción en el tamaño de los cloroplastos (Günthardt-Goerg *et al.*, 1993; Reig-Armiñana *et al.*, 2004) e incluso su desintegración (Rinnan y Holopainen, 2004).

La disminución en la eficiencia del transporte de electrones conduce a la acumulación excesiva de energía de excitación en los pigmentos antena del fotosistema II, que daría lugar a lesiones en los centros de reacción de dicho fotosistema (Ranieri *et al.*, 1996a), o posiblemente a un aumento de la disipación térmica de la energía al estar la ruta fotoquímica disminuida (Reiling y Davison, 1994).

Se han observado incrementos en los niveles celulares de almidón y azúcares, probablemente como consecuencia de la alteración de la función de las membranas producida por los radicales libres (Meyer *et al.*, 1997).

#### **4.4- Rendimiento agrícola**

La biomasa es la medida más relevante del impacto causado por un estrés, ya que refleja la salud global del organismo. Los efectos del ozono sobre los procesos bioquímicos y fisiológicos de la planta mencionados anteriormente tienen como consecuencia la disminución del rendimiento agrícola de muchos cultivos sensibles a este contaminante (Bastrup-Birk y Mortensen, 1997). Los principales programas dedicados a estudiar el impacto del ozono sobre los cultivos: el "International Cooperative Program on Effects of Air Pollutants on Natural Vegetation and Crops" (Kärenlampi y Skärby, 1996) y el "US National Crops Loss Assessment Network (NCLAN)" (Heagle, 1989) han demostrado que la disminución del rendimiento agrícola causada por el ozono ambiental es significativa; estas pérdidas varían según especies y variedades, estrés hídrico y otras condiciones

de crecimiento, y oscilan entre un 0 y un 39%. Las pérdidas agrícolas atribuidas al ozono ambiental en los Estados Unidos de Norteamérica son aproximadamente de 1 a 2 billones de dólares al año (US EPA, 1998).

Se ha demostrado que las concentraciones ambientales de ozono en la región mediterránea provocan pérdidas en el rendimiento agrícola de cultivos como el trigo (20-27%), judía (17-31%), sandía (19-39%) y tomate (17-24%), y una disminución en el peso seco total del trébol (20-40%) (Fumagalli *et al.*, 2001). El impacto negativo del ozono sobre los cultivos también puede resultar de un incremento en la sensibilidad de las plantas a patógenos como virus (Porcuna, 1997; Gimeno *et al.*, 1999).

### 5. El ozono en la legislación

El régimen jurídico relativo a la contaminación atmosférica en el ámbito de la Unión Europea ha sido establecido con carácter general en la Directiva 96/62/CE, del 27 de septiembre de 1996, sobre evaluación y gestión del aire ambiente, que constituye un marco regulatorio donde se integra su posterior desarrollo mediante la adopción de directivas específicas sobre cada uno de los distintos contaminantes atmosféricos. En este marco regulatorio, la directiva específica relativa al ozono troposférico más reciente es la Directiva 2002/3/CE del Parlamento Europeo, del 12 de febrero de 2002, que ha sido incorporada al ordenamiento jurídico español por el Real Decreto 1796/2003, de 26 de diciembre de 2003. En este Real Decreto se establecen los valores de calidad en términos de umbrales de protección a la salud humana y a la vegetación (tabla 1), así como valores objetivo a corto y largo plazo (tabla 2).

**Tabla 1.** Umbrales establecidos por la directiva europea vigente para el ozono 2002/3/CE, adoptada por el Estado español en el R.D. 1796/2003.

Umbrales	Valor	Período de promedio / acumulación
Protección de la salud	120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (60 ppb)	Promedio móvil de 8 horas
Información a la población	180 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (90 ppb)	Promedio de 1 hora
Alerta a la población	240 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (120 ppb)	Promedio de 1 hora <sup>(a)</sup>
Protección de la vegetación	AOT40 <sup>(b)</sup> = 6000 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ).h (3000 ppb.h)	1 hora, acumulada, de mayo a julio
Protección de los bosques	AOT40 = 20000 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ).h (10000 ppb.h)	1 hora, acumulada, de abril a septiembre
Materiales	40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (20 ppb)	1 año

<sup>(a)</sup>La superación del umbral se debe medir o prever durante tres horas consecutivas

<sup>(b)</sup>El AOT40 es la suma de la diferencia entre las concentraciones horarias superiores a los  $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (= 40 ppb) y  $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$  a lo largo de un período dado utilizando únicamente los valores horarios medidos entre las 8:00 y las 20:00 horas (CET), cada día.

**Tabla 2.** Valores objetivo de ozono establecidos por la directiva europea 2002/3/CE y por el R.D. 1796/2003 para los años 2010 y 2020 (es decir, el cumplimiento de los valores objetivo se verificará a partir de estas fechas)

Finalidad	Parámetro	Objetivo para 2010	Objetivo para 2020
Protección de la salud humana	Máximo de las medias de 8 horas del día <sup>(a)</sup>	$120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (60 ppb), que no deberá superarse más de 25 días por cada año civil de promedio en un período de 3 años	$120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (60 ppb)
Protección de la vegetación	AOT40, calculada a partir de valores horarios de mayo a julio	$18000 (\mu\text{g}/\text{m}^3)\cdot\text{h}$ (9000 ppb.h) de promedio en un período de 5 años	$6000 (\mu\text{g}/\text{m}^3)\cdot\text{h}$ (3000 ppb.h)

<sup>(a)</sup> Promedios móviles de 8 horas

## 6. Superación de los niveles legales de ozono

El umbral de protección a la salud humana, el de alerta a la población y el de protección a la vegetación es superado ampliamente en muchos puntos de Europa, incluida la Península Ibérica (EEA, 2007; Fiala, 2002).

En un exhaustivo estudio realizado entre los años 1996-2002 con datos de concentración de ozono de Gandía y del campo experimental de La Peira en Benifaió, muy cercano a la estación experimental de Carcaixent en la que se ha realizado la presente tesis, se encontró que el valor objetivo de AOT40 de protección a la vegetación para el año 2020 se superó ampliamente todos los años en ambos lugares, y el valor objetivo de AOT40 para el año 2010 se superó en el año 1996 tanto en Benifaió como en Gandía y en el año 2001 en Gandía (Calvo, 2003).

Antes de la entrada en vigor de la normativa mencionada anteriormente, la legislación europea (Directiva 92/72/CE) y su trasposición a la legislación española en el Real Decreto 1494/1995 contemplaban el umbral de protección a la vegetación de 32.5 ppb como media diaria. En un estudio realizado en los años 1997, 1998 y 1999 en la estación experimental de Carcaixent se calculó que este umbral de 32.5 ppb se superó el 43, 57 y 40% de los días de cada año, respectivamente, y que los meses de mayo a julio más del 75% de los días de cada mes superaban esta concentración media diaria (Carrasco-Rodríguez, 2000).

En la Comunidad Valenciana, el cultivo de hortalizas se realiza a lo largo de prácticamente todo el año, y muchos cultivos desarrollan todo su ciclo o parte de él en períodos no contemplados en la actual normativa; la concentración de ozono en estos períodos de cultivo puede ser muy elevada y sin embargo quedar fuera de la protección establecida por la ley (Calvo, 2003).

## **7. El cultivo de la patata**

El cultivo estudiado en esta tesis doctoral es la patata (*Solanum tuberosum* L. cv. Agria). La patata es un cultivo sensible al ozono que muestra síntomas visibles con concentraciones ambientales de este contaminante (Sanz *et al.*, 2001; De Temmerman *et al.*, 2002). Constituye el segundo cultivo en cuanto a producción en Europa, y el cuarto a nivel mundial por detrás del trigo, arroz y maíz (FAO, 2000). La patata tiene una gran importancia para la nutrición humana en muchas partes del mundo. También se utiliza a gran escala en la industria, no sólo para su consumición directa como patatas fritas, sino también por su gran contenido en almidón, que tiene un gran número de aplicaciones. Dentro de la Unión Europea, España es el quinto país productor (7%), por detrás de Alemania, Holanda, Francia y Reino Unido. La producción de patata en la Comunidad Valenciana en el año 2002 supuso un 3.3% el total producido en España. La patata que se cultiva en mayor proporción en la Comunidad Valenciana es la patata temprana (recolección del 16 de abril al 15 de junio); en el año 2002 la Comunidad Valenciana fue la segunda productora de patata temprana en España (11.4 %), únicamente por detrás de Andalucía (CCAIE, 2004). En el año 2005 se produjeron 58370 toneladas de patata en la Comunidad Valenciana, en una superficie cultivada de 2807 hectáreas (CAPA, 2007).



- CAPÍTULO 2 -

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES:  
CULTIVO DE LAS PLANTAS  
EN CÁMARAS ABIERTAS



## 1. Introducción

Todos los capítulos experimentales de la presente tesis doctoral se han realizado empleando la metodología de las cámaras abiertas y los tratamientos aplicados a las plantas han sido los mismos. Debido a esta metodología común, y a que diferentes capítulos emplean cultivos del mismo año, se ha decidido describir en un mismo capítulo el cultivo de las plantas en cámaras abiertas y las condiciones, tanto meteorológicas como de concentraciones de contaminantes a las que han sido expuestas las plantas durante su crecimiento, evitando así la repetición de información. Así, en cada capítulo experimental se han omitido las descripciones referentes a estas materias, remitiendo en su lugar a la consulta del presente capítulo.

## 2. Lugar experimental

Los estudios presentados en esta tesis doctoral se han realizado en el Centre de Capacitació Agrària de Carcaixent, perteneciente a la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación (Generalitat Valenciana). Este centro está situado a las afueras de Carcaixent, 40 km al sur de la ciudad de Valencia (39° 7' Norte, 0° 27' Oeste), y a 22.1 m sobre el nivel del mar, en una zona rural. No hay fuentes importantes de contaminación atmosférica en las proximidades de este lugar.

## 3. Material vegetal y metodología de cultivo

La especie utilizada en los experimentos es la patata (*Solanum tuberosum* L. cv. Agria). Los tubérculos se compraron a Mercosemillas, S. L. (Valencia) y se sembraron manualmente en macetas o suelo, según el tipo de cultivo, a 15 cm de profundidad.

Se realizaron dos tipos de cultivo:

- En suelo, para el estudio descrito en el Capítulo 3. El método seguido para este cultivo se detalla en el apartado "Materiales y Métodos" de dicho capítulo.

- En cámaras abiertas, para los estudios descritos en todos los capítulos experimentales. Los tubérculos se sembraron en macetas de 20 litros de capacidad, que se colocaron en el interior de las cámaras abiertas. Se sembró 1 tubérculo por maceta, en sustrato estándar Terraplant 1 (BASF).

Las plantas desarrollaron su ciclo completo en el interior de las cámaras abiertas, divididas en tres tratamientos consistentes en tres concentraciones de ozono diferentes: aire filtrado de ozono, que se utilizó como control, aire ambiental no filtrado y aire ambiental enriquecido con ozono. La metodología de las cámaras abiertas y la forma de realizar los tratamientos se describe con detalle en el siguiente apartado del presente capítulo.

Los cultivos se realizaron en las condiciones agronómicas utilizadas en la zona, de manera que el único factor desfavorable fuera la concentración de ozono en el aire. El riego se realizó por goteo de acuerdo a las necesidades de las plantas para evitar el estrés hídrico, suministrándose 2.6 litros de agua por maceta a la semana desde la siembra hasta la emergencia y una media de 2.2 litros de agua por maceta al día desde la emergencia hasta la cosecha. También se realizaron tratamientos fitosanitarios habitualmente empleados en agricultura ecológica contra las plagas (hongos, pulgones y caracoles) cuando fue necesario. No se emplearon fertilizantes. En la tabla 1 se detalla el calendario de todos los cultivos realizados.

**Tabla 1.** Fechas de siembra, emergencia y cosecha de los cultivos de patata realizados para los experimentos descritos en esta tesis doctoral.

Año	Cultivo en cámaras abiertas			Cultivo en suelo		
	Siembra	Emergencia	Cosecha	Siembra	Emergencia	Cosecha
2002	4 de Febrero	4 de Marzo	5 de Junio	4 de Febrero	4 de Marzo	13 de Junio
2003	*	*	*	10 de Febrero	10 de Marzo	19 de Junio
2004	20 de Enero	16 de Febrero	18 de Mayo	*	*	*
2005	3 de Febrero	4 de Marzo	19 de Mayo			

(\*) En los años 2003 y 2004 se realizaron cultivos en cámaras abiertas y suelo, respectivamente, pero el cultivo en cámaras del año 2003 sufrió un estrés hídrico acusado debido a un fallo en el sistema automático de riego y el cultivo en suelo del 2004 sufrió heladas tardías y un ataque grave de mildiu.

#### 4. Las cámaras abiertas

Las cámaras de techo abierto o cámaras abiertas, conocidas en inglés como “open-top chambers” (abreviado OTC), se han utilizado ampliamente desde su diseño por Heagle en 1973 para el estudio del efecto de los contaminantes atmosféricos sobre cultivos agrícolas (Heagle *et al.*, 1973). La principal ventaja de esta técnica es que permite mantener los cultivos en unas condiciones muy similares a las condiciones naturales. Por otra parte, permite analizar las diferencias entre cultivos que se han desarrollado en:

- (i) aire filtrado con una concentración de ozono ambiental muy baja
- (ii) aire ambiental
- (iii) aire ambiental suplementado con un suministro adicional de ozono en el interior de la cámara (fumigación).

Otra ventaja de esta tecnología es la capacidad de distribuir los contaminantes uniformemente, tanto en horizontal como en vertical (Manning y Krupa, 1992; Olszyk *et al.*, 1992).

#### **4.1- Estructura de las cámaras abiertas**

Las cámaras abiertas tienen forma cilíndrica, con la parte superior descubierta. Sus dimensiones son 3 metros de diámetro y 2.5 metros de altura. Cada cámara está conectada en su parte inferior a un ventilador eléctrico que suministra el aire al interior de la cámara (figura 1A). Están formadas por una estructura de aluminio anclada a una base de ladrillo, que sirve de sujeción para plásticos de cloruro de polivinilo (PVC) transparente. Constan de tres partes: la parte inferior y media tienen forma cilíndrica, y la parte superior es un frustum o cono truncado con una inclinación de 40° hacia el interior para minimizar el influjo del aire exterior. La cubierta de plástico de la parte inferior es doble, estando la capa externa acoplada al ventilador y la capa interna agujereada para permitir la entrada en la cámara del aire proveniente de éste. El ventilador tiene una potencia suficiente para renovar el aire del interior de la cámara tres veces por minuto; de esta manera, se impide la entrada de aire ambiental por la parte superior y se facilita un rápido intercambio de gases.

#### **4.2- Tratamientos**

Se aplicaron tres tratamientos durante todo el período de cultivo:

- Aire filtrado de ozono (tratamiento denominado CF)
- Aire ambiental, es decir, no filtrado (tratamiento denominado NF)
- Aire fumigado con ozono (tratamiento denominado NF<sup>+</sup>)

El tratamiento CF se realizaba haciendo pasar el aire ambiental a través de filtros de carbón activo colocados en la entrada del ventilador; estos filtros eliminan aproximadamente un 80% del ozono ambiental y un 90% de peroxiacetil nitratos (PAN) (Olszyk *et al.*, 1989). El tratamiento NF consistía en la aplicación de aire ambiental a través de los ventiladores sin ningún tipo de filtrado. El tratamiento NF<sup>+</sup> consistía en aire ambiental al que se añadía ozono siguiendo un perfil programado; concretamente, se añadía 80, 100, 120, 100 y 80 ppb de ozono de 7:30 a 8:30 h, 8:30 a 9:30 h, 9:30 a 10:30 h, 10:30 a 11:30 h y 11:30 a 12:30 h (UTC\*), respectivamente. El ozono era originado a partir de oxígeno puro mediante descargas eléctricas de alto voltaje producidas por un generador (GOAC S-3003, SIR, Valencia).

\*UTC: Hora solar en el meridiano de Greenwich, que coincide con la hora solar en el lugar experimental.

El tratamiento  $\text{NF}^+$  se aplicaba de lunes a viernes debido a que la apertura de la bala de oxígeno utilizado para la generación de ozono debía realizarse manualmente por los trabajadores del centro.

Los tratamientos se asignaron de manera homogénea entre las 9 cámaras abiertas de la estación experimental, disponiendo así de 3 cámaras por tratamiento.

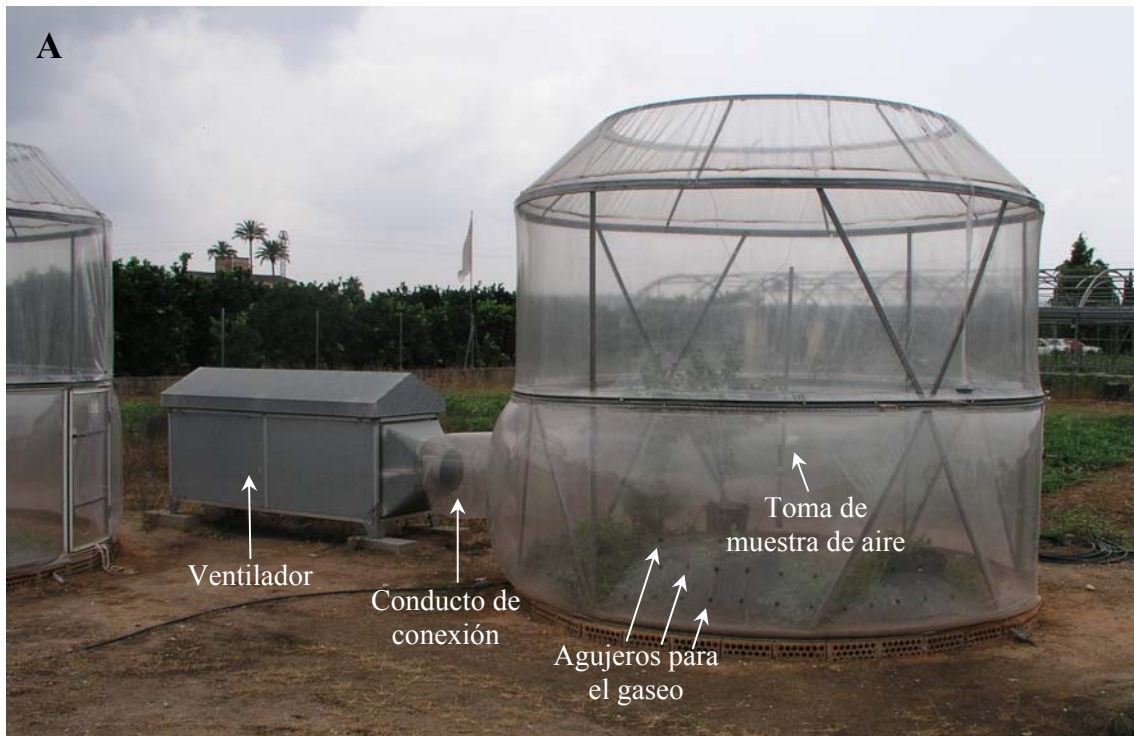
#### 4.3- Medida de contaminantes y variables climáticas

Dentro de cada cámara, y también en el exterior, se disponía de un punto de toma de muestra de aire situado a una altura de 1 m sobre el suelo, y en una cámara de cada tratamiento había además sensores de temperatura y humedad relativa (Skye SKH 2013/1) y radiación solar (Starpyranometer 8101, Philip Schenk) junto al punto de muestreo de aire. La toma de datos de las variables climáticas se realizaba cada 15 minutos, y cada hora la de contaminantes atmosféricos, lo que permitía un registro continuo de estos parámetros durante los experimentos.

Las muestras de aire circulaban por conductos de teflón enterrados en el suelo hacia los medidores alojados en una caseta de instrumentación (figura 1B). El ozono se determinaba por absorción en el ultravioleta (Dasibi 1008 RS), el  $\text{SO}_2$  por fluorescencia (Dasibi 4181) y los óxidos de nitrógeno por quimioluminiscencia (Dasibi modelo 2108). Las concentraciones de los contaminantes se presentan en partes por billón (ppb,  $1:10^9$ ); otras unidades que se suelen utilizar para expresar la concentración de contaminantes atmosféricos son los  $\text{nL L}^{-1}$  y, con menos frecuencia, los  $\mu\text{g m}^{-3}$ . La equivalencia entre estas unidades es la siguiente:

- 1 ppb (cualquier contaminante) =  $1 \text{ nL L}^{-1}$
- 1 ppb de  $\text{O}_3$  =  $1.997 \mu\text{g m}^{-3}$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  y 1 atmósfera
- 1 ppb de  $\text{NO}$  =  $1.248 \mu\text{g m}^{-3}$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  y 1 atmósfera
- 1 ppb de  $\text{NO}_2$  =  $1.914 \mu\text{g m}^{-3}$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  y 1 atmósfera
- 1 ppb de  $\text{SO}_2$  =  $2.665 \mu\text{g m}^{-3}$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  y 1 atmósfera

Las medidas se guardaban en un sistema de registro (Dasibi 8001) con salida RS232 a un ordenador que gestionaba el almacenamiento de los datos. El correcto funcionamiento de los aparatos de medida tanto de contaminantes químicos como de variables climáticas era controlado periódicamente mediante calibraciones antes y durante la realización de los experimentos por la empresa SIR, S. A.



**Figura 1.** A) Estructura de una cámara abierta en el Centre de Capacitació Agrària de Carcaixent. B) Caseta donde se alojan los medidores de contaminantes atmosféricos ( $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$  y  $\text{O}_3$ ), el generador de ozono y el ordenador donde se almacenan los datos.

## 5. Procesado de los datos

En primer lugar se realizó un pretratamiento de los datos para localizar valores perdidos (valores correspondientes a intervalos temporales durante los cuales no se dispone de registros) y valores erróneos (valores que han sido registrados incorrectamente por los sensores). Estos valores perdidos o erróneos pueden tener diversas causas; las más comunes son averías en los sensores, cortes en la corriente eléctrica y calibraciones. La mayoría de los métodos estadísticos no se pueden aplicar si existen este tipo de valores perdidos y erróneos. Por lo tanto, se realizó una corrección en los casos en que fue posible.

El método más habitual para la corrección es una interpolación lineal. Sin embargo, cuando existen muchos valores ausentes correlativos, este método puede falsear la información. Por este motivo, se ha seguido el siguiente criterio: sólo los períodos temporales sin datos válidos de duración inferior a 6 horas han sido interpolados linealmente con el programa SPSS v12.0; así se completan las series temporales en muchos casos. Los días con más valores perdidos o erróneos se han eliminado totalmente.

## 6. Cálculo de AOT y nivel crítico para los cultivos

El AOT es un índice de exposición acumulada sobre un umbral de cierta concentración media horaria de ozono durante un período de tiempo. Los índices utilizados en esta tesis son el AOT00, AOT40 y AOT50, siendo el umbral de concentración de ozono 0, 40 y 50 ppb, respectivamente. El AOT se calcula de la siguiente manera:

$$\text{AOTX} = \sum_{i=1}^n [C_{O_3} - X], \text{ para } C_{O_3} > X \text{ ppb} \quad (\text{unidades: ppb.h})$$

Siendo X el umbral de concentración de ozono elegido (ppb),  $C_{O_3}$  la concentración media horaria de ozono (ppb), y n el número de horas con  $C_{O_3} > X$  ppb.

El AOT40 tiene especial relevancia debido a su estrecha relación con las pérdidas en el rendimiento agrícola. Concretamente, los experimentos realizados en OTC con 10 cultivos de trigo, en 6 países y durante 10 años (Fuhrer *et al.*, 1997) fueron la base para establecer un nivel crítico de ozono de AOT40 igual a 3000 ppb.h, a partir del cual se considera que los cultivos sufren pérdidas en el rendimiento superiores a un 5% (Kärenlampi y Skärby, 1996; WHO Regional Office for Europe, 2000). El nivel crítico se calcula como el mayor valor de AOT40 para tres meses consecutivos durante el período de cultivo, utilizando para el cálculo las horas de luz (radiación global superior a  $50 \text{ W m}^{-2}$ ). Este nivel crítico ha sido adoptado por la legislación (ver Capítulo 1),



donde los tres meses se restringen a Mayo-Julio, y las horas para su cálculo se fijan entre las 8:00 h y las 20:00 h (CET).

## **7. Condiciones meteorológicas y niveles de contaminantes durante los experimentos en cámaras abiertas**

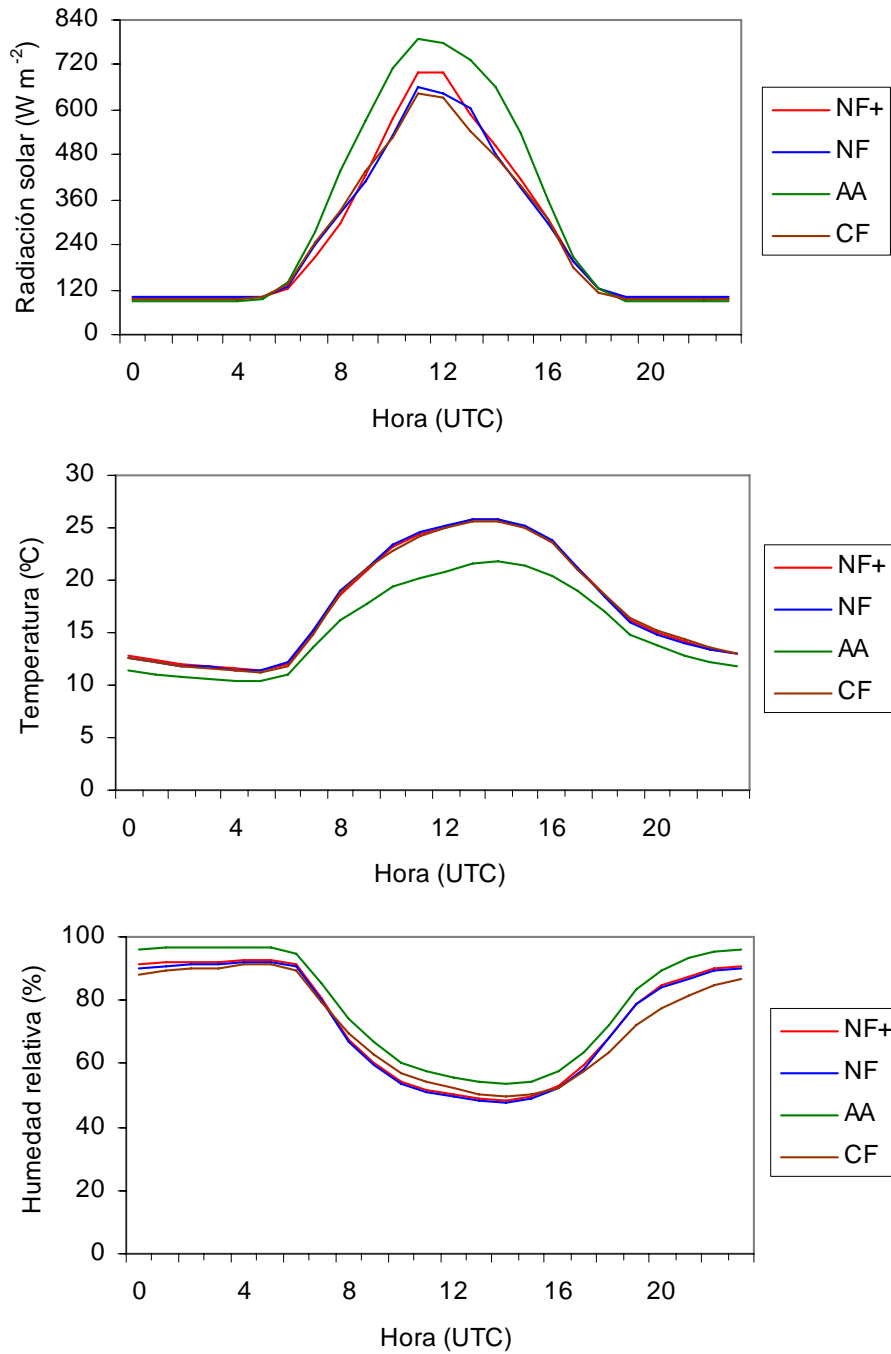
Para ilustrar las condiciones de radiación solar, temperatura y humedad relativa a las que estaban expuestas las plantas en el interior de las cámaras, en la figura 2 se presenta el perfil diario de cada variable, elaborado con medias horarias, tanto del interior de cada tipo de cámara como del exterior o ambiental. En esta figura se puede apreciar que la radiación solar en el interior de las cámaras es inferior a la ambiental, ya que el PVC tiene una pérdida de transmitancia con respecto al espectro de luz visible de entre un 10 y un 25 % dependiendo de la hora del día y el daño del plástico debido a la intemperie. En el interior de las cámaras se experimenta además un aumento de la temperatura de entre 3 y 4 °C en las horas de más calor y una ligera disminución de la humedad relativa respecto a las condiciones ambientales. No hay diferencias importantes en estas variables climáticas entre los diferentes tipos de cámaras.

Estas variaciones del microclima de la cámara respecto al ambiente representan la principal desventaja del método de las cámaras abiertas, que dificulta la extrapolación de los resultados obtenidos en las cámaras abiertas a las condiciones ambientales. El rendimiento agrícola en condiciones ambientales en comparación con las cámaras NF (aire no filtrado) puede ser mayor, menor o igual, y estas relaciones varían de un año a otro (Heagle, 1989).

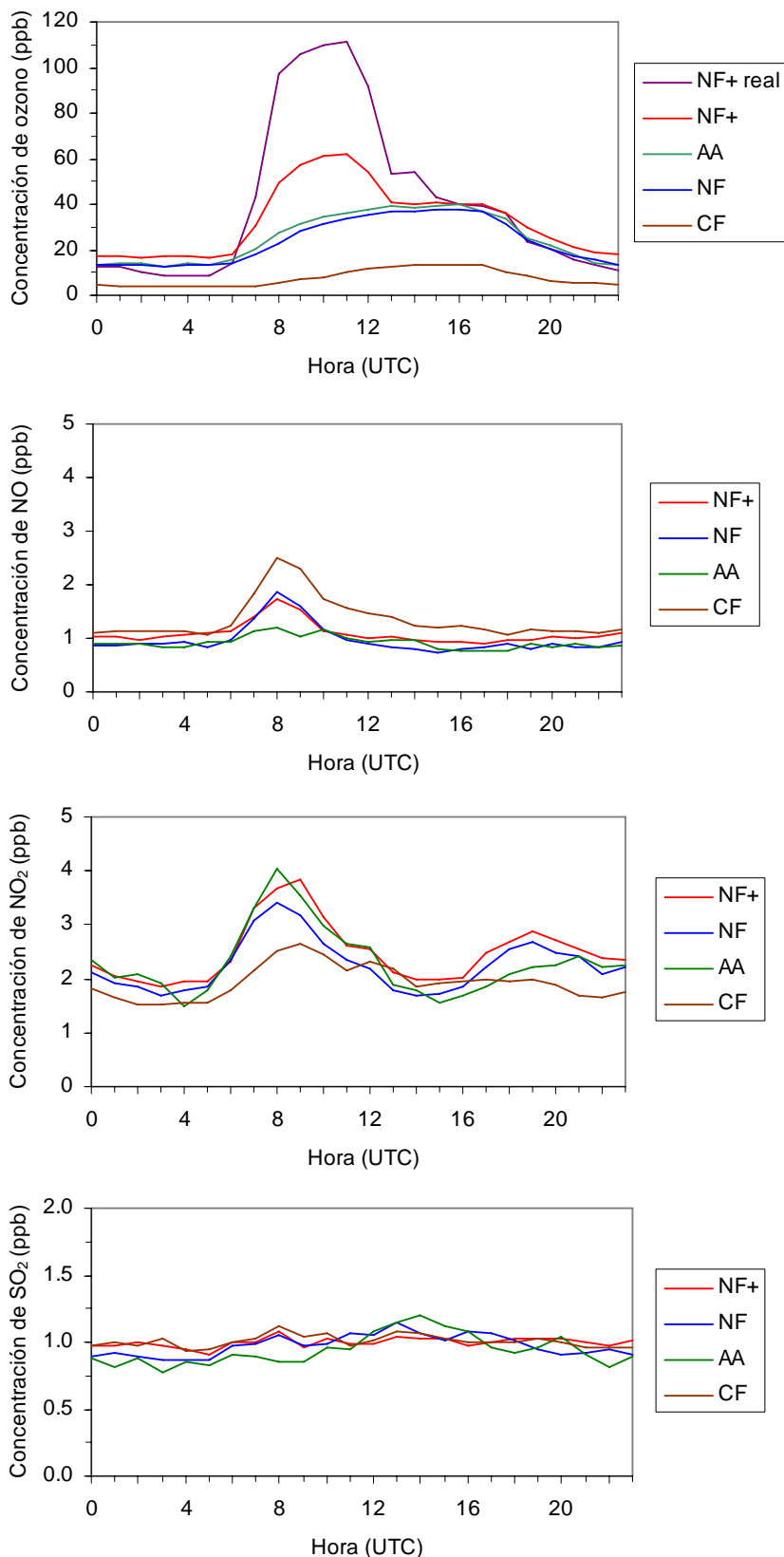
La figura 3 representa el perfil diario de ozono, dióxido de azufre, monóxido de nitrógeno y dióxido de nitrógeno dentro y fuera de las cámaras. En cuanto al ozono, su perfil en condiciones ambientales describe una curva que empieza a aumentar hacia las 8:00 h, alcanza su máximo entre las 12:00 y las 16:00 h (UTC), y disminuye paulatinamente hasta la noche. Por tanto los mayores niveles de ozono se experimentan durante las horas centrales del día, que son las de mayor temperatura y radiación solar, condiciones determinantes para su formación como se ha indicado en el Capítulo 1. No hay apenas diferencias entre las concentraciones ambientales y las de las cámaras de aire no filtrado. En las cámaras de aire filtrado se elimina aproximadamente un 70% del ozono ambiental. El perfil de las cámaras NF<sup>+</sup> pone de manifiesto algunas limitaciones del sistema de fumigación: la curva imita el perfil natural del ozono, aunque se adelanta unas horas debido a la apertura manual del oxígeno; el control manual también es el motivo de que los fines de semana no se fumigue, y por ello el promedio para todo el período desde la emergencia hasta la cosecha (curva denominada NF<sup>+</sup>) es menor que el perfil durante los días de fumigación (curva denominada NF<sup>+</sup>

real); por otra parte, la fumigación tiene algunos altibajos y tiende a alcanzar niveles inferiores a los programados. No obstante, el objetivo de la fumigación era conseguir concentraciones de ozono claramente superiores a la concentración ambiental, que al final del cultivo constituyeran una dosis acumulada elevada; en la exposición a largo plazo (crónica) de las plantas al ozono, desde un punto de vista toxicológico, el parámetro más relevante en la cuantificación de la relación entre dosis y respuesta es la dosis acumulada de ozono recibida por las plantas (Fiscus *et al.*, 2005).

El NO<sub>2</sub> ambiental sigue un perfil inverso al del ozono, registrándose sus mayores concentraciones a primera hora de la mañana y al final de la tarde, como se ha explicado en el Capítulo 1, y los niveles de NO son muy bajos. La concentración de NO y NO<sub>2</sub> es muy similar entre las cámaras y el ambiente, con la excepción de las cámaras de aire filtrado, donde el NO es ligeramente superior y el NO<sub>2</sub> ligeramente inferior; estas variaciones del NO y NO<sub>2</sub> en las cámaras CF son consecuencia de los filtros (Bytnerowicz *et al.*, 1995) y tienen poca relevancia debido a que los niveles de ambos agentes son muy bajos. Por lo que respecta al SO<sub>2</sub>, sus niveles son también muy bajos en las cámaras y en el ambiente, y se encuentran en el límite de detección del sensor.



**Figura 2.** Perfil diario de la radiación solar, temperatura y humedad relativa en el interior de las cámaras abiertas (NF<sup>+</sup>= tratamiento de aire fumigado con ozono, NF= tratamiento de aire ambiental, CF= tratamiento de aire filtrado) y en el ambiente exterior (AA). Los datos corresponden al año 2005 y son un promedio del período desde la emergencia de las plantas hasta la cosecha.



**Figura 3.** Perfil diario de ozono, NO, NO<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub>, calculado como promedio del período desde la emergencia de las plantas hasta la cosecha, en el interior de las cámaras abiertas (NF<sup>+</sup>= tratamiento de aire fumigado con ozono, NF= tratamiento de aire ambiental, CF= tratamiento de aire filtrado; NF<sup>+</sup> real= perfil diario de ozono en el tratamiento de fumigación calculado como promedio del 2 al 13 de mayo excluyendo el fin de semana) y en el ambiente exterior (AA). Los datos corresponden al año 2005.

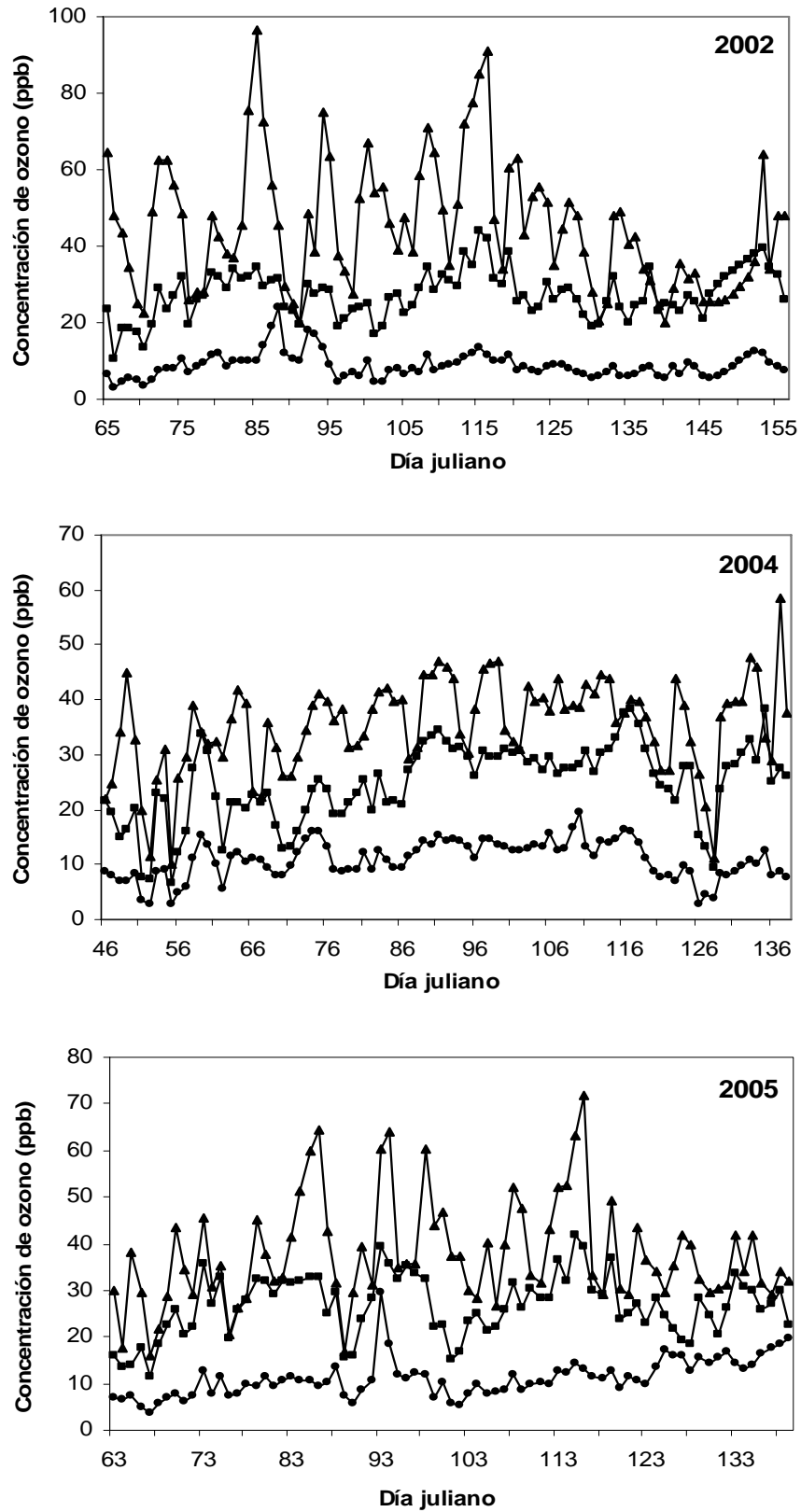
A continuación se muestran varios estadísticos básicos de los parámetros meteorológicos y de contaminantes atmosféricos que permiten conocer las condiciones en las que se han desarrollado las plantas en el interior de las cámaras durante los tres cultivos realizados. En la tabla 2 se presentan las medias, mínimos y máximos de las variables meteorológicas dentro de las cámaras abiertas durante dichos cultivos. Estos parámetros meteorológicos fueron muy similares en los tres tipos de cámaras y en los tres cultivos; únicamente la temperatura durante el período de 2004 fue inferior a los períodos de 2002 y 2005 debido a que la emergencia de las plantas tuvo lugar con anterioridad a los otros cultivos y además hubo heladas en el mes de marzo de 2004.

**Tabla 2.** Temperatura, humedad relativa y radiación solar mínimas, medias y máximas diarias en el interior de las cámaras abiertas (CF= tratamiento de aire filtrado, NF= tratamiento de aire ambiental, NF+= tratamiento de aire fumigado con ozono). Los datos son un promedio del período desde la emergencia de las plantas hasta la cosecha para cada año.

Año	Cámara	Temperatura (°C)			Humedad relativa (%)			Radiación solar (W m <sup>-2</sup> )		
		Mínima	Media	Máxima	Mínima	Media	Máxima	Mínima	Media	Máxima
2002	CF	11.3	18.3	27.1	43.6	70.2	93.9	102.6	254.1	719.2
	NF	11.4	18.7	28.8	41.0	71.1	95.5	102.6	248.9	715.2
	NF <sup>+</sup>	11.3	18.6	28.2	42.2	72.3	96.8	104.4	241.9	695.0
2004	CF	9.1	15.0	22.8	47.4	73.1	95.0	106.4	227.8	620.1
	NF	9.2	15.3	23.5	46.5	75.0	97.3	111.0	229.8	638.1
	NF <sup>+</sup>	9.2	15.2	23.6	48.2	76.1	97.8	104.4	224.9	635.6
2005	CF	9.9	18.0	28.1	37.2	66.5	92.7	92.8	250.2	755.2
	NF	9.8	18.2	29.2	36.4	69.0	96.0	98.5	249.7	757.3
	NF <sup>+</sup>	9.7	18.3	30.0	37.8	71.0	97.3	95.1	259.3	813.0

La concentración media diaria de ozono a lo largo de todo el período comprendido entre la emergencia y la cosecha para cada año de cultivo se representa en la figura 4. Para una mejor interpretación de las concentraciones de ozono se han calculado diferentes índices de exposición a este contaminante en el interior de las cámaras abiertas, que se muestran en la tabla 3. En la tabla 4 aparecen las concentraciones mínimas, medias y máximas diarias de NO, NO<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub>.

En la figura 4 y en las tablas 3 y 4 se puede observar que la concentración de ozono en las cámaras de aire filtrado fue relativamente baja. En cambio, en las cámaras de aire ambiental, en los años 2002 y 2005 se excedió el nivel crítico de AOT40 establecido en 3000 ppb.h para la protección de cultivos agrícolas. En las cámaras de aire fumigado, este umbral se superó ampliamente durante los tres años de cultivo.



**Figura 4.** Concentración media diaria de ozono a lo largo de todo el período comprendido entre la emergencia y la cosecha en cada tipo de cámara abierta y para cada año de cultivo. Símbolos: triángulos= cámaras NF<sup>+</sup>, cuadrados= cámaras NF, círculos= cámaras CF.

**Tabla 3.** Índices de exposición a ozono en el interior de las cámaras abiertas (abreviaturas de las cámaras como en la tabla 2). Los datos representan la media del período desde la emergencia de las plantas hasta la cosecha para cada año. (1): Concentración media de ozono entre las 9:00 h y las 16:00 h UTC. (2): Número de horas entre las 8:00 h y las 20:00 h (CET) durante el período de emergencia-cosecha en que se supera los 40 ppb de ozono, utilizadas para el cálculo de AOT40. (3): Porcentaje del total de horas entre las 8:00 h y las 20:00 h (CET) del período emergencia-cosecha que representa el parámetro anterior.

Año	Cámara	Mínimo diario	Máximo diario	Media 7 h <sup>(1)</sup>	Media 24 h	AOT40	Nº horas <sup>(2)</sup>	% del total de horas <sup>(3)</sup>	AOT00
2002	CF	0.63	22.84	12.02	8.97	9	3	0.27	14717
	NF	3.60	49.43	36.97	26.28	3836	386	34.59	44967
	NF <sup>+</sup>	16.38	118.39	80.58	48.27	30249	797	71.42	82615
2004	CF	2.33	19.87	12.81	9.87	8	2	0.18	22265
	NF	5.69	40.79	31.40	22.78	2361	348	31.52	51415
	NF <sup>+</sup>	11.20	66.99	47.62	31.87	14071	666	60.33	70026
2005	CF	0.58	18.24	10.83	7.52	33	7	0.77	20267
	NF	2.54	37.76	34.82	23.80	4186	342	37.50	43188
	NF <sup>+</sup>	7.78	75.92	48.43	32.60	16488	538	58.99	58543

**Tabla 4.** Concentraciones mínimas, medias y máximas diarias de NO, NO<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub> en el interior de cada tipo de cámara abierta (abreviaturas de las cámaras como en la tabla 2), promediadas para el período emergencia-cosecha de cada cultivo.

Año	Cámara	NO			NO <sub>2</sub>			SO <sub>2</sub>		
		Mínima	Media	Máxima	Mínima	Media	Máxima	Mínima	Media	Máxima
2002	CF	0.03	1.91	5.89	0.04	2.50	7.39	0.01	0.88	2.21
	NF	0.00	0.98	4.53	0.05	4.03	14.47	0.00	0.90	2.42
	NF <sup>+</sup>	0.00	1.03	3.97	0.17	4.25	13.39	0.02	0.83	2.17
2004	CF	0.02	1.30	4.62	0.01	1.79	5.78	0.08	0.99	2.41
	NF	0.00	0.95	3.90	0.03	2.06	7.37	0.02	0.95	2.28
	NF <sup>+</sup>	0.01	1.08	4.12	0.06	2.30	8.26	0.04	0.98	2.53
2005	CF	0.01	1.94	7.21	0.09	3.13	9.45	0.01	0.91	0.09
	NF	0.00	1.13	5.19	0.04	4.26	14.69	0.00	0.90	2.15
	NF <sup>+</sup>	0.00	1.21	5.06	0.18	4.51	14.81	0.03	0.89	2.07

Las concentraciones de NO, NO<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub> en los tres tipos de cámaras se mantuvieron muy por debajo de las concentraciones deletéreas para las plantas durante los tres períodos de cultivo. En consecuencia, las concentraciones de estos gases fueron demasiado bajas como para producir un efecto sobre las plantas; también es descartable que estos contaminantes a concentraciones tan reducidas pudieran tener un efecto sinérgico con el ozono (Darrall, 1989).

Por lo tanto, el ozono fue el contaminante ambiental predominante en el estudio, a excepción de las cámaras CF, utilizadas como control.





- CAPÍTULO 3 -

EFECTO DEL OZONO SOBRE EL RENDIMIENTO  
AGRÍCOLA DE LA PATATA  
Y APLICACIÓN DE PROTECTORES QUÍMICOS  
EN CONDICIONES DE CAMPO



## **RESUMEN**

Se ha estudiado el efecto de la exposición crónica de plantas de patata a diferentes concentraciones de ozono en cámaras abiertas: aire filtrado de ozono (CF), aire ambiental (NF) y aire ambiental enriquecido con ozono (NF<sup>+</sup>), durante tres períodos de cultivo (2002, 2004 y 2005). La actividad guaiacol peroxidasa (GPOD) aumentó en las plantas expuestas a ozono, en relación a la dosis recibida, indicando un estrés oxidativo causado por estos tratamientos. El ozono causó una disminución en la concentración de clorofilas a y b. El rendimiento agrícola total y de patatas de calibre comercial ( $\geq 40$  mm) disminuyó en relación a la exposición acumulada a ozono durante todo el ciclo de cultivo (AOT40 y AOT00). Además, se ha estudiado el efecto protector de dos compuestos químicos, difenilamina (DPA) y citrulina frente a la disminución en el rendimiento agrícola de patata inducida por el ozono ambiental. Se realizaron dos cultivos de patata en condiciones de campo en los años 2002 y 2003. Las plantas estuvieron expuestas al aire ambiental; durante los dos períodos de cultivo, la concentración de ozono fue superior a los niveles críticos establecidos por la Unión Europea y por tanto potencialmente dañina para los cultivos. Se realizaron tratamientos con DPA 100, 200 y 300 mM y con citrulina 50, 100 y 200 mM. El DPA 200 mM y 300 mM causó un aumento significativo en la producción por planta de un 11-20 % según la concentración y el año, y la citrulina hizo aumentar la producción en un 73-113 %. La concentración de clorofilas a y b aumentó en las plantas tratadas con citrulina. Las actividades enzimáticas guaiacol peroxidasa (GPOD) y glutatión reductasa (GR) disminuyeron marcadamente debido a la aplicación de ambos compuestos químicos en todas sus concentraciones. Este es el primer estudio que demuestra un aumento significativo en el rendimiento agrícola debido a la aplicación de DPA y de citrulina, y una disminución en la concentración de peróxido de hidrógeno como posible mecanismo de protección frente al estrés oxidativo causado por el ozono ambiental.

## INTRODUCCIÓN

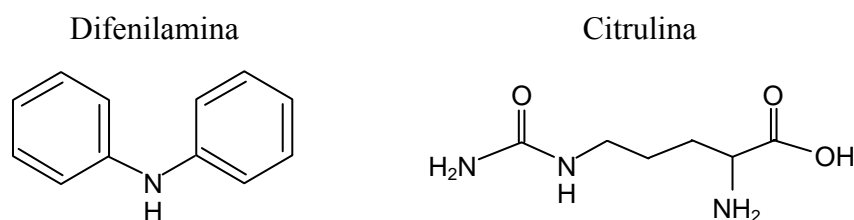
El ozono troposférico se considera un problema global y creciente, que provoca una disminución en el rendimiento de los cultivos agrícolas (Fuhrer y Booker, 2003). Además, las mayores concentraciones de ozono ocurren durante el período de desarrollo de muchos cultivos (Fiscus *et al.*, 2005). Se ha realizado un importante esfuerzo con el objetivo de cuantificar el impacto del ozono sobre la productividad de los cultivos, para así predecir las pérdidas en el rendimiento agrícola y establecer estándares de calidad del aire para mantener estas pérdidas a un nivel económicamente aceptable (US EPA, 1996; UNECE, 2000). Se ha estimado que las pérdidas agrícolas anuales a causa del ozono en los cultivos más importantes en Estados Unidos ascendieron a más de 1000 millones de dólares en 1996 (US EPA, 1996). Estudios recientes han calculado un beneficio de 310 millones de euros en Holanda (Kuik *et al.*, 2000) y 2000 millones de dólares en China (Mauzerall y Wang, 2001) si se redujera el ozono a su concentración natural.

La fotosíntesis y la distribución de asimilados en la planta son factores que contribuyen a la productividad de los cultivos. Ambos procesos son afectados negativamente por el ozono. El ozono provoca una disminución en la asimilación fotosintética de carbono (Runeckles y Chevone, 1992; Morgan *et al.*, 2003), relacionada con la degradación de la enzima Rubisco (Eckardt y Pell, 1994). Se han observado reducciones sustanciales en  $F_v/F_m$ , que representa la eficiencia en la captación de fotones por parte del PSII (Castagna *et al.*, 2001; Plazek *et al.*, 2000); algunos estudios indican un daño o desactivación de los centros de reacción del PSII (Leipner *et al.*, 2001; Guidi *et al.*, 2002). Una exposición crónica a ozono causa un cambio en la partición de asimilados hacia la parte aérea en detrimento de la distribución hacia las raíces, sugiriendo un efecto inhibitorio del ozono sobre la carga floemática y la translocación a las raíces (Miller *et al.*, 1998; Grantz y Yang, 2000; Guidi *et al.*, 2002). Debido a esta modificación en la partición de los asimilados en la planta, los cultivos de raíz y tubérculo son especialmente sensibles al ozono (Bastrup-Birk y Mortensen, 1997).

La aplicación de protectores químicos a las plantas en el campo para prevenir los daños por exposición al ozono ambiental es un método aceptado en la actualidad. Un diverso grupo de compuestos químicos, como antioxidantes, agentes antisenescentes, antitranspirantes, reguladores y/o retardadores del crecimiento, plaguicidas, fungicidas y herbicidas proporcionan diferentes grados de protección a corto plazo contra este contaminante (Manning, 2000), aunque se ha encontrado que la mayoría no son prácticos. El antioxidante ascorbato, el antiozonante etilendiurea (EDU) y el fungicida sistémico benomilo son los protectores químicos más ampliamente utilizados en la investigación acerca de los efectos del ozono ambiental sobre el crecimiento y rendimiento de

las plantas (Manning, 2000). En trabajos previos realizados en el campo por nuestro grupo de investigación se aplicaron diferentes compuestos a las plantas: ascorbato, benomilo, tierra de diatomeas, antitranspirantes (Wiltproof<sup>®</sup>), DPA, citrulina, putrescina y cadaverina, y únicamente se encontró una mejora significativa en el rendimiento agrícola en plantas tratadas con DPA y citrulina.

En 1967, Walker observó que la difenilamina (*N*-fenilbencenamina), abreviada como DPA (figura I), es efectiva en la protección de las plantas frente a los daños visibles inducidos por ozono cuando se pulveriza sobre las hojas (Walker, 1967). También encontró que un aumento en la concentración de DPA producía un aumento en la protección, sugiriendo un efecto antagónico del ozono y el DPA. Actualmente, este efecto protector está bien establecido. Los estudios han demostrado que el DPA protege a las plantas del daño visible y del daño histológico inducido por ozono (Walker, 1967; Elfving *et al.*, 1976). Por otra parte, se ha observado que este compuesto protege al fotosistema II frente a la alta intensidad luminosa (fotoinhibición) en cloroplastos aislados evitando la degradación de la proteína D1; esta protección ha sido asociada a la disminución del oxígeno singlete (Trebst *et al.*, 2002).



**Figura I.** Estructura química de la difenilamina y de la citrulina

Además de estas acciones protectoras, se han observado otros efectos de los tratamientos con DPA. Este compuesto es empleado actualmente como fungicida post-cosecha para prevenir el deterioro de manzanas y peras (Papadoupalou-Mourkidou, 1991; Wang y Dilley, 2000).

La citrulina es un aminoácido libre derivado del glutamato. La citrulina es un intermediario del ciclo de la ornitina en plantas, donde actúa como precursora de la arginina (Schubert, 1986). La citrulina es un soluto compatible que se acumula en cantidades masivas en hojas de sandía salvaje (*Citrullus lanatus* L.) en condiciones de sequía (Kawasaki *et al.*, 2000). Se ha sugerido que los solutos compatibles actúan como eliminadores ("scavengers") de radicales libres (Smirnoff y Cumbes, 1989); concretamente, se ha demostrado que tanto el manitol (Shen *et al.*, 1997) como la

citrulina (Akashi *et al.*, 2001) eliminan el radical hidroxilo *in vitro*, aunque se ha observado que la citrulina es más eficaz que el manitol (Akashi *et al.*, 2001). Debido a que el ozono causa estrés oxidativo y producción de radicales hidroxilo en plantas, la citrulina es un potencial protector químico frente al ozono que no ha sido probado hasta ahora.

En este capítulo se describe un experimento con plantas de patata crecidas durante todo su ciclo en el interior de cámaras abiertas para determinar el efecto de una exposición crónica a ozono sobre el rendimiento agrícola, la concentración de clorofilas y la actividad enzimática guaiacol peroxidasa. Además, se han tratado plantas de patata con diferentes concentraciones de difenilamina y citrulina en condiciones de campo, con el objetivo de valorar los efectos protectores de ambos compuestos químicos frente a la disminución del rendimiento agrícola causada por ozono; también se investigaron los cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes guaiacol peroxidasa y glutatión reductasa, y el contenido en clorofilas tras los tratamientos de la patata con DPA y citrulina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Lugar experimental

El experimento se llevó a cabo en el Centro de Capacitación Agraria de Carcaixent. Para mayor detalle consultar el Capítulo 2.

### 2. Cultivo de las plantas en cámaras abiertas

Las plantas de patata (*Solanum tuberosum* cv. Agría) se obtuvieron a partir de tubérculos adquiridos en el mercado local. Los tubérculos se sembraron en macetas de 20 L. Las plantas desarrollaron todo su ciclo, desde la siembra hasta la cosecha, en el interior de cámaras abiertas (OTC), expuestas a tres concentraciones de ozono: aire filtrado de ozono (CF), aire ambiental no filtrado (NF) y aire ambiental enriquecido con ozono (NF<sup>+</sup>). Se realizaron tres cultivos, en los años 2002 (siembra: 4 de Febrero, cosecha: 5 de Junio), 2004 (siembra: 20 de Enero, cosecha: 18 de Mayo) y 2005 (siembra: 3 de Febrero, cosecha: 19 de Mayo).

En el año 2002 se dispuso de 12 plantas por tratamiento, y en los años 2004 y 2005 se dispuso de 9 plantas por tratamiento. Los detalles sobre el cultivo de las plantas, las cámaras abiertas y los tratamientos con ozono están descritos en el Capítulo 2.

### 3. Cultivo de las plantas en campo y tratamientos con protectores químicos

Los tubérculos de patata (*Solanum tuberosum* cv. Agría) se sembraron manualmente en el suelo a 15 cm de profundidad y a una distancia de 20 x 80 cm. Se realizaron dos cultivos, en los años 2002 (siembra: 4 de febrero, cosecha: 13 de Junio) y 2003 (siembra: 10 de febrero, cosecha: 19 de Junio). Las plantas se regaron por goteo; el riego se ajustó a las necesidades hídricas de las plantas, aplicando una media de 13 L m<sup>-2</sup> a la semana.

En experimentos preliminares llevados a cabo en años anteriores, se aplicaron tres dosis de DPA (10, 50 y 100 mM) y tres dosis de citrulina (10, 25 y 50 mM). Ninguna de estas dosis causó signos de fitotoxicidad, y se observó una mejora del rendimiento agrícola con la mayor concentración aplicada de ambos compuestos (datos no mostrados). Por lo tanto, en los experimentos descritos en este capítulo se aplicaron los siguientes tratamientos: DPA 100 y 200 mM en el año 2002; en el año 2003 se aplicó DPA 100, 200 y 300 mM, y citrulina 50, 100 y 200 mM. El DPA se disolvió en etanol al 10 % (v/v); como control se utilizó etanol al 10 % (v/v). La citrulina se disolvió en agua y como control se aplicó agua. El agua utilizada para preparar las soluciones provenía del grifo, al igual que el agua de riego. Cada planta se regó con 20 mL de la

disolución correspondiente. Los tratamientos del año 2002 consistieron en 5 aplicaciones los días 22 de marzo, 5 y 19 de abril, 3 y 10 de mayo. En el 2003 se realizaron 4 aplicaciones los días 24 de abril, 9, 16 y 23 de mayo.

Los tratamientos se aplicaron por bloques aleatorios consistentes en parcelas de 0.8 x 3 m, con tres réplicas o parcelas para cada tratamiento. Se sembraron 15 tubérculos por parcela. Se utilizaron terrenos diferentes, aunque próximos y con el mismo tipo de suelo, para cada cultivo, con el fin de evitar la presencia de residuos de los tratamientos del cultivo anterior.

#### **4. Contaminantes atmosféricos y variables meteorológicas**

Las concentraciones de ozono ambiental y otros contaminantes atmosféricos como el NO, NO<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub>, así como las condiciones microclimáticas (temperatura, humedad relativa y radiación solar) se registraron continuamente como se especifica en el Capítulo 2.

#### **5. Rendimiento agrícola**

Los cultivos se cosecharon cuando habían alcanzado un estado de senescencia avanzada (fechas de cosecha indicadas en los apartados 2 y 3). En las cámaras abiertas, se pesaron los tubérculos producidos por cada planta y se clasificaron de acuerdo a su calibre en patatas comerciales, de calibre igual o superior a 40 mm, y patatas no comerciales, de calibre inferior a 40 mm (BOE n° 166, del 13-7-1983). En el cultivo de 2005 en cámaras abiertas, dentro del calibre comercial se distinguieron dos categorías: calibre igual o superior a 40 mm e inferior a 60 mm, y calibre igual o superior a 60 mm. Los calibres se determinaron utilizando mallas cuadradas de 40 y 60 mm de lado, respectivamente. En el caso de las plantas tratadas con protectores químicos, únicamente se seleccionaron los tubérculos de calibre comercial.

#### **6. Parámetros bioquímicos**

Las medidas de las actividades enzimáticas guaiacol peroxidasa (GPOD) y glutatión reductasa (GR), y de la concentración de clorofilas a y b se realizaron en hojas adultas recogidas cuando los cultivos habían alcanzado su madurez (17 de mayo de 2002 y 5 de mayo de 2004 para los cultivos en OTC, y 17 de mayo de 2002 y 29 de mayo de 2003 para los cultivos en campo). La recolección de muestras se realizó a las 12:00 h del mediodía, tomando hojas adultas de tamaño y edad similar. Las muestras se pesaron en el campo y se congelaron en nitrógeno líquido para su transporte hasta el laboratorio, donde fueron guardadas a -80 °C hasta su medida.



### 6.1- Actividad GPOD (Astorino *et al.*, 1995)

Se trituraron en mortero 100 mg de hoja utilizando nitrógeno líquido, 2.5 mL de tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 6.0, como tampón de extracción y 30 mg de PVPP. El homogenado se centrifugó a 15000 x g durante 20 minutos a 4 °C.

La mezcla de reacción contenía tampón de extracción, guaiacol 0.3 % (v/v), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM y 150 µL de sobrenadante del extracto enzimático en un volumen total de reacción de 3 mL. La actividad enzimática se midió siguiendo el aumento de la absorbancia a 470 nm ( $\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) durante la polimerización del guaiacol a tetraguaiacol.

### 6.2- Actividad GR (Jahnke *et al.*, 1991)

Se trituraron en mortero 90 mg de hoja utilizando nitrógeno líquido, 3 mL de tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 7.0, como tampón de extracción y 30 mg de PVPP. El homogenado se centrifugó a 15000 x g durante 20 minutos a 4 °C.

La mezcla de reacción estaba compuesta de tampón fosfato de potasio 80 mM, pH 7.8, DTPA 200 µM, NADPH 100 µM, glutatión oxidado 0.5 mM y 100 µL de sobrenadante del extracto enzimático en un volumen total de 2 mL. Se siguió la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la oxidación del NADPH a NADP<sup>+</sup> ( $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Se realizó una corrección para la oxidación del NADPH no dependiente de la GR; para ello se llevó a cabo la reacción sin incluir el glutatión oxidado en la mezcla, y su velocidad se restó a la reacción de la GR.

Los resultados de ambas actividades se expresan como unidades enzimáticas por gramo de peso fresco; una unidad enzimática es la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 µmol de sustrato por minuto.

### 6.3- Clorofilas a y b (Lichtenthaler, 1987)

La extracción de las clorofilas se realizó con acetona fría al 80%. Los extractos se centrifugaron a 10000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Las concentraciones de clorofila a y clorofila b se cuantificaron midiendo la absorbancia a 646, 664 y 750 nm, en base a los siguientes algoritmos:

- Clorofila a ( $\mu\text{g mL}^{-1}$  de extracto) =  $12.25 * (A_{664}) - 2.79 * (A_{646})$
- Clorofila b ( $\mu\text{g mL}^{-1}$  de extracto) =  $21.5 * (A_{646}) - 5.1 * (A_{664})$

La medida a 750 nm se utilizó para comprobar que los extractos no mostraban turbidez. La concentración de clorofilas se expresó como  $\mu\text{g mg}^{-1}$  de peso fresco.

Todas las medidas se realizaron en un espectrofotómetro de luz UV-visible Hewlett-Packard 8452A.

### **7. Análisis estadístico**

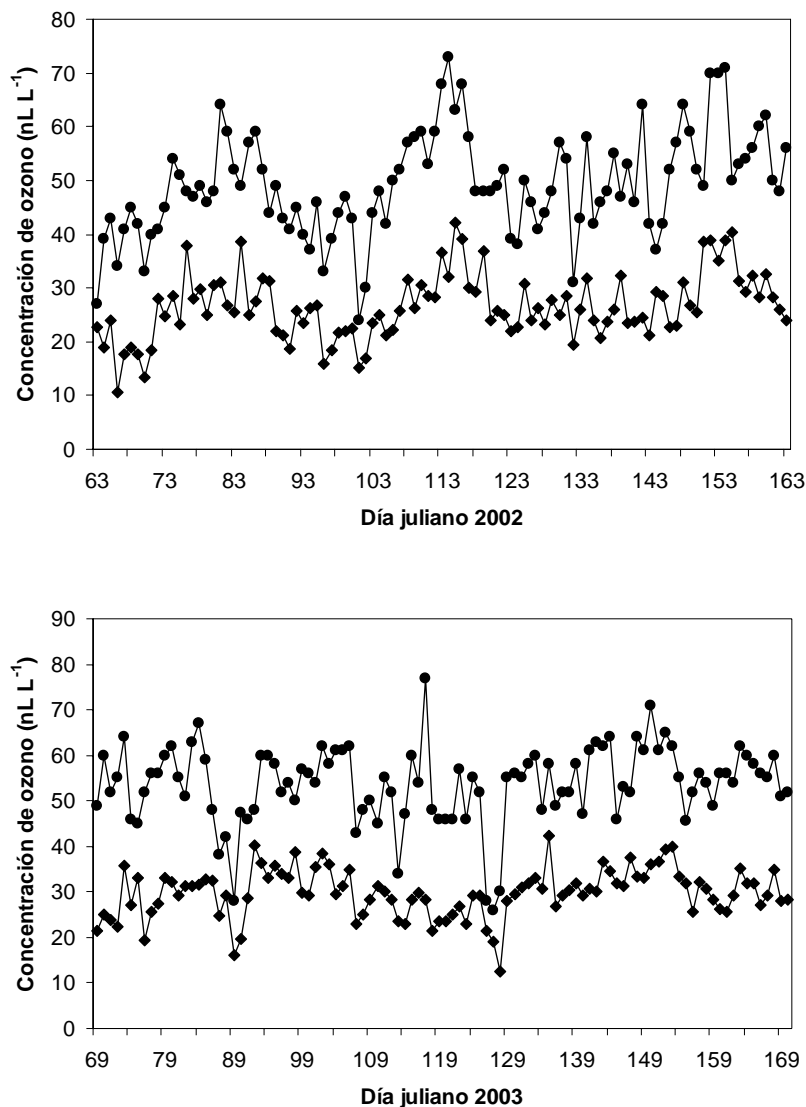
Los datos se analizaron con el programa estadístico SPSS v12.0. La comparación de medias se realizó mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney. Se consideró que las diferencias eran significativas con p-valores  $\leq 0.05$ .

## RESULTADOS

### 1. Datos ambientales

Los datos referentes a concentraciones de contaminantes ( $O_3$ ,  $NO$ ,  $NO_2$  y  $SO_2$ ) y variables meteorológicas en el interior de las cámaras abiertas se describen con detalle en el Capítulo 2.

Las concentraciones media y máxima diaria de ozono ambiental durante las dos épocas de cultivo en campo se muestran en la figura 1. La tendencia de la concentración de ozono fue típicamente estacional, con valores máximos durante los períodos cálidos y de alta radiación solar. En 2002 y



**Figura 1.** Concentraciones media ( $\diamond$ ) y máxima ( $\circ$ ) diaria (24-h) de ozono ( $nL L^{-1}$ ) durante el experimento en campo con patata en Carcaixent, Valencia. Se representa el período comprendido entre la emergencia de las plantas y la cosecha, del 4 de marzo al 13 de junio de 2002 y del 10 de marzo al 19 de junio de 2003.

2003 tuvieron lugar tres y dos episodios, respectivamente, con elevadas concentraciones de ozono, en los que las concentraciones máximas diarias superaron los 70 ppb. La media diaria de 32.5 ppb como límite de protección a la vegetación establecido en la anterior legislación (Real Decreto 1494/1995) se superó un 10% de los días del período entre la emergencia y la cosecha en 2002 y un 24% de los días en 2003; aunque este límite no se contempla en la nueva legislación (Real Decreto 1796/2003) se ha considerado para este estudio como indicador de los altos niveles de ozono experimentados por los cultivos. Las concentraciones medias de ozono de 7 horas (11:00-18:00 horas) y de 24 horas para el experimento completo, así como la exposición acumulada sobre los umbrales de 40 ppb entre las 8:00 y las 20:00 horas, cada día (AOT40) (Kärenlampi y Skärby, 1996), 50 ppb (AOT50) (Kostka-Rick y Manning, 1992), y la exposición acumulada sin umbral (AOT00) se muestran en la tabla 1.

Asimismo, las concentraciones ambientales de SO<sub>2</sub>, NO y NO<sub>2</sub> se midieron durante los dos períodos de cultivo. En el período de 2002, la concentración media diaria de SO<sub>2</sub> fue 0.98 ppb, la concentración de NO<sub>2</sub> fue bastante baja con una media de 5.56 ppb, y la concentración de NO tuvo una media muy baja, de 1.57 ppb. Las concentraciones medias diarias de SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> y NO en el período de 2003 fueron 0.96, 4.80 y 1.28 ppb, respectivamente.

**Tabla 1.** Concentración media diaria de ozono (24-h) y para 7 horas al día (11:00-18:00 h), y exposición acumulada sobre diferentes umbrales de concentración de ozono, 40 ppb (AOT40), 50 ppb (AOT50), y sin umbral (AOT00). Datos referidos al período emergencia-cosecha de cada cultivo (4 de marzo-13 de junio de 2002 y 10 de marzo-19 de junio de 2003). (\*)AOT40 máximo para un período de 3 meses entre la emergencia y la cosecha (13 de marzo-13 de junio del 2002 y 19 de marzo-19 de junio del 2003), según la definición de nivel crítico (Kärenlampi y Skärby, 1996).

Índice de exposición	Concentración de ozono	
	2002	2003
24-h	26.46 ppb	29.97 ppb
7-h	43.58 ppb	45.91 ppb
AOT00	52713 ppb.h	60973 ppb.h
AOT40	4137 ppb.h	6856 ppb.h
AOT40 <sup>(*)</sup>	4103 ppb.h	6462 ppb.h
AOT50	1209 ppb.h	1746 ppb.h

En la tabla 2 se presentan las condiciones meteorológicas durante los dos períodos de cultivo; se observa que ambos años son muy parecidos, con temperatura y radiación solar ligeramente superiores en el 2003.

**Tabla 2.** Condiciones meteorológicas: temperatura, humedad relativa y radiación solar (mínimas, medias y máximas) en la estación experimental de Carcaixent para los dos períodos de cultivo en campo en 2002 y 2003.

	4 Marzo-13 Junio 2002			10 Marzo-19 Junio 2003		
	Min	Media	Max	Min	Media	Max
<b>Temperatura (°C)</b>	10.4	16.8	24.2	11.1	17.7	25.5
<b>Humedad relativa (%)</b>	44.6	75.8	99.9	44.6	75.8	99.9
<b>Radiación solar (W m<sup>-2</sup>)</b>	102.6	313.5	869.8	109.4	326.5	904.2

## 2. Concentración de clorofilas

La concentración de clorofilas (Chl) a y b disminuyó alrededor de un 30 % en las cámaras NF, y un 40 % en las cámaras NF<sup>+</sup> respecto a las CF. En las cámaras NF y NF<sup>+</sup>, la disminución tanto de Chl a como de Chl b respecto a las cámaras CF fue significativa (datos no mostrados). El cociente Chl a / Chl b fue similar en los tres tipos de cámara.

El efecto de los tratamientos con DPA y citrulina sobre el contenido en clorofilas se presenta en las tablas 3A y 3B. La concentración de Chl a y Chl b experimentó en general un ligero aumento en las plantas tratadas con DPA; este aumento no fue significativo, excepto en el caso de la Chl a en plantas tratadas con DPA 100 mM en el cultivo de 2002. En las plantas tratadas con citrulina se observó un aumento las concentraciones tanto de Chl a como de Chl b; este aumento fue significativo en la mayoría de los casos. El incremento fue mayor en la Chl b, lo cual se refleja en la disminución del cociente entre la Chl a y la Chl b.

**Tablas 3A y 3B.** Concentración de clorofilas a y b (Chl a y Chl b, respectivamente) en  $\mu\text{g mg}^{-1}$  de peso fresco en hojas de patata tratada con DPA (3A) en los dos años de cultivo (2002 y 2003) y con citrulina (3B) en el cultivo de 2003. Se presenta la media y su desviación típica ( $n=5$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo parámetro ( $p \leq 0.05$ ); nd: no determinado.

**3A**

Tratamiento	2002			2003		
	Chl a	Chl b	Chl a / Chl b	Chl a	Chl b	Chl a / Chl b
Control	$0.63 \pm 0.21a$	$0.29 \pm 0.06a$	$2.14 \pm 0.55a$	$0.81 \pm 0.08ab$	$0.27 \pm 0.03a$	$3.00 \pm 0.11a$
DPA 100 mM	$0.87 \pm 0.15b$	$0.33 \pm 0.03a$	$2.64 \pm 0.26b$	$0.78 \pm 0.07a$	$0.26 \pm 0.04a$	$3.01 \pm 0.26a$
DPA 200 mM	$0.65 \pm 0.13a$	$0.32 \pm 0.07a$	$2.08 \pm 0.42a$	$0.91 \pm 0.08b$	$0.29 \pm 0.03a$	$3.17 \pm 0.13a$
DPA 300 mM	nd	nd	nd	$0.97 \pm 0.21ab$	$0.31 \pm 0.07a$	$3.14 \pm 0.08a$

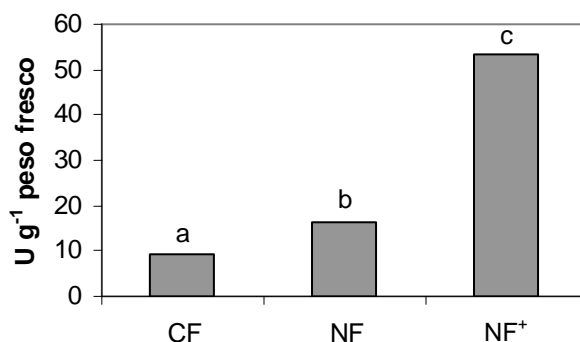
**3B**

Tratamiento	Chl a	Chl b	Chl a / Chl b
Control	$0.71 \pm 0.13a$	$0.22 \pm 0.05a$	$3.26 \pm 0.14a$
Citrulina 50 mM	$0.97 \pm 0.07b$	$0.34 \pm 0.04b$	$2.87 \pm 0.11b$
Citrulina 100 mM	$0.84 \pm 0.10a$	$0.30 \pm 0.06b$	$2.86 \pm 0.37ab$
Citrulina 200 mM	$1.01 \pm 0.17b$	$0.35 \pm 0.07b$	$2.89 \pm 0.20b$

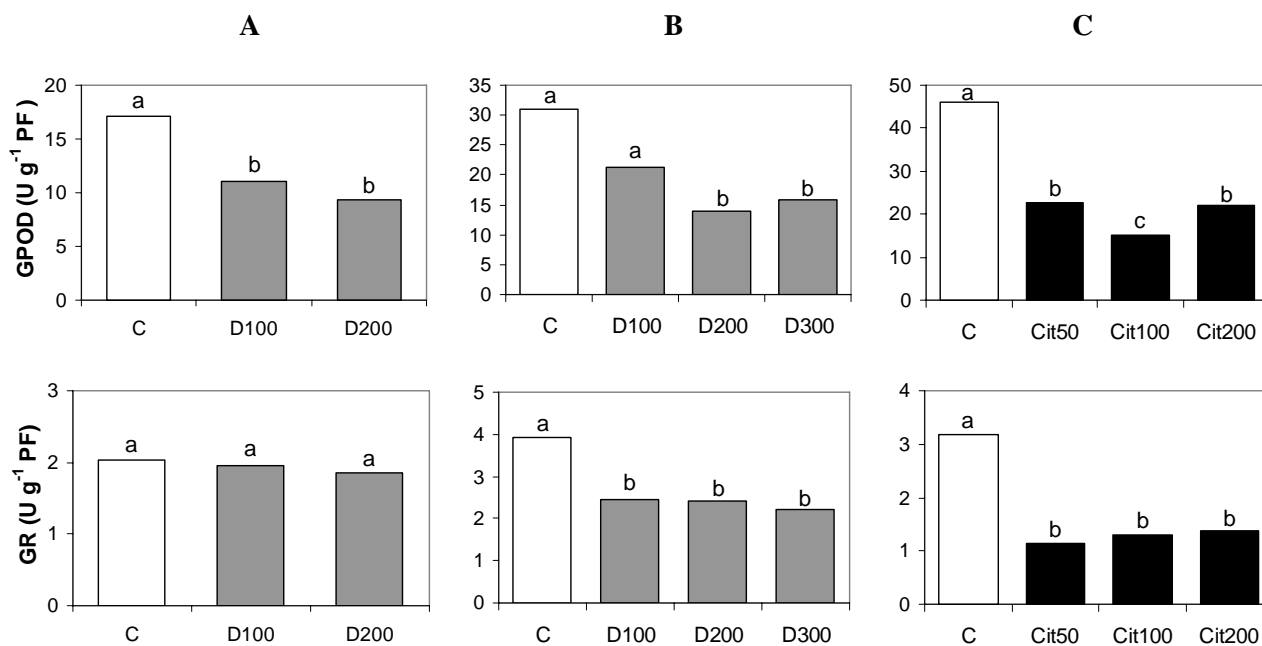
### 3. Actividades enzimáticas

En las cámaras abiertas, se encontró un aumento de la actividad guaiacol peroxidasa (GPOD) en las cámaras NF y NF<sup>+</sup> respecto a las cámaras CF: esta actividad aumentó un 76% en las cámaras NF y un 482% en las cámaras NF<sup>+</sup>, respecto a las cámaras CF; es decir, el aumento de esta actividad enzimática fue mayor en las cámaras con las concentraciones de ozono más altas. Las diferencias fueron estadísticamente significativas entre los tres tipos de cámaras (figura 2).

Las actividades enzimáticas GPOD y GR en plantas tratadas con DPA y citrulina se muestran en la figura 3. La actividad GPOD disminuyó significativamente tanto en plantas tratadas con DPA (disminución en torno a un 30% en la concentración 100 mM y alrededor de un 50% en las concentraciones 200 y 300 mM) como en plantas tratadas con citrulina (52-67%). Aunque el tratamiento con DPA en el cultivo del 2002 no afectó significativamente a la actividad GR, en el cultivo de 2003 dicha actividad disminuyó marcadamente con los tratamientos de DPA (alrededor de un 40% en las tres concentraciones aplicadas) y citrulina (alrededor de un 60% en las tres concentraciones).



**Figura 2.** Actividad enzimática guaiacol peroxidasa en hojas de patata crecida en cámaras con aire filtrado de ozono (CF), aire ambiental no filtrado (NF) y aire fumigado con ozono (NF<sup>+</sup>). Los valores son medias para n=6. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ).

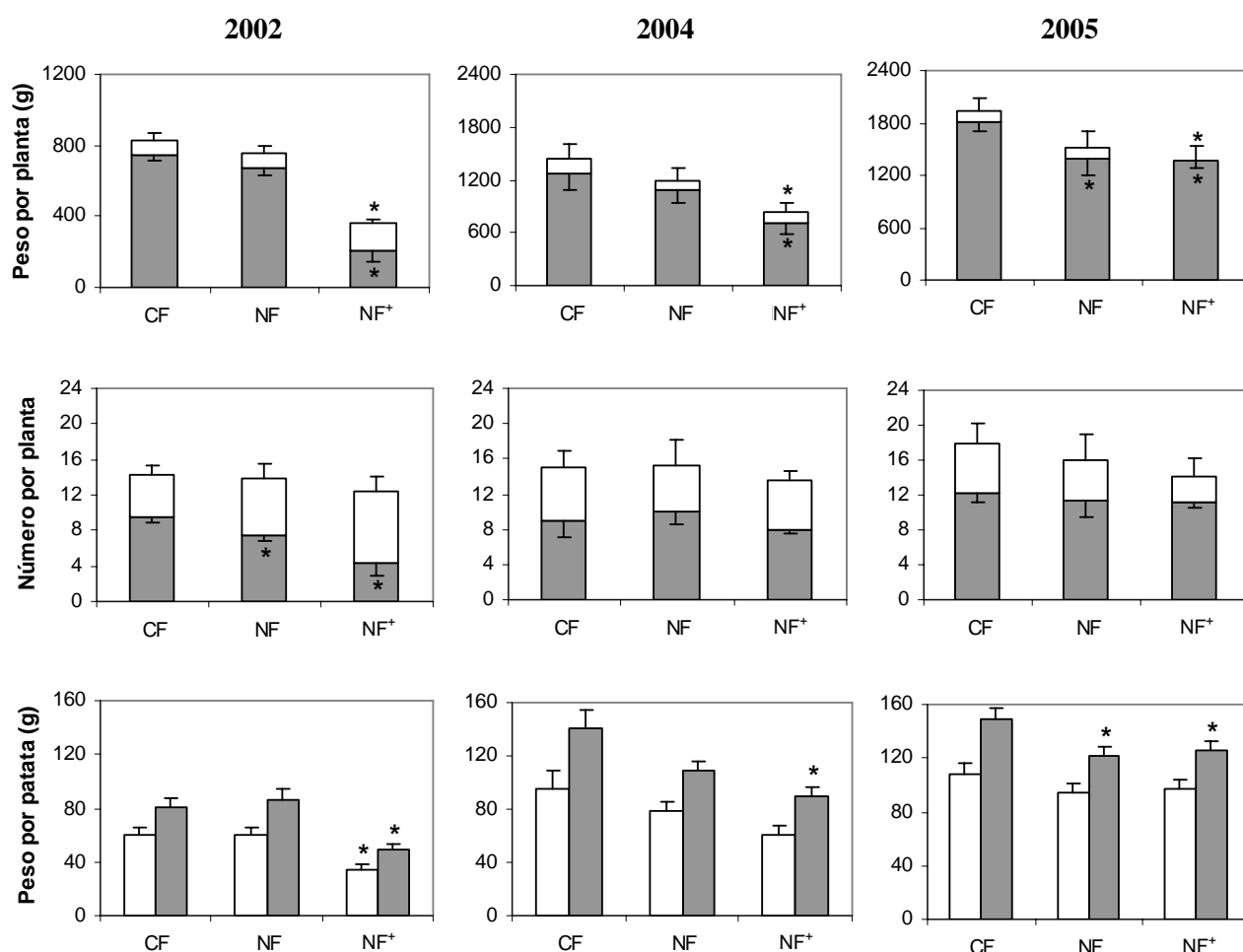


**Figura 3.** Actividades guaiacol peroxidasa (GPOD) y glutatión reductasa (GR) expresadas en unidades enzimáticas por gramo de peso fresco en hojas de patata tratada con DPA en los años 2002 (columna A) y 2003 (columna B), y con citrulina en el año 2003 (columna C). Las actividades enzimáticas están expresadas como unidades por gramo de peso fresco. Los símbolos C, D100, D200, D300 indican respectivamente los tratamientos control, DPA 100, 200 y 300 mM; Cit50, Cit100 y Cit200 representan los tratamientos citrulina 50, 100 y 200 mM, respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ,  $n = 5$ ).

## 4. Rendimiento agrícola

### 4.1- Rendimiento agrícola en cámaras abiertas

En la figura 4 se muestra el rendimiento agrícola medido en las cámaras abiertas durante los años 2002, 2004 y 2005. El peso de las patatas por planta, tanto del total de patatas como únicamente de las patatas comerciales, disminuyó significativamente en el tratamiento NF<sup>+</sup> los tres años de cultivo. La disminución del peso de las patatas por planta en las cámaras NF fue menor que en las cámaras NF<sup>+</sup>, encontrándose una disminución significativa únicamente en las patatas de calibre comercial del cultivo de 2005. La disminución del rendimiento observada en las patatas de calibre comercial se debió principalmente a la reducción del peso por patata, aunque en el cultivo de 2002 también se



**Figura 4.** Rendimiento agrícola de la patata crecida en el interior de las cámaras abiertas (CF: cámaras con aire filtrado, NF: cámaras con aire ambiental, NF<sup>+</sup>: cámaras con aire ambiental enriquecido con ozono) para los cultivos de 2002 (1ª columna), 2004 (2ª columna) y 2005 (3ª columna). Las barras blancas representan todas las patatas, y las barras grises representan las patatas de calibre comercial (calibre  $\geq 40$  mm). Se presentan las medias con su error típico; los asteriscos indican diferencias significativas con el tratamiento CF ( $p \leq 0.05$ ).

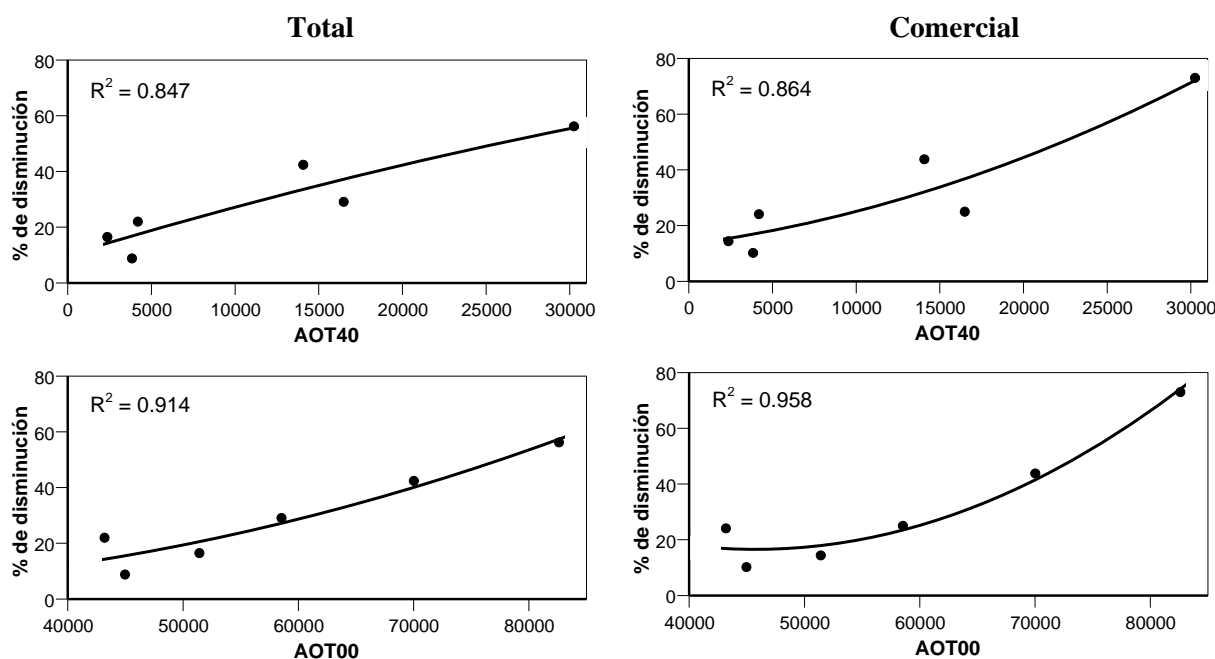


encontró una disminución en el número de patatas comerciales por planta. En el cultivo del año 2005 se observó que la disminución del peso por patata era debida a una disminución significativa en el número de patatas de mayor calibre ( $\geq 60$  mm), tanto en cámaras NF como en cámaras NF<sup>+</sup> (datos no mostrados).

El porcentaje de disminución del rendimiento agrícola (peso de las patatas por planta) en las plantas expuestas a ozono respecto a las plantas de las cámaras filtradas varió de un cultivo a otro (tabla 4). La relación entre la disminución del rendimiento respecto al control y la dosis de ozono acumulada recibida por las plantas (AOT40 y AOT00) en los tratamientos NF y NF<sup>+</sup> se estudió mediante regresión por el método de los mínimos cuadrados (figura 5). El mejor ajuste fue un polinomio de grado 2 en todos los casos ( $p < 0.01$ ). El mayor coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se obtuvo para el ajuste entre la disminución del rendimiento comercial y el AOT00.

**Tabla 4.** Porcentaje de disminución del peso de las patatas por planta en los tratamientos NF y NF<sup>+</sup> respecto al tratamiento CF (abreviaturas de los tratamientos como en la figura 4). Se indica la disminución para todas las patatas y para las patatas con calibre comercial ( $\geq 40$  mm), en los tres años de cultivo en cámaras abiertas.

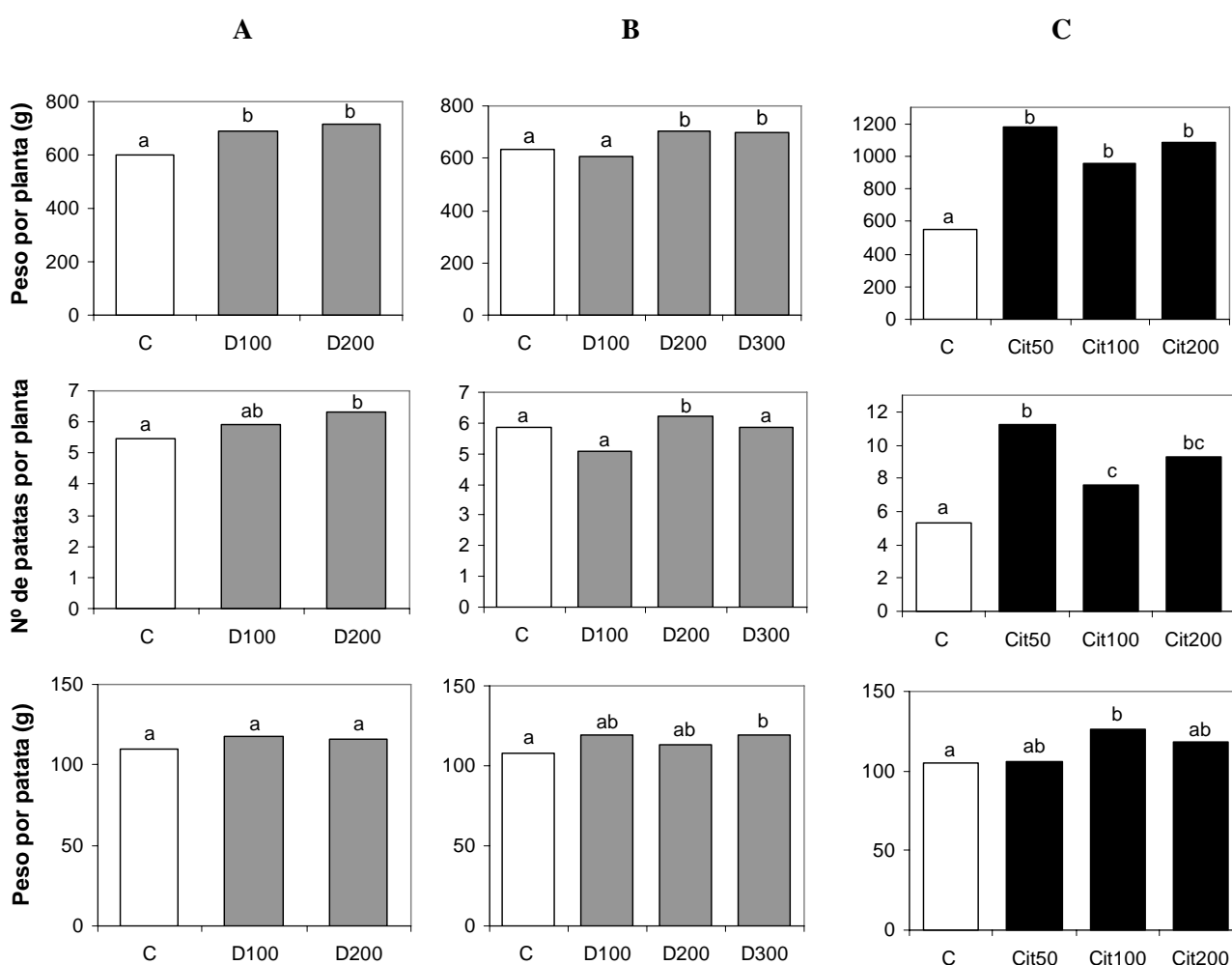
	2002		2004		2005	
	Total	Comercial	Total	Comercial	Total	Comercial
NF	8.8	10.22	16.46	14.45	22.04	24.07
NF <sup>+</sup>	56.2	73.04	42.39	43.78	29.10	24.95



**Figura 5.** Relación entre el porcentaje de disminución del peso de las patatas por planta en los tratamientos NF y NF<sup>+</sup> respecto al tratamiento CF (datos de la tabla 4) y la exposición a ozono acumulada (AOT40 y AOT00) entre la emergencia y la cosecha para los tres cultivos en cámaras abiertas. Se muestra la relación para todas las patatas (columna izquierda) y para las patatas de calibre  $\geq 40$  mm (columna derecha).

### 4.2- Rendimiento agrícola en campo

Los resultados del rendimiento comercial en plantas tratadas con DPA y citrulina se recogen en la figura 6. El tratamiento con DPA 200 mM causó un aumento significativo del peso de las patatas por planta tanto en el 2002 como en el 2003 (aumento del 20 y 11.6%, respectivamente). El efecto producido por el tratamiento con DPA 300 mM en el año 2003 fue similar al efecto del DPA 200 mM. El DPA 100 mM también provocó un aumento de la producción en el año 2002 (15.4%). La citrulina produjo un aumento importante en el peso de las patatas por planta (73-113% según la concentración aplicada), siendo la concentración 50 mM la que causó un mayor estímulo.



**Figura 6.** Efecto del DPA (columna A, cultivo del 2002; columna B, cultivo del 2003) y de la citrulina (columna C, cultivo del 2003) sobre el rendimiento de la patata medido como peso fresco de las patatas por planta, número de patatas por planta y peso por patata, para patatas de calibre comercial ( $\geq 40$  mm). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). Abreviaturas de los tratamientos al igual que se ha indicado en la figura 3.

No se encontró un efecto claro del DPA sobre el número de patatas por planta o sobre el peso por patata: el tratamiento 200 mM afectó principalmente al número de patatas por planta, mientras que la concentración 300 mM hizo aumentar el peso por patata. La citrulina afectó sobre todo al número de patatas por planta, causando un aumento en todas las concentraciones aplicadas; el peso por patata aumentó significativamente en la concentración 100 mM.

## DISCUSIÓN

Las concentraciones de ozono excedieron el nivel crítico de AOT40 establecido en 3000 ppb.h como máximo acumulado durante 3 meses para la protección de cultivos agrícolas (Kärenlampi y Skärby, 1996) en los años 2002 y 2005 en las cámaras NF. En las cámaras NF<sup>+</sup>, este umbral se superó ampliamente durante los tres años de cultivo. La concentración de ozono en las cámaras de aire filtrado fue relativamente baja. En el campo, el nivel crítico de AOT40 fue superado en los dos períodos de crecimiento de las plantas, y por tanto los valores de ozono ambientales fueron lo suficientemente elevados como para causar daños en los cultivos de patata.

Las concentraciones de SO<sub>2</sub>, NO y NO<sub>2</sub> tanto en las cámaras abiertas como en el aire ambiental estuvieron por debajo del umbral de daños conocido para las especies sensibles a estos agentes, tanto en el interior de las cámaras abiertas como en el ambiente. Las concentraciones de dióxido de azufre fueron muy bajas, justo por encima del límite de detección. Las concentraciones de óxidos de nitrógeno se mantuvieron muy por debajo del nivel crítico de 30 ppb durante ambos períodos de cultivo. Según Darrall (1989), no sería esperable un efecto sinérgico entre unas concentraciones tan bajas de SO<sub>2</sub>, NO y NO<sub>2</sub>, y el ozono. Por lo tanto, el ozono fue el único contaminante atmosférico en este estudio.

La concentración de Chl a y Chl b en las plantas expuestas a ozono en las cámaras NF y NF<sup>+</sup> disminuyó respecto al control; esta disminución fue mayor a mayores dosis de ozono (tratamiento NF<sup>+</sup>). La disminución en la concentración de clorofilas por efecto del ozono está ampliamente documentada (Knudson *et al.*, 1977; Heagle *et al.*, 1998; Lorenzini *et al.*, 1999; Bindi *et al.*, 2002). Knudson *et al.* (1977) observaron una disminución del cociente Chl a / Chl b a causa del ozono. Sin embargo, en el presente capítulo no se encontraron variaciones en este cociente, lo que indica que ambos tipos de clorofila fueron afectados por igual. La disminución en la concentración de clorofilas podría ser una de las causas del menor rendimiento agrícola encontrado en las plantas expuestas a ozono.

No se encontraron diferencias significativas en el contenido en clorofilas entre las plantas control y las tratadas con DPA; estos resultados sugieren que la protección del DPA no está relacionada con una retención general de las clorofilas. En cambio, la citrulina produjo un aumento significativo en la concentración de Chl a y, en mayor proporción, en la concentración de Chl b; la clorofila b se encuentra en los complejos captadores de luz solar, principalmente en el complejo

asociado al fotosistema II (Govindjee *et al.*, 1986). El efecto de la citrulina puede estar asociado a la protección del fotosistema II.

La actividad guaiacol peroxidasa, presente en muchos compartimentos celulares, es un buen indicador de una situación de estrés (Scalet *et al.*, 1995; MacFarlane y Burchett, 2001). El aumento de la actividad guaiacol peroxidasa en las cámaras NF y, en mayor medida, en las cámaras NF<sup>+</sup> respecto a las cámaras CF muestra que el ozono produce un aumento de peróxido de hidrógeno en las plantas, lo que indica un estrés oxidativo. Existen numerosos estudios que describen un aumento en la actividad de diversas enzimas antioxidantes como consecuencia de la exposición de las plantas al ozono (Kangasjärvi *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 1996; Ranieri *et al.*, 1996; Rao y Davis, 1999). Por ejemplo, los niveles de actividad ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa en guisante expuesto a ozono fueron aproximadamente el doble de los encontrados en plantas control (Mehlhorn *et al.*, 1987); la actividad guaiacol peroxidasa en plantas fumigadas con 48 ppb de ozono durante un mes fue 4 veces mayor que en plantas control (Astorino *et al.*, 1995).

Lee y Bennett (1982) encontraron que el aumento en la tolerancia al ozono en judía verde tratada con EDU siempre se correlacionaba con un incremento en la actividad guaiacol peroxidasa. Dos modernos fungicidas, azoxistrobina y epoxiconazole, aplicados como spray foliar sobre cebada previamente a la fumigación con ozono, indujeron protección frente a los daños foliares mediante un aumento significativo de las actividades GPOD y GR (Wun y Von Tiedermann, 2002). Por el contrario, en el presente estudio, el efecto beneficioso del DPA y de la citrulina sobre el rendimiento agrícola puede estar relacionado con la disminución en las actividades GPOD y GR en hojas de patata. Esta divergencia en la respuesta enzimática indicaría diferencias entre el mecanismo de acción de los protectores aplicados en este estudio y el EDU o los fungicidas. La disminución de la actividad guaiacol peroxidasa sugiere que tanto el DPA como la citrulina estarían relacionados con una disminución en la producción de peróxido de hidrógeno. La disminución en la actividad glutatión reductasa podría reflejar una menor oxidación del glutatión, debido a una menor producción de peróxido de hidrógeno u otras especies reactivas del oxígeno.

La exposición a ozono de las plantas de patata durante todo su ciclo de cultivo da lugar a una disminución del rendimiento agrícola. Los resultados sugieren que esta disminución es debida principalmente a que las patatas no alcanzan su tamaño potencial; por este motivo, disminuye la producción de mayor calibre. La disminución del rendimiento de las patatas de calibre comercial puede tener importantes repercusiones económicas. Clarke *et al.* (1990) observaron pérdidas de un

30% en el rendimiento de cultivos de patata en EE.UU. causadas por el ozono ambiental. Craigon *et al.* (2002) han descrito una reducción en el rendimiento agrícola de un 5% de media en patata variedad Bintje cultivada en cámaras NF en diferentes lugares de Europa. La cuantía de la disminución encontrada en el presente estudio está estrechamente relacionada con la dosis de ozono acumulada recibida por el cultivo. Las variables para las que se encontró un mejor ajuste fueron la disminución en el rendimiento comercial en relación al AOT00; esto indica que no sólo las concentraciones de ozono superiores a 40 ppb, sino todo el ozono que recibe la planta durante su cultivo, afecta negativamente a la patata variedad Agria. Las concentraciones ambientales de ozono tienden a causar una disminución en el rendimiento agrícola en todos los cultivos realizados; la ausencia de diferencias significativas con el control podría deberse a que el número de plantas que pueden crecer en el interior de las cámaras es muy escaso, y el coeficiente de variación de los datos es muy alto (15% - 32%). Además, las condiciones microclimáticas dentro de las cámaras son diferentes a las condiciones ambientales: la temperatura es entre 3 y 5 °C superior, la intensidad de la radiación solar es aproximadamente un 15% inferior y la humedad relativa es ligeramente inferior en el interior de las cámaras respecto al ambiente. Estas condiciones podrían mitigar el efecto del ozono sobre el rendimiento agrícola y explicar en parte la ausencia de diferencias significativas a concentraciones de ozono ambientales en las cámaras abiertas. El rendimiento agrícola de las plantas crecidas en el campo fue menor que en las cámaras NF en el año 2002 (datos no mostrados). Un resultado similar se encontró en avena crecida en cámaras abiertas y en el condiciones ambientales: la disminución (respecto a las cámaras filtradas) del peso de las semillas fue mayor en condiciones ambientales que en las cámaras no filtradas, y se encontraron diferencias significativas únicamente en las condiciones ambientales (Carrasco-Rodríguez, 2000). Además, la exposición acumulada a ozono del cultivo en el campo suele ser mayor que en el interior de las cámaras NF porque la duración del cultivo es algo superior (8.6% y 6.5% más días en campo que en OTC desde la emergencia hasta la cosecha en 2002 y 2004 respectivamente, datos de 2004 en campo no mostrados). Por lo tanto, el efecto del ozono ambiental sobre el rendimiento agrícola de la patata en condiciones de campo posiblemente sea superior al encontrado en cámaras abiertas, aunque la confirmación de esta hipótesis requiere un estudio en mayor profundidad. Las OTC son un buen método para el estudio de la relación dosis-respuesta (Manning y Krupa, 1992). Sin embargo, la extrapolación de la disminución en el rendimiento agrícola encontrada en las OTC a las condiciones ambientales es problemática; el rendimiento en campo puede ser mayor (sobre todo debido a problemas de polinización en el interior de las cámaras), menor o igual que en las cámaras abiertas según el cultivo, y estas relaciones pueden variar de un año a otro (Heagle, 1989).

El objetivo del experimento con DPA y citrulina fue determinar si estos compuestos podían proporcionar una protección frente a la disminución en la producción agrícola como consecuencia de una exposición al ozono durante toda la etapa del cultivo. La difenilamina causó un aumento del rendimiento agrícola de entre un 11 y un 20%; probablemente las diferentes condiciones meteorológicas y una variación en la concentración de ozono de un año a otro sean las principales causas de esta diferencia en el rendimiento de ambos años. El aumento en el rendimiento de la patata debido a la aplicación de citrulina fue mucho mayor (73-113%). La explicación más sencilla para el aumento en el rendimiento agrícola es que el DPA y, en mayor medida, la citrulina, protegen a las plantas frente a los daños por ozono. Hasta la fecha existen pocos estudios acerca de la protección química de los tratamientos con DPA (Walker, 1967; Elfving *et al.*, 1976). Elfving *et al.* (1976) encontraron una importante prevención del daño foliar visible e histológico. En dicho estudio, las plantas fueron expuestas durante un corto período a concentraciones muy elevadas de ozono. No se han encontrado otros estudios sobre la aplicación de citrulina en plantas expuestas a ozono.

Además de las conocidas propiedades antioxidantes del DPA, este compuesto posee otras características químicas interesantes. Trebst *et al.* (2002) han demostrado que el DPA protege a las plantas frente a la fotoinhibición; esta protección parece estar asociada a la capacidad del DPA para eliminar el oxígeno singlete. El oxígeno singlete es considerado un intermediario de la fotoinhibición (Styring y Jegersschöld, 1994), aunque puede participar en otros procesos dañinos para la planta. Las especies químicas capaces de eliminar el oxígeno singlete protegen a la proteína D1 de la degradación y mantienen la estructura y función del PSII a altas intensidades de luz (Kanofsky y Sima, 1995). El O<sub>3</sub> ambiental provoca fotoinhibición en avena (Carrasco-Rodríguez y Del Valle-Tascón, 2001). En consecuencia, la protección del DPA podría estar asociada al mantenimiento de la estructura y función del PSII. No se encontraron diferencias significativas entre las plantas control y las tratadas con DPA con respecto al contenido en clorofilas; estos resultados experimentales sugieren que la protección del DPA no es consecuencia de una retención general de estos pigmentos.

La citrulina es un potente eliminador del radical hidroxilo, aunque esta característica se ha observado en un solo trabajo (Takahara *et al.*, 2006). La citrulina se acumula en la sandía salvaje en condiciones de estrés hídrico y estrés lumínico. También se ha observado que la concentración de citrulina se triplica en acículas de pino expuesto a lluvia ácida de pH 3 (Shumejko *et al.*, 1996). Se ha estimado que la concentración de citrulina en las hojas de sandía salvaje en condiciones de estrés

hídrico podría ser hasta 200 mM (Akashi *et al.*, 2001); estos autores han demostrado que la citrulina evita la rotura del DNA y la inactivación de enzimas como la piruvato kinasa por acción del radical hidroxilo. Además, la citrulina en altas concentraciones (hasta 600 mM) es compatible con enzimas metabólicos como malato deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa. El mecanismo de acción de la citrulina en las plantas de patata se desconoce todavía. La eliminación de especies reactivas del oxígeno, o la prevención de su formación, son las hipótesis de trabajo más probables. Su mecanismo protector podría estar relacionado con su capacidad de eliminar los radicales hidroxilo. El hidroxilo se forma a partir de  $H_2O_2$  mediante la reacción de Fenton (ver Capítulo 1); la eliminación del radical hidroxilo estimularía la reacción de Fenton de manera que el  $H_2O_2$  tendería también a disminuir. Por otra parte, si la citrulina puede eliminar el radical hidroxilo, posiblemente podría eliminar otros radicales libres como el superóxido; el superóxido da lugar a  $H_2O_2$  por dismutación, de manera que una disminución del radical superóxido daría lugar a una disminución en la producción de  $H_2O_2$ .

Este estudio en patata ha demostrado que el DPA y, en mayor medida, la citrulina, pueden proporcionar protección frente a la reducción en el rendimiento agrícola causado por ozono, y que ambos protectores pueden ser utilizados en experimentos en campo. La protección de ambos agentes químicos parece estar basada en una disminución del estrés oxidativo; por este motivo, el DPA y la citrulina podrían proporcionar una protección general frente a otros estreses ambientales que causan un estrés oxidativo.

La utilización de protectores químicos para el estudio de los mecanismos de acción del ozono en cultivos agrícolas tiene las ventajas de ser una técnica más barata y sencilla que las cámaras abiertas. A pesar de las ventajas, la aplicación de DPA tiene algunos inconvenientes, como la baja solubilidad en agua. La citrulina no tiene tantos problemas como el DPA y su efecto sobre el rendimiento agrícola es mayor. La aplicación de DPA y citrulina debería ser evaluada en una variedad de plantas con importancia económica para valorar su efectividad como herramienta en la determinación de los efectos de los daños oxidativos sobre el rendimiento en plantas.



## **CONCLUSIONES**

En conclusión, la exposición de patata variedad Agria a ozono durante todo su período de cultivo provoca una disminución en la concentración de clorofilas a y b, un aumento en la actividad guaiacol peroxidasa y una disminución en el rendimiento agrícola. La disminución en el rendimiento agrícola afecta tanto a la producción total como a la producción de calibre comercial, y está relacionada con la exposición acumulada a ozono durante el período de cultivo, especialmente con el AOT00. Las limitaciones de espacio en las cámaras abiertas y la diferencia entre las condiciones en el interior de las cámaras y el exterior indican que es necesaria una revisión crítica de la utilización de las cámaras abiertas como método para cuantificar la disminución del rendimiento agrícola en condiciones ambientales.

Los tratamientos con DPA y, en mayor medida, con citrulina, estimulan el rendimiento en las patatas de calibre comercial. Dosis efectivas de ambos protectores químicos producen una disminución en las actividades enzimáticas antioxidantes guaiacol peroxidasa y glutatión reductasa. Esto sugiere que tanto la citrulina como el DPA producen la disminución de las especies reactivas del oxígeno. El tratamiento con citrulina aumenta la concentración de clorofilas a y b. El DPA y la citrulina tienen un efecto protector frente a la acción del ozono en las plantas. Ambos protectores químicos tienen una utilidad potencial para el estudio de los mecanismos de acción del ozono en cultivos agrícolas.



- CAPÍTULO 4 -

EFECTO DEL OZONO SOBRE EL GLUTATIÓN



## **RESUMEN**

Se ha estudiado el efecto de la exposición crónica a ozono de plantas de patata sobre la concentración de glutatión en hojas. Las plantas se han desarrollado durante todo su período de cultivo en el interior de cámaras abiertas, donde han sido expuestas a aire filtrado de ozono (CF), aire ambiental (NF) y aire ambiental enriquecido con ozono (NF<sup>+</sup>). La concentración de glutatión total, glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) aumentó significativamente en el tratamiento NF<sup>+</sup> (74%, 75% y 59% de aumento, respectivamente); el 97% del glutatión se encontraba reducido en los tres tipos de cámaras, aunque se encontró una tendencia al aumento (no significativo) de la relación GSH/GSSG con la concentración de ozono. Estos resultados indican que las plantas expuestas a ozono aumentan la capacidad amortiguadora del glutatión frente al estrés oxidativo. La expresión de la enzima  $\gamma$ -glutamilcistein sintetasa ( $\gamma$ -GCS) fue 2.5 y 3.3 veces superior al control en las cámaras NF y NF<sup>+</sup>, respectivamente, indicando que la síntesis de esta enzima está implicada en el aumento de los niveles de GSH. La actividad enzimática glutatión reductasa (GR) no fue afectada por la exposición a ozono.

## INTRODUCCIÓN

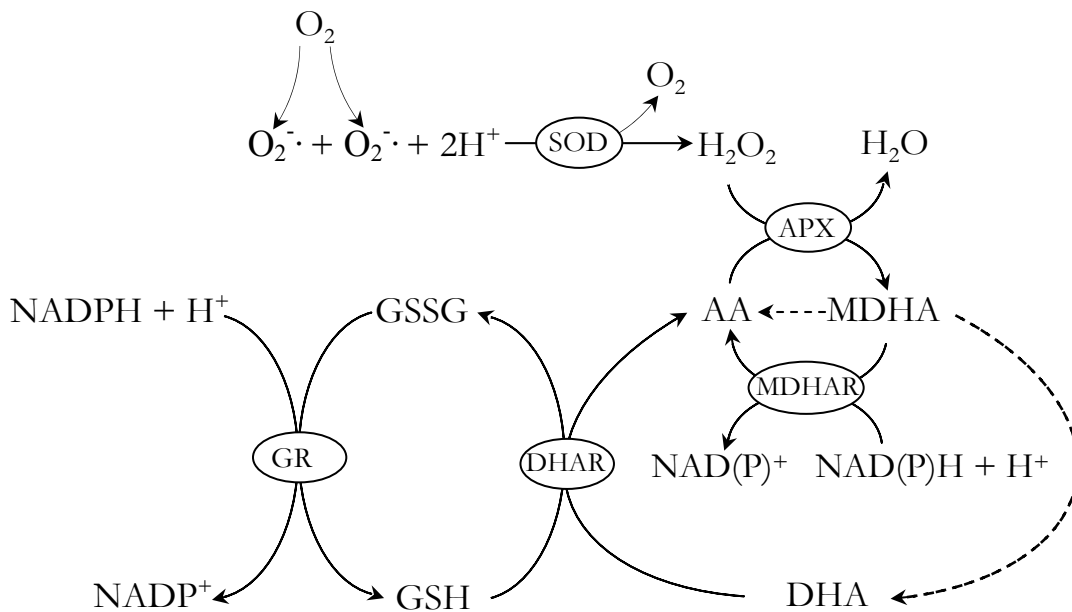
El glutatión es un antioxidante clave para la célula (Noctor y Foyer, 1998). El glutatión se puede encontrar bajo dos formas intercambiables, reducida y oxidada; la forma reducida (GSH) es el tripéptido  $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina; cuando el grupo tiol de la cisteína se oxida, dos de estas moléculas se unen mediante un puente disulfuro, formando el glutatión oxidado (GSSG). Cuando el GSH es oxidado a GSSG, éste es reducido de nuevo a GSH mediante la enzima glutatión reductasa (GR), de manera que, en condiciones normales, más del 95% del pool de glutatión se encuentra reducido (Foyer *et al.*, 2001). El glutatión reducido puede eliminar directamente radicales libres (Kalyanaraman *et al.*, 1996) o actuar como sustrato de las glutatión peroxidasas (GPX) y las glutatión S-transferasas (GSTs) para la detoxificación del peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos lipídicos (Ursini *et al.*, 1995). El glutatión también participa en la detoxificación del peróxido de hidrógeno a través del ciclo del ascorbato-glutatión, también conocido como ciclo de Halliwell-Asada (Halliwell y Gutteridge, 1989; Asada, 1994), y que se describe en la figura I. El ciclo del ascorbato-glutatión tiene lugar en casi todos los compartimentos celulares (citosol, cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y apoplasto), lo cual sugiere que tiene una función crucial en el control de las especies reactivas del oxígeno. Cabe destacar que, además de su función como antioxidante, el glutatión reducido interviene en otros mecanismos protectores para la célula: por una parte, la conjugación del glutatión con moléculas electrofílicas por la acción de las GSTs es fundamental para la detoxificación de compuestos xenobióticos (Edwards *et al.*, 2000); por otra, es el precursor de las fitoquelatinas (polímeros de  $\gamma$ -Glu-Cys), que son quelantes de metales pesados, facilitando su almacenamiento en la vacuola (Salt y Rauser, 1995; Cobbett, 1999).

Otra función fisiológica del glutatión es su participación en el metabolismo del azufre. El GSH constituye la mayor reserva no proteica de azufre reducido en plantas (Foyer *et al.*, 2001), y regula la incorporación de azufre en las raíces (Herschbach y Rennenberg, 1994).

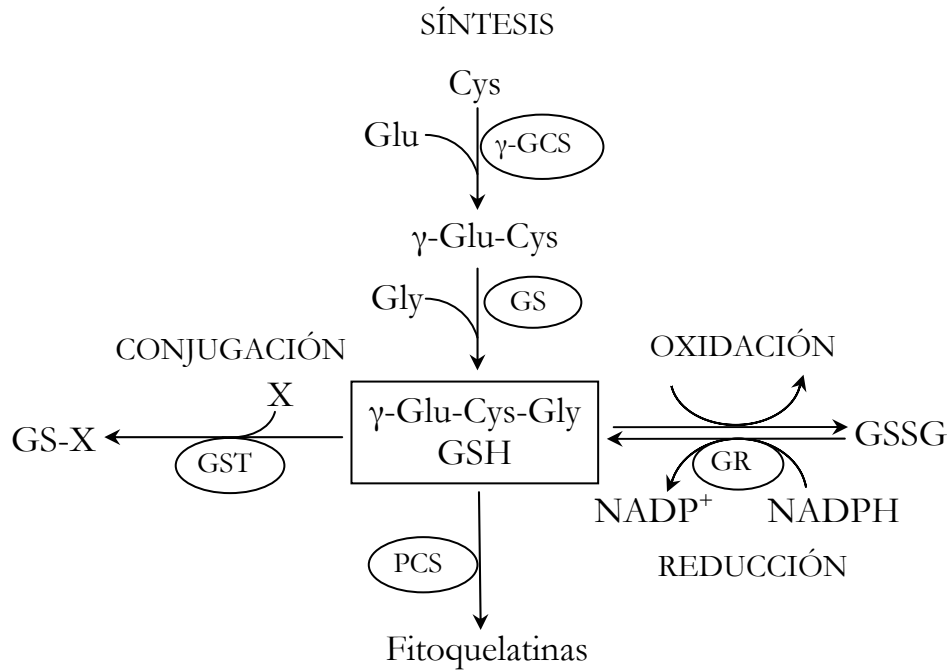
El GSH es sintetizado a partir de glutamato, cisteína y glicina en dos reacciones dependientes de ATP catalizadas por la  $\gamma$ -glutamilcistein sintetasa ( $\gamma$ -GCS) y la glutatión sintetasa (GS) (Meister, 1973), como se representa en la figura II. En las células vegetales, estas enzimas se encuentran en el citosol y los cloroplastos; en ambos compartimentos poseen actividades muy parecidas (Noctor y Foyer, 1998). La ruta de biosíntesis de GSH ha sido extensamente estudiada, sobre todo en plantas donde se han modificado los genes que codifican las enzimas que intervienen en esta ruta. Estos estudios han demostrado que la síntesis de GSH está regulada por la disponibilidad de cisteína (Buwalda *et al.*, 1988), la inhibición retroalimentativa de la  $\gamma$ -GCS por GSH (Schneider y Bergmann, 1995), y la síntesis *de novo* de la  $\gamma$ -GCS y/o GS (Noctor y Foyer,

1998); además, la disponibilidad de  $\gamma$ -glutamilcisteína parece ser el factor limitante en la ruta de biosíntesis del GSH (Strohm *et al.*, 1995; Wellburn *et al.*, 1998).

Se ha encontrado una acumulación de glutatión como respuesta a un incremento en las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Schmidt y Kunert, 1986; May y Leaver, 1993). El ozono es un potente oxidante que provoca la formación de ROS en la planta (Heath y Taylor, 1997). La fumigación con ozono afecta de una manera variable a las concentraciones de glutatión de la planta dependiendo de la especie y de su sensibilidad a este contaminante (Ranieri *et al.*, 1996; Pasqualini *et al.*, 2001; Puckette *et al.*, 2007). Además, la diferente edad de las muestras empleadas en los estudios y la variabilidad tanto en los niveles de ozono utilizados como en la duración de la exposición dificulta las comparaciones. La información relativa al efecto de una fumigación crónica con ozono, empleando concentraciones de ozono y duración de la exposición parecidas a las observadas en condiciones de campo, sobre la concentración de glutatión es además muy escasa.



**Figura I.** Ciclo del ascorbato-glutatión. El radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), formado por la transferencia de un electrón al oxígeno es rápidamente dismutado a peróxido de hidrógeno por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD). El  $H_2O_2$  generado a partir de superóxido o por otras vías es destruido por la ascorbato peroxidasa (APX), que utiliza ascorbato (AA) como sustrato, oxidándolo a monodehidroascorbato (MDHA). El MDHA es un radical con una vida media corta, que puede disproporcionar no enzimáticamente a ascorbato o a dehidroascorbato (DHA) (flechas discontinuas), y también puede ser reducido enzimáticamente a AA por la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), cuyo donador de electrones es el  $NAD(P)H$ . El DHA es reducido a AA mediante la enzima dehidroascorbato reductasa (DHAR), que utiliza glutatión reducido (GSH) como donador de electrones; esto da lugar a glutatión oxidado (GSSG), que es reducido de nuevo a GSH por el  $NADPH$ , reacción catalizada por la glutatión reductasa (GR). Ni el ascorbato ni el glutatión son consumidos en estas reacciones, sino que participan en una transferencia cíclica de equivalentes reductores que permite la reducción de  $H_2O_2$  a  $H_2O$ , utilizando cuatro enzimas y los electrones derivados del  $NAD(P)H$ . No todas las reacciones están representadas estequiométricamente. Adaptado de Noctor y Foyer (1998).



**Figura II.** Síntesis y utilización del glutatión en las células vegetales. El glutatión (GSH) es sintetizado en el citosol y en los cloroplastos por isoformas de  $\gamma$ -glutamylcistein sintetasa ( $\gamma$ -GCS) y glutatión sintetasa (GS) específicas de cada compartimento. Como antioxidante, el glutatión es oxidado a glutatión disulfuro (GSSG), aunque el pool de glutatión se encuentra principalmente en su forma reducida debido a la acción de la glutatión reductasa (GR). En las reacciones de detoxificación de xenobióticos, el GSH se une covalentemente a compuestos electrofílicos (X) por las glutatión-S-transferasas (GST) del citosol para formar conjugados (GS-X). El glutatión también es el sustrato de la enzima citosólica fitoquelatina-sintetasa (PCS), que produce polímeros de  $\gamma$ -Glu-Cys que se unen a metales, conocidos como fitoquelatinas. Adaptado de Foyer *et al.* (2001).

Este estudio tiene como objetivo conocer de qué manera influye en la concentración de glutatión la exposición crónica a tres concentraciones de ozono (filtrada, ambiental y ambiental más fumigación con ozono). Además, se estudiará el efecto del ozono sobre dos enzimas muy relacionadas con su ciclo: la  $\gamma$ -GCS, enzima que cataliza el paso limitante en la ruta de biosíntesis del glutatión, y la GR, encargada de reducir el GSSG a GSH.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material vegetal

En este estudio se utilizaron plantas de patata (*Solanum tuberosum* L. cv. Agria) obtenidas a partir de tubérculos. Los tubérculos fueron sembrados el 4 de febrero de 2002 y el 20 de enero de 2004. Las plantas se mantuvieron durante todo su ciclo en cámaras abiertas. Desde su emergencia hasta el final de su ciclo, las plantas fueron expuestas a tres concentraciones de ozono: aire filtrado de ozono (CF), utilizado como control, aire ambiental no filtrado (NF) y aire ambiental enriquecido con ozono (NF<sup>+</sup>). Los detalles sobre el cultivo de las plantas, las cámaras abiertas y los tratamientos con ozono están descritos en el Capítulo 2. Las muestras consistieron en hojas adultas totalmente expandidas, de tamaño y posición en el tallo similares, y se recogieron los días 17 de mayo de 2002 y 5 de mayo de 2004, entre las 12:00 y las 13:00 h.

Se recogieron hojas enteras; inmediatamente después, en el campo, se pesaron las muestras y se congelaron en nitrógeno líquido para su transporte hasta el laboratorio, donde fueron guardadas a -80 °C hasta su medida.

### 2. Determinación del contenido en glutatión por HPLC

El método tradicional de análisis para determinar la concentración de glutatión es la espectrofotometría (Tietze, 1969; Griffith, 1980). Sin embargo, el método espectrofotométrico no es del todo fiable. Esto es debido a que el GSH se oxida fácilmente y este método no lo impide de manera eficaz; además, la presencia de otros compuestos tioles puede falsear la medida (Asensi *et al.*, 1994). Por tanto, es necesario buscar otro método de detección que pueda eliminar estos inconvenientes. En esta tesis se ha utilizado el método de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), basado en el procedimiento de Reed *et al.* (1980), con las modificaciones aportadas por Asensi *et al.* (1994). La determinación de la concentración de glutatión por este método está descrita para tejidos animales, y por tanto ha sido necesario adaptarlo al tejido vegetal.

El protocolo seguido se describe con detalle en el Anexo 1. Básicamente, consiste en la determinación, por una parte, de la concentración de glutatión total en equivalentes de GSH. Por otra parte, se determina la concentración de GSSG utilizando NEM para impedir la oxidación del GSH. El GSH se calcula por diferencia entre la concentración de glutatión total y la de GSSG:

$$[\text{GSH}] = [\text{Glutatión total}] - (2 \times [\text{GSSG}])$$

Se ha utilizado un cromatógrafo modelo Shimadzu LC 10A, una columna Spherisorb aminada (Waters) y un detector UV-visible.

### 3. Cuantificación de la expresión génica de la enzima $\gamma$ -GCS

Las muestras congeladas de hoja se homogeneizaron en un mortero con nitrógeno líquido. El RNA se extrajo con el reactivo Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen life technologies), en una proporción de 50 mg de hoja por 1 mL de Trizol, y siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Tras la extracción, la pureza del RNA se comprobó mediante el ratio  $A_{260}/A_{280}$ ; este ratio (1.8 - 2.0) indicó que se trataba de RNA de gran pureza. Además, y con el fin de asegurar la integridad del RNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa.

La cuantificación de la expresión génica de la enzima  $\gamma$ -GCS se realizó mediante RT-PCR cuantitativa. La reacción se llevó a cabo en un termociclador iCycler (Biorad, Hercules, CA), utilizando el kit SYBR<sup>®</sup> Green Quantitative RT-PCR (Sigma-Aldrich, Inc.), que permite realizar en un único paso la transcripción inversa y la amplificación del cDNA sintetizado. La reacción se realizó según el protocolo recomendado por el fabricante. El gen de referencia empleado fue actina. Los cebadores o "primers" que se utilizaron para la amplificación (tabla I) fueron diseñados utilizando el programa GCG a partir de las secuencias génicas obtenidas en el "Genbank" (base de datos que contiene todas las secuencias de DNA disponibles públicamente, cuya dirección de internet es <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>).

Los protocolos de extracción y reacción por RT-PCR se describen con detalle en el Anexo 2.

**Tabla I.** Secuencias de los cebadores en sentido 5' a 3' (F: "Forward primer", R: "Reverse primer") para el gen problema ( $\gamma$ -GCS) y para el gen de referencia (actina).

Gen	Secuencia
$\gamma$ -GCS (Subunidad catalítica)	<b>F:</b> GGAAACTTCCGCCTATTCC
	<b>R:</b> AATGCAGGCAATGCACATAA
Actina	<b>F:</b> ACGATGAGTCTGGTCCATCC
	<b>R:</b> AAAGAGGCTTGCACTGGAAA

Se realizaron las reacciones de amplificación para ambos genes (problema y referencia) y para cada tratamiento (cámara filtrada, cámara no filtrada y cámara fumigada) por triplicado. Se aplicó la siguiente ecuación de comparación de Ct (ciclo umbral) para la cuantificación relativa de

la expresión del gen problema:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . De esta manera se cuantificó la expresión del gen  $\gamma$ -GCS en las muestras tratadas con aire no filtrado y fumigado en relación a las muestras control, crecidas en las cámaras filtradas.

#### **4. Medida de la actividad enzimática glutatión reductasa**

La extracción y medida de la actividad enzimática GR se realizó según el protocolo de Jahnke *et al.* (1991). Se trituraron en mortero 90 mg de hoja utilizando nitrógeno líquido, 3 mL de tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 7.0 como tampón de extracción y 30 mg de PVPP. Los extractos se centrifugaron a 15000 x g durante 20 minutos a 4 °C.

La mezcla de reacción estaba compuesta de tampón fosfato de potasio 80 mM pH 7.8, DTPA 200  $\mu$ M, NADPH 100  $\mu$ M, glutatión oxidado 0.5 mM y 100  $\mu$ L de sobrenadante del extracto enzimático en un volumen total de 2 mL. Se midió el descenso de la absorbancia a 340 nm debido a la oxidación del NADPH a  $\text{NADP}^+$  ( $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Se realizó una corrección restando la oxidación del NADPH no dependiente de la GR; para ello se llevó a cabo la misma reacción sin el glutatión oxidado en la mezcla de reacción. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro de luz UV-visible Hewlett-Packard 8452A.

Los resultados se expresan como unidades enzimáticas por gramo de peso fresco; una unidad enzimática es la cantidad de enzima GR que cataliza la reducción de 1  $\mu$ mol de glutatión oxidado por minuto.

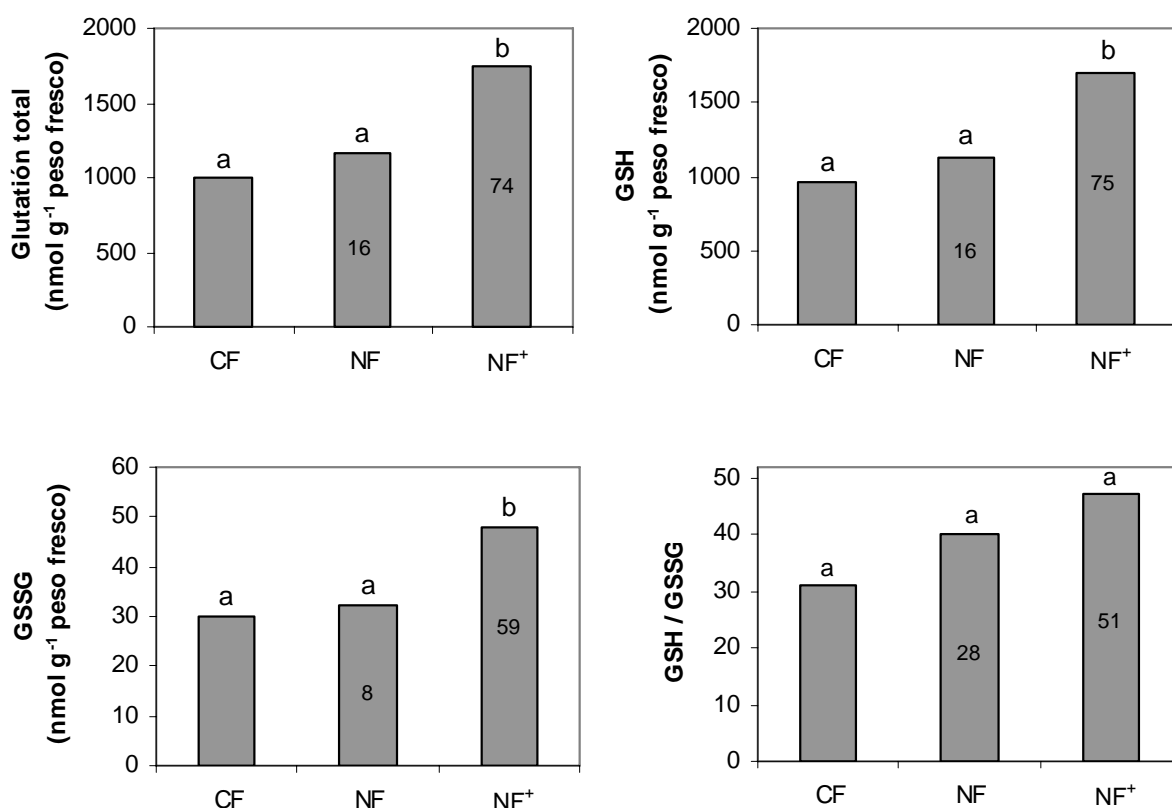
#### **5. Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron mediante el test estadístico no paramétrico U de Mann-Whitney. Se consideraron significativos los p-valores  $\leq 0.05$ . Estos análisis se realizaron con el programa estadístico SPSS v12.0.

## RESULTADOS

### 1. Niveles de glutatión

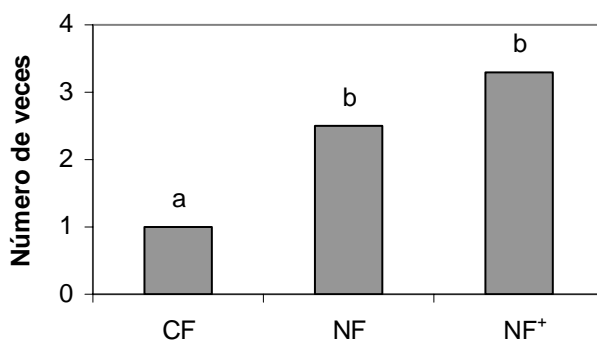
Los resultados de la medida de la concentración de glutatión total, glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y proporción entre GSH y GSSG en hojas de patata se muestran en la figura 1. Los niveles tanto de la forma reducida como de la forma oxidada del glutatión aumentaron con la concentración de ozono, y en consecuencia también los niveles de glutatión total. El aumento fue mayor cuanto mayor fue la dosis de ozono aplicada, encontrándose diferencias significativas entre el control y el tratamiento NF<sup>+</sup> con ozono en estos tres parámetros. La proporción entre GSH y GSSG también aumentó de manera escalonada en los tratamientos NF y NF<sup>+</sup>, aunque las diferencias con el control no fueron estadísticamente significativas. La proporción de GSH respecto al glutatión total fue de un 97% en los tres tipos de cámaras, lo que significa que el glutatión estaba mayoritariamente reducido en los tres casos y el tratamiento crónico con ozono no afectó a esta relación.



**Figura 1.** Concentración de glutatión total, GSH y GSSG, y relación entre las concentraciones de GSH y GSSG en hojas de patata crecida en cámaras con aire filtrado de ozono (CF), aire ambiental no filtrado (NF) y aire fumigado con ozono (NF<sup>+</sup>). Dentro de las barras se indica el porcentaje de aumento respecto a CF. Los valores son medias para n=10. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) para un mismo parámetro.

## 2. Expresión génica de la enzima $\gamma$ -GCS

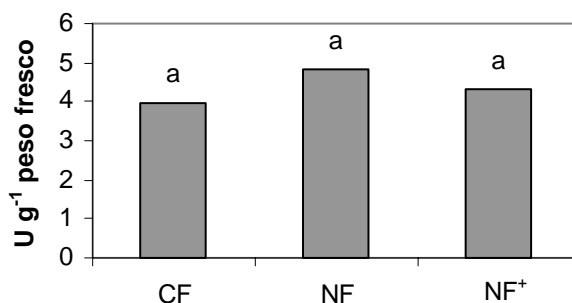
Se cuantificó la expresión de la enzima gamma-glutamilcistein sintetasa ( $\gamma$ -GCS), enzima clave en la biosíntesis del GSH. Se midió la expresión relativa al control (CF) en las plantas tratadas con aire ambiental (NF) y en las plantas fumigadas con ozono (NF<sup>+</sup>). Como se puede apreciar en la figura 2, en las plantas NF la expresión relativa del gen para la  $\gamma$ -GCS fue 2.5 veces mayor que en las plantas control, y 3.3 veces mayor en las plantas NF<sup>+</sup>.



**Figura 2.** Expresión génica de la enzima  $\gamma$ -GCS en hojas de plantas de patata desarrolladas en cámaras abiertas (abreviaturas como en la figura 1) relativa a la expresión en hojas de plantas crecidas en aire filtrado de ozono (CF). Los valores son medias para n=6. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ).

## 3. Actividad enzimática glutatión reductasa

Por último se realizaron medidas de la actividad GR para estudiar su implicación en el aumento de los niveles de glutatión como respuesta al ozono. Los resultados se muestran en la figura 3, en la que se observa que esta actividad enzimática aumentó ligeramente, pero no de manera significativa, como consecuencia de la exposición de las plantas al ozono, tanto a niveles ambientales (NF) como a niveles mayores (NF<sup>+</sup>).



**Figura 3.** Actividad GR en hojas de plantas de patata expuestas a diferentes concentraciones de ozono (abreviaturas como en la figura 1). Los valores son medias para n=6. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ).

## DISCUSIÓN

En este capítulo se ha medido la concentración de glutatión (tanto GSH como GSSG) en plantas de patata expuestas a ozono. Es difícil medir con precisión la concentración de GSH y GSSG debido a la autooxidación del GSH durante el procesado de la muestra. La medida del GSSG en presencia de GSH requiere un bloqueo rápido y efectivo del GSH; en caso contrario, se puede sobreestimar la concentración de GSSG (Viña *et al.*, 1995). Como bloqueadores del grupo tiol se suele utilizar la vinilpiridina (VP), el ácido iodoacético (IAA) o la N-etilmaleimida (NEM). En la mayor parte de los casos, para la medida de glutatión en plantas se utiliza un método espectrofotométrico conocido como GR-DTNB (Tietze, 1969); sin embargo, este método no es adecuado para la medida de las concentraciones de GSH ni de GSSG por los motivos que se explican a continuación. En los estudios que utilizan el método espectrofotométrico se suele emplear VP como bloqueador del grupo tiol porque no inhibe a la enzima GR, mientras que el NEM sí la inhibe (Griffith, 1980). El método de HPLC, empleado en esta tesis, permite la utilización de NEM. El NEM es mucho más eficaz que la VP y el IAA porque necesita menos de un minuto para completar la reacción, mientras que el tiempo de reacción para el IAA es de 10 minutos y para la VP es de una hora; además, el NEM puede reaccionar con los grupos tiol en frío, y tanto el IAA como la VP necesitan temperaturas más altas (alrededor de 21 °C). El NEM, al disminuir tanto el tiempo como la temperatura necesarios para bloquear los grupos tiol del GSH, disminuye enormemente la probabilidad de que éstos se oxiden (Asensi *et al.*, 1994). Por lo tanto, se puede concluir que el método de medida del glutatión utilizado en esta tesis es adecuado y fiable para la determinación de la concentración tanto del GSH como del GSSG.

Se ha encontrado un aumento en la concentración de glutatión total como respuesta al ozono. Tanto la forma reducida del glutatión como la forma oxidada han experimentado un aumento. El porcentaje de aumento respecto a la cámara filtrada ha sido mayor en el GSH, lo que queda reflejado en la proporción GSH/GSSG. Los cambios en los niveles de ambas formas redox del glutatión y la proporción entre la forma reducida y la forma oxidada están relacionados con las concentraciones de ozono aplicadas, es decir, han seguido el patrón  $CF < NF < NF^+$ . Estas variaciones en los niveles de GSH y GSSG no han alterado la proporción de glutatión reducido respecto al glutatión total, es decir, el conjunto del glutatión se encuentra mayoritariamente reducido (el 97% del glutatión está en forma de GSH) en los tres tipos de cámaras. La mayor parte de estudios de los efectos del ozono sobre el glutatión en plantas se realizan a partir de una exposición aguda a este contaminante; es decir, se aplican concentraciones muy altas de ozono, que

superan (a veces ampliamente) los 100 ppb, durante pocas horas, y se mide inmediatamente después de la exposición. En estos casos, la concentración de GSSG suele aumentar y la de GSH suele disminuir, sobre todo en las especies o cultivares sensibles al ozono (Guri, 1983; Sen Gupta *et al.*, 1991; Pasqualini *et al.*, 2001; Scebba *et al.*, 2003). Cuando la exposición a ozono dura varios días (Ranieri *et al.*, 1996; Vahala *et al.*, 2003) o incluso todo el período vegetativo (Mehlhorn *et al.*, 1986; Hausladen *et al.*, 1990; Bender *et al.*, 1994), se obtienen resultados similares a los presentados en este capítulo. Esto sugiere que el aumento de la concentración de GSH y el mantenimiento del conjunto del glutatión en estado mayoritariamente reducido es una respuesta común de las plantas al tratamiento prolongado con ozono.

La causa del aumento de los niveles de GSH debido a la exposición a ozono probablemente sea el aumento de su síntesis. Esta hipótesis ha sido expuesta anteriormente (Sen Gupta *et al.*, 1991; Scebba *et al.*, 2003), pero hasta ahora no ha sido demostrada. La síntesis de GSH está regulada por varios factores, como se ha indicado en la introducción. Sen Gupta *et al.* (1991) observaron una brusca disminución del cociente GSH/GSSG y la posterior acumulación de GSH tras la exposición de *Populus sp.* a ozono, y propuso el mecanismo de alivio de la inhibición de la actividad  $\gamma$ -GCS por GSH para explicar sus resultados. Otro factor que regula la concentración de GSH es la síntesis *de novo* de la  $\gamma$ -GCS y/o GS, que son las enzimas implicadas en la biosíntesis del glutatión. Sin embargo, hay muy poca evidencia de que exista una regulación de la síntesis del glutatión a nivel transcripcional por exposición a agentes oxidantes como el ozono (Foyer y Noctor, 2005). Los resultados presentados aquí demuestran que la exposición a ozono provoca un aumento significativo en la expresión de la enzima  $\gamma$ -GCS, y por lo tanto aportan una evidencia de que existe este tipo de regulación.

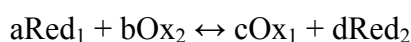
Se ha observado que el ácido jasmónico induce el aumento en la transcripción de los genes *GSH1* y *GSH2*, que codifican la  $\gamma$ -GCS y la GS, respectivamente (Xiang y Oliver, 1998; Harada *et al.*, 2000). El ozono estimula la biosíntesis de ácido jasmónico (Rao *et al.*, 2000; Tuominen *et al.*, 2004). Por lo tanto, el aumento del mRNA correspondiente a la enzima  $\gamma$ -GCS observado en nuestro estudio podría estar mediado por el ácido jasmónico, aunque esta hipótesis requiere constatación.

La glutatión reductasa es una enzima relacionada con la función antioxidante del glutatión. La GR se encarga de reducir el glutatión oxidado y mantener así el glutatión en su forma reducida. El tratamiento crónico con ozono no produce un cambio significativo en la actividad de esta enzima en ninguna de las dosis aplicadas, NF y NF<sup>+</sup>, respecto al control (CF). La actividad GR ha sido ampliamente estudiada en plantas expuestas a ozono y, al igual que para el glutatión, los resultados

son contradictorios. Se ha observado un aumento de esta actividad enzimática tras la exposición de guisantes y *Arabidopsis thaliana* a dosis altas (200 ppb) de ozono (Edwards *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 1996). En cambio, otros estudios han demostrado que la actividad GR no varía o disminuye después del tratamiento con ozono, incluso cuando los niveles de GSH disminuyen (Bender *et al.*, 1994; Pasqualini *et al.*, 2001; Scebba *et al.*, 2003); esto indica una ausencia de correlación entre los niveles de GSH y la actividad GR. En este capítulo se observa que la actividad enzimática GR no parece estar implicada, al menos directamente, en el mantenimiento del glutatión en su forma reducida en las plantas expuestas a ozono. Cuando se aplican otros tipos de estrés en plantas (frío, estrés lumínico, paraquat, etc.) se obtiene un resultado similar: la actividad GR no suele aumentar más del doble (Tanaka *et al.*, 1988; Edwards *et al.*, 1994), a veces no cambia (Madamanchi *et al.*, 1992; Kirtikara y Talbot, 1996) o incluso disminuye (Stokes *et al.*, 1998). Foyer y Noctor (1998; 2005) dan una interpretación biológica novedosa a la ausencia de un incremento en la actividad de algunos enzimas antioxidantes observada en condiciones de estrés. Esta aparente falta de respuesta podría no deberse a una incapacidad de la planta para adaptarse a la situación adversa; al contrario, al no eliminar los metabolitos oxidados, la planta estaría generando una señal que modularía la expresión génica.

El término *estado redox* se utiliza ampliamente en la investigación del estrés oxidativo. Sin embargo, el estado redox es un término general que se utiliza para referirse a cambios relativos que no están bien definidos ni cuantificados; es decir, no hay uniformidad en la definición de estado redox, y como tal se puede encontrar  $[GSH]/[GSSG]$ ,  $[GSSG]/[GSH]$ , ó  $[GSH]/([GSH]+[GSSG])$ ; los dos últimos índices suelen aparecer multiplicados por 100 para expresarlos en porcentaje.

Recientemente, Schafer *et al.* (2001) han aportado una nueva definición de estado redox aplicable a los pares redox de la célula en condiciones biológicas. Según estos autores, el *estado redox* de un par redox está definido por su potencial de reducción (E) y por su capacidad reductora, es decir, la concentración de la forma reducida de ese par redox. La notación a utilizar para definir el estado redox, por ejemplo del glutatión, sería: {E(GSH); [GSH]}, a modo ilustrativo, {-180 mV (GSH); 3.5 mM}. La base de esta definición se encuentra en la ecuación de Nernst, que permite cuantificar el voltaje de una célula electroquímica. Dada la reacción:

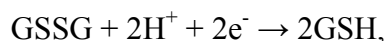


donde Red<sub>1</sub> y Ox<sub>1</sub> forman el par redox 1, y Ox<sub>2</sub> y Red<sub>2</sub> forman el par redox 2,

$$\Delta E = \Delta E^\circ - (RT / nF) \ln \left( \frac{[\text{Ox}_1]^c [\text{Red}_2]^d}{[\text{Red}_1]^a [\text{Ox}_2]^b} \right) \quad \text{V}$$



donde  $\Delta E$  es el voltaje o fuerza electromotriz (potencial de reducción entre los dos pares redox que forman una célula electroquímica),  $\Delta E^\circ$  es el potencial de reducción en condiciones estándar (solución 1 molal; 1 atm de presión para gases;  $T = 298 \text{ K}$  ó  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $\text{pH}=0$ ),  $R$  es la constante de gases ( $8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ),  $T$  es la temperatura (K),  $n$  es el número de electrones intercambiados en la reacción química y  $F$  es la constante de Faraday ( $9.6485 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$ ). Cada par redox forma una semicélula electroquímica. Utilizando la ecuación de Nernst se puede calcular el potencial de reducción de diferentes pares redox en condiciones biológicas. En el caso del glutatión, su reacción es:



El potencial redox del glutatión se calcula mediante la siguiente fórmula, obtenida al desarrollar la ecuación de Nernst:

$$E = -240 - (59.1 / 2) \log([\text{GSH}]^2/[\text{GSSG}]) \text{ mV}$$

a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} 7.0$

Hay que destacar que  $[\text{GSH}]$  interviene como un término al cuadrado. Esto significa que el potencial de reducción depende no sólo del cociente  $[\text{GSH}]/[\text{GSSG}]$ , sino también de la concentración absoluta del GSH. De esta definición se deriva que la cuantificación del estado redox del glutatión requiere conocer la molaridad del GSH y del GSSG, lo que implica que es necesario conocer el volumen de las células de la muestra; esta medida, además de laboriosa, no siempre es posible. No obstante, con esta nueva definición de estado redox se introduce un cambio significativo en términos cualitativos: la concentración absoluta de la forma reducida del glutatión, que hasta ahora había permanecido relegada a un segundo plano en los estudios sobre el glutatión, es de gran importancia. La concentración de GSH contribuye de igual manera que la relación entre GSH y GSSG al potencial redox de este antioxidante. Así, para dos situaciones con un cociente GSH/GSSG similar, la célula tendrá mayor capacidad para amortiguar un estrés oxidativo cuanto mayor sea la concentración de glutatión reducido. Por lo tanto, los niveles de GSH aportan una información muy valiosa que debe ser tenida en cuenta a la hora de establecer conclusiones sobre la situación oxidativa de la célula.

Este nuevo concepto de estado redox del glutatión permite obtener otra conclusión del presente capítulo. Si bien el aumento de la relación entre las concentraciones de GSH y GSSG en plantas expuestas a ozono no es estadísticamente significativo, está asociado a un incremento

significativo en la concentración de GSH en las cámaras NF<sup>+</sup>. Esto tiene como consecuencia el aumento del valor absoluto del potencial de reducción del glutatión, lo que significa que cuando las plantas son sometidas a una fumigación crónica con ozono, sus células adquieren una mayor capacidad para afrontar el estrés oxidativo.

## CONCLUSIONES

La exposición de plantas de patata a dosis altas de ozono durante todo su período de cultivo provoca un aumento en la concentración de las formas reducida y oxidada del glutatión; el GSH aumenta en mayor proporción que el GSSG. En definitiva, la capacidad amortiguadora del glutatión frente al estrés oxidativo aumenta. En plantas expuestas a concentraciones ambientales de ozono se observa el mismo patrón, aunque los cambios son menores. Una de las causas del aumento de la concentración de GSH es una mayor síntesis regulada por la expresión de la enzima  $\gamma$ -GCS. La actividad GR no se ve afectada por los tratamientos con ozono.

### Agradecimientos

Agradezco al profesor José Viña por permitirme realizar las medidas de glutatión y de expresión génica en su laboratorio, y a Ana Lloret y Consuelo Borrás por su inestimable ayuda y simpatía.

- CAPÍTULO 5 -

DETECCIÓN DE RADICALES LIBRES  
MEDIANTE ESPECTROSCOPIA ESR  
EN PLANTAS TRATADAS CON OZONO



## **RESUMEN**

Se ha realizado un estudio de los radicales libres (RL) mediante espectroscopía de resonancia de spin electrónico (ESR) generados en las hojas de patata expuesta a diferentes concentraciones de ozono durante casi dos meses. Las plantas de patata crecieron en cámaras abiertas (OTC), donde fueron expuestas a aire filtrado, aire ambiental no filtrado y aire ambiental enriquecido con ozono. Las medidas de ESR se realizaron utilizando frecuencias de la banda X (9.4 GHz) y de la banda Q (34 GHz). Se detectaron dos señales paramagnéticas estables: la señal del Mn(II) y una señal correspondiente a uno o varios radicales libres. En este capítulo se presentan las ventajas de la espectroscopía ESR en banda Q en comparación con la banda X; la principal ventaja es la no superposición entre la señal del Mn(II) y la señal de los RL ( $g = 2.0105$ ), lo que ha permitido cuantificar la intensidad de la señal de los RL. Además, se ha desarrollado un método de análisis de imagen para medir el área de la lesión causada por el ozono en las hojas. Los resultados demuestran una estrecha relación entre los síntomas visibles inducidos por el ozono y la intensidad de la señal de los RL permanentes.

## INTRODUCCIÓN

La formación de radicales libres se cree que es una de las primeras consecuencias de la exposición de las plantas a ozono (Grimes *et al.*, 1983). El ozono en medio acuoso da lugar a especies reactivas del oxígeno (ROS) como peróxido de hidrógeno y los radicales libres hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ) y superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ); esta reacción podría tener lugar en el apoplasto de la hoja (Heath y Taylor, 1997). El ozono y sus ROS derivados reaccionan con los lípidos de membrana dando lugar a hidroperóxidos lipídicos y radicales peroxilo, lo que conlleva daños en la integridad de las membranas (Schraudner *et al.*, 1997). También se producen radicales libres tipo fenoxi como intermediarios en la oxidación de los compuestos fenólicos que participan en la defensa frente al estrés oxidativo causado por el ozono (Goodman y Reichenauer, 2003). En general, el hecho de tener un electrón desapareado convierte a los radicales libres en especies muy reactivas con las moléculas de su entorno, aunque la reactividad y modo de acción de los diferentes radicales libres es variable (Pirker *et al.*, 2003). Por ejemplo, el radical hidroxilo tiene una vida muy corta y reacciona indiscriminadamente con moléculas cercanas a su lugar de formación extrayendo un átomo de hidrógeno ( $\cdot\text{H}$ ) y dando lugar a la generación de radicales orgánicos; por otra parte, la deslocalización de los electrones en los radicales tipo fenoxi aumenta su estabilidad.

Se considera que los radicales libres son importantes mediadores de la disfunción celular causada por el ozono. Los ROS inducen los genes que determinan la muerte celular programada (Pell *et al.*, 1997; Schraudner *et al.*, 1997; Wohlgemuth *et al.*, 2002), también inducen los genes responsables de la síntesis de sustancias detoxificantes (Kolb *et al.*, 1997; Alscher *et al.*, 1997) y actúan como señal para el inicio o coordinación de otros procesos como la producción de etileno, que induce senescencia (Pell *et al.*, 1997; Schraudner *et al.*, 1997).

A pesar de la importancia que se atribuye a los radicales libres, la evidencia de su generación como consecuencia de la exposición a ozono proviene en su mayor parte de medidas indirectas, como los cambios en la concentración de antioxidantes y en la actividad de las enzimas antioxidantes de la planta. Existen, no obstante, algunos estudios en los que se ha detectado directamente la formación de radicales libres en plantas tratadas con ozono utilizando la espectroscopía ESR. La primera evidencia directa de la formación de RL en plantas expuestas a ozono proviene de Mehlhorn *et al.* (1990): en plantas de judía tratadas con N-t-butil- $\alpha$ -fenilnitrona, compuesto que se utiliza para aumentar el tiempo de permanencia de un radical libre ("spin-trapping"), y posteriormente fumigadas con ozono, se obtuvo un radical libre cuya naturaleza no se logró identificar. Se ha demostrado la aparición de una señal con las características del radical

superóxido durante la exposición a ozono ( $240 \mu\text{g m}^{-3}$ ) hecho fluir a través de la cavidad del espectrofotómetro (Runeckles y Vaartnou, 1997). En hojas de trigo liofilizadas y tratadas con aire ambiental suplementado con 80 ó 120 ppb de ozono apareció un RL estable (Reichenauer y Goodman, 2001). En el proceso de liofilización se producen RL en grandes cantidades (Pirker *et al.*, 2002), por lo que el RL encontrado en trigo (Reichenauer y Goodman, 2001) probablemente era consecuencia del proceso de liofilización de la hoja. En hojas de trigo fumigadas con altas concentraciones de ozono (150 a 400 ppb durante 8 horas al día, por un período de 3 días) apareció un RL cuya señal estaba formada por una sola línea, y la señal del Fe(III) en  $g = 4.3$  aumentó considerablemente (Goodman y Reichenauer, 2003). En definitiva, la fumigación con diferentes concentraciones de ozono y los diversos tratamientos aplicados a las hojas sugieren la posibilidad de que se hayan observado RL diferentes en los estudios realizados.

El ozono puede provocar la expresión de síntomas foliares visibles. La severidad del daño foliar causado por el ozono está determinada por la concentración de este contaminante, la duración de la exposición y por muchas variables genéticas y ambientales. Los síntomas visibles causados por ozono se suelen denominar moteado, y se caracterizan por pequeñas lesiones punteadas en el haz y/o envés de la hoja, de mayor abundancia cuanto más intenso es el daño. El moteado es normalmente marrón o negro, aunque también puede ser de color bronce, amarillo, blanco o plateado. Las hojas con daños severos se vuelven cloróticas, y son afectadas por una necrosis progresiva (Manning y Krupa, 1992). Estos síntomas suelen aparecer en primer lugar en las hojas más viejas de la planta y ocupar los espacios entre las nervaduras (Calvo, 2003). Los síntomas visibles se han asociado a la presencia de radical superóxido: en algunos casos, en las zonas de la hoja afectadas por este radical se desarrollarán posteriormente síntomas visibles (Rossetti y Medeghini-Bonatti, 2001; Langebartels *et al.*, 2002); también se ha encontrado radical superóxido alrededor de las lesiones visibles ya formadas (Scebba *et al.*, 2003).

En este capítulo se ha utilizado la espectroscopía ESR para estudiar los compuestos paramagnéticos formados en patata durante la exposición a ozono a largo plazo (crónica) en condiciones de campo. El objetivo principal de este estudio consiste en evaluar el efecto de diferentes dosis de ozono sobre la formación de radicales libres en patata; además, se determinará si existe alguna relación entre la presencia de radicales libres y los síntomas visibles producidos por el ozono.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material vegetal

La especie utilizada en este capítulo, al igual que en el resto de la tesis, fue patata (*Solanum tuberosum* L. cv. Agria). Las plantas crecieron a partir de tubérculos sembrados el 3 de febrero de 2005 en cámaras abiertas. Durante todo su ciclo, las plantas fueron expuestas a tres tratamientos: control, consistente en aire filtrado, con niveles muy bajos de ozono (CF), aire no filtrado, con concentraciones ambientales de ozono (NF) y aire ambiental enriquecido con ozono (NF<sup>+</sup>). En el Capítulo 2 se detallan las condiciones de cultivo de las plantas en las cámaras abiertas y los tratamientos con ozono.

Las muestras se recogieron en una etapa avanzada del cultivo, el 26 de abril de 2005 (aproximadamente dos meses después de la emergencia). Se recogió el tercer foliolo de la cuarta hoja totalmente expandida correspondiente a un tallo elegido al azar en cada planta, e inmediatamente se congeló en nitrógeno líquido. Las muestras se guardaron a -80 °C hasta su medida.

### 2. Preparación de las muestras para espectroscopía ESR

Las hojas se mantuvieron en nitrógeno líquido antes de la medida de ESR. Se emplearon dos métodos para la selección de las muestras. Inicialmente, se seleccionaron al azar fragmentos de hoja sin descongelar, descartando las venas principales, de 12 a 16 mg de peso para las medidas en banda X y de 2 a 7 mg para la banda Q (los pesos de las muestras se determinaron tras la medida ESR en una balanza analítica AND HA-202 M, con una resolución de 0.01 mg). El segundo método consistió en la selección de muestras de 2 a 7 mg de peso para espectroscopía en banda Q siguiendo una gradación en la proporción de superficie afectada por daños visibles debidos al ozono. La hoja fue previamente descongelada para realizar esta selección. Cada muestra fue fotografiada e inmediatamente después se guardó en nitrógeno líquido hasta su medida por espectroscopía en banda Q. Durante la selección y fotografía de cada muestra, la hoja permaneció descongelada 1 minuto aproximadamente.

### 3. Espectroscopía ESR

Las medidas de ESR se realizaron en un espectrómetro Bruker ELEXSYS E-500 controlado por ordenador, operando a frecuencias de la banda X o de la banda Q (9.4 ó 34 GHz, respectivamente).



Se llevaron a cabo medidas preliminares a diferentes temperaturas en el rango 10-250 K para encontrar la señal óptima en ambas bandas, X y Q. La temperatura con la que se obtuvo la señal de mayor calidad en banda X fue de 10 K, mientras que en banda Q fue de 100 K.

Los espectros se registraron con 1024 puntos, utilizando una frecuencia de modulación de 100 kHz, una atenuación de las microondas de 10-25 dB (resultando en potencias de las microondas de 19.3-0.6 mW), y amplitud de modulación de 0.2-0.8 mT (1 mT = 10 G). Las medidas se realizaron en el rango 238-438 mT en banda X, y 1160-1260 mT en banda Q. Los parámetros fueron seleccionados tras la determinación de las características de saturación de las señales con el fin de obtener una intensidad de la señal máxima sin llegar a la distorsión ni a la saturación. Los espectros se adquirieron como la primera derivada de la absorción de las microondas.

La intensidad de la señal del Mn se midió como el área bajo la curva ( $A_{bc}$ ), calculada como la suma de los trapezoides formados por el espectro, y fue normalizada por el peso de la muestra. La intensidad de la señal del radical libre se midió como  $A_{bc}$  y fue normalizada por el peso y por la intensidad de la señal del Mn de la muestra. Los valores de  $g$  se determinaron a partir de la ecuación de resonancia  $h\nu = g\beta H$ , donde  $h$  es la constante de Planck ( $6.626 \times 10^{-34}$  J s),  $\nu$  es la frecuencia de la radiación electromagnética,  $\beta$  es el magnetón de Bohr ( $9.274 \times 10^{-24}$  J T<sup>-1</sup>),  $H$  es el campo magnético resonante y  $g$  es la constante giromagnética que caracteriza la posición del punto de resonancia de la especie química. Las desviaciones estándar fueron un 0.04 - 0.07 % de los valores medios de  $g$ .

#### **4. Análisis de imagen**

Se fotografiaron hojas enteras de patata y muestras de ESR para determinar el porcentaje de superficie foliar con daños visibles por ozono mediante análisis de imagen. Las hojas enteras se fotografiaron el 26 de abril de 2005 con una cámara digital (Olympus Camedia C-5050 Zoom). Las muestras de hoja seleccionadas para ESR en banda Q fueron fotografiadas a través de una lupa con una cámara digital incorporada (Olympus DP 10) antes de realizar las medidas de ESR. La identificación de los síntomas visibles causados por el ozono se basó en los ejemplos dados por Donnelly *et al.* (2001) y Calvo (2003), y en la experiencia adquirida tras muchas fumigaciones en cámaras abiertas. Las zonas dañadas se seleccionaron con la herramienta conocida como Varita Mágica del programa de tratamiento de imágenes Adobe Photoshop v7.0. Las áreas seleccionadas se rellenaron con color blanco utilizando las opciones de Edición del mencionado programa. Por otra parte, se seleccionó el área total de la hoja o fragmento y se rellenó de color blanco siguiendo el mismo procedimiento. A continuación, las imágenes se analizaron con el programa Matlab v6.5

(toolbox de Análisis de Imagen); los píxeles blancos de la selección se diferenciaron del resto de la imagen por segmentación mediante umbral de intensidades. El área ocupada por los píxeles seleccionados en ambas imágenes de una misma muestra (área de las zonas con daño visible y área total de la muestra) se midió como número de píxeles. Por último, se calculó el porcentaje de daño visible de la muestra como  $100 \times (\text{área dañada} / \text{área total de la muestra})$ .

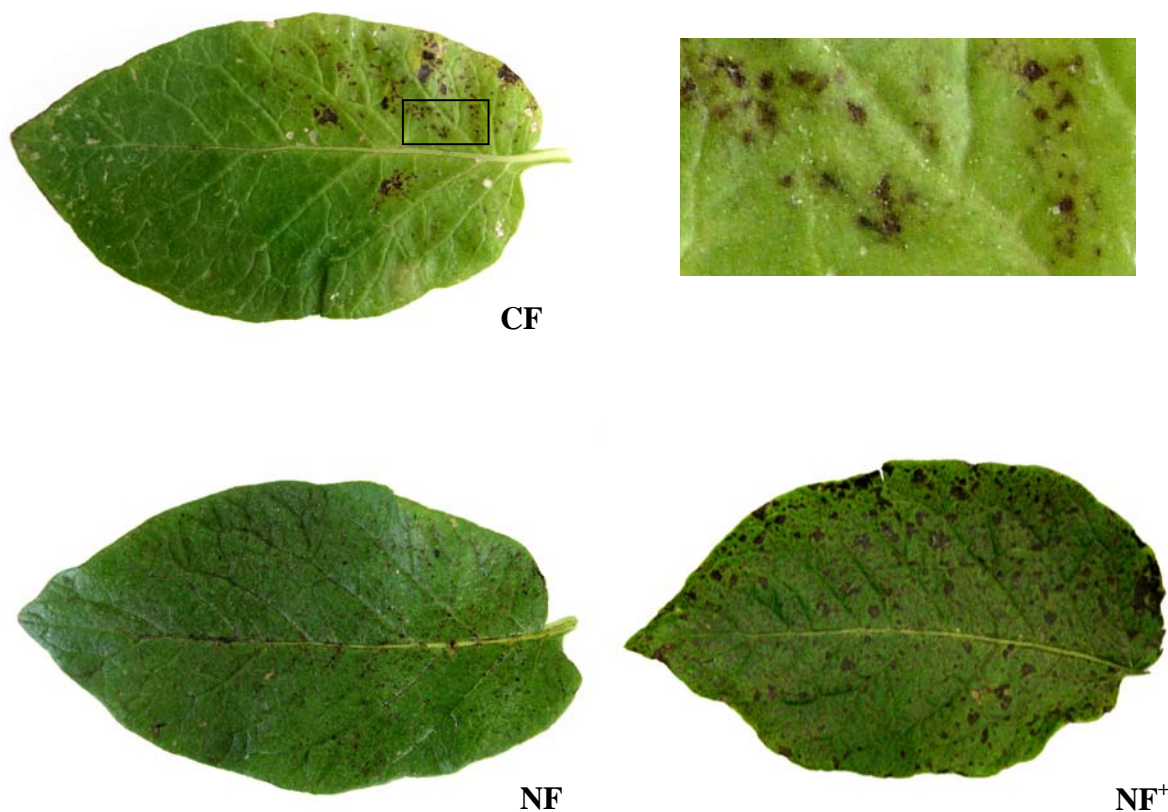
### **5. Análisis estadístico**

Para determinar el efecto de los tratamientos con ozono sobre la intensidad de las señales del Mn y de los radicales libres se realizó el test no paramétrico U de Mann-Whitney con el programa SPSS v12.0. Las diferencias se consideraron significativas para  $p \leq 0.05$ . La regresión polinomial se calculó con Matlab v6.5 (toolbox de Ajuste de Curvas).

## RESULTADOS

### 1. Exposición a ozono y daño visible

La severidad del daño visible por ozono se determinó en hojas enteras para cada tratamiento. Los síntomas visibles característicos de la exposición a ozono se observaron en los tres tipos de cámaras abiertas, aunque el momento de aparición y el grado de daño varió según el tipo de cámara (figura 1). Los síntomas aparecieron en primer lugar en las cámaras NF<sup>+</sup> (17 de marzo), más tarde en las cámaras NF (31 de marzo) y por último en las cámaras CF (15 de abril). El mayor daño se observó en las cámaras NF<sup>+</sup>, donde la superficie foliar media afectada por síntomas visibles fue un 33.9%, mientras que en las cámaras CF y NF fue 0.7 y 6.5%, respectivamente.



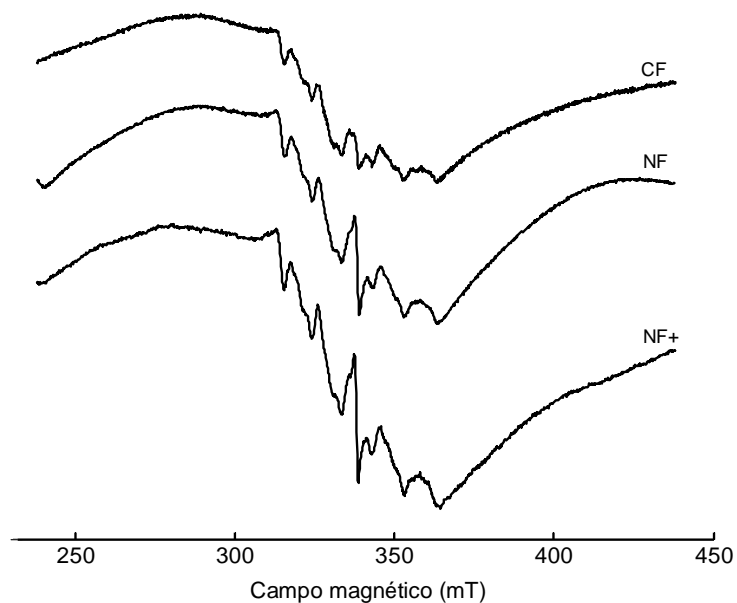
**Figura 1.** Fotografías de hojas enteras de patata crecidas en los tres tipos de cámaras abiertas (CF: cámara filtrada, NF: cámara no filtrada, NF<sup>+</sup>: cámara fumigada con ozono), mostrando daños visibles por ozono. Junto a la hoja CF se presenta ampliada la zona recuadrada.

## 2. Señales paramagnéticas en banda X y banda Q: comparación

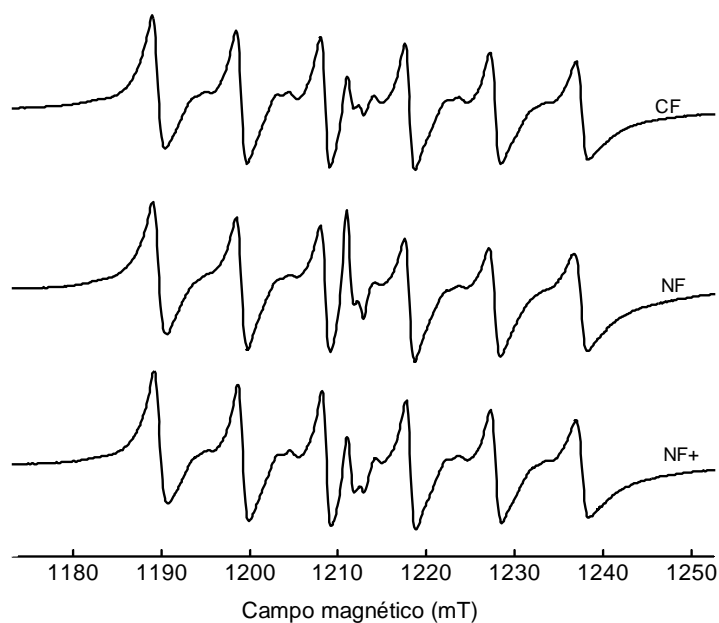
Todos los estudios de ESR en plantas utilizan la banda X. Al inicio de este trabajo, las medidas se realizaron empleando frecuencias de la banda X. Se encontró una señal hiperfina formada por 6 líneas (figura 2); las señales hiperfinas resultan de la interacción entre el electrón desapareado con el spin nuclear (I) del núcleo o núcleos a los que pertenece dicho electrón (número de señales hiperfinas =  $2I + 1$ ). Las señales tenían un valor medio de  $g = 2.00119 \pm 0.00089$  y un spin nuclear de  $5/2$ . Esta señal se puede atribuir al  $^{55}\text{Mn(II)}$ , que tiene una abundancia natural del 100%. La asignación de esta señal al Mn(II) también se encuentra en otros trabajos (Stegmann *et al.*, 1989; Mehlhorn *et al.*, 1990; Reichenauer *et al.*, 1997; Runeckles y Vaartnou, 1997; Alberti *et al.*, 2000; Goodman y Reichenauer, 2003). A veces, en los espectros ESR de plantas se encuentra otra señal, correspondiente a complejos de Fe(III), que tiene un  $g = 4.27$  (Goodman y Reichenauer, 2003), aunque esta señal no se detectó en las muestras del presente estudio (datos no mostrados). Sin embargo, se apreciaba una amplia señal bajo el espectro del Mn(II) en banda X; dicha señal ha sido atribuida por otros autores al Fe(III) en proteínas de almacenaje como la ferritina (Goodman y Reichenauer, 2003). El cuarto componente hiperfino de la señal parecía tener mayor altura que los demás, sugiriendo una superposición con otra(s) señal(e)s. Debido a esta gran superposición no era posible el cálculo de parámetros con exactitud. La espectroscopía en banda Q ofrece diversas ventajas en comparación con la banda X; por este motivo se realizaron medidas similares utilizando la banda Q para comprobar si era posible mejorar la señal.

Como se muestra en la figura 3, la señal de 6 líneas tenía mucha mayor resolución al utilizar las frecuencias de la banda Q, y por lo tanto los parámetros de la señal pudieron ser calculados con precisión, obteniendo una constante de desdoblamiento hiperfino (distancia entre pico y pico) =  $9.567 \pm 0.080$  mT, anchura de banda (distancia entre pico y valle) =  $1.253 \pm 0.223$  mT y  $g = 2.0064 \pm 0.0014$ . Los valores de estos parámetros confirmaron que esta señal podía ser atribuida al Mn(II). Además, apareció una nueva señal entre los componentes hiperfinos tercero y cuarto, con  $g = 2.0105 \pm 0.0014$  y anchura de banda =  $0.7539 \pm 0.0776$  mT. Esta señal podría ser atribuida a una sola especie radical o a varios radicales libres; a lo largo de este capítulo, esta señal se nombrará como radical libre o RL. Cabe destacar que la superposición de señales encontrada en la banda X no se observó en la banda Q.

La intensidad de la señal del Mn(II) se calculó para cada tratamiento de OTC. La prueba de Mann-Whitney dio como resultado un p-valor = 0.461, indicando que el  $A_{bc}$  de la señal del Mn(II) no estaba afectada por la dosis de ozono recibida por las plantas. Por este motivo, la intensidad de la señal del RL se normalizó por la del Mn para cada muestra.



**Figura 2.** Espectros ESR en banda X medidos a 10 K en hojas de patata crecida en cámaras abiertas. Se observa una señal hiperfina con 6 componentes debida al Mn(II). CF: aire filtrado de ozono, NF: aire ambiental no filtrado, NF+: aire ambiental enriquecido con ozono.



**Figura 3.** Espectros ESR en banda Q medidos a 100 K en hojas de patata crecida en cámaras abiertas. Además de la señal del Mn(II), aparece una nueva señal entre el tercer y cuarto componente de la señal hiperfina debida a uno o varios radicales libres. Abreviaturas de los tratamientos como en la figura anterior.

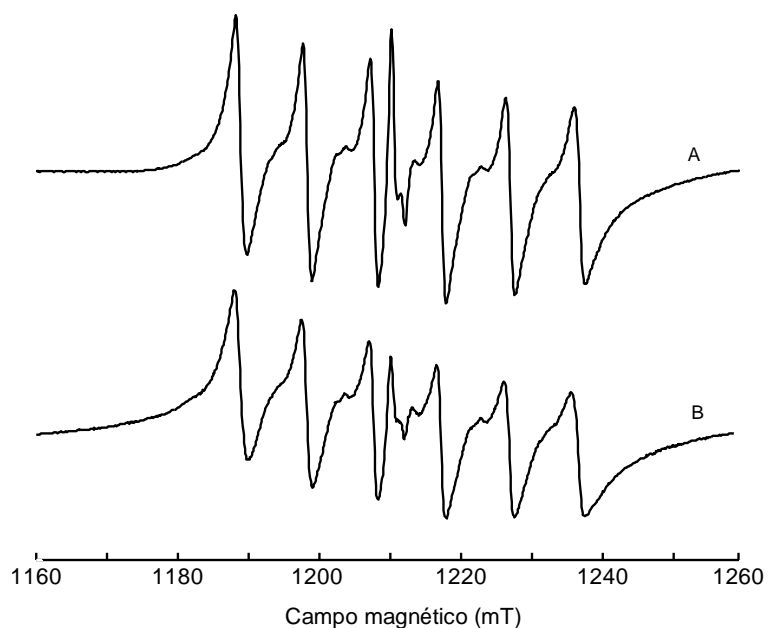
### 3. Daño visible y señal ESR

La hipótesis de trabajo de este capítulo estaba inicialmente basada en la suposición de que las patatas crecidas en altas concentraciones de ozono presentan señales paramagnéticas inducidas por ozono más intensas que las plantas expuestas a bajas concentraciones de este contaminante. En la figura 3 se presenta el efecto del tipo de cámara sobre la señal del RL. La inspección visual de estas señales y la prueba de Mann Whitney (p-valor = 0.735), demostraron que el RL no estaba relacionado con las concentraciones de ozono en las OTC. Por lo tanto, la hipótesis de trabajo debía ser reformulada. Sin embargo, cuando se medían fragmentos de hoja con daños por ozono, su señal de RL era mayor que la observada en fragmentos verdes no dañados de las mismas hojas. Este resultado apuntaba a que la señal del RL podría estar relacionada con el daño visible causado por el ozono. Para contrastar esta nueva hipótesis, era necesario emplear un método que permitiera la selección de muestras con diferente proporción de superficie dañada por ozono. Antes de la utilización de este método se estudió la estabilidad de la señal a temperatura ambiente, de la siguiente manera: se midió la señal ESR de dos muestras e, inmediatamente después, estas muestras se mantuvieron en los tubos de cuarzo a temperatura ambiente durante 24 horas; transcurrido este tiempo, las muestras se volvieron a medir. Aunque la intensidad de la señal, tanto del Mn(II) como del RL, disminuyó con el tiempo, aún era detectable después de 24 horas a temperatura ambiente. La disminución media de la señal fue de un 21.9 % para el Mn(II) y de un 41.2 % para el RL (figura 4). Estos datos demostraron que ambas señales eran relativamente persistentes.

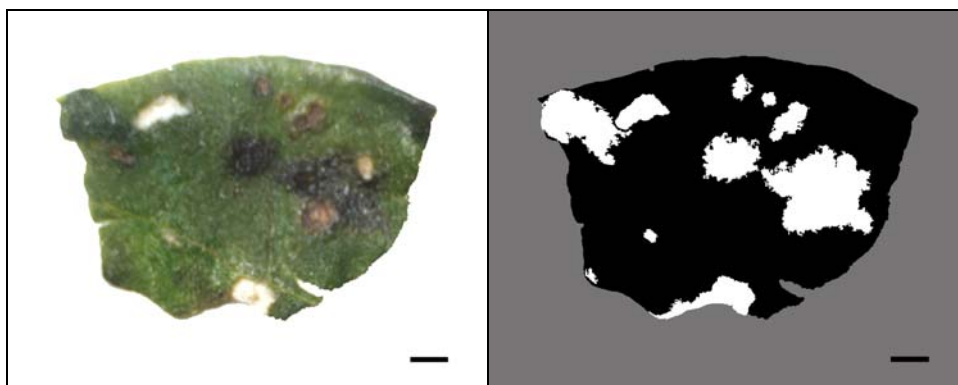
El porcentaje de superficie dañada por ozono de las muestras se determinó con precisión mediante el método desarrollado de análisis de imagen. En la figura 5 se puede observar, a modo de ejemplo, un fragmento de hoja de patata y la selección de las áreas dañadas utilizada para los cálculos de análisis de imagen.

En la figura 6 se representan los espectros de muestras con diferente proporción de síntomas visibles para cada tipo de tratamiento; la intensidad de la señal del RL mostró un aumento progresivo en relación a la proporción de superficie foliar dañada por ozono. Cuando se representa el área bajo la señal del radical libre frente al porcentaje de superficie de muestra con síntomas visibles por ozono (figura 7), se observa mejor esta relación.

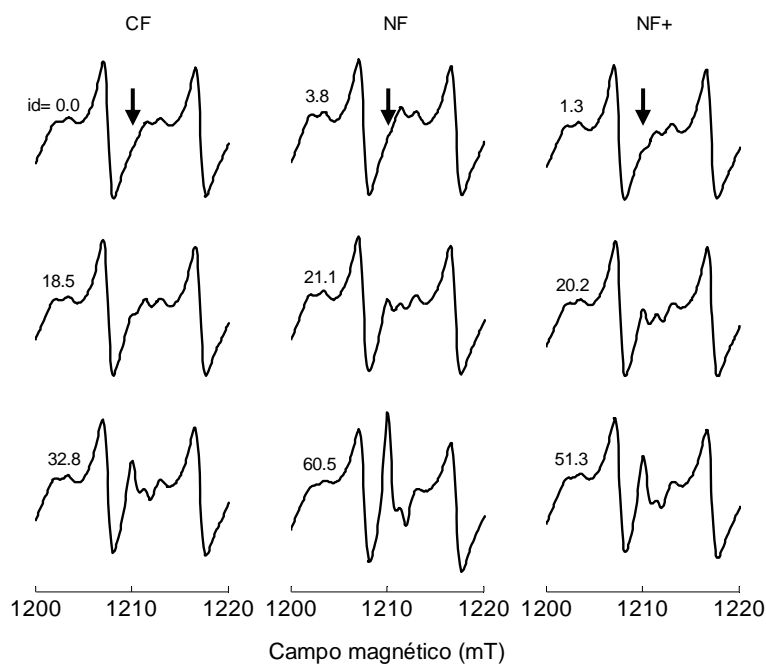
Se llevaron a cabo diversas regresiones polinomiales; los estadísticos de bondad del ajuste,  $R^2$  (coeficiente de determinación) ajustada y RMSE (raíz cuadrada del promedio de los errores al cuadrado), para los diversos tipos de regresiones polinomiales realizadas, se muestran en la tabla 1. Las regresiones se realizaron por el método no robusto y por dos métodos robustos: LAR y bicuadrado. El método robusto tipo LAR minimiza los valores absolutos de los residuos y el método



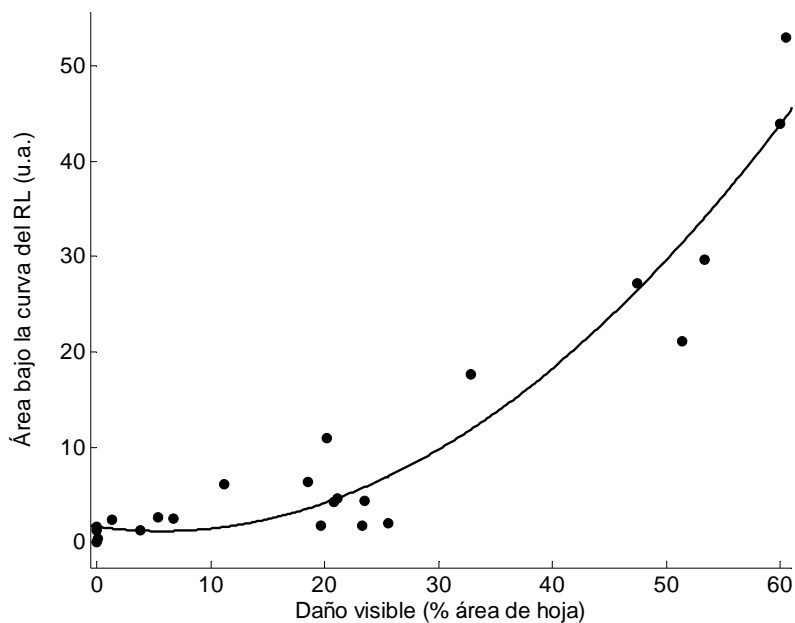
**Figura 4.** Variación de la señal ESR en banda Q al mantener la muestra a temperatura ambiente. A: espectro de una hoja no filtrada medido inmediatamente tras la preparación de la muestra, B: espectro de la misma muestra medido tras mantenerla a temperatura ambiente durante 24 horas.



**Figura 5.** Izquierda: fotografía de una muestra de hoja de patata no filtrada para medida en banda Q, en la que se aprecian las lesiones causadas por el ozono. Derecha: imagen del mismo fragmento de hoja, en la que las zonas lesionadas se han rellenado de color blanco. Para una mejor visualización, el resto de muestra se ha pintado de negro y el fondo de gris. Las barras representan 1 mm. Según el análisis de imagen, el área dañada de esta muestra representaba un 21.1% del área total.



**Figura 6.** Señales ESR de muestras de patata crecida en cámaras abiertas (CF, columna izquierda; NF, columna central; NF+, columna derecha; abreviaturas de los tratamientos como en la figura 1) con diferente proporción de daño visible. Se representa únicamente la parte de los espectros entre el tercer y cuarto componente hiperfino de la señal del Mn(II). Las flechas indican la localización de la señal del RL ( $g = 2.011$ ) en cada columna. Junto a cada espectro se indica el porcentaje de daño visible de la muestra medido mediante análisis de imagen (id: intensidad del daño).



**Figura 7.** Diagrama de dispersión y regresión cuadrática robusta tipo LAR del área bajo la curva de la señal del radical libre como función del porcentaje de superficie foliar dañada por ozono. La ecuación de la regresión polinomial cuadrática fue:  $y = 0.01451x^2 - 0.1649x + 1.65$ , donde  $y$  es el  $A_{bc}$  del radical libre y  $x$  es el porcentaje de superficie foliar dañada por ozono (u.a.: unidades arbitrarias).



**Tabla 1.** Estadísticos de bondad de ajuste,  $R^2$  ajustada y RMSE, para las regresiones realizadas entre las variables porcentaje de síntomas visibles de la muestra y área bajo la curva de la señal del radical libre. Las regresiones fueron polinomiales de grado 1 a 4, realizadas siguiendo los métodos no robusto y robustos tipo LAR y bicuadrado.

<b>Grado del polinomio</b>	<b>R<sup>2</sup> ajustada</b>			<b>RMSE</b>		
	No robusto	Robusto LAR	Robusto Bicuadrado	No robusto	Robusto LAR	Robusto Bicuadrado
1	0.78555	0.93249	0.85556	6.81529	3.82403	5.59324
2	0.91768	<b>0.97238</b>	0.92218	4.22259	<b>2.44568</b>	4.10557
3	0.93103	0.96626	0.85556	3.86511	2.70328	5.59324
4	0.92906	0.95879	0.92491	3.91978	2.98762	4.03282

bicuadrado minimiza la suma de los residuos al cuadrado. La regresión cuadrática robusta tipo LAR se aceptó como el mejor ajuste debido a que poseía el menor RMSE (2.45) y la mayor  $R^2$  ajustada (0.97); los residuos se distribuían al azar alrededor de cero, indicando que este modelo describía bien los datos. La relación era estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ), lo que indicó que la intensidad de la señal del RL estaba estrechamente asociada con los síntomas visibles. Por el contrario, el  $A_{bc}$  de la señal del Mn(II) no estaba correlacionada con los daños visibles (datos no mostrados).

La figura 7 muestra la presencia de una señal débil del RL estable cuando el daño visible de la muestra es inferior a un 30% aproximadamente, junto con un aumento exponencial en la intensidad del RL cuando los síntomas visibles superan este umbral del 30%. Esta relación sugiere que este RL se forma principalmente cuando los síntomas visibles exceden un cierto límite, a partir del cual las células no pueden eliminar el RL y en consecuencia su concentración aumenta de manera abrupta.

## DISCUSIÓN

En este capítulo se ha investigado la utilidad de la banda Q, en combinación con la estimación cuantitativa del área de hoja afectada por síntomas visibles debidos al ozono, para medir la formación de especies paramagnéticas en plantas de patata durante la exposición a ozono a largo plazo.

Las cámaras abiertas se han utilizado ampliamente como un método estándar para establecer los efectos del ozono sobre los cultivos agrícolas. El efecto más evidente del ozono en plantas es el daño foliar visible. El índice de exposición a ozono utilizado actualmente en Europa es el AOT40. Los niveles críticos de los contaminantes atmosféricos corresponden a la exposición acumulativa que causa efectos negativos significativos en las plantas. El AOT40 para el período experimental fue de 4186 ppb.h en las cámaras NF. Este valor de AOT40 fue superior a 3000 ppb.h, el nivel crítico propuesto por la UNECE para los cultivos agrícolas (Fuhrer *et al.*, 1997). Los resultados presentados en este capítulo indican claramente la influencia del ozono sobre el desarrollo de daños visibles en las hojas de patata.

Debido a que las concentraciones de ozono ambientales fueron particularmente altas, el tratamiento de filtrado con carbón activo (CF) resultó en unos niveles de ozono suficientes para inducir síntomas visibles en las hojas adultas; no obstante, la magnitud del daño en estas cámaras fue muy reducida en comparación con las cámaras ambientales (NF) y las cámaras fumigadas (NF<sup>+</sup>). El mayor daño por ozono, medido como porcentaje de superficie foliar dañada, se observó en plantas crecidas en las cámaras fumigadas. Se ha sugerido que el ozono difiere de otros contaminantes atmosféricos en el hecho de que puede dañar las especies sensibles en concentraciones ligeramente superiores a las máximas naturales (aproximadamente 4 ppb) (Boone y Westwood, 2003). La concentración media diaria de ozono en las cámaras CF fue 7.52 ppb; por lo tanto, la manifestación de daños por ozono en estas cámaras indica que las plantas de patata son sensibles al ozono. El daño por ozono presenta un amplio rango de síntomas visibles cuyo significado fisiológico no se conoce bien. La severidad del daño foliar está determinada por la concentración de ozono, duración de la exposición, y por variables genéticas y ambientales. Los daños visibles son el resultado de la acumulación de ROS y la síntesis de compuestos para su detoxificación (Guderian *et al.*, 1985; Kangasjärvi *et al.*, 2005).

Todos los estudios de ESR en hojas de plantas se han realizado empleando frecuencias de medida de la banda X. Sin embargo, las señales en banda X presentaron diversos problemas: superposición de componentes espectrales, ruido y baja resolución. La espectroscopía en banda Q

ofrece mayor sensibilidad y mayor resolución del factor g; además, y como consecuencia de lo anterior, se pueden medir muestras más pequeñas que en banda X. Así, la espectroscopía en banda Q, con una mayor intensidad de campo magnético, podría aportar mayor información de las hojas de patata. Con esta finalidad, las muestras se midieron utilizando la banda Q; los espectros adquiridos mostraron una mayor resolución y menor ruido.

Otra ventaja de la espectroscopía en banda Q es el tamaño de la muestra. Las muestras tenían una superficie de entre 20 y 50 mm<sup>2</sup>, y un peso de 2 a 7 mg. Este tamaño es relativamente pequeño en comparación con las muestras utilizadas para la medida de la actividad de enzimas antioxidantes (80-120 mg de peso fresco). El pequeño tamaño de las muestras ha permitido la selección de síntomas visibles en distinta proporción.

La señal paramagnética del Mn(II) es típica de los tejidos vegetales (Hepburn *et al.*, 1986). El manganeso es un elemento esencial para las plantas y un cofactor de las arginasas, fosfotransferasas, superóxido dismutasas y forma parte del complejo de escisión del agua en el aparato fotosintético (Marshner, 1986). La señal ESR del Mn(II) es intensa en las acículas de las coníferas y ha sido utilizada como bioindicador de la contaminación por ozono (Alberti *et al.*, 2000). Se ha observado una disminución en la intensidad de la señal del manganeso tras la exposición a ozono, hecho que se ha asociado a la desintegración del PSII (Iqbal *et al.* 1997; Valavanidis *et al.*, 2004). En el presente estudio no se ha encontrado variación en la intensidad de la señal del Mn(II); estos resultados están de acuerdo con las observaciones en trigo expuesto a aire ambiental enriquecido con 80 nmol mol<sup>-1</sup> de O<sub>3</sub> (Reichenauer y Goodman, 2001). Sin embargo, se han encontrado disminuciones significativas en la señal ESR del Mn(II) en centeno fumigado con 120 nmol mol<sup>-1</sup> de O<sub>3</sub> durante 4 semanas (Runeckles y Vaartnou, 1997) y en acículas de pino crecido en zonas con altas concentraciones de este contaminante (Valavanidis *et al.*, 2004). Debido a que la señal del Mn(II) era estadísticamente independiente de la dosis de ozono y de los síntomas visibles, esta señal se ha utilizado para normalizar la señal del RL. La señal ESR con g = 4.27 no se observó en los espectros de patata. Estos resultados son coherentes con la débil señal encontrada en trigo expuesto a aire ambiental suplementado con 80 y 120 nmol mol<sup>-1</sup> de ozono (Reichenauer y Goodman, 2001).

Los resultados presentados muestran una señal de una sola línea correspondiente a uno o varios radicales libres permanentes, con g = 2.0105 ± 0.0014 y anchura de banda de aproximadamente 0.75 mT. Se han observado anchuras de banda considerablemente mayores en las señales de radicales libres obtenidas mediante ESR en banda X para tratamientos con ozono (Runeckles y Vaartnou, 1997; Reichenauer y Goodman, 2001). Los valores del factor g citados en

la literatura se sitúan en el rango 2.001 - 2.003, claramente inferior al factor g observado en este estudio. Debido a las diferencias en el factor g y anchuras de banda citadas, y en los tratamientos con ozono (crónicos o agudos) aplicados en los distintos estudios, es posible que se formen diferentes tipos de radicales libres como resultado de los daños por ozono. Desafortunadamente, no es posible determinar con exactitud la naturaleza química del radical o radicales libres formados por la exposición a ozono. Estudios previos con ozono y otros procesos de estrés (senescencia y desecación) han asignado las señales observadas a diferentes radicales de tipo quinona y semiquinona (Atherton *et al.*, 1993), radicales fenoxi u otros radicales atrapados en estructuras macromoleculares como las proteínas (Goodman y Reichenauer, 2003). La asignación de la señal a un RL derivado de la quinona ha sido discutida previamente (Goodman, 1995).

La hipótesis inicial de trabajo consistente en que la concentración de radicales libres estaría relacionada con la exposición a ozono se basaba en la respuesta de los enzimas antioxidantes (guaiacol peroxidasa, glutatión peroxidasa, ascorbato peroxidasa, etc.) y compuestos antioxidantes (como el ácido ascórbico y el glutatión) a este contaminante. Ambos sistemas, enzimáticos y no enzimáticos, son afectados por la exposición a ozono (Iqbal *et al.*, 1997; Pell *et al.*, 1997; Schraudner *et al.*, 1997). Sin embargo, los resultados preliminares en banda Q no apoyaban dicha hipótesis. Estos inesperados resultados han conducido al estudio de otros parámetros que se relacionaran con la intensidad de la señal del RL, como los síntomas visibles. La ausencia de relación entre la señal del RL y los tratamientos con ozono en las OTC se podría atribuir al pequeño tamaño de las muestras utilizadas para la espectroscopía en banda Q, que no serían representativas de los síntomas visibles de la hoja completa.

Se ha desarrollado un método para medir los RL en fragmentos de hoja con diferente proporción de síntomas visibles. En base a las medidas de estabilidad de la señal ESR, se asumió que la intensidad de la señal no disminuía significativamente durante el corto período de tiempo requerido para la selección y fotografía de la muestra. Es importante destacar que la obtención de muestras con un alto porcentaje de daño visible a partir de hojas CF fue una tarea difícil. Por otra parte, se pudieron seleccionar pocas muestras con una baja proporción de daño por ozono en hojas NF<sup>+</sup>. Esto es una consecuencia de que la proporción de zonas dañadas en las hojas aumentó con la concentración de ozono en las OTC.

Existen diferentes métodos para medir los síntomas visibles. Las técnicas más utilizadas hasta el momento están basadas en la estimación visual (Horsfall y Barratt, 1945). La valoración visual está limitada por la subjetividad del observador y por las variaciones intra- e inter-observador. La principal ventaja del análisis de imagen consiste en la visualización simultánea de la

heterogeneidad de los síntomas visibles de la hoja. Con este método se puede determinar con rigor las áreas lesionadas de la imagen de la hoja para evaluar la severidad de la exposición al ozono en patata. Este procedimiento podría ser útil para llevar a cabo medidas de evolución de los síntomas visibles por ozono y también para valorar los síntomas causados por otros contaminantes atmosféricos.

Con la finalidad de conocer la relación entre los síntomas visibles y la intensidad de la señal del RL, los datos experimentales se ajustaron mediante una regresión polinomial. Los parámetros estadísticos de dicho ajuste ( $R^2$  ajustada y RMSE) demostraron que los valores calculados eran similares a los valores observados. Había una relación estadísticamente significativa entre la intensidad del RL y los síntomas visibles. La relación encontrada sugería que este RL se acumula principalmente cuando los síntomas visibles exceden un cierto límite, posiblemente debido a que los mecanismos antioxidantes de las células no son suficientes para su detoxificación.

## CONCLUSIONES

En conclusión, estos resultados constituyen una nueva aproximación experimental para el estudio de los efectos deletéreos del ozono y otros contaminantes atmosféricos sobre los cultivos agrícolas. En un campo magnético de 1.25 T para la banda Q (en comparación con 0.36 T para la banda X), el sexteto del Mn(II) tenía mucha mayor resolución y la señal del radical no se superponía con los componentes hiperfinos de la señal del Mn(II); en definitiva, se minimizaba el ruido, el tamaño de la muestra y otras limitaciones de la espectroscopía ESR en banda X. Por lo tanto, la banda Q es mucho más conveniente que la banda X para el estudio de los tejidos vegetales. Los espectros ESR de las hojas de patata mostraron un radical permanente inducido por la exposición a ozono. Además, existe una relación entre la intensidad (medida como área bajo la curva) de la señal del RL y el porcentaje de daño foliar visible. En suma, la espectroscopía ESR en banda Q representa una herramienta valiosa para la detección de especies paramagnéticas inducidas por ozono en cultivos agrícolas.

### Agradecimientos

Quiero agradecer al profesor Carlos Gómez por colaborar con su magnífico equipo de ESR y por encontrar siempre un hueco en su apretada agenda para la realización de las medidas, y a Sam Benmansour y Chema por su gran ayuda con las medidas de ESR. Agradezco también al profesor José Pertusa su valioso asesoramiento en análisis de imagen.

- CAPÍTULO 6 -

ALTERACIONES EN LA ANATOMÍA FOLIAR  
Y DETECCIÓN HISTOQUÍMICA DE ROS  
EN PLANTAS TRATADAS CON OZONO





## **RESUMEN**

Se han empleado técnicas microscópicas para el estudio del efecto de una exposición crónica a ozono sobre la anatomía, ultraestructura celular, contenido en almidón, y localización de radical superóxido y peróxido de hidrógeno en hojas de patata. Se mantuvieron plantas de patata durante todo su ciclo desde la siembra hasta la cosecha en el interior de cámaras abiertas, expuestas a tres tratamientos: aire filtrado de ozono (CF), aire ambiental (NF) y aire con una concentración de ozono superior a la concentración ambiental (NF<sup>+</sup>); una vez alcanzada la madurez del cultivo, se recolectaron hojas jóvenes y hojas adultas para su estudio. Las principales alteraciones causadas por el ozono, observadas al microscopio óptico mediante la tinción con azul de toluidina y confirmadas mediante microscopio electrónico, fueron la degradación de la lámina media y oxidación de la pared celular, junto con la desaparición de la vacuola; estos procesos provocaron la adopción de formas estrelladas en las células, desorganización del contenido celular, y el colapso celular en las zonas más afectadas. Los daños afectaron principalmente al parénquima lagunar, en especial las zonas próximas a los estomas. Además, se encontraron grandes acúmulos de calosa en el floema. Estas alteraciones se observaron en los tratamientos NF y NF<sup>+</sup>, aunque fueron más intensas y prematuras en este último, puesto que se observaron también en hojas jóvenes. La tinción con lugol manifestó la acumulación de almidón en las células dañadas del mesofilo en los tratamientos NF y NF<sup>+</sup>. Se detectó radical superóxido mediante precipitación con NBT: se observó una distribución parcheada que afectaba a grupos de células, tanto en el parénquima en empalizada como en el parénquima lagunar en los tres tratamientos, aunque más abundante en el parénquima lagunar de las muestras NF y NF<sup>+</sup>; en la célula, el radical superóxido se encontró en la pared y/o plasmalema, membrana de los cloroplastos, grana y tonoplasto. Se localizó peróxido de hidrógeno mediante la precipitación con CeCl<sub>3</sub> en muestras NF<sup>+</sup>; el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observó en la pared celular, plasmalema, disperso por el citosol y en el interior de algunos orgánulos como cloroplastos y peroxisomas; también se encontró H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el interior del floema sugiriendo una relación con la acumulación de calosa.

## INTRODUCCIÓN

Los efectos deletéreos del ozono en los vegetales y en concreto en los cultivos agrícolas han sido documentados en numerosos estudios desde hace algo más de 30 años (Tingey *et al.*, 1972; Fiscus *et al.*, 2005). Desde entonces, han proliferado los estudios sobre el impacto del ozono en los procesos fisiológicos y bioquímicos de los vegetales. Las siguientes referencias (Heagle *et al.*, 1979; Lee *et al.*, 1984; Pell *et al.*, 1992; Ranieri *et al.*, 1996a; Del Valle-Tascón y Carrasco-Rodríguez, 2004; Carrasco-Rodríguez y Del Valle-Tascón, 2001; Hassan, 2006) son sólo un pequeño ejemplo. En comparación con estos trabajos, los estudios realizados a nivel microscópico son relativamente escasos y recientes. El estudio microscópico está empezando a tomar importancia debido a que se considera una herramienta muy potente para la validación de los síntomas visibles encontrados en condiciones naturales, es decir, para comprobar que los daños macroscópicos observados en la superficie de las hojas están asociados al ozono (Vollenweider *et al.*, 2003; Günthardt-Goerg y Vollenweider, 2007). La necesidad de validación de los síntomas visibles causados por ozono ha surgido recientemente, enmarcada en la decisión de inspeccionar los daños por este contaminante en los ecosistemas forestales europeos tomada en el año 2001 por la Comisión Económica para Europa de las Naciones Unidas y el Programa Cooperativo Internacional para la evaluación de los efectos de la contaminación atmosférica sobre los bosques (UNECE ICP-Forests; para mayor información ver <http://www.icp-forests.org>). Por este motivo, los estudios microscópicos se han realizado principalmente en especies de interés forestal, mientras que las especies agrícolas permanecen sin ser estudiadas a este nivel.

Algunos de los efectos del ozono sobre las plantas observados al microscopio son: condensación de material fenólico en las vacuolas (Günthardt-Goerg *et al.*, 2000), engrosamiento de la pared celular (Pääkkönen *et al.*, 1995), engrosamiento de la cutícula, aumento de los espacios intercelulares, disminución del número y tamaño de los cloroplastos (Reig-Armiñana *et al.*, 2004), deposición de calosa en las paredes del parénquima en empalizada (Gravano *et al.*, 2003) y, en general, una aceleración de los procesos de senescencia. Cabe destacar que se han observado alteraciones anatómicas importantes causadas por el ozono sin que se manifiesten síntomas visibles en la superficie de la hoja, como en el caso del lentisco (Reig-Armiñana *et al.*, 2004).

La implicación de especies reactivas del oxígeno, como el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno, en el daño causado por ozono ha sido ampliamente estudiada mediante diferentes parámetros indirectos medidos tras la exposición de la planta a este contaminante, como la generación de productos de la peroxidación de lípidos (Ranieri *et al.*, 1996b), alteración de la

permeabilidad celular (Heath, 1988) o el aumento de la actividad de enzimas antioxidantes (Rao *et al.*, 1995). Además de la formación de ROS como consecuencia de la interacción del ozono con los constituyentes del apoplasto (Grimes *et al.*, 1983), se ha demostrado que el O<sub>3</sub> induce en la planta la producción activa de ROS, de manera similar a la respuesta hipersensitiva (HR) provocada por patógenos que conduce a la muerte celular programada en la zona de invasión. En plantas fumigadas con ozono y tratadas con DPI, un inhibidor de las enzimas NAD(P)H-oxidasas (NOX), se ha demostrado la participación de estas enzimas en la generación de superóxido como respuesta a este contaminante (Rao y Davis, 1999; Pellinen *et al.*, 1999). Las NOX son enzimas localizadas en el plasmalema (Sagi y Fluhr, 2006) y están relacionadas con la producción de superóxido como respuesta a la invasión de patógenos (Torres *et al.*, 2002). Además de las NOX, se ha sugerido que múltiples sistemas de generación de ROS podrían estar implicados en la respuesta al O<sub>3</sub>, como las peroxidasas de la pared celular y las oxalato oxidasas (Pellinen *et al.*, 1999; Langebartels *et al.*, 2002; Kangasjärvi *et al.*, 2005).

El radical superóxido puede participar en diversas reacciones deletéreas (Fridovich, 1986). El peróxido de hidrógeno es menos tóxico que otras especies reactivas del oxígeno; se ha sugerido que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podría tener una función como mensajero secundario por su capacidad de rápida difusión desde los lugares de generación e inducción de genes implicados en la defensa frente al estrés (Kalyanaraman *et al.*, 1996; Van Camp *et al.*, 1998) y su participación en una ruta de transducción que lleva a la muerte celular (Kovtun *et al.*, 2000).

En este capítulo, plantas de patata han sido expuestas durante todo su ciclo de cultivo a concentraciones ambientales de ozono y concentraciones de ozono superiores a las ambientales con los siguientes objetivos: en primer lugar, el estudio de los efectos de dichas dosis de ozono sobre los tejidos foliares y a nivel subcelular; las alteraciones encontradas pueden desvelar la base anatómica de la sensibilidad de esta especie al ozono y la consiguiente disminución del rendimiento agrícola encontrada en el Capítulo 3. El segundo objetivo de este trabajo es la localización histoquímica de radicales superóxido y de peróxido de hidrógeno, para determinar los tejidos y los compartimentos celulares donde aparecen estas especies reactivas del oxígeno como respuesta a una exposición crónica a ozono.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material vegetal

Para este estudio se sembraron plantas de patata (*Solanum tuberosum* L. cv. Agria) en macetas. Las macetas se colocaron en cámaras abiertas, donde las plantas desarrollaron todo su ciclo expuestas a tres concentraciones de ozono: aire filtrado con carbón activado, con concentraciones muy bajas de ozono (CF), aire ambiental (NF) y aire ambiental enriquecido con ozono (NF<sup>+</sup>). El cultivo de la patata y los tratamientos en las cámaras abiertas están descritos en el Capítulo 2.

Se realizaron dos cultivos, uno en el año 2004 (siembra realizada el 20 de enero y cosecha el 18 de mayo) y otro en el 2005 (sembrado el 3 de febrero y cosechado el 19 de mayo).

Las muestras fueron recolectadas cuando el cultivo había alcanzado la madurez. Las muestras utilizadas para el análisis de la anatomía foliar y del contenido en almidón, y para la localización subcelular de peróxido de hidrógeno se recogieron el 6 de mayo de 2004, y las muestras empleadas para la detección histoquímica de radicales superóxido se recogieron el 26 de abril de 2005. En ambos casos el muestreo se realizó a las 13 h. del mediodía. Se recolectó 1 hoja joven y 1 hoja adulta por planta, de posición en el tallo y tamaño similar. Se tomaron 6 muestras de cada edad por tratamiento de ozono. Las hojas adultas se utilizaron para todos los análisis; las hojas jóvenes se utilizaron únicamente para el estudio de la anatomía foliar.

### 2. Métodos microscópicos

#### 2.1- Análisis de la anatomía foliar y del contenido en almidón

El estudio de la estructura de los tejidos foliares y del contenido en almidón de las muestras se realizó según el siguiente protocolo:

- Fijación de las muestras en una mezcla de glutaraldehído 5 % (v/v) y paraformaldehído 5 % (v/v) tamponado con fosfato de sodio 100 mM, pH 7.2, durante 10 horas a 4 °C.
- Lavados en tampón fosfato de sodio, 3 x 10 minutos, para eliminar los restos de fijador.
- Deshidratación en una sucesión de soluciones de etanol de concentración creciente (70%, 90%, 96% y 2 x 100%, v/v). Cada uno de los pasos tuvo una duración de 30 minutos.
- Inclusión en resina acrílica RL-White de grado medio (London Resin Co.), en sucesivas mezclas de etanol absoluto / resina en distinta proporción hasta llegar a resina pura:
  - 2 etanol : 1 resina (v/v) durante 30 minutos
  - 1 etanol : 1 resina (v/v) durante 30 minutos

1 etanol : 2 resina (v/v) durante toda la noche; este paso se realizó en tubos abiertos para la máxima evaporación del etanol.

Posteriormente se pasaron a resina pura durante 1 h y se introdujeron luego en la estufa a 60 °C. Los bloques se elaboraron en tubos de polipropileno de 1 mL.

- Obtención de cortes semifinos de 1 µm de grosor con un ultramicrotomo Sorvall MT 5000 (Knifemaker, Reichert-Jung) provisto de una cuchilla de vidrio (Leica 6.4 mm).

Las secciones semifinas se tiñeron con azul de toluidina al 1% en agua destilada durante 10 segundos para la observación de la estructura de los tejidos de la hoja, o con solución acuosa de iodo al 1% (lugol), que tiñe de azul oscuro los granos de almidón.

Estas secciones se observaron y fotografiaron con un microscopio óptico Olympus provis AX 70 acoplado a una cámara digital Olympus Camedia C-2000 Z.

## **2.2- Detección histoquímica de radicales superóxido**

La detección histoquímica de radicales superóxido se llevó a cabo según el método de Hernández *et al.* (2001). Porciones cuadradas de la zona central de la hoja, de unos 3 cm de lado, fueron infiltradas con NBT (nitroblue tetrazolium) 0.1 mg/mL tamponado con HEPES-KOH 25 mM, pH 7.6 durante 2 horas a temperatura ambiente. El NBT es un indicador redox cromogénico ampliamente utilizado para demostrar la generación de aniones superóxido: cuando el NBT (color amarillo pálido) es reducido por el superóxido da lugar a depósitos insolubles de formazán, de color azul oscuro. El superóxido es el mayor responsable de la reducción del NBT a formazán (Maly *et al.*, 1989). Como controles se utilizaron muestras incubadas en la misma solución, que además contenía MnCl<sub>2</sub> 10 mM (el MnCl<sub>2</sub> es un agente dismutador del superóxido altamente efectivo).

Después de la infiltración es necesario eliminar las clorofilas para poder observar la coloración azul debida al superóxido. Para conseguir este objetivo, las muestras se lavaron con etanol 80% (v/v) durante 15 minutos a 70 °C.

A continuación se obtuvieron secciones de 2-3 mm de lado de diferentes zonas, seleccionadas al azar, de cada porción de hoja. Se evitó tomar muestras en un margen de unos 0.5 cm a partir de los bordes de las porciones de hoja, ya que en esa zona se había generado radical superóxido como consecuencia del corte de la hoja. Estas secciones fueron procesadas para su observación al microscopio óptico según el siguiente protocolo:

- Deshidratación en una sucesión de soluciones de etanol de concentración creciente (70%, 96% y 2 x 100%, v/v). Cada uno de los pasos tuvo una duración de 30 minutos.

- Infiltración en acetato de isoamilo, 2 x 30 minutos.

- Infiltración en parafina (Histosec, Merck, punto de fusión de 56 - 58 °C) durante 25 minutos en estufa a 60 °C.

- Colocación de la muestra en un molde que contiene parafina líquida. Se mantiene a temperatura ambiente hasta que la parafina solidifica.

- Obtención de cortes de 10 µm de grosor con un microtomo Anglia Scientific.

Los cortes se colocan sobre portaobjetos con una película de albúmina de Mayer para su adhesión, y se introducen en la estufa a 60 °C durante 30 minutos.

- Desparafinado en xileno (2 x 30 minutos) y a continuación etanol absoluto (30 minutos).

- Montaje de los cortes con Eukitt®

Los cortes se observaron con un microscopio óptico Olympus provis AX 70, y se fotografiaron con una cámara digital Olympus Camedia C-2000 Z acoplada al microscopio.

Se observaron y fotografiaron 6 muestras por cada uno de los tres tratamientos aplicados (CF, NF y NF<sup>+</sup>), 3 cortes por muestra y 5 campos de 200 aumentos por corte, lo que hace un total de 5 fotografías x 3 cortes x 6 muestras x 3 tratamientos = 270 fotografías.

Las fotografías realizadas se utilizaron para la localización de radical superóxido y su cuantificación. La cuantificación de radical superóxido se realizó mediante estimación visual del porcentaje de área de la sección transversal de la hoja teñida de azul. La estimación visual está aceptada actualmente como la técnica más precisa para cuantificar ciertos tipos de tinciones histológicas (Brey *et al.*, 2003). Las imágenes fueron valoradas por dos personas independientes y en tres días distintos para mitigar la posible variación inter- e intra- observador. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney; las diferencias se consideraron significativas con p-valores  $\leq 0.05$ .

### 2.3- Localización subcelular de peróxido de hidrógeno

La localización subcelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizó por el método de Bestwick *et al.* (1997). Secciones cuadradas de 2-3 mm de lado de diferentes partes de hojas adultas recogidas al mediodía (13:00 h) fueron infiltradas con una solución recién preparada de cloruro de cerio (CeCl<sub>3</sub>) 5 mM en tampón MOPS 50 mM, pH 7.2, durante 6 horas a 4 °C. Durante esta incubación, los iones Ce<sup>+3</sup> reaccionan con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente en la muestra y dan lugar a precipitados de perhidróxido de cerio,

Ce(OH)<sub>2</sub>OOH y Ce(OH)<sub>3</sub>OOH. Los precipitados de perhidróxido de cerio son electrondensos; esta propiedad permite su observación al microscopio electrónico.

Como controles se usaron muestras incubadas en tampón MOPS sin CeCl<sub>3</sub>.

A continuación las muestras fueron procesadas para su observación al microscopio electrónico de transmisión según el siguiente protocolo:

- Lavados en tampón MOPS, 2 x 10 minutos.
- Fijación de las muestras en una mezcla de glutaraldehído 5 % (v/v) y paraformaldehído 5 % (v/v) tamponado con fosfato de sodio 100 mM, pH 7.2, durante 10 horas a 4 °C.
- Lavados en tampón fosfato de sodio, 3 x 10 minutos, para eliminar los restos de fijador.
- Post-fijación en tetróxido de osmio 1% (v/v) tamponado con fosfato sódico durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Lavados en tampón, 3 x 20 minutos.
- Deshidratación en una sucesión de soluciones de etanol de concentración creciente (50%, 70%, 90%, 96% y 2 x 100%, v/v). Cada uno de los pasos tuvo una duración de 30 minutos.
- Inclusión en resina acrílica RL-White de grado medio (London Resin Co.), en sucesivas mezclas de etanol absoluto / resina en distinta proporción hasta llegar a resina pura:
  - 2 etanol : 1 resina (v/v) durante 30 minutos
  - 1 etanol : 1 resina (v/v) durante 30 minutos
  - 1 etanol : 2 resina (v/v) durante toda la noche; este paso se realizó en tubos abiertos para la evaporación completa del etanol.

Los bloques se elaboraron en tubos de polipropileno de 1 mL.

- Obtención de cortes semifinos de 1 µm de grosor, que se utilizaron como control del material y para estudiar el tejido al microscopio óptico.
- Realización de cortes ultrafinos de 70 a 90 nm de grosor para los estudios de ultraestructura. Estos cortes se hicieron a partir de la selección de los cortes semifinos realizados previamente. Las secciones semifinas y ultrafinas se obtuvieron con un ultramicrotomo Sorvall MT 5000 (Knifemaker, Reichert-Jung) provisto de una cuchilla de vidrio (Leica 6.4 mm).
- Recogida de los cortes en medio acuoso sobre rejillas de cobre de 200 mesh.
- Contrastado de los cortes con citrato de plomo al 1% (v/v) durante 12 minutos y lavado con agua destilada.

Todos los pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente, excepto cuando se especifica otra temperatura.

## *Capítulo 6*

La observación de las muestras se realizó con un microscopio electrónico de transmisión JEOL mod. JEM-1010 con una tensión de aceleración de 100 kV (Servicio de Microscopía de la Universidad de Valencia).



## **RESULTADOS**

### **1. Anatomía foliar**

#### **1.1- Efecto de la edad**

La tinción con azul de toluidina es una tinción diferencial que revela muchos detalles de la forma e integridad de las células, así como de muchos aspectos histoquímicos. Existen ciertas diferencias en la anatomía de hojas jóvenes y hojas adultas de plantas crecidas en aire con concentraciones muy bajas de ozono (CF). Con la edad, se dan una serie de cambios que se describen a continuación. Los cloroplastos aumentan de tamaño y su contenido se hace más denso por aumento del número de grana y por la acumulación moderada de almidón. La cutícula y las paredes celulares adquieren un color violáceo al teñirse con azul de toluidina, color que indica el aumento de la densidad en los depósitos de celulosa y un ligero proceso normal de oxidación; los espacios intercelulares aumentan (figuras 1, 3 y 4). En el floema aparecen pequeñas acumulaciones de calosa, sin impedir su función y con poca incidencia en la carga floemática de la planta (figuras 2 y 7). Todos estos síntomas son característicos de un proceso de senescencia natural.

#### **1.2- Efecto del ozono**

En las secciones transversales de hojas adultas expuestas a aire filtrado de ozono (CF) se puede observar una estructura de los tejidos sin anomalías, formada por células funcionales. Desde la superficie adaxial hasta la superficie abaxial de la hoja se puede encontrar (figuras 3 y 4): una cutícula de escaso grosor, una epidermis del haz cuyas células disponen de paredes delgadas en la que se intercalan estomas (figura 20), parénquima en empalizada monoestratificado de células grandes, vacuola central y cloroplastos menudos en disposición perivacuolar; haces vasculares desprovistos de vaina, parénquima lagunar que ocupa algo más de un 50% del volumen del mesofilo y que conecta con las células epidérmicas del envés sin ningún estrato celular especializado intermedio; la epidermis del envés presenta estomas abundantes y en número significativamente superior al del haz. Tanto en el parénquima en empalizada como en el parénquima lagunar las células están turgentes y unidas entre sí por una lámina media intacta. Los cloroplastos se disponen junto a la pared celular alrededor de una vacuola central (figuras 5 y 6). Los haces vasculares son funcionales (figuras 7 y 8), con pequeñas deposiciones de calosa en el floema de hojas adultas (figura 7), característica propia del proceso normal de senescencia como se ha comentado en el apartado anterior.

En hojas jóvenes crecidas en cámaras con aire ambiental (NF) se observa un ligero aumento de los espacios intercelulares y una disminución del número de cloroplastos en comparación con las cámaras filtradas (figuras 15 a 18). En hojas adultas se aprecia una serie de alteraciones de la anatomía foliar. En el parénquima empalizada se observa una degeneración de la lámina media en algunos puntos de la pared celular que provoca la separación de las células contiguas en dichos puntos (figuras 19 y 21); en algunas células los cloroplastos están desorganizados, ocupando la zona central por una clara disminución del tamaño de la vacuola, y el contenido vacuolar se hace más denso (figuras 19 y 21). Estos efectos son mucho más acentuados en el parénquima lagunar, donde una importante proporción de células adquiere una forma angulosa como consecuencia de la pérdida de la lámina media, de la degeneración de la pared primaria y de la pérdida de turgencia vacuolar; sus cloroplastos son de menor tamaño y ocupan el centro de la célula, debido probablemente a la desaparición del tonoplasto (figura 23). Algunas células del parénquima lagunar sufren un mayor grado de degeneración y aparecen colapsadas, con un contenido muy denso (figuras 19 y 24). La pérdida de cohesión entre las células y la disminución de su volumen tiene como consecuencia el aumento considerable de los espacios intercelulares, sobre todo bajo los estomas, de manera que las cámaras subestomáticas aumentan de tamaño y se extienden por gran parte del mesofilo (figura 19). También se puede observar una ligera degeneración de la pared primaria del xilema (figura 24) y en los estomas aumenta la densidad del citoplasma (figuras 22 y 25).

En las plantas desarrolladas en cámaras con aire fumigado con ozono (NF<sup>+</sup>) los procesos descritos anteriormente son mucho más marcados y acelerados, puesto que algunos de estos procesos aparecen en las hojas jóvenes. Como se observa en las figuras 29 a 32, pertenecientes a muestras jóvenes, la cutícula y las paredes celulares adquieren un color ligeramente violáceo con el azul de toluidina; dicha tonalidad indicaría una compactación y oxidación de las fibras celulósicas. Las células empiezan a perder cohesión por la oxidación y desaparición consiguiente de las láminas medias, adoptando formas irregulares diversas, desde una ligera ondulación (figura 29) hasta formas angulosas, tal como se ha comentado anteriormente (figuras 30 y 31). Los cloroplastos se hacen más densos y aumenta su contenido en almidón (figura 29), y se ubican por toda la célula (figuras 29-31), síntoma de la desaparición de la vacuola central. En el floema se observan deposiciones de calosa (figura 32), y como consecuencia disminuye la luz de este tejido conductor.

En hojas adultas fumigadas con ozono la degeneración afecta a todos sus tejidos de manera muy acusada. El colapso celular alcanza grandes proporciones en el parénquima lagunar, que está lleno de células estrelladas (figuras 38, 39, 41 y 44), de manera que el contacto celular desaparece

casi por completo en la mayoría de las células; esta situación implica la pérdida de comunicación entre células por medio de punteaduras y de plasmodesmos. En algunas zonas las células están colapsadas o prácticamente han desaparecido (figuras 35 y 36). Esta degradación se extiende por el parénquima en empalizada, donde las células también han adquirido forma estrellada o están colapsadas (figuras 33 a 37). Se observan acúmulos probablemente de sustancias fenólicas en el interior de las células afectadas (figuras 37, 39, 41 y 42). Incluso las células epidérmicas, en el haz y en mayor medida en el envés, aparecen colapsadas, hasta tal punto que en las zonas más afectadas la epidermis se ha convertido en una delgada línea (figuras 35, 36, 37, 39 y 40).

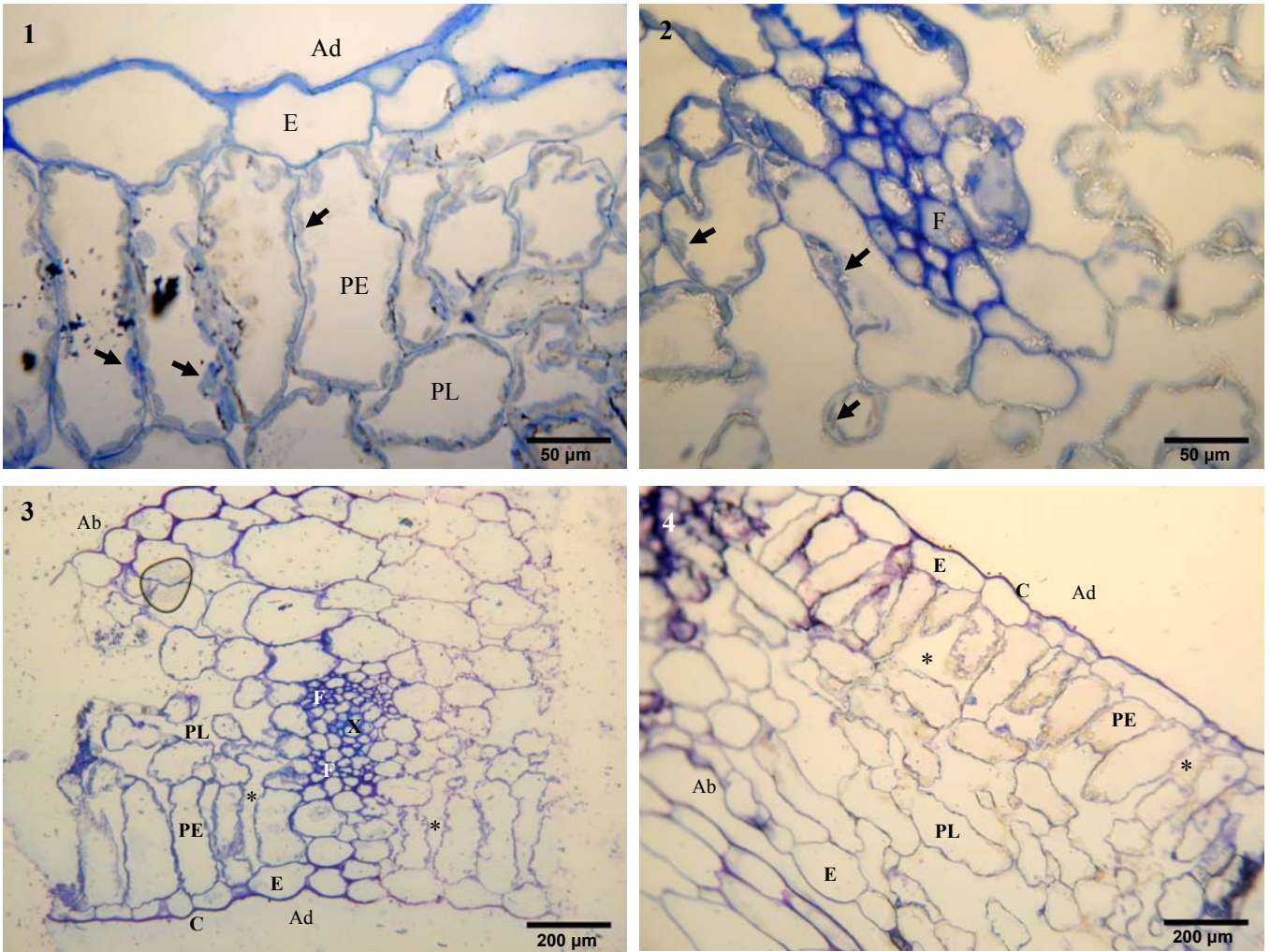
El xilema, en algunos casos, tiene un aspecto ligeramente comprimido y el floema está taponado con calosa y colapsado (figuras 42 y 43). Los estomas no están demasiado alterados, muestran una pared celular inferior engrosada y un contenido citoplásmico muy denso (figuras 40 y 44).

## **2. Contenido en almidón**

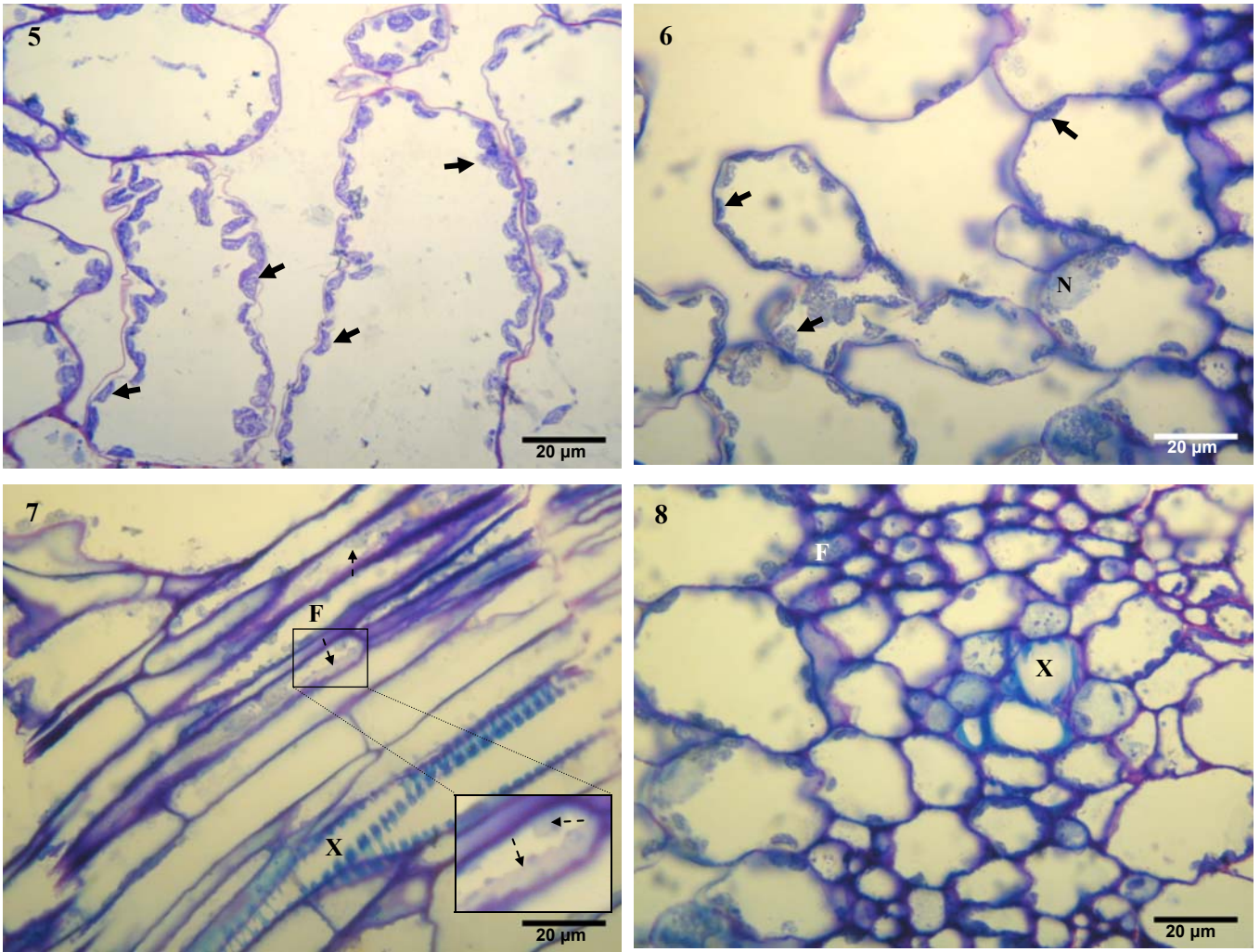
En plantas desarrolladas en aire filtrado de ozono (CF), el almidón en los cloroplastos tanto del parénquima en empalizada como del parénquima lagunar es inapreciable (figuras 11 y 13) o muy escaso (figuras 12 y 14). En los estomas, en cambio, el contenido en almidón es muy abundante (figura 10).

Cuando las plantas han crecido en presencia de concentraciones ambientales de ozono (NF), se observa un aumento de almidón en las células dañadas, es decir, en las células que presentan una morfología irregular y cuyos cloroplastos aparecen dispersos debido a la desaparición de la vacuola central (figuras 27 y 28). Los cloroplastos de los estomas, al igual que en plantas control, se muestran repletos de almidón (figura 26).

En muestras fumigadas con ozono (NF<sup>+</sup>) el almidón es abundante y, al igual que en muestras NF, aparece en las células dañadas en el parénquima en empalizada y en el parénquima lagunar (figuras 45 y 46). Cuando el deterioro celular está muy avanzado, el almidón del parénquima lagunar desaparece (figura 47). En los estomas, el almidón se mantiene de manera cuantiosa (figura 48), como en las muestras CF y NF.

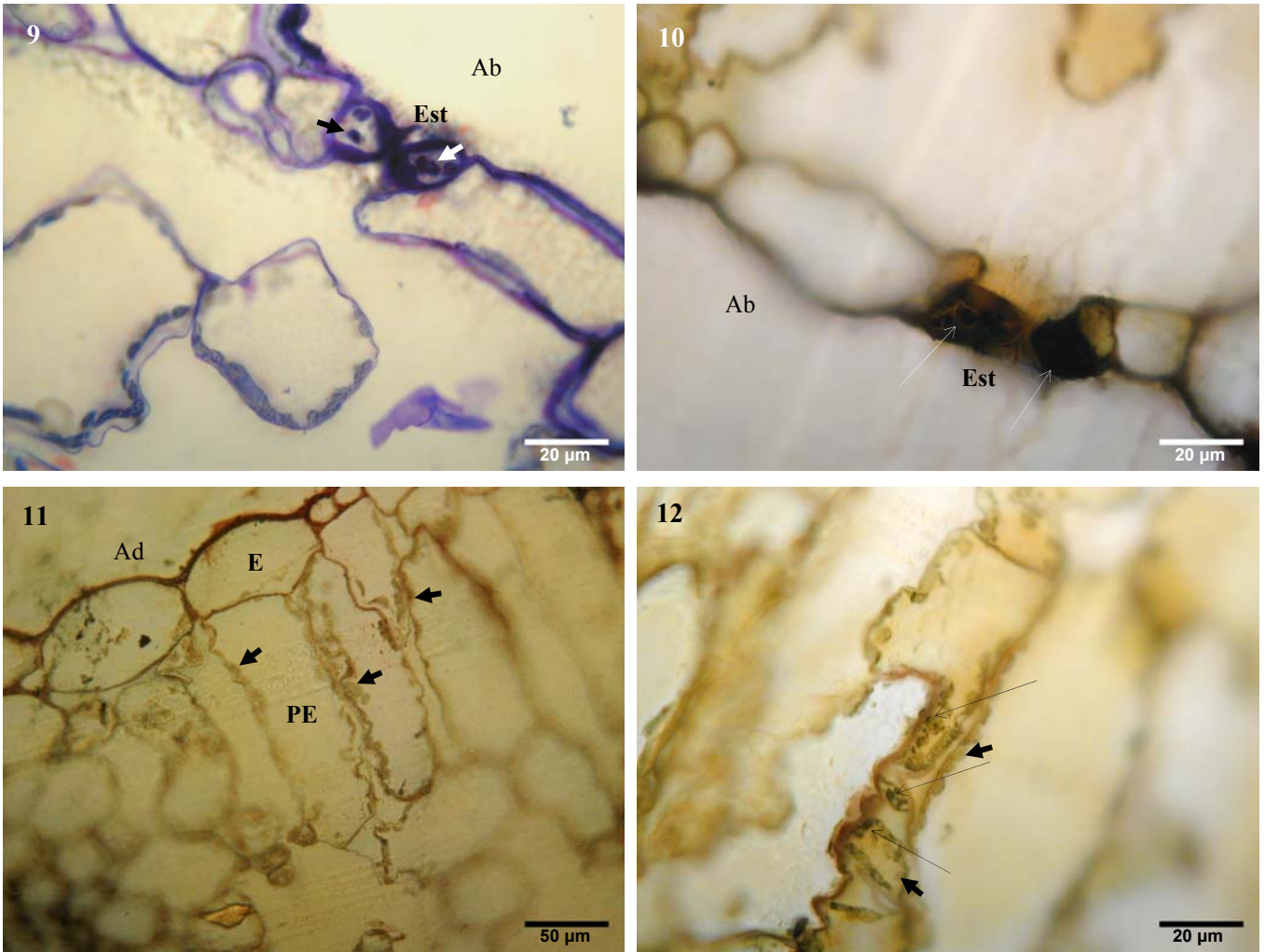


**Figuras 1-4.** Secciones transversales de hojas de patata crecida en cámaras con aire filtrado de ozono; tinción con azul de toluidina. **1:** Epidermis adaxial y parénquima en empalizada de una hoja joven sin alteraciones. Los cloroplastos son abundantes y se disponen alrededor de la vacuola central (flechas). **2:** Floema de una hoja joven no anómalo; los cloroplastos se marcan con flechas. **3 y 4:** Vista general de secciones transversales de hojas adultas en proceso de maduración y senescencia natural; se observa un aumento de los espacios intercelulares respecto a las hojas jóvenes (asteriscos) y la cutícula y las paredes celulares adquieren un color violáceo con la tinción de azul de toluidina. **Ab:** superficie abaxial de la hoja (envés), **Ad:** superficie adaxial de la hoja (haz), **C:** cutícula, **E:** epidermis, **F:** floema, **PE:** parénquima en empalizada, **PL:** parénquima lagunar, **X:** xilema.

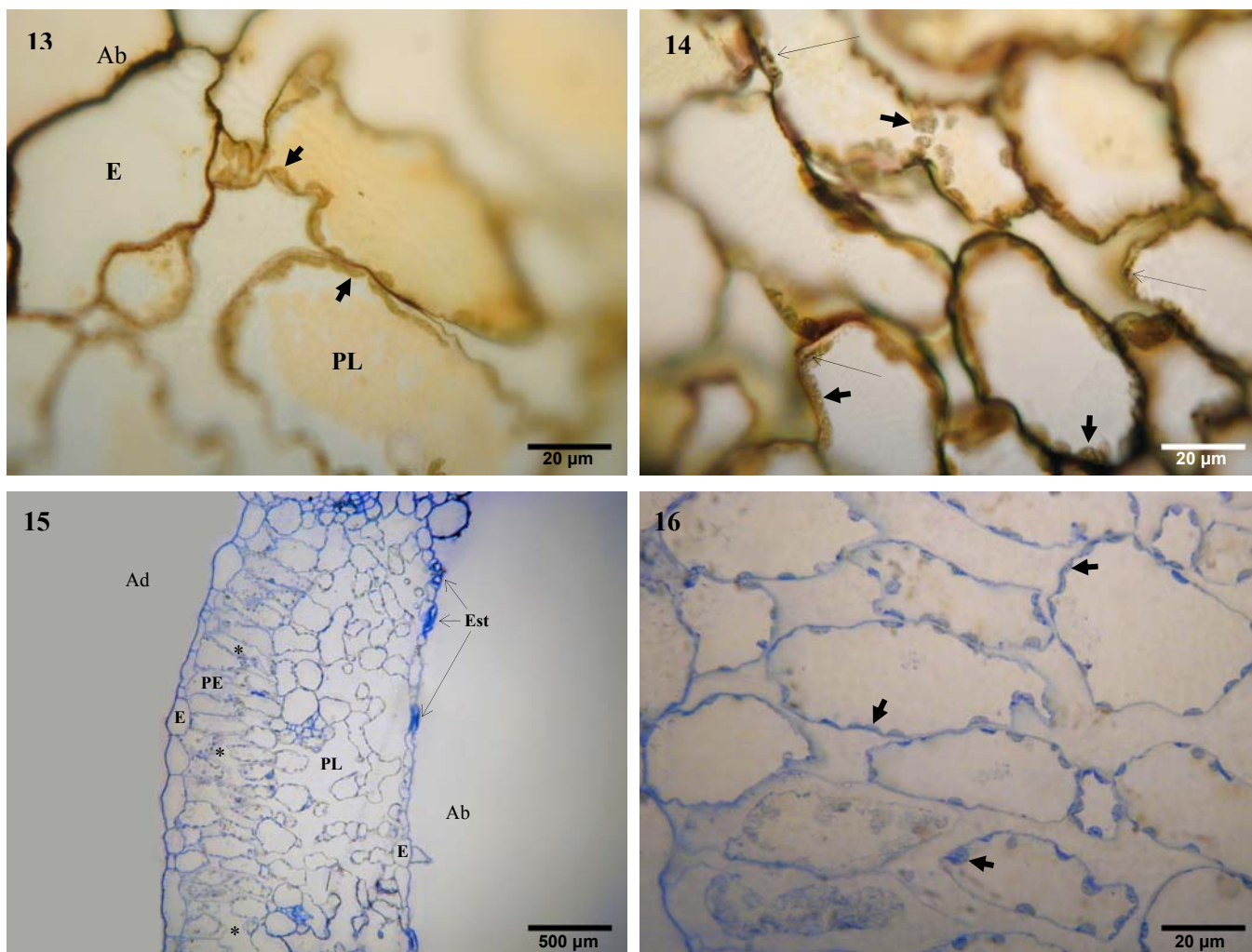


**Figuras 5-8.** Secciones transversales de hojas adultas de patata crecida en cámaras con aire filtrado de ozono, teñidas con azul de toluidina. **5:** Parénquima en empalizada; los cloroplastos presentan una disposición perivacuolar (flechas). **6:** Parénquima lagunar; las flechas señalan cloroplastos. **7:** Corte longitudinal de los haces vasculares. En el floema aparecen pequeños depósitos de calosa (flechas discontinuas), lo que indica un proceso normal de senescencia; se amplía una pequeña zona para apreciar mejor la calosa. **8:** Corte transversal de los haces vasculares. **F:** floema, **N:** núcleo, **X:** xilema.



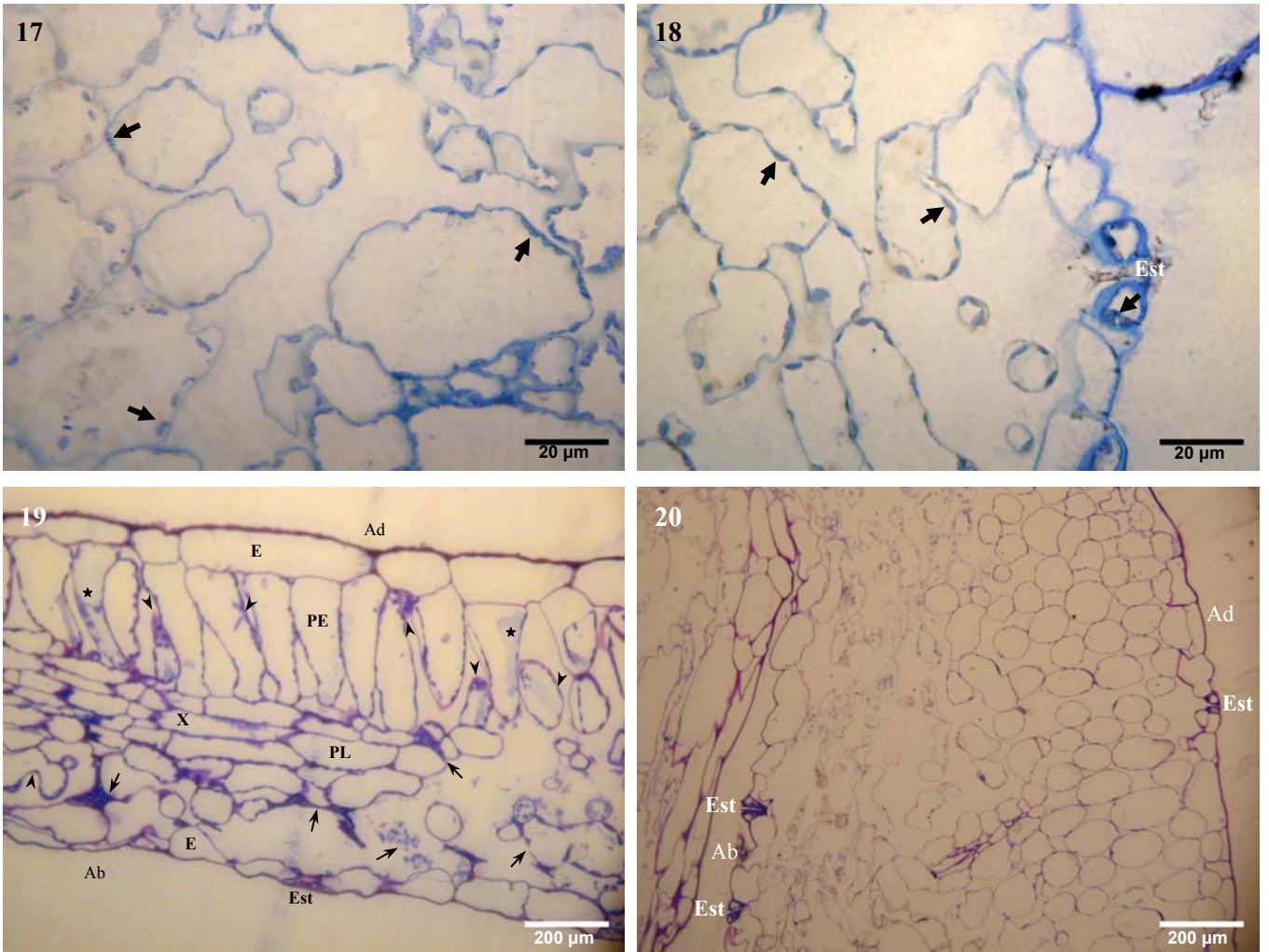


**Figuras 9-12.** Secciones transversales de hojas adultas de patata crecida en cámaras con aire filtrado de ozono (**figura 9:** tinción con azul de toluidina; **figuras 10-12:** tinción con lugol). **9:** Estoma del envés; las flechas señalan algunos de sus cloroplastos. **10:** Estoma del envés; sus cloroplastos presentan una marcada tinción con lugol debido a la abundancia de almidón (flechas). **11:** Epidermis adaxial y parénquima en empalizada; en sus cloroplastos (flechas) no se observa almidón. **12:** Parénquima en empalizada. Se observan escasos acúmulos de almidón (flechas alargadas); las flechas cortas indican los cloroplastos. **Ab:** superficie abaxial de la hoja (envés), **Ad:** superficie adaxial de la hoja (haz), **E:** epidermis, **Est:** estoma, **PE:** parénquima en empalizada.



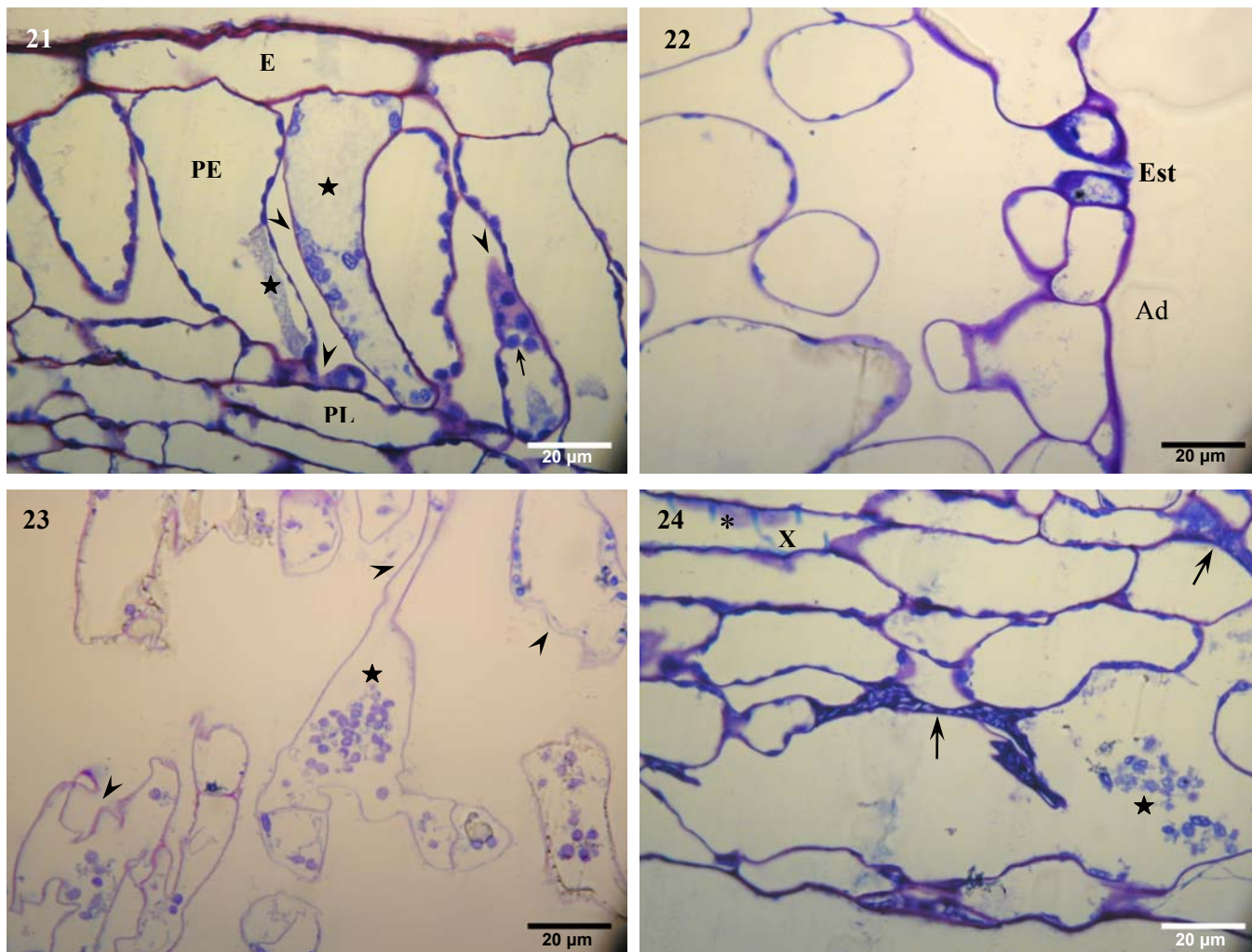
**Figuras 13-14.** Secciones transversales de hojas adultas de patata crecida en cámaras con aire filtrado de ozono; tinción con lugol. **13:** Epidermis abaxial y parénquima lagunar. La presencia de almidón es inapreciable; algunos de sus cloroplastos se señalan con flechas. **14:** Parénquima lagunar con muy pocos granos de almidón (flechas alargadas); las flechas cortas indican cloroplastos. **Figuras 15-16.** Secciones transversales de hojas jóvenes de patata crecida en cámaras con concentraciones ambientales de ozono; tinción con azul de toluidina. **15:** Vista general de una sección transversal de hoja joven; se observa un aumento de los espacios intercelulares respecto a las muestras filtradas jóvenes (asteriscos). **16:** Parénquima en empalizada, donde se aprecia una disminución del número de cloroplastos (flechas) respecto a las muestras filtradas. **Ab:** superficie abaxial de la hoja (envés), **Ad:** superficie adaxial de la hoja (haz), **E:** epidermis, **Est:** estoma, **PE:** parénquima en empalizada, **PL:** parénquima lagunar.



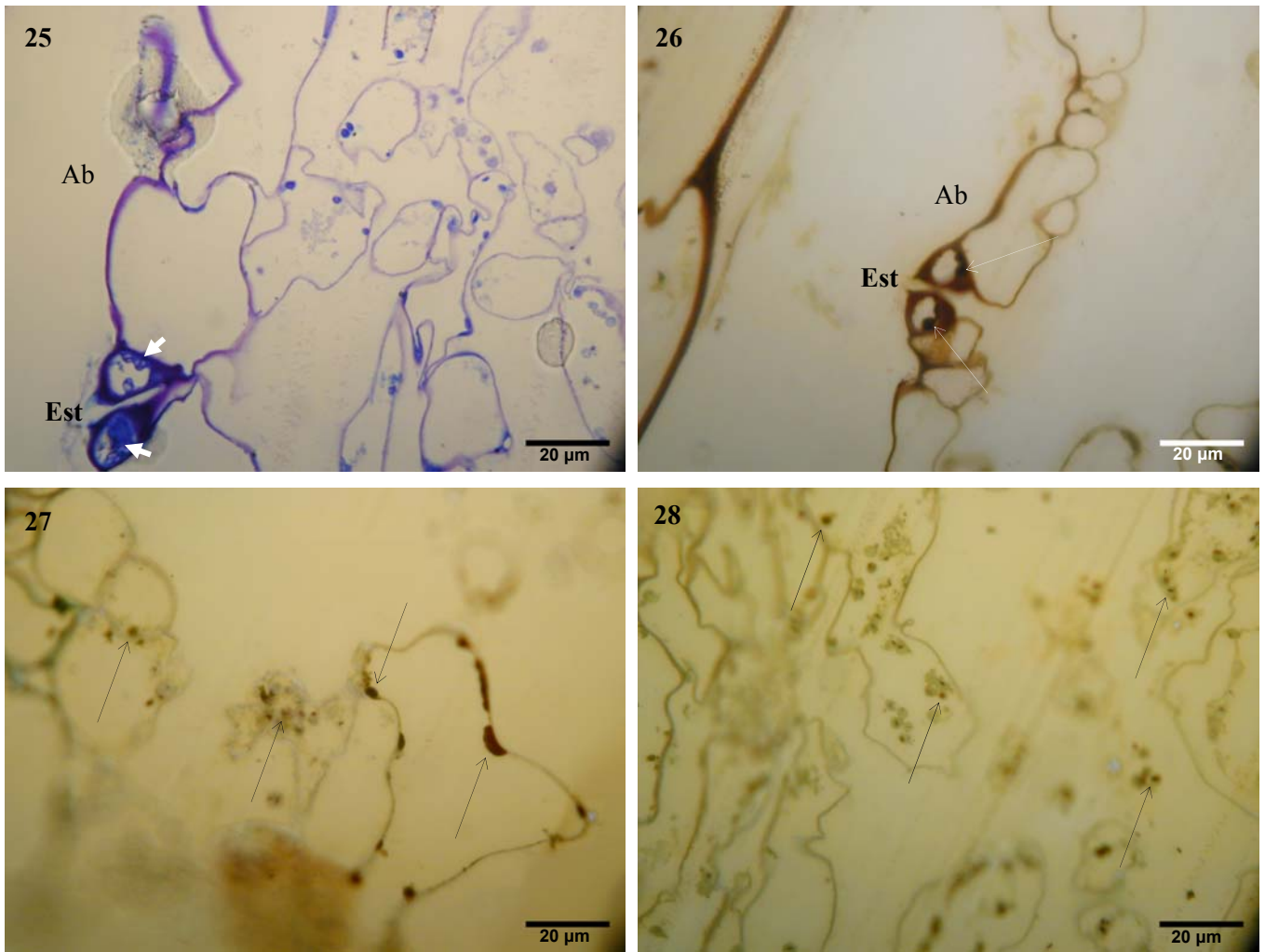


**Figuras 17-20.** Secciones transversales de hojas de patata crecida en cámaras con concentraciones ambientales de ozono; tinción con azul de toluidina. **17:** Parénquima lagunar de hoja joven; las flechas indican cloroplastos. **18:** Hoja joven. Parénquima lagunar y epidermis abaxial con un estoma; las flechas señalan cloroplastos. **19:** Vista general de una sección transversal de hoja adulta; la cutícula y las paredes celulares se tiñen de un color violáceo al igual que las muestras filtradas (indicativo de una incipiente degeneración de la celulosa); se aprecia una densificación del contenido vacuolar (estrellas) y una pérdida de cohesión en las células del mesofilo por degeneración de la lámina media (puntas de flecha) que en casos extremos conlleva el colapso celular y la liberación del contenido celular al apoplasto (flechas). **20:** Hoja adulta. Vista general de una sección transversal donde se aprecia la condición anisostomática de la patata y se observa que en el envés hay una mayor densidad de estomas que en el haz. **Ab:** superficie abaxial de la hoja (envés), **Ad:** superficie adaxial de la hoja (haz), **E:** epidermis, **Est:** estoma, **PE:** parénquima en empalizada, **PL:** parénquima lagunar, **X:** xilema.



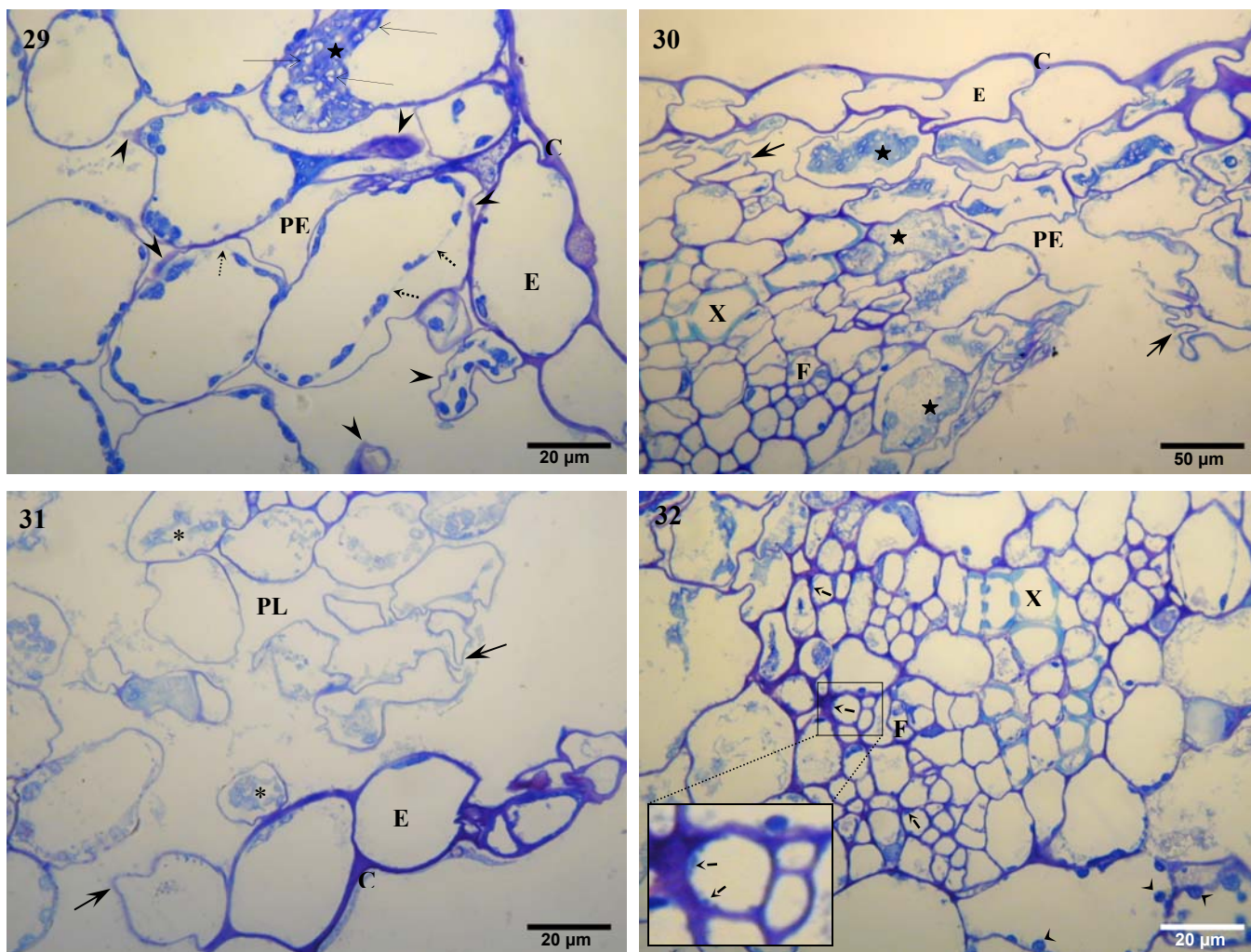


**Figuras 21-24.** Secciones transversales de hojas adultas de patata crecida en cámaras con concentraciones ambientales de ozono; tinción con azul de toluidina. **21:** Epidermis adaxial y parénquima en empalizada donde se muestra con mayor detalle la densificación del contenido vacuolar (estrellas), la pérdida de cohesión celular (puntas de flecha) y cierta desorganización de los cloroplastos (flecha). **22:** Epidermis adaxial mostrando un estoma. **23:** Parénquima lagunar donde se aprecia la adopción de formas muy irregulares e incluso angulosas por parte de las células que han perdido su lámina media (puntas de flecha) y una reubicación de los cloroplastos en el centro de la célula posiblemente por pérdida del tonoplasto (estrella). **24:** Parénquima lagunar, donde se observa con mayor detalle las células colapsadas, que poseen un contenido muy denso (flechas) y la liberación del contenido celular al apoplasto (estrella); también se observa una ligera degeneración de la pared del xilema (asterisco). **Ad:** superficie adaxial de la hoja (haz), **E:** epidermis, **Est:** estoma, **PE:** parénquima en empalizada, **PL:** parénquima lagunar, **X:** xilema.

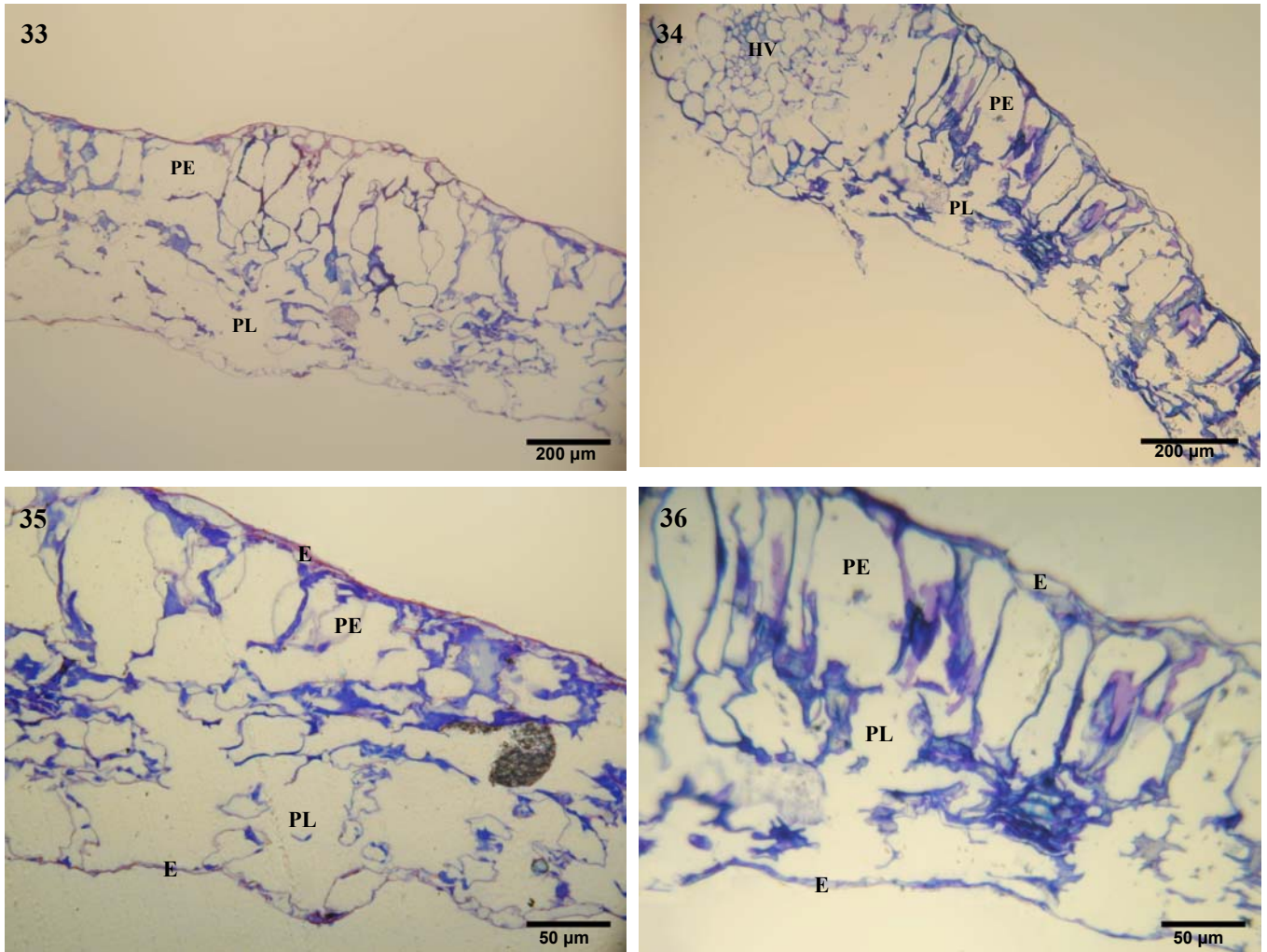


**Figuras 25-28.** Secciones transversales de hojas adultas de patata crecida en cámaras con concentraciones ambientales de ozono (**figura 25:** tinción con azul de toluidina; **figuras 26-28:** tinción con lugol). **25:** Epidermis abaxial mostrando un estoma con un citoplasma denso; las flechas indican cloroplastos. **26:** Estoma del envés cuyos cloroplastos se tiñen marcadamente con lugol, indicando un alto contenido en almidón (flechas). **27 y 28:** Parénquima lagunar donde se observa almidón en las células dañadas y en los cloroplastos liberados al apoplasto (flechas). **Ab:** superficie abaxial de la hoja (envés), **Est:** estoma.



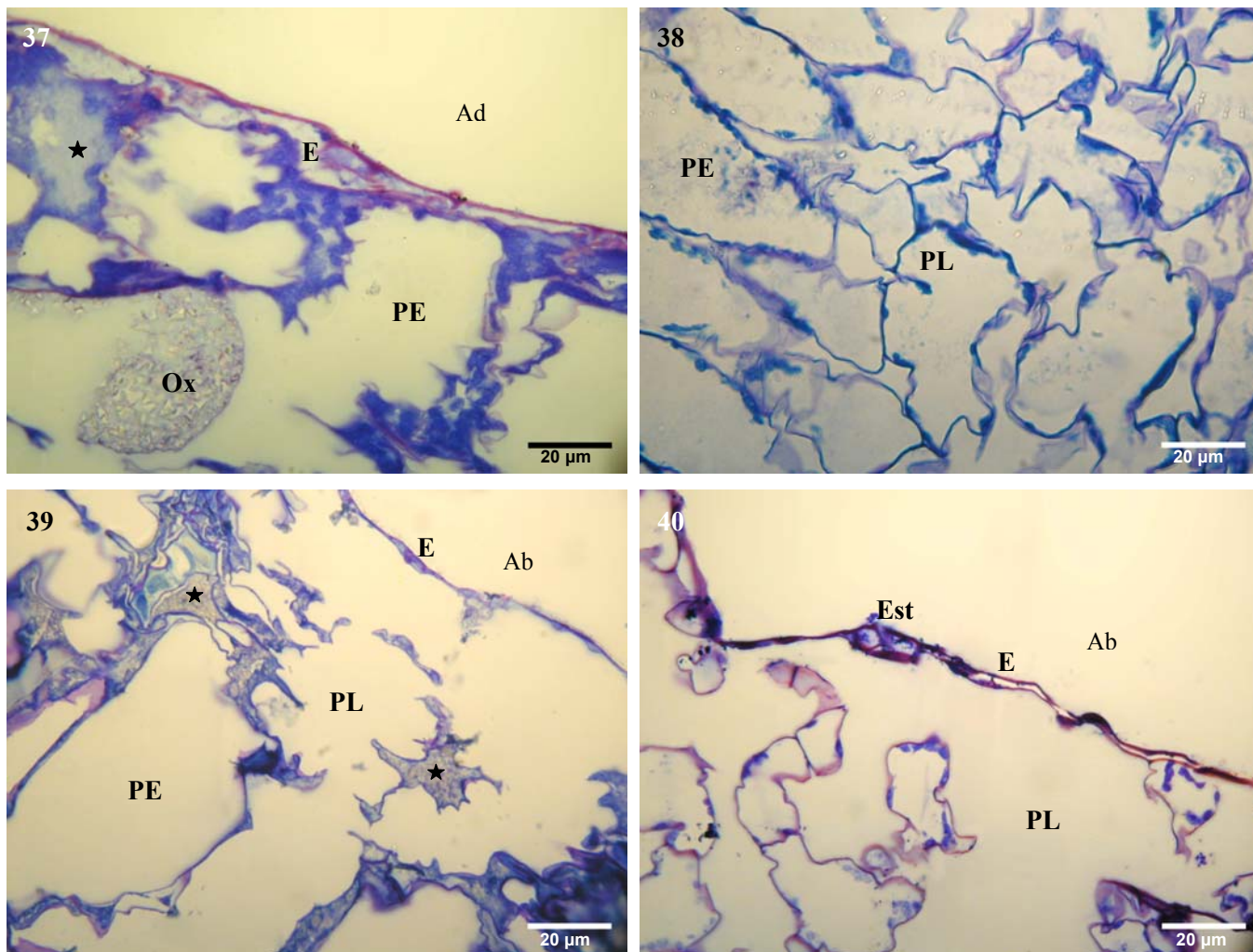


**Figuras 29-32.** Secciones transversales de hojas jóvenes de patata crecida en cámaras fumigadas con ozono; tinción con azul de toluidina. **29:** Epidermis adaxial y parénquima en empalizada (corte ligeramente paradermal), donde ya se aprecian los daños causados por el ozono: pérdida de contacto entre las células, que adoptan formas irregulares (puntas de flecha) y hacinamiento y densificación de los cloroplastos (estrella), que aparecen repletos de almidón (flechas); se puede observar la pérdida de turgencia de la vacuola central, cuyo tonoplasto se señala (flechas discontinuas), arrastrando consigo a los cloroplastos que se disponen a su alrededor. **30:** Epidermis adaxial y parénquima en empalizada (corte ligeramente paradermal), mostrando una densificación del contenido vacuolar en algunas de sus células (estrellas); la pérdida progresiva de contacto entre las células en puntos determinados por la oxidación y degeneración de la lámina media es la causa de las formas angulosas adoptadas por éstas (flechas). **31:** Epidermis abaxial y parénquima lagunar con células angulosas (flechas) y cloroplastos desorganizados (asteriscos). **32:** Xilema y floema donde aparecen acúmulos de calosa (flechas discontinuas); se ha ampliado una célula cribosa para ver mejor la calosa. También se observan gotas de degeneración de la pared en algunas células (puntas de flecha). En las figuras 29-32 la cutícula y las paredes celulares tienen un tono ligeramente violáceo, indicador de una oxidación, especialmente en las zonas donde las células pierden contacto. **C:** cutícula, **E:** epidermis, **F:** floema, **PE:** parénquima en empalizada, **PL:** parénquima lagunar, **X:** xilema.

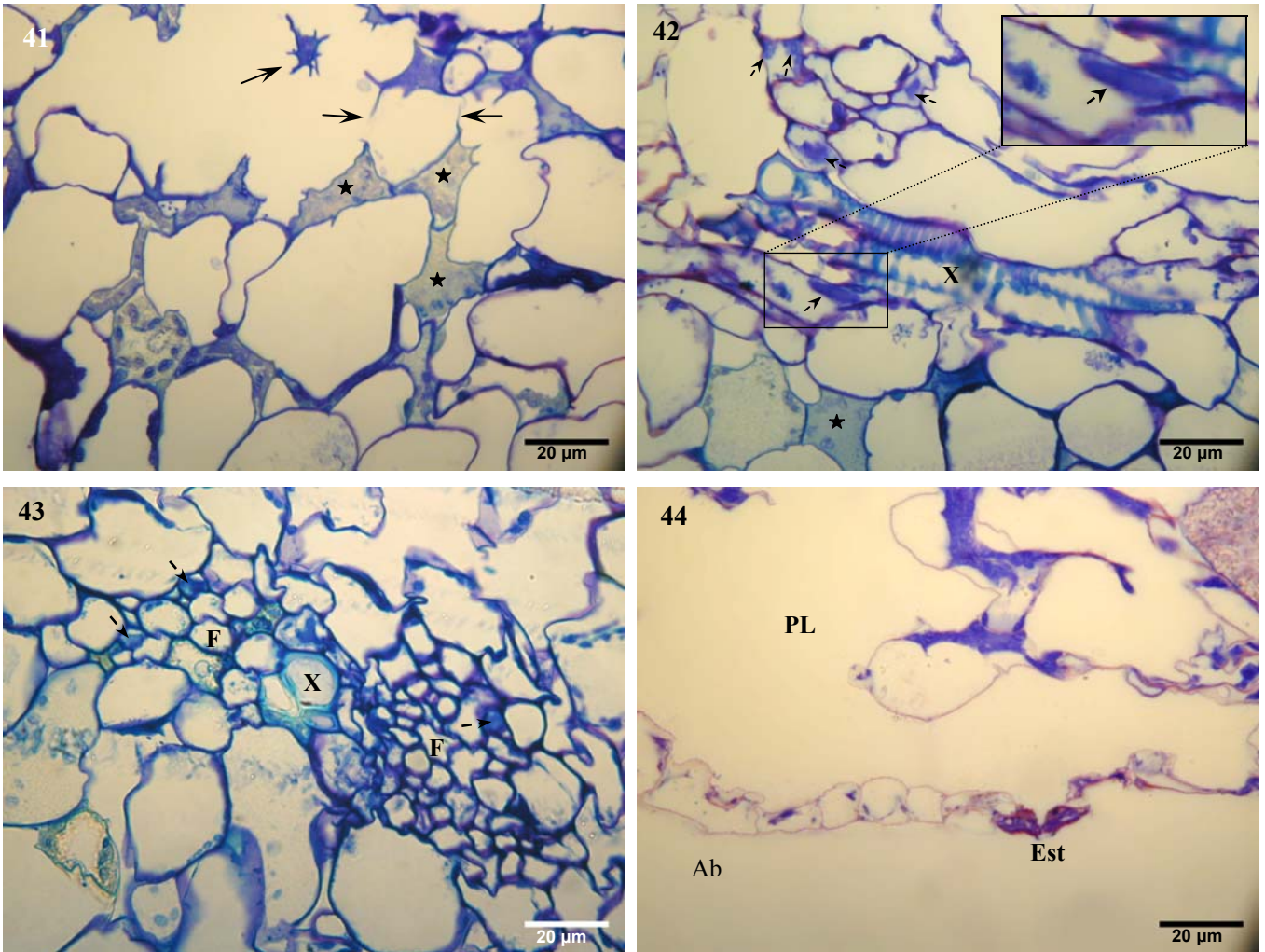


**Figuras 33-36.** Vista general de secciones transversales de hojas adultas de patata crecida en cámaras fumigadas con ozono; tinción con azul de toluidina. Se observa la gran cantidad de células colapsadas del mesofilo, lo que conlleva un notable incremento de los espacios intercelulares. **E:** epidermis, **HV:** haces vasculares, **PE:** parénquima en empalizada, **PL:** parénquima lagunar.



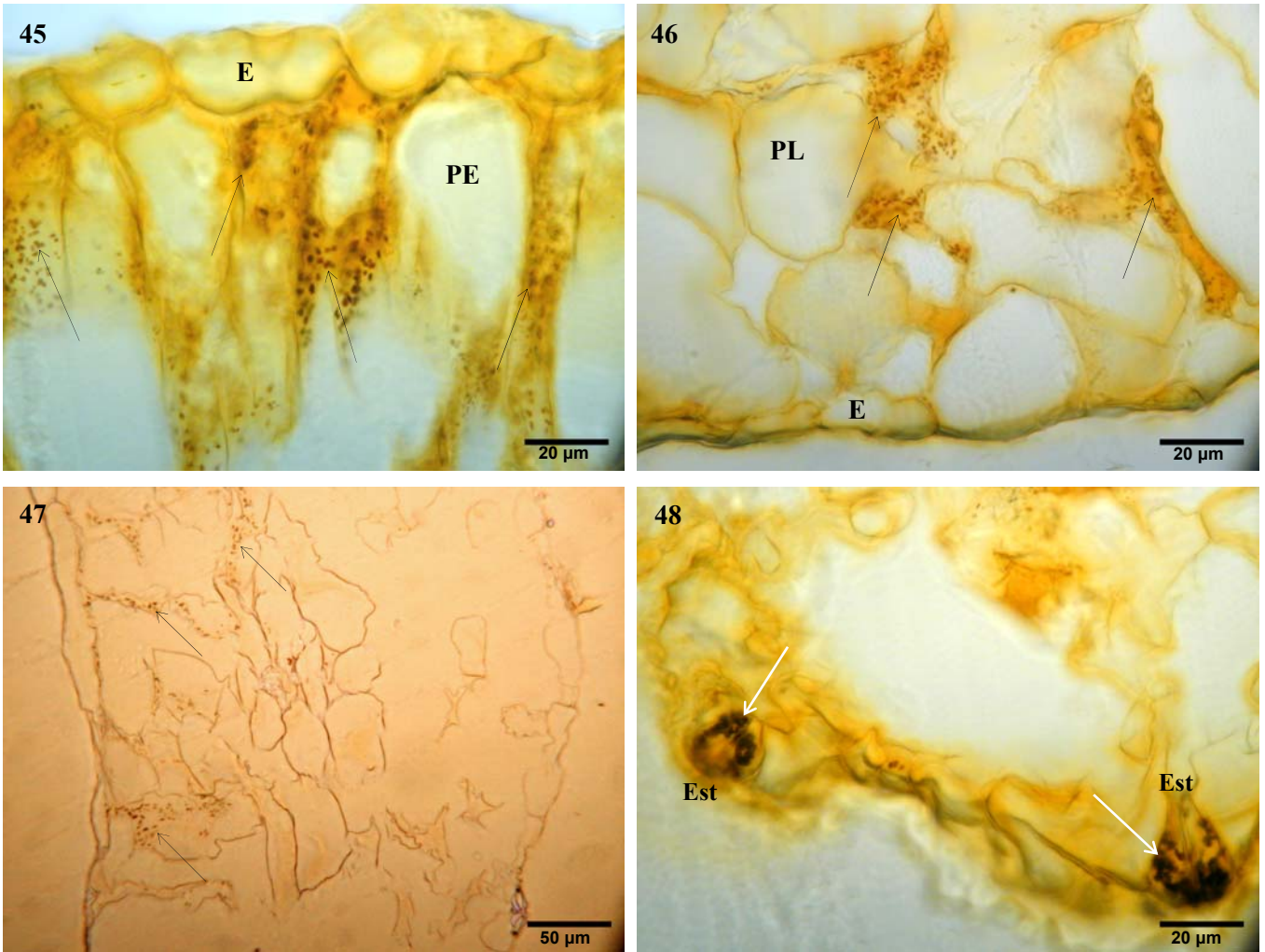


**Figuras 37-40.** Secciones transversales de hojas adultas de patata crecida en cámaras fumigadas con ozono; tinción con azul de toluidina. **37:** Detalle de la epidermis adaxial y parénquima en empalizada; la epidermis ha disminuido su grosor por colapso de sus células y el parénquima en empalizada muestra células muy dañadas y con contenido celular denso (estrella); también aparece un cristal de oxalato cálcico (Ox). **38:** Parénquima en empalizada con células ligeramente irregulares y parénquima lagunar con células con forma angulosa. **39:** Parénquima en empalizada y parénquima lagunar mostrando un mayor grado de daño, con células totalmente colapsadas; algunas células del parénquima lagunar poseen un citoplasma denso y de aspecto refringente (estrellas); la epidermis abaxial se ha convertido en una delgada línea. **40:** Epidermis abaxial mostrando un estoma con citoplasma denso; de nuevo se aprecia la extrema delgadez de la epidermis. **Ab:** superficie abaxial de la hoja (envés), **Ad:** superficie adaxial de la hoja (haz), **E:** epidermis, **Est:** estoma, **PE:** parénquima en empalizada, **PL:** parénquima lagunar.



**Figuras 41-44.** Secciones transversales de hojas adultas de patata crecida en cámaras fumigadas con ozono; tinción con azul de toluidina. **41:** Células con forma estrellada del parénquima lagunar, donde se observa con detalle el proceso de pérdida de contacto entre las células y su posterior reducción de tamaño por colapso celular (flechas); estas células muestran un contenido citoplásmico denso y en algunas ocasiones de aspecto refringente (estrellas). **42:** Xilema ligeramente comprimido. El floema contiene grandes acúmulos de calosa (flechas discontinuas) que forman tapones en algunas células cribosas (ampliado). Junto a los tejidos conductores se observan células estrelladas y con contenido denso (estrella). **43:** Xilema, y alrededor de éste, floema con gran cantidad de células comprimidas y con depósitos abundantes de calosa (flechas discontinuas). **44:** Epidermis abaxial con estoma; las células oclusivas contienen un citoplasma muy denso, y sus paredes están engrosadas y se tiñen de rosa con el azul de toluidina (coloración característica de los procesos degenerativos de la celulosa). **Ab:** superficie abaxial de la hoja (envés), **Est:** estoma, **F:** floema, **PL:** parénquima lagunar, **X:** xilema.





**Figuras 45-48.** Secciones transversales de hojas adultas de patata crecida en cámaras fumigadas con ozono; tinción con lugol. **45:** Epidermis adaxial y parénquima en empalizada donde se observa que el almidón se acumula en las células dañadas con los cloroplastos desorganizados (flechas). **46:** Epidermis abaxial y parénquima lagunar; las células estrelladas poseen cloroplastos repletos de almidón (flechas). **47:** Cuando el daño es más avanzado, las células del parénquima lagunar pierden su almidón, mientras que en el parénquima en empalizada lo conservan (flechas). **48:** Estomas de hojas muy degeneradas, cuyas células oclusivas conservan el almidón (flechas); en cambio, las células del mesófilo ya lo han perdido completamente. **E:** epidermis, **Est:** estoma, **PE:** parénquima en empalizada, **PL:** parénquima lagunar.

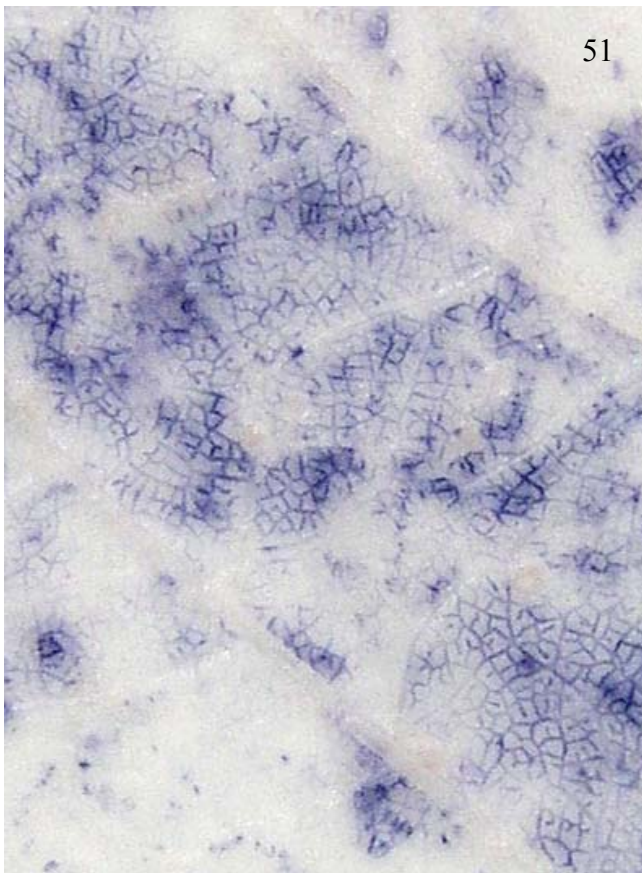
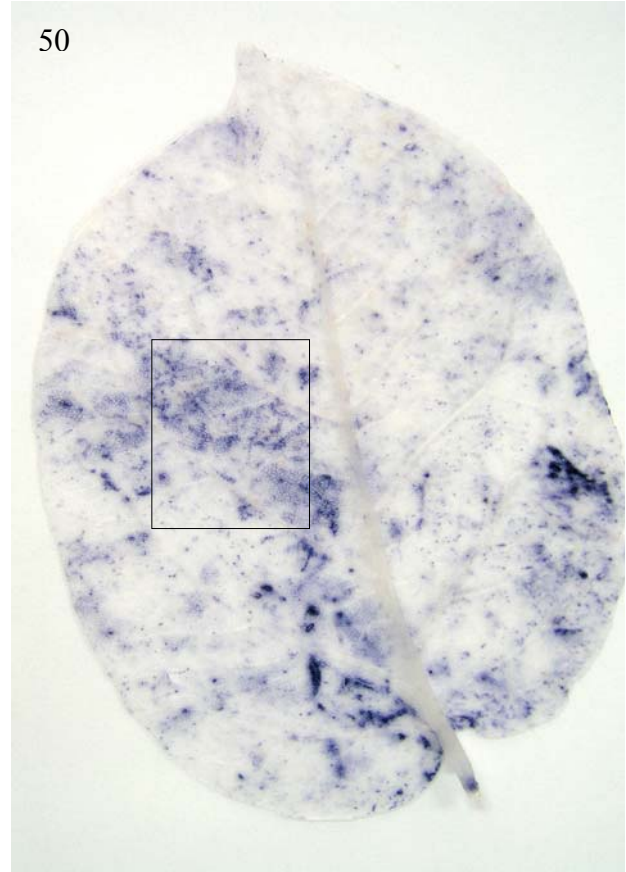
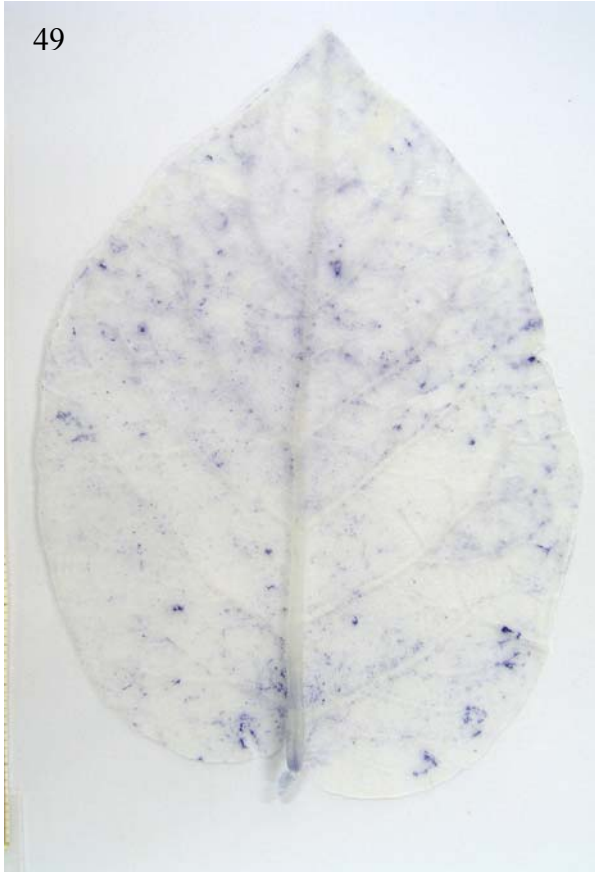
### 3. Formación de radicales superóxido

El tratamiento de las muestras con NBT reveló la presencia de radical superóxido en los tejidos foliares. El control negativo, realizado con muestras tratadas con  $MnCl_2$ , demostró que la coloración azul se debía exclusivamente al radical superóxido (figura 52). La distribución de este radical en la hoja no era homogénea, sino que afectaba a grupos dispersos de células (figuras 49-51). En cuanto a la distribución por tejidos, el superóxido se detectó principalmente en el parénquima lagunar y en el parénquima en empalizada; también se encontró este radical libre en la epidermis abaxial de algunas muestras fumigadas (figuras 53-60). Los resultados de la valoración de la superficie teñida de azul en cada uno de estos tejidos se muestran en la figura 61. En los tres tipos de muestras, la presencia de radical en el parénquima lagunar fue mayor que en el parénquima en empalizada, aunque las diferencias entre ambos tejidos fueron significativas únicamente en los tratamientos NF y  $NF^+$ . En el parénquima lagunar, el área afectada por radical superóxido en los tratamientos NF y  $NF^+$  fue superior al control, aunque sólo se detectaron diferencias significativas entre el control y el tratamiento de fumigación con ozono; en el parénquima en empalizada, la presencia de superóxido en los tratamientos NF y  $NF^+$  fue ligeramente superior al control, sin detectarse diferencias significativas. Hay que puntualizar que estos valores constituyen una superficie muy pequeña en relación al total debido a la distribución parcheada del radical como se ha comentado anteriormente: se han encontrado muchos campos de medida donde el radical ocupaba entre un 30 y hasta un 80 % del mesofilo; no obstante, el hecho de encontrar otros muchos campos sin la presencia del radical hace disminuir la media total. La dificultad para encontrar diferencias significativas entre el control y las muestras NF y  $NF^+$  probablemente es debida a que la distribución parcheada del radical aporta una gran varianza a los datos.

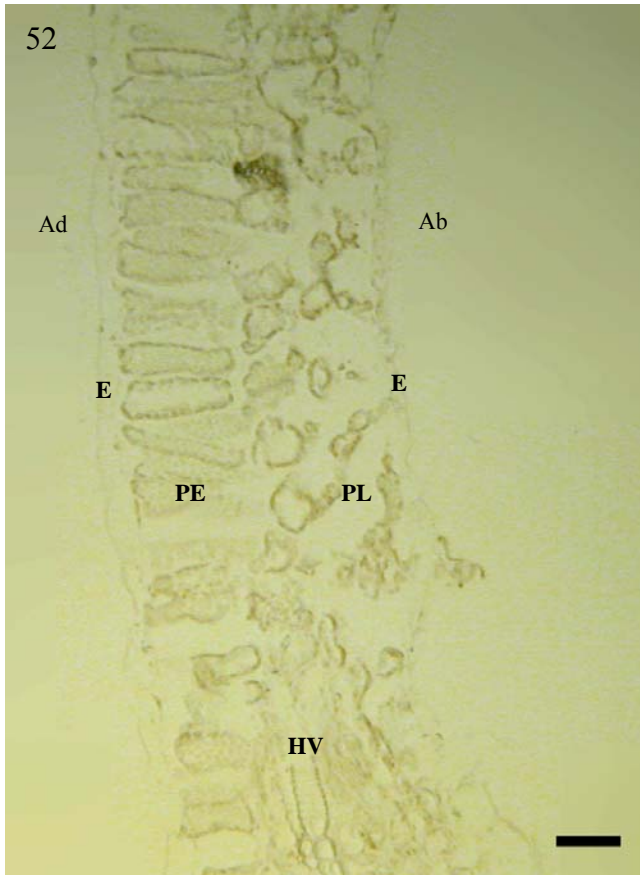
No se encontró radical superóxido en el interior de los haces vasculares, aunque sí se detectó en las células adyacentes a éstos casi siempre que apareció en el parénquima lagunar. El radical superóxido se encontró tanto en células cuya morfología no estaba alterada como en células colapsadas, aunque en las células colapsadas la tinción era más intensa (figuras 55 y 60).

Cuando se emplea un mayor aumento en el microscopio (figuras 62-67), se observa que el superóxido aparece en la membrana plasmática y/o pared celular (no se puede precisar el lugar exacto con el microscopio óptico), el tonoplasto, la membrana de los cloroplastos y dentro de éstos formando una especie de granulaciones. La tinción en el interior de los cloroplastos se encontró sobre todo en las muestras NF y  $NF^+$ .





**Figuras 49-51.** Hojas enteras de patata teñidas con NBT para la localización de radical superóxido. **49:** Muestra crecida en aire filtrado de ozono. **50:** Muestra fumigada con ozono. **51:** Detalle de la zona encuadrada de la figura anterior.

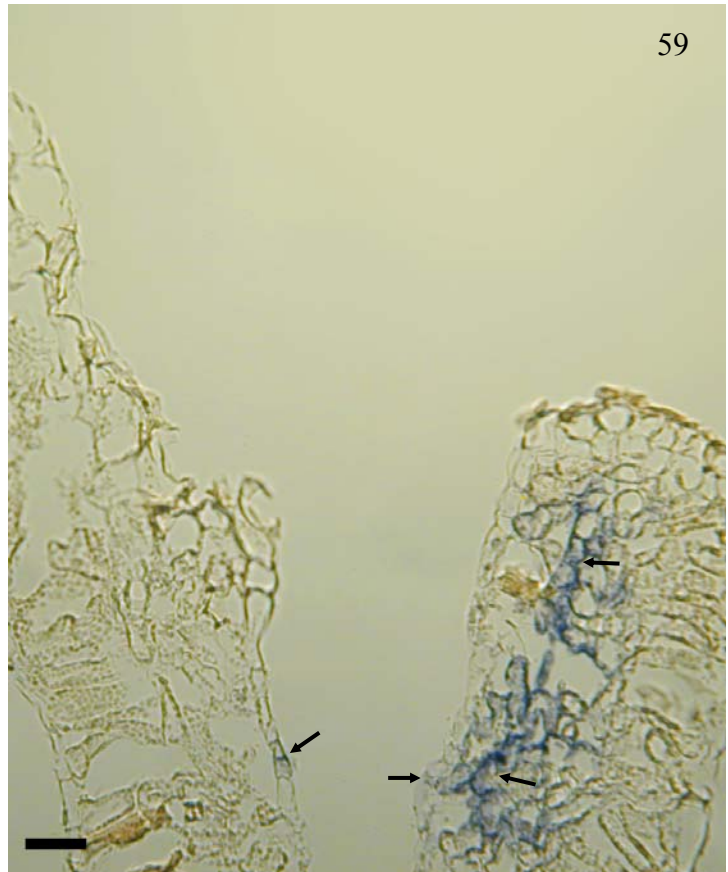


**Figuras 52-60** (página actual y siguientes). Secciones transversales de hojas de patata tratadas con NBT para la localización de radical superóxido; las flechas indican las zonas de localización de dicho radical, teñidas de color azul. **52:** Muestra perteneciente al tratamiento  $NF^+$  (aire ambiental enriquecido con ozono), infiltrada con  $MnCl_2$  y NBT como control del método, donde no aparece tinción azul (**Ab:** superficie abaxial de la hoja, **Ad:** superficie adaxial de la hoja, **E:** epidermis, **PE:** parénquima en empalizada, **PL:** parénquima lagunar, **HV:** haces vasculares). **53:** Imagen representativa del tratamiento CF (aire filtrado), donde la mayoría de los campos observados no mostraban presencia de radical superóxido. **54:** Tratamiento CF, donde se observa una ligera tinción del parénquima lagunar. Las barras representan 40  $\mu m$ .

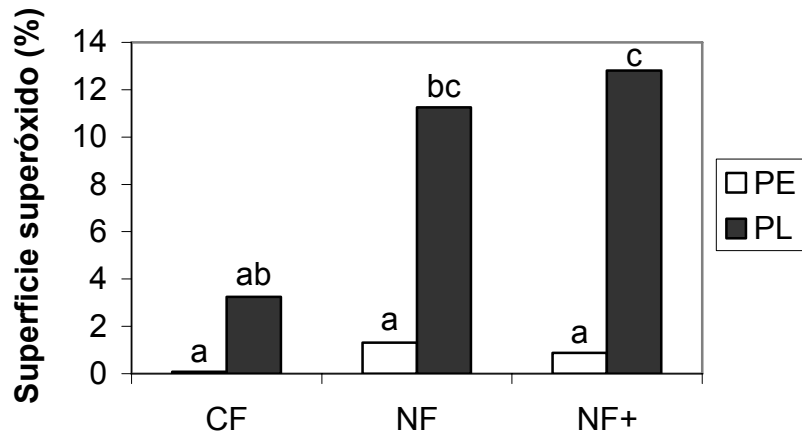




**Figuras 55-57:** Muestras pertenecientes al tratamiento NF (aire ambiental). **55:** Se observa la tinción del parénquima lagunar, más intensa en las células colapsadas (puntas de flecha). **56:** Hay presencia de radical en algunas células del parénquima en empalizada y en una extensa zona del parénquima lagunar, próxima al parénquima en empalizada teñido de azul. **57:** Se detecta radical superóxido en algunas células del parénquima en empalizada, concretamente en la zona más cercana a la superficie del haz; también se observa este radical libre en el parénquima lagunar. Las barras representan 40  $\mu\text{m}$ .

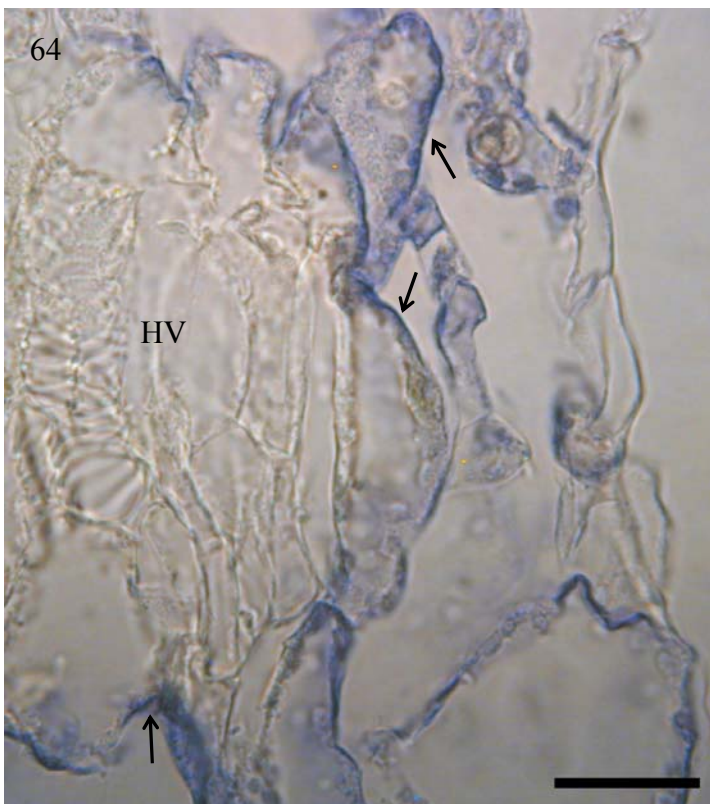
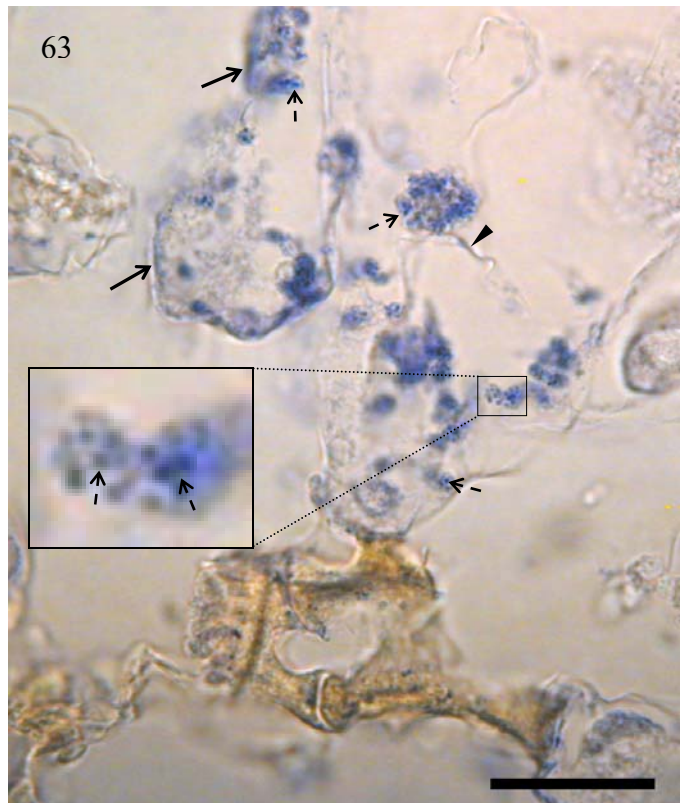


**Figuras 58-60:** Muestras pertenecientes al tratamiento  $NF^+$  (aire ambiental enriquecido con ozono). **58:** Se observa tinción en el parénquima en empalizada y en el parénquima lagunar. **59:** Se muestra una intensa tinción en una zona extensa y localizada del parénquima lagunar y algunas células de la epidermis abaxial. **60:** Se aprecia una intensa tinción azul en las células colapsadas del parénquima lagunar (puntas de flecha) y la epidermis abaxial, además de una coloración más suave en el extremo adaxial del parénquima en empalizada. Las barras representan 40  $\mu m$ .

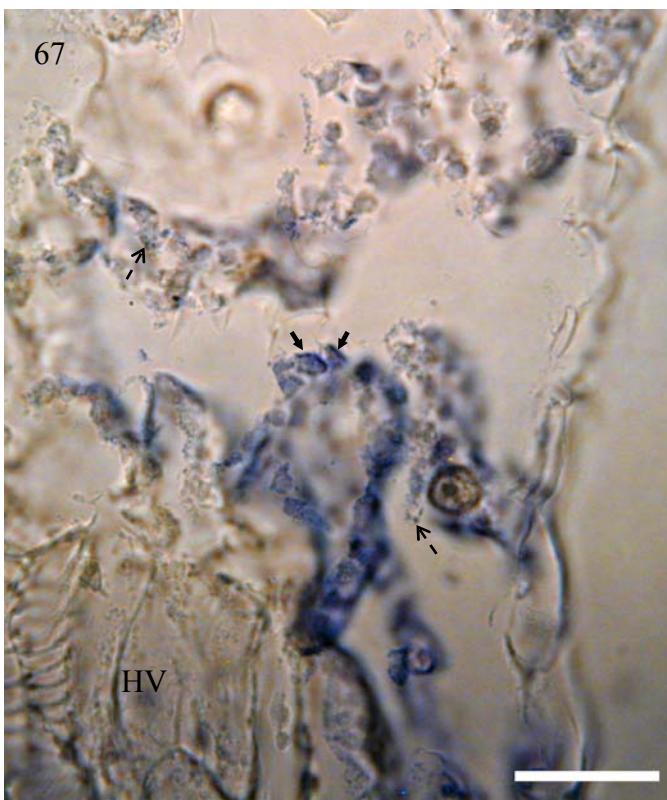
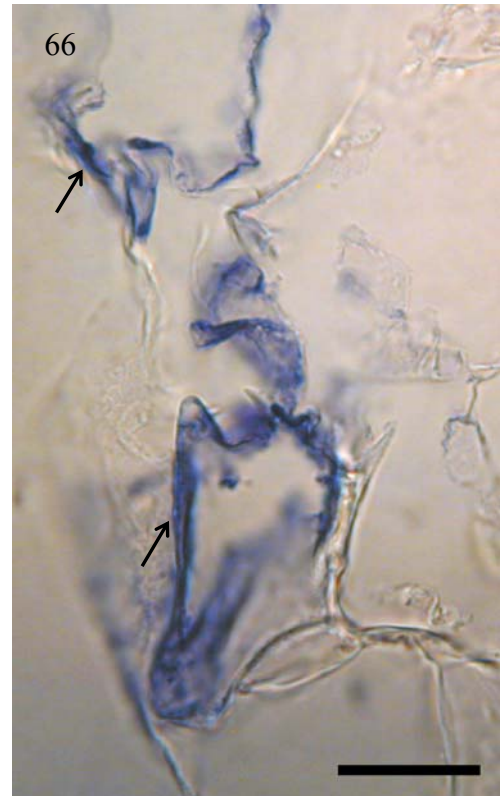
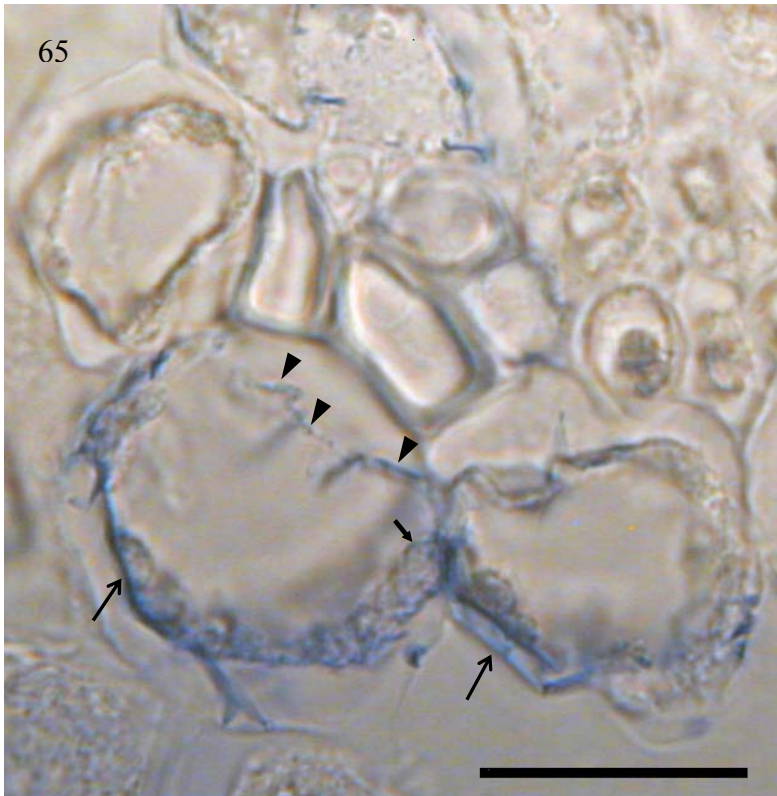


**Figura 61.** Porcentaje de superficie ocupada por radicales superóxido en el parénquima empalizada (PE) y en el parénquima lagunar (PL), para cada tratamiento (CF: aire filtrado de ozono, NF: aire ambiental no filtrado, NF+: aire ambiental enriquecido con ozono). Los valores son medias para n=6. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ).





**Figuras 62-64:** Secciones transversales de hojas de patata crecida en aire ambiental (NF) teñidas con NBT. **62:** Parénquima en empalizada, donde el radical está presente en la membrana plasmática / pared celular (flechas alargadas) y la membrana de los cloroplastos (flechas cortas) de la parte de las células más cercana al haz de la hoja. **63:** Parénquima lagunar con células de morfología alterada y cloroplastos desorganizados; el radical superóxido se localiza en la membrana plasmática / pared celular (flechas alargadas), en el interior de los cloroplastos en forma de granulaciones que probablemente sean los grana (flechas discontinuas; ver cuadro de detalle) y en el tonoplasto de la vacuola (punta de flecha). **64:** Haces vasculares (HV) y parénquima lagunar; el radical no aparece en el interior de los haces vasculares, aunque sí en las células adyacentes, donde se aprecia con nitidez la tinción de la membrana plasmática / pared celular (flechas alargadas). Las barras representan 20  $\mu\text{m}$ .



**Figuras 65-67:** Secciones transversales de hojas de patata crecida en aire ambiental enriquecido con ozono ( $\text{NF}^+$ ) teñidas con NBT. **65:** Detalle del parénquima lagunar; se puede observar la tinción del tonoplasto de la vacuola que está perdiendo turgencia (puntas de flecha), de la membrana plasmática / pared celular (flechas alargadas) y de la membrana de algún cloroplasto (flecha corta). **66:** Epidermis abaxial, donde se encuentra radical superóxido en la membrana plasmática (flechas alargadas). **67:** Haces vasculares (HV) y parénquima lagunar; el radical superóxido se detecta en la membrana de los cloroplastos (flechas cortas) y las granulaciones en el interior de éstos (flechas discontinuas). Las barras representan 20  $\mu\text{m}$ .



#### 4. Ultraestructura celular y localización subcelular de peróxido de hidrógeno

La localización de  $H_2O_2$  en hojas adultas de plantas crecidas en cámaras filtradas (CF) y fumigadas con ozono ( $NF^+$ ) se llevó a cabo para determinar si esta especie reactiva del oxígeno participa en la degeneración celular asociada a la senescencia en patata, y en qué lugares se acumula como respuesta al ozono.

El  $H_2O_2$  aparece en forma de precipitados de perhidróxido de cerio como se puede observar en la figura 68, correspondiente a una muestra tratada con  $H_2O_2$  como control positivo del método. Cabe puntualizar que los precipitados formados en esta muestra control son de mayor tamaño que los encontrados como producto del ozono en las muestras de estudio; esto es debido a que la concentración de peróxido de hidrógeno con que se ha infiltrado esta muestra control es muy alta. Las muestras filtradas (figuras 69-75) mostraron signos de senescencia: orgánulos como plastos, mitocondrias y peroxisomas degenerados, y vacuolas con restos de degradación de la cara interna de la pared celular (figuras 70, 73 y 74). No todas las células presentaban el mismo grado de senescencia, encontrando algunas con cloroplastos aún bastante funcionales (figuras 71 y 72). En las muestras filtradas sólo se observaron precipitados de perhidróxido de cerio en las paredes del floema (figura 75).

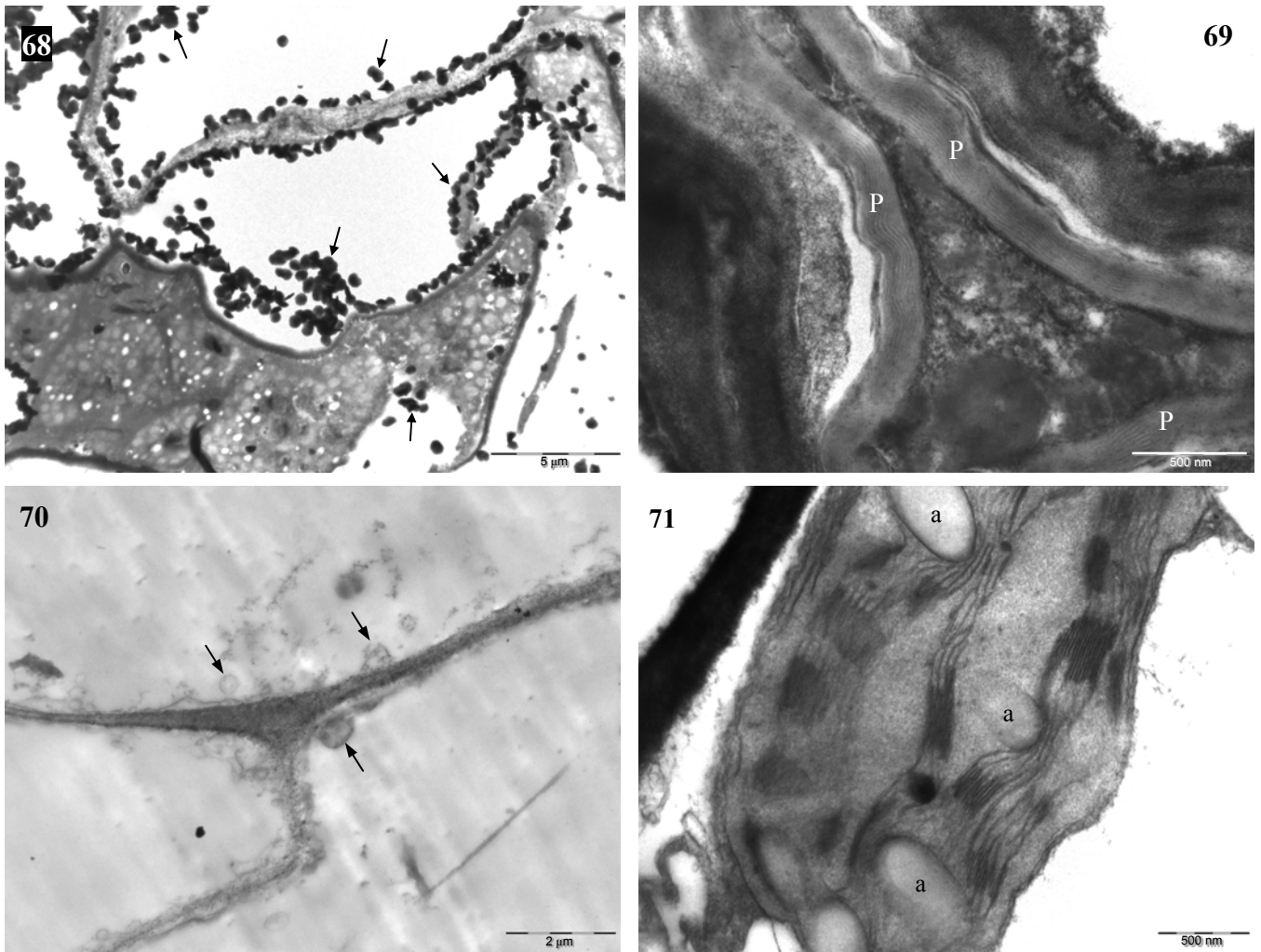
En las muestras fumigadas con ozono, la mayoría de las células también presentaron orgánulos marcadamente senescentes, además de otros signos que las diferencian de las muestras filtradas. El más llamativo fue el colapso celular, como ya se había observado al microscopio óptico, aunque con menos detalle, por degeneración de la lámina media y pérdida de la vacuola, lo que conlleva un hacinamiento de los orgánulos celulares. Los cloroplastos tenían un aspecto denso y acumulaban granos de almidón pequeños y numerosos (figuras 79-81), al contrario que en las muestras filtradas (figura 72). Las paredes celulares presentaban un alto grado de degeneración, sobre todo por su parte externa (figuras 79-82). Las células cribosas del floema estaban colapsadas y contenían abundantes acúmulos de calosa, y las células acompañantes tenían un contenido vacuolar muy denso (figuras 82 y 83).

Estas muestras crecidas en altos niveles de ozono presentaron marcaje de peróxido de hidrógeno en diferentes lugares. Se encontraron precipitados de perhidróxido de cerio abundantes en la cara apoplástica de la pared celular; también se encontraron precipitados en el interior de la pared celular, membrana plasmática, y dispersos por el citoplasma y diversos compartimentos y orgánulos celulares (núcleo, vacuolas, cloroplastos y peroxisomas) (figuras 76-78). Se observó marcaje de  $H_2O_2$  tanto en células no dañadas estructuralmente como en células colapsadas; en las células colapsadas, el peróxido de hidrógeno se acumulaba principalmente en la cara citosólica de la

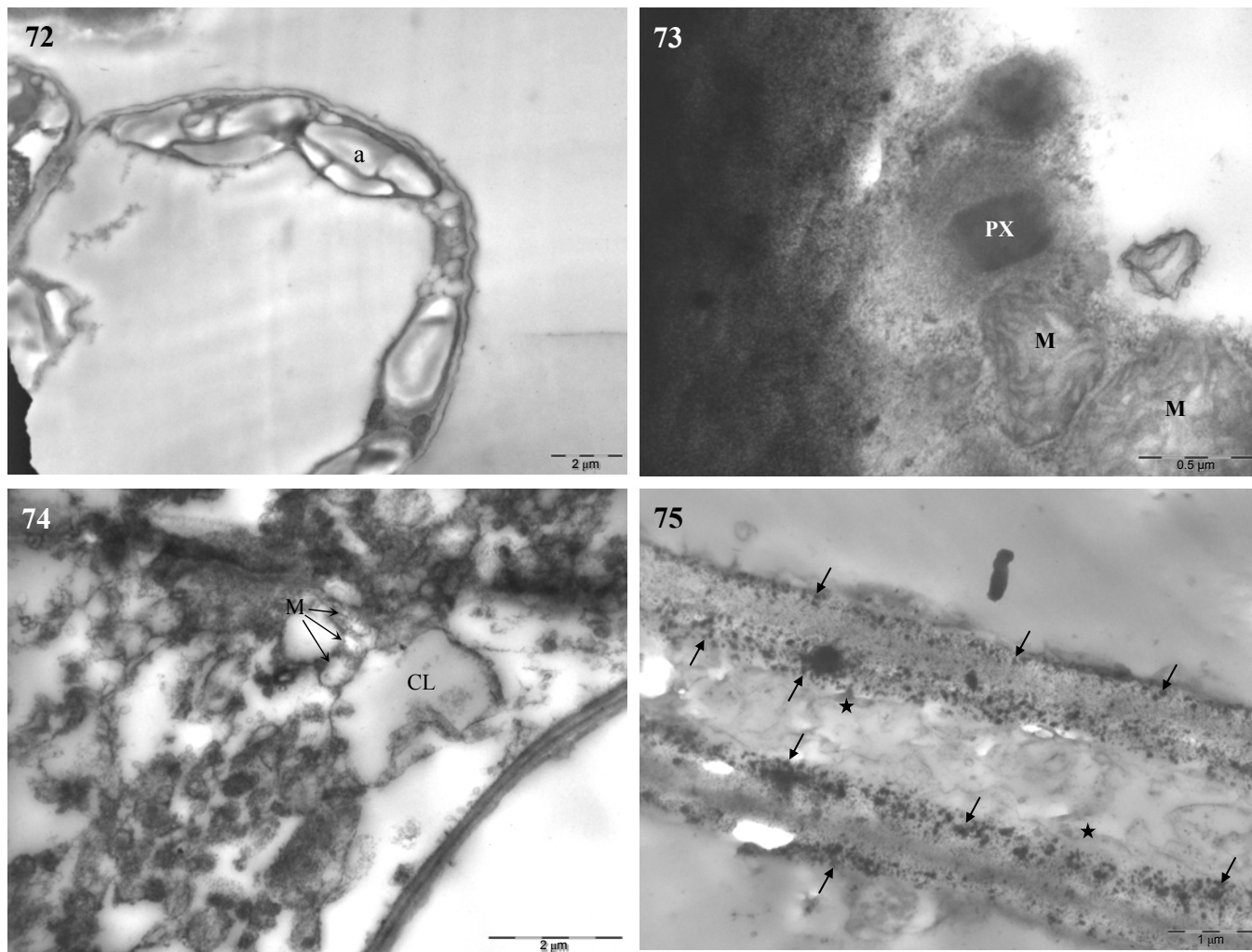


pared celular (figuras 79-81). Estos patrones se observaron tanto en el parénquima en empalizada como en el parénquima lagunar. También se encontró un marcaje de peróxido de hidrógeno especialmente abundante en las paredes de las células del floema que acumulaban calosa (figura 82).

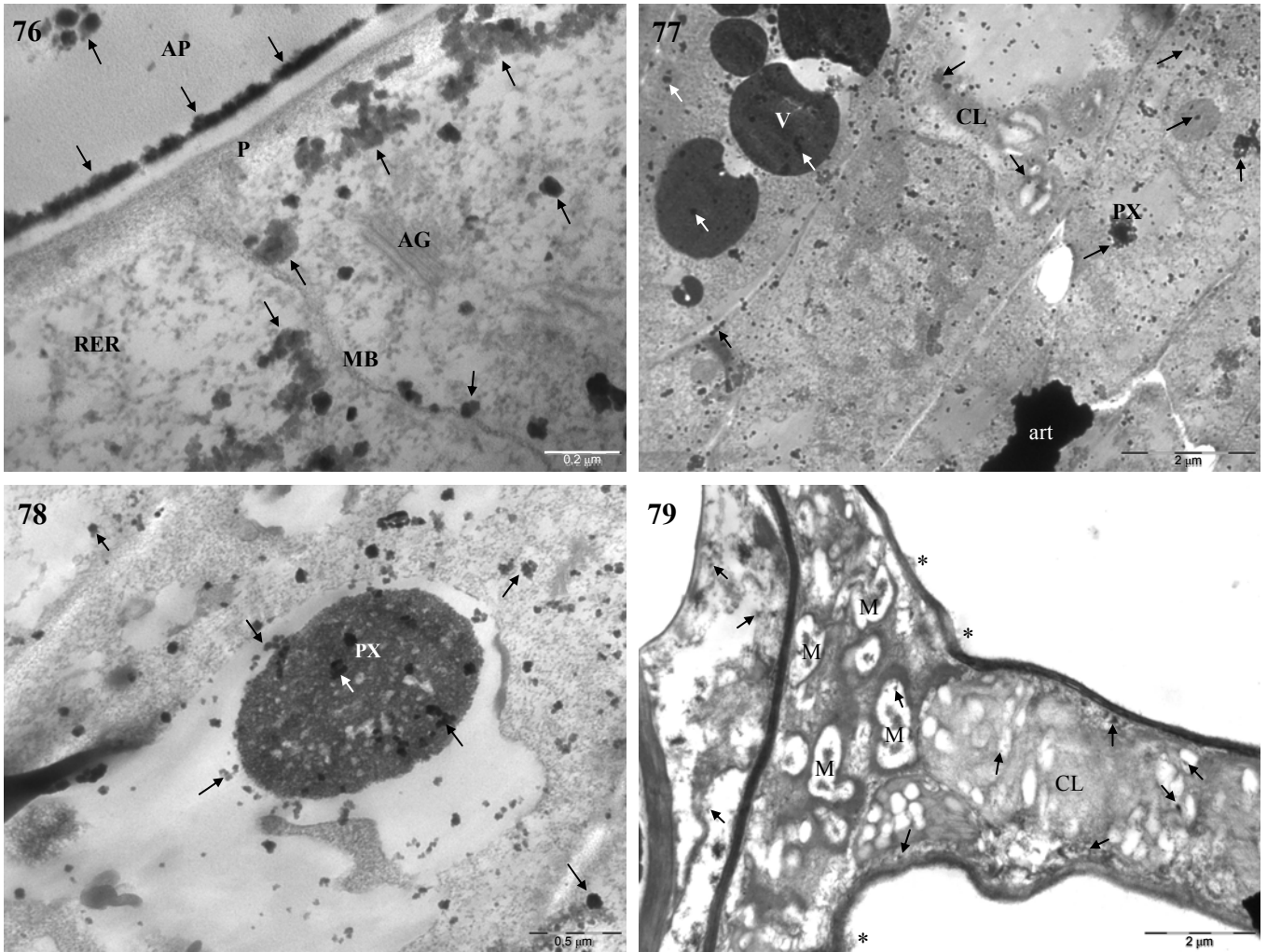
Los controles negativos, realizados en muestras fumigadas sin tratar con cloruro de cerio demostraron que estos acúmulos fueron debidos al peróxido de hidrógeno (datos no mostrados).



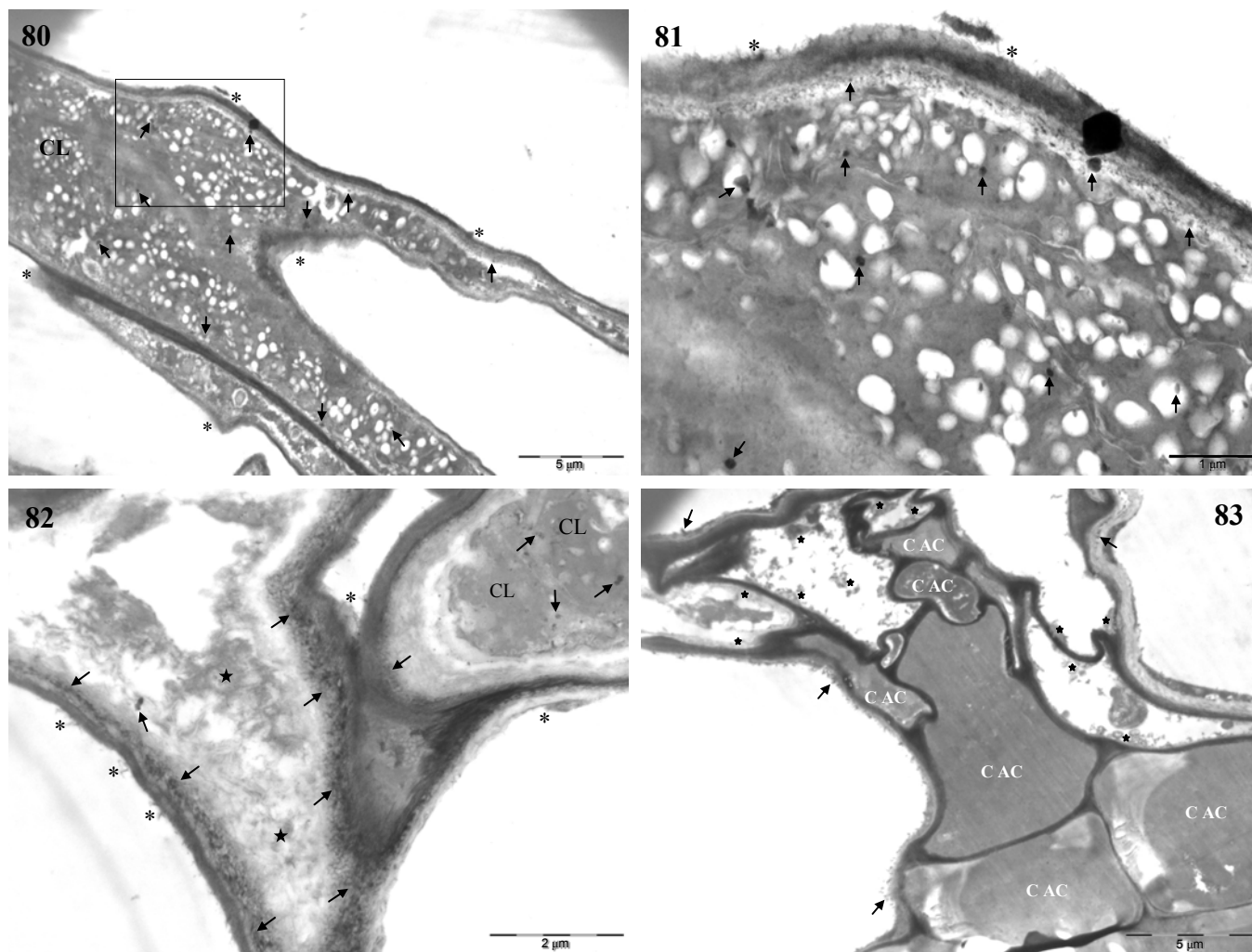
**Figuras 68-83** (página actual y siguientes). Secciones transversales de hojas adultas de patata infiltradas con  $\text{CeCl}_3$  para la localización de peróxido de hidrógeno, observadas al microscopio electrónico de transmisión. **68:** Muestra fumigada infiltrada con peróxido de hidrógeno y cloruro de cerio como control positivo del método. Los precipitados señalados con flechas son perhidróxido de cerio, producto de la reacción entre el peróxido de hidrógeno y el cloruro de cerio. **69:** Muestra CF (crecida en cámara con aire filtrado de ozono). Paredes de tres células adyacentes; no se observan precipitados de perhidróxido de cerio. **70:** Muestra CF. Paredes y membranas celulares de tres células adyacentes; se observan vacuolas con restos de degradación de la cara interna de la pared celular (flechas). **71:** Muestra CF. Cloroplasto maduro con algunos granos de almidón (a), aunque funcional, con membranas tilacoidales y grana bien estructurados, sin presencia de peróxido de hidrógeno. **a:** almidón, **P:** pared celular.



**Figuras 72-75.** Secciones transversales de hojas adultas de patata crecida en cámaras con aire filtrado de ozono. **72:** Cloroplastos en disposición perivacuolar con granos de almidón en su interior; aunque el almidón no se encuentra con frecuencia en las muestras filtradas (ver sección anterior), cuando aparece muestra el aspecto observado en esta imagen: pocos granos por cloroplasto y de gran tamaño. **73:** Peroxisoma y mitocondrias senescentes; no se observa peróxido de hidrógeno. **74:** Célula senescente; se puede apreciar la degeneración de los orgánulos celulares, que son de difícil reconocimiento. No se encuentra peróxido de hidrógeno en ningún compartimento celular. **75:** Floema; en sus paredes aparecen abundantes precipitados debidos al peróxido de hidrógeno (flechas). En el interior del floema se observan acúmulos de calosa (estrellas). **a:** almidón, **CL:** cloroplasto, **M:** mitocondria, **PX:** peroxisoma.



**Figuras 76-79:** Muestras crecidas en cámaras con aire fumigado con ozono. **76:** Parénquima en empalizada, donde aún no hay daño a nivel ultraestructural. Se observan acúmulos de perhidróxido de cerio (flechas) en el apoplasto, de manera abundante en las caras apoplástica y citosólica de la pared celular y algunos acúmulos en su interior, además de aparecer precipitados en la membrana plasmática y en el citosol. **77:** Células relativamente poco dañadas anatómicamente de una muestra fumigada. Los precipitados formados a partir del peróxido de hidrógeno (flechas) aparecen dispersos por todo el citosol, en el interior de los distintos compartimentos celulares y en algunos puntos de la pared celular; también se encuentran formando acúmulos en los peroxisomas. **78:** Detalle de un peroxisoma, en cuyo interior se encuentran abundantes precipitados de perhidróxido de cerio, y también a su alrededor (flechas). **79:** Células angulosas del parénquima lagunar. El contenido celular está muy degenerado, las crestas mitocondriales están condensadas en el centro, en los cloroplastos se acumula almidón y sus membranas tilacoidales han desaparecido, y la pared celular está dañada (asteriscos). Aparecen precipitados abundantes de perhidróxido de cerio (flechas) junto a la pared celular, y dispersos en el citosol, en los cloroplastos y en el interior de algunas mitocondrias. **AG:** aparato de Golgi, **AP:** apoplasto, **art:** artefacto, **CL:** cloroplasto, **M:** mitocondria, **MB:** membrana plasmática, **P:** pared celular, **PX:** peroxisoma, **RER:** retículo endoplásmico rugoso, **V:** vacuola.



**Figuras 80-83:** Muestras crecidas en cámaras con aire fumigado con ozono. **80:** Células del parénquima en empalizada con forma angulosa; se observa la aglomeración de los orgánulos celulares y la degeneración de la pared celular (asteriscos). Aparecen precipitados originados por peróxido de hidrógeno (flechas) en la pared, citosol adyacente a la membrana plasmática y en el interior de los cloroplastos. La zona encuadrada se muestra ampliada en la siguiente figura. **81:** Detalle de la zona encuadrada de la figura anterior, donde se aprecia la localización de los precipitados a lo largo de la pared celular y citosol adyacente, y en el interior de los cloroplastos (flechas); los asteriscos indican degeneración de la zona externa de la pared celular. **82:** Floema. Se aprecia la forma angulosa de las células como consecuencia de los daños por ozono así como el contenido de la luz vascular, con depósitos de calosa muy abundantes (estrellas), y la degeneración de la cara externa de la pared (asteriscos). El peróxido de hidrógeno se encuentra de manera abundante en la zona adyacente a la pared celular; también hay algunos precipitados en el interior de los cloroplastos (flechas). **83:** Células cribosas del floema y células acompañantes (C AC). Las células cribosas están comprimidas y contienen grandes acúmulos de calosa (estrellas). Las células acompañantes tienen un contenido muy denso. Aparecen precipitados de perhidróxido de cerio en las paredes celulares adyacentes al parénquima. CL: cloroplasto, C AC: células acompañantes del floema.

## DISCUSIÓN

En este capítulo se han utilizado métodos microscópicos para estudiar el efecto del ozono en los tejidos y en los compartimentos celulares. Se han analizado tanto las consecuencias de la exposición a este contaminante sobre la anatomía foliar como sobre la generación de dos especies reactivas del oxígeno, como son el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno. A diferencia de los estudios bioquímicos y moleculares, esta aproximación proporciona una visión más amplia y revela la existencia de un efecto diferencial del ozono tanto en tejidos como en grupos de células dentro de un mismo tejido.

El ozono provoca una degeneración de la lámina media y pared celular, lo que conlleva una pérdida de cohesión entre las células y su separación en puntos localizados. Debido a estos efectos, las células adquieren un aspecto estrellado muy característico de la acción de este contaminante sobre el parénquima lagunar. Una de las consecuencias de la pérdida de contacto entre células adyacentes es la pérdida de comunicación entre ellas a través de punteaduras y plasmodesmos. Las células terminan por colapsarse y los espacios intercelulares aumentan considerablemente; el aumento de los espacios intercelulares a causa del ozono ha sido anteriormente descrito en lentisco (Reig-Armiñana *et al.*, 2004). Estos daños empiezan a observarse en las proximidades de los estomas, afectando principalmente al parénquima lagunar, y se extienden progresivamente al parénquima en empalizada y epidermis.

A nivel subcelular se observa una densificación del contenido vacuolar, de naturaleza probablemente fenólica. La acumulación de sustancias fenólicas, incluyendo taninos (Reig-Armiñana *et al.*, 2004) y proantocianidinas (Vollenweider *et al.*, 2003), se ha encontrado en diferentes especies como respuesta al ozono, y se ha observado en otros tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos: ataque de patógenos, radiación ultra-violeta, iluminación intensa, bajas temperaturas, heridas, contaminantes atmosféricos, baja disponibilidad de nutrientes o sequía (Bussotti *et al.*, 1995; Pasqualini *et al.*, 2003). Las sustancias fenólicas de las plantas son potentes antioxidantes, capaces de detoxificar especies reactivas del oxígeno y radicales libres (Rice-Evans *et al.*, 1997). Su acumulación en situaciones de estrés cumpliría, por tanto, una función protectora frente a estas especies dañinas.

En estadios avanzados en los daños inducidos por ozono, el tonoplasto desaparece y da lugar a la redistribución de los cloroplastos, que a su vez se vuelven más pequeños y densos. La desintegración del tonoplasto y desorganización del contenido celular ha sido descrita anteriormente (Reig-Armiñana *et al.*, 2004).

Otro efecto del ozono observado en este estudio es la acumulación anormal de calosa en el floema. Esta acumulación de calosa afecta a la función del floema. La calosa es un polímero de glucosa unida por enlaces (1,3)- $\beta$ -glucano, que participa en diferentes procesos del crecimiento y desarrollo de la planta. Por ejemplo, la calosa está presente alrededor de los plasmodesmos de las placas cribosas del floema, y durante la época de reposo de la planta (invierno), se extiende por la pared celular y taponan los plasmodesmos, interrumpiéndose así las comunicaciones entre los tubos cribosos, y entre éstos y las células anexas. Por otra parte, se han encontrado deposiciones localizadas de calosa entre la membrana plasmática y la pared celular tras la exposición de las plantas a diversos estreses bióticos y abióticos, que incluyen heridas, desecación, metales pesados y ataques de patógenos; en este último caso actuaría como una barrera física para impedir una invasión por parte de éstos (Stone y Clarke, 1992). También se ha encontrado deposición de una capa de calosa entre la membrana plasmática y la pared celular en el parénquima en empalizada como respuesta al ozono en *Ailanthus altissima*, que separa las células dañadas de las células sanas (Gravano *et al.*, 2003). La búsqueda bibliográfica sobre este tema dio como resultado un único trabajo científico que demuestra un aumento de la deposición de calosa en las placas cribosas del floema en tallos de abedul como consecuencia del ozono (Matyssek *et al.*, 2002); también se ha encontrado un aumento de calosa en el floema de pino silvestre expuesto a otros contaminantes atmosféricos (NO<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub>) (Kurczynska *et al.*, 1997). El taponamiento del floema por calosa en las plantas expuestas a ozono impediría la correcta carga, circulación y descarga de los productos de la fotosíntesis (sacarosa y azúcares derivados, aminoácidos, etc.) desde las hojas hacia los órganos sumidero. En el caso de la patata, uno de los órganos sumidero son los tubérculos en formación. Se ha demostrado que hay una fuerte dependencia entre el metabolismo del tubérculo y el suministro momentáneo de sacarosa (Geigenberger y Stitt, 2000). Probablemente este efecto sobre el floema sea uno de los motivos por los que el peso de los tubérculos por planta disminuye como consecuencia de la exposición de las plantas al ozono (ver Capítulo 3). El efecto del ozono sobre el floema también podría estar implicado en la disminución del contenido en almidón de los tubérculos de patata encontrado por Vorne *et al.* (2002).

Es interesante la acumulación de almidón que se observa en las células más dañadas, tanto en las cámaras no filtradas como en las cámaras fumigadas. Durante el día, las hojas fotosintetizan azúcares que se exportan a los órganos sumidero, al mismo tiempo que almacenan almidón como fuente de energía para la noche. La acumulación de almidón alcanza su máximo al final de la tarde (Geigenberger y Stitt, 2000). Por este motivo, en las muestras de las cámaras filtradas, tomadas al mediodía, no se observan acúmulos importantes de almidón. Es difícil determinar si el gran acopio

de almidón encontrado al mediodía en las plantas expuestas a ozono se debe a la inmovilización de la sacarosa por colapso floemático o por el contrario no tiene ninguna relación con los efectos del ozono en el floema. El acúmulo de granos de almidón provoca la alteración de los cloroplastos (grana y tilacoides), de manera que pierden progresivamente su funcionalidad.

Las características anatómicas de la hoja de patata podrían explicar, al menos en parte, la sensibilidad de esta especie a la acción negativa del ozono. El hecho de ser anfiestomática puede favorecer la entrada de este contaminante en las hojas, puesto que los estomas abiertos son la principal vía de entrada del ozono en las plantas (Runeckles, 1992). Además, como se ha observado en este estudio, las células más dañadas son las más próximas a los estomas y situadas probablemente en las zonas por las que difunde el ozono o sus especies reactivas derivadas.

La deposición de ozono sobre la hoja tiene lugar mayoritariamente sobre la cutícula; la reacción del ozono con la cutícula puede representar una forma importante de eliminación de este contaminante en la superficie de las hojas (Fowler *et al.*, 2001). Se ha observado un aumento del grosor de la cutícula como respuesta al ozono en otras especies (Reig-Armiñana *et al.*, 2004). En cambio, nuestros resultados sugieren que la fina cutícula de la patata es bastante susceptible a la degradación por el ozono.

Los haces vasculares de las hojas de patata no poseen vaina, lo cual probablemente los haga especialmente sensibles a la acción del ozono, como se ha demostrado con la deposición de calosa en el floema.

La localización histoquímica de radicales superóxido muestra, por una parte, una distribución parcheada por toda la hoja que afecta a grupos de células; por otra parte, revela diferencias sustanciales entre tejidos, siendo el parénquima lagunar el tejido que muestra mayor presencia de esta especie reactiva del oxígeno cuando las plantas son tratadas con ozono. Este hecho puede deberse a que el parénquima lagunar es el tejido más cercano a la principal vía de penetración del ozono en la hoja, que son los estomas, cuya población en el envés supera a la del haz en patata. Además, cuando se encuentra superóxido en el parénquima en empalizada de muestras pertenecientes a los tratamientos NF y NF<sup>+</sup> llama particularmente la atención que éste aparece en la zona superior de las células, es decir, la más próxima al haz de la hoja. Teniendo en cuenta que las muestras se recogieron al mediodía, es posible que un efecto sinérgico entre la luz y el ozono dé lugar a la formación de radical superóxido en la zona del parénquima más expuesta a la luz. Los efectos sinérgicos entre el ozono y la luz se han descrito en diversas publicaciones, donde las células más expuestas a la luz fueron las que mostraron mayor daño visible por ozono (Maurer *et*



*al.*, 1997; Vollenweider *et al.*, 2003). Dentro de un mismo tejido, la distribución irregular del superóxido indica que existen células con diferente susceptibilidad a este radical.

La presencia de superóxido en plantas crecidas en las cámaras filtradas se podría atribuir a que en estas cámaras, aunque a niveles muy bajos, hay ozono (concentración media diaria de 7.5 ppb de ozono); también podría deberse a una producción basal por procesos relacionados con el metabolismo aerobio (Asada, 1994). El problema para la planta sobreviene cuando la formación de radical superóxido y ROS derivados excede la capacidad de detoxificación de los sistemas antioxidantes de las células.

Dentro de las células, el superóxido se ha encontrado en la pared y/o membrana celular (con el microscopio óptico es difícil precisar el lugar exacto), tonoplasto, membrana de los cloroplastos y en el interior de los cloroplastos formando granulaciones que sugieren que el lugar de aparición del superóxido en el interior de los cloroplastos sean los grana. El radical superóxido encontrado en la pared/membrana celular podría ser el producto de la reacción del ozono con los componentes de la pared celular y plasmalema (Laisk *et al.*, 1989). Además, el superóxido del plasmalema podría haber sido formado activamente por la planta mediante las enzimas NOX (Rao y Davis, 1999).

El superóxido encontrado en cloroplastos y tonoplasto probablemente se ha generado en los lugares de localización, puesto que su vida media es muy corta y es muy improbable que este radical atraviese las membranas debido a su carga negativa (Lamb y Dixon, 1997). El ozono reacciona rápidamente en el apoplasto y su concentración en este compartimento es próxima a cero (Laisk *et al.*, 1989), y por estos motivos se cree que el ozono no puede penetrar en el interior de las células. En conclusión, el superóxido encontrado en el interior de las células posiblemente no deriva directamente del ozono, sino que se ha formado por otros mecanismos. El mecanismo de formación del radical superóxido en el interior de las células no se conoce por el momento; a continuación se discuten algunas posibilidades. El radical superóxido localizado en lo que probablemente son los grana de los cloroplastos podría deberse a su producción por la reacción de Mehler, en la que el O<sub>2</sub> es reducido directamente por componentes de la cadena de transporte electrónico dando lugar a este radical (Mehler, 1951). Se ha demostrado que esta reacción es un sumidero de electrones cuando la asimilación de CO<sub>2</sub> está restringida por condiciones de estrés hídrico y previene daños mayores por sobre-reducción en la cadena de transporte electrónico (Biehler y Fock, 1996). El ozono disminuye la actividad y la concentración de la enzima Rubisco, y en consecuencia afecta a la capacidad de fijación de CO<sub>2</sub> por la hoja (Pell *et al.*, 1992). Es posible por tanto que la exposición a ozono dé lugar a la formación de superóxido mediante la reacción de Mehler en los grana. La presencia de superóxido en la membrana de los cloroplastos y tonoplasto deja abierta la posibilidad de la

existencia de enzimas NOX en estas membranas intracelulares. Las NOX se han localizado recientemente en membranas intracelulares en animales (Murillo y Henderson, 2005), pero aún no se ha descrito una localización intracelular para las NOX en plantas (Sagi y Fluhr, 2006). Nuestros resultados apuntarían a una posible localización de las NOX en la membrana de los cloroplastos y tonoplasto, aunque la confirmación de esta hipótesis requiere una investigación más profunda.

En las muestras filtradas no se encontró peróxido de hidrógeno en las células senescentes; únicamente se observó  $H_2O_2$  en la pared celular del floema. En cambio, se encontró  $H_2O_2$  en muestras senescentes tratadas con ozono, tanto en células dañadas como en células no dañadas. El  $H_2O_2$  se acumulaba en la cara apoplástica de la pared celular, posiblemente derivado de la reacción del ozono con los componentes de la pared celular. El  $H_2O_2$  encontrado en la cara citosólica de la pared celular, membrana plasmática, citosol y en el interior de los diferentes compartimentos celulares podría tener diversos orígenes: podría ser el producto directo de la descomposición del ozono en la pared celular, o haber sido generado activamente por las peroxidasas de pared en respuesta al ozono (Pellinen *et al.*, 1999) y haber difundido desde ésta hacia el interior de la célula; también podría ser el producto de la dismutación del superóxido localizado en la pared celular/plasmalema, tonoplasto y cloroplastos, y haber difundido por el citosol. El patrón de distribución de los precipitados de perhidróxido de cerio en los peroxisomas y su alrededor sugiere que estos orgánulos son, en condiciones de estrés por ozono, una importante fuente de generación de  $H_2O_2$ , que difunde desde los peroxisomas hacia el citosol. Los peroxisomas generan peróxido de hidrógeno en abundancia como producto de diversos procesos celulares (fotorrespiración,  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y metabolismo del glioxilato); este  $H_2O_2$  es detoxificado principalmente por la enzima catalasa y también por enzimas del ciclo del ascorbato-glutatión. El ozono podría estimular los mecanismos de producción de  $H_2O_2$  en los peroxisomas, o bien causar una disminución de los mecanismos de detoxificación. Se ha atribuido a los peroxisomas una función de señalización mediante la producción de  $H_2O_2$  y su liberación al citosol (Del Rio *et al.*, 2002).

Es interesante la presencia abundante de  $H_2O_2$  en el floema, coincidiendo con la acumulación masiva de calosa. En el floema de las muestras CF también se encontró  $H_2O_2$  y calosa, aunque de manera menos abundante que en las muestras fumigadas. En tomate inoculado con el hongo *Cladosporium fulvum* se encontró una acumulación de calosa en las zonas de contacto de las paredes celulares con las hifas del hongo asociada a la presencia de  $H_2O_2$ , que era menor en muestras tratadas con catalasa (Borden y Higgins, 2002); los autores concluyen que el  $H_2O_2$  podría

ser una señal para la acumulación de calosa y otras respuestas encontradas en estas zonas de contacto (entrecruzamiento de las proteínas de la pared celular y acumulación de compuestos fenólicos). Nuestros resultados sugieren que la acumulación de calosa en el floema podría estar asociada al peróxido de hidrógeno.

## **CONCLUSIONES**

La exposición de plantas de patata a ozono durante todo su ciclo de cultivo provoca:

- Alteraciones celulares. Las alteraciones más características son la degradación de la lámina media en zonas localizadas, que da lugar a morfologías celulares estrelladas; las células más dañadas pierden contacto y su vacuola desaparece, lo que provoca la desorganización del contenido de la célula y, finalmente, su colapso. Los daños afectan más al parénquima lagunar, especialmente a las zonas próximas a los estomas, por ser el lugar de entrada del ozono en la hoja.

- La acumulación anómala de calosa en el floema. Esta acumulación de calosa impide el correcto transporte del floema hacia los órganos sumidero. Además, las plantas expuestas a ozono acumulan almidón en las células dañadas de sus hojas. La inmovilización del almidón en las hojas, junto con el taponamiento del floema probablemente sean unas de las causas más importantes de la disminución del rendimiento agrícola.

- Un aumento en la concentración de radical superóxido, que se encuentra en su mayor parte en el parénquima lagunar. Este radical libre se detecta en la pared y/o plasmalema, y podría ser producto de la descomposición del ozono o de la actividad de las enzimas NOX. En presencia de ozono también se produce radical superóxido en membranas intracelulares (tonoplasto, membrana de los cloroplastos y grana).

- La acumulación de peróxido de hidrógeno en la pared celular y peroxisomas. También se encuentra  $H_2O_2$  en plasmalema, citosol, cloroplastos, vacuola, mitocondrias y núcleo. La acumulación de  $H_2O_2$  en la cara apoplástica de la pared celular sugiere que el  $H_2O_2$  es producto de la reacción del ozono con los componentes de la pared. Los peroxisomas también son una fuente importante de  $H_2O_2$  en presencia de ozono, aunque no es posible precisar las causas. Otros orígenes posibles del  $H_2O_2$  son la dismutación del radical superóxido y las peroxidasas de la pared celular. La observación de calosa y  $H_2O_2$  en el floema sugiere una estrecha relación entre ambos.

**Agradecimientos**

"Amparoxisoma" agradece profundamente al profesor Pepe Reig por descubrirle el fantástico mundo de la microscopía y por el buen humor que le caracteriza. Sin su valiosa tutela este capítulo no existiría. Agradezco también al profesor Francisco García y a David Lázaro "Davidovich" por resolverme un sinfín de dudas.

## CONCLUSIONES FINALES

❖ La exposición de patata variedad Agria a ozono durante todo su período de cultivo provoca:

1. Estrés oxidativo, incluso a concentraciones ambientales, lo que se refleja en un aumento en la actividad peroxidasa. Una disminución en la concentración de clorofilas a y b y una disminución en el rendimiento agrícola. Esta disminución es debida principalmente a que las patatas de mayor calibre no alcanzan su tamaño potencial; esto produce un menor rendimiento comercial. La disminución en el rendimiento agrícola está estrechamente relacionada con la exposición acumulada a ozono durante el período de cultivo, especialmente con el AOT00.

2. Un aumento en la concentración de las formas reducida y oxidada del glutatión; el GSH aumenta en mayor proporción que el GSSG. En definitiva, la capacidad amortiguadora del glutatión frente al estrés oxidativo aumenta. Una de las causas del aumento de la concentración de GSH es una mayor síntesis regulada por la expresión de la enzima  $\gamma$ -GCS.

3. La formación de uno o varios radicales libres permanentes. La concentración de estos radicales libres está estrechamente relacionada con la proporción de daños visibles inducidos por el ozono en la hoja. La espectroscopía ESR en banda Q es más apropiada que la banda X para el estudio de los radicales libres producidos por ozono en plantas debido a la ausencia de solapamiento de la señal del Mn(II) y la señal de los radicales libres, la mayor sensibilidad y mejora de la relación señal a ruido.

4. Alteraciones anatómicas y celulares importantes. Las principales alteraciones son:

- Colapso celular debido a la oxidación de la lámina media y pared celular, y la pérdida de turgencia de la vacuola; estos daños son más intensos en las zonas del mesofilo próximas a los estomas.

- Acumulación de almidón en las células dañadas y acumulación de calosa en el floema. Ambos procesos probablemente sean unas de las causas más importantes de la disminución de la producción de tubérculos.

## *Conclusiones finales*

5. Aumento en la concentración de radical superóxido y peróxido de hidrógeno. El radical superóxido aparece principalmente en el parénquima lagunar, y se localiza tanto en la envoltura de la célula (pared / plasmalema) como en su interior (tonoplasto, cloroplastos). El peróxido de hidrógeno se encuentra prácticamente en todos los compartimentos celulares y se concentra en el apoplasto, pared y membrana celular, y en los peroxisomas. El peróxido de hidrógeno encontrado en el floema parece estar relacionado con la acumulación de calosa.
- ❖ Los tratamientos con DPA y, en mayor medida, con citrulina, estimulan el rendimiento en las patatas de calibre comercial en condiciones de campo. El mecanismo protector de ambos compuestos químicos parece estar basado en la disminución del estrés oxidativo.

- ANEXOS -





## ANEXO 1. PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN GLUTATIÓN POR HPLC

### 1.1- Determinación del glutatión total

Se ha utilizado el método de Reed (Reed *et al.*, 1980), adaptándolo al tejido vegetal. Este método se basa en la separación de los S-carboximetildinitro derivados por cromatografía y posterior cuantificación a 365 nm. Este método no debe utilizarse para determinar el estado (reducido u oxidado) de glutatión, ya que la muestra sufre una autooxidación del GSH importante en el proceso de derivatización (Asensi *et al.*, 1994): parte del GSH se oxida a GSSG dando falsos positivos en los resultados. Sin embargo, sí que es un buen método para la determinación del glutatión total (GSH + (2 x GSSG)), cuya concentración se obtiene en equivalentes de GSH.

La extracción de la muestra (300 mg de hoja) se realiza en mortero con nitrógeno líquido, y 1 mL de ácido perclórico 7.25% (v/v) y BPDS 1.25 mM. A continuación, se centrifuga a 15000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Se toman 200 µL de sobrenadante y se le añade 20 µL de ácido iodoacético 1 M disuelto en púrpura de m-cresol 0.2 mM, que es un indicador de pH que vira a color púrpura entre 8.5 y 9. La mezcla se lleva a pH 8.5 – 9 usando un tampón KOH 3 M CHES 0.3 M y una vez alcanzado el pH adecuado (el indicador de pH vira a color púrpura), se incuba la muestra durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Seguidamente se añaden 400 µL de 1-flúor dinitrobenceno al 1% (v/v) en etanol absoluto y se mantiene a 4 °C y en oscuridad al menos durante 4 horas. Las muestras se centrifugan a 15000 x g durante 5 minutos a 4 °C. Finalmente se prepara una solución con 50 µL de sobrenadante y 270 µL de una mezcla metanol - agua en proporción 800:200 (solución S).

#### 1.1.1- Técnica cromatográfica

Se inyectan en el cromatógrafo 80 µL de la solución S. La fase móvil está constituida por 2 solventes:

- Eluyente A: es una solución de metanol al 80% en agua bidestilada.
- Eluyente B: es una solución tampón acético/acetato 0.5 M en metanol al 64%.

Todo el proceso se realiza a un flujo constante de 1 mL/minuto. La elución de las sustancias que nos interesan se realiza aplicando un gradiente:

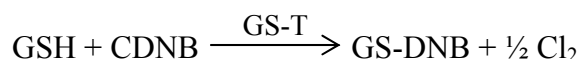
- La fase móvil se mantiene durante 5 minutos a un 20% del eluyente B y un 80% del eluyente A.

- Tras este tiempo, comienza a aumentar la cantidad de eluyente B de manera lineal, hasta que a los 15 minutos del cromatograma se alcanza un 99% de B y un 1% de A.
- Se mantienen estas concentraciones de cada solvente de 5 a 10 minutos, dependiendo del tiempo de elución del último compuesto.
- Una vez eluído el último compuesto de interés, se procede al reequilibrado de la columna. Para ello, se alcanzan las condiciones iniciales (20% de B y 80 % de A) manteniéndose así durante 15 minutos.

### 1.1.2- Cálculos

La concentración de glutatión total (en equivalentes de GSH) se calcula en el cromatograma a partir de una recta de calibrado construida con patrones de concentraciones conocidas de GSH.

En primer lugar, los patrones deben ser calibrados enzimáticamente para conocer su concentración exacta, por medio de la reacción de la glutatión transferasa (Brigelius *et al.*, 1983). El método de la reacción de la glutatión transferasa está basado en la determinación espectrofotométrica de la conjugación del GSH con el cloro-2,4-dinitrobenzoceno. Esta reacción está catalizada por la glutatión S-transferasa (GS-T). El aducto formado, 2,4-dinitrofenil-S-glutatión, presenta un máximo de absorción a 340 nm.



En una microcubeta se añaden los siguientes reactivos:

- 25-100  $\mu\text{L}$  del patrón de GSH disuelto en PCA 6% (v/v) y BPDS 1 mM.
- 10  $\mu\text{L}$  de una solución de 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno 10 mM en etanol al 100%
- Tampón fosfato potásico 0.1 M con EDTA 1mM, pH 7.0, hasta completar un volumen de 990  $\mu\text{L}$

Se realiza un autocero (ha de tenerse en cuenta que la absorbancia de la línea de base debe ser estable) (A1) y la reacción comienza añadiendo 10  $\mu\text{L}$  de una solución de glutatión S-transferasa 500 U/mL en tampón fosfato sódico 0.1 M, EDTA 1 mM, pH 7.4 (esta solución se dializa previamente durante 6 horas en tampón fosfato cambiando el tampón de diálisis cada dos horas). Se registra la variación de la absorbancia a 340 nm hasta el final de la reacción (A2). La diferencia A2-

A1 es proporcional a la concentración de GSH existente. Para calcular la concentración de GSH se utiliza el coeficiente de extinción del 2,4 dinitrofenil-S-glutati6n a 340 nm ( $\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Una vez determinadas las concentraciones exactas de los patrones, 6stos se inyectan en el cromat6grafo y se mide su absorbancia a  $\lambda=340$  nm. De esta manera se construye una recta de calibrado en la que se interpola la absorbancia de la muestra problema para conocer su concentraci6n.

## 1.2- Determinaci6n del glutati6n oxidado (GSSG)

La determinaci6n del GSSG se realiz6 mediante el m6todo cromatogr6fico descrito por Asensi y colaboradores (Asensi *et al.*, 1994). Se basa en la separaci6n cromatogr6fica de los dinitrobenz6n derivados y posterior detecci6n a 365 nm. Con la finalidad de que el GSH no sufra una autooxidaci6n en el proceso, se bloquea el grupo tiol con N-etilmaleimida (NEM). Este bloqueo hace que este m6todo sea id6neo para evitar el aumento de concentraci6n de GSSG por oxidaci6n del GSH durante el procesado de la muestra.

La muestra de 300 mg de hoja se extrae en mortero con nitr6geno l6quido y 1 mL de 6cido percl6rico 12% (v/v), BPDS 2 mM y NEM 40 mM. A continuaci6n, se centrifuga a 15000 x g durante 15 minutos a 4 6C. Se toman 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y se le a6aden 20  $\mu\text{L}$  de p6rpura de m-cresol 0.2 mM como indicador de pH. Se lleva la muestra a pH 8.5 – 9 usando un tamp6n KOH 3 M CHES 0.3 M (el indicador de pH vira a color p6rpura). Se centrifuga de nuevo a 15000 x g durante 15 minutos a 4 6C. Se recogen 25  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y se mezclan con 50  $\mu\text{L}$  de 1-flu6r dinitrobenz6n al 1% (v/v) en etanol absoluto. Se incuba la muestra 45 minutos en oscuridad y se deseca la disoluci6n a vaci6 hasta 70 mTorr. Inmediatamente antes de la inyecci6n en el cromat6grafo, las muestras se resuspenden en 200  $\mu\text{L}$  del eluyente A.

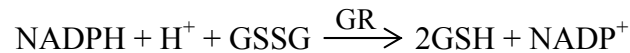
### 1.2.1- T6cnica cromatogr6fica

Las muestras se procesan en el mismo aparato cromatogr6fico que el glutati6n total (apartado 1.2.1). Las condiciones aplicadas en el ensayo son las mismas, siendo el gradiente de eluyentes, fase estacionaria, fase m6vil y detecci6n, id6nticas que en el caso anterior.

### 1.2.2- Cálculos

La concentración de GSSG se calcula en el cromatograma basándose en la recta de calibrado construida con patrones de concentraciones conocidas de GSSG.

Los patrones de GSSG deben ser previamente calibrados para conocer su concentración exacta mediante la reacción de la glutatión reductasa (Brigelius *et al.*, 1983). Esta reacción se basa en la reducción, dependiente de NADPH, del GSSG a GSH:



En una microcubeta se añaden:

- 500  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 0.2 M con EDTA 2 mM a pH 7.0.
- 50  $\mu\text{L}$  de NADPH 3 mM disuelto en Tris-HCl 10 mM, pH 7.0.
- 50  $\mu\text{L}$  de GSSG 20 mM disuelto en agua.
- 0.01 unidades de GR
- agua (hasta un volumen final de 1 mL)

Se registra la disminución de absorbancia a 340 nm (debida al consumo de NADPH) hasta que finalice la reacción, es decir, hasta que se consuma completamente el GSSG. El incremento de absorbancia durante la reacción es proporcional a la concentración de GSSG del patrón ( $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para el NADPH a 340 nm). Una vez halladas las concentraciones de los patrones, éstos se inyectan en el cromatógrafo y se mide su absorbancia a  $\lambda=340 \text{ nm}$ . Así, se construye una recta de calibrado en la que se interpola la absorbancia de la muestra para conocer su concentración.

### **1.3- Cálculo de la concentración de glutatión reducido (GSH)**

El GSH se calcula restándole a la concentración de glutatión total (obtenida en equivalentes de GSH) 2 veces la de GSSG:

$$[\text{GSH}] = [\text{Glutatión total}] - (2 \times [\text{GSSG}])$$

## ANEXO 2. PROTOCOLO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA ENZIMA $\gamma$ -GCS

### 2.1- Extracción del RNA

Las muestras congeladas de hoja se homogeneizaron en un mortero con nitrógeno líquido. El RNA se extrajo con el reactivo Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen life technologies) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Reactivo Trizol<sup>®</sup>, que es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina.
- Cloroformo
- Isopropil alcohol
- Agua libre de RNAsas. Para prepararla se utiliza agua bidestilada a la que se añade dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.01% (v/v); se deja agitando toda la noche y finalmente se autoclava.
- Etanol al 70% (en agua tratada con DEPC)

Los pasos a seguir son los siguientes:

- **Homogeneización del tejido:** Se homogeneizan 50 mg de cada muestra de hoja en 1 mL de reactivo Trizol<sup>®</sup>. Este reactivo rompe las células y disuelve los componentes celulares, manteniendo la integridad del RNA.

- **Separación de fases:** Se incuban las muestras homogeneizadas durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se añaden 0.2 mL de cloroformo, se agita vigorosamente durante unos 15 segundos y se incuba a temperatura ambiente durante 2-3 minutos. Se centrifuga a 12000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación, la mezcla se separa en tres fases: en la parte inferior aparece una fase de fenol-cloroformo, de color rojo, una interfase y una fase acuosa transparente en la parte superior, donde se encuentra el RNA.

- **Precipitación del RNA:** La fase acuosa se transfiere a un nuevo tubo. El RNA de esta fase se precipita mezclando con 0.5 mL de isopropil alcohol. Las muestras se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugan a 12000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El RNA forma un precipitado con aspecto de gel en el lateral, hacia el fondo del tubo.

- **Lavado del RNA:** Se decanta el sobrenadante y se lava el precipitado de RNA al menos una vez con 1 mL de etanol al 75%. Se mezcla con la ayuda de un vórtex y se centrifuga a 7500 x g durante 5 minutos a 4 °C.

- **Redisolución del RNA:** Al final del procedimiento se aspira el etanol, y el precipitado de RNA se deja secar al aire unos 10-15 minutos (sin secarlo completamente). Se disuelve el RNA en agua libre de RNAsas pipeteando varias veces; se deja en hielo durante 15-30 minutos, se agita con Vórtex y se incuba durante 10 minutos a 65 °C para favorecer la disolución.

Tras la extracción del RNA, se cuantificó su concentración mediante la medida de su absorbancia a 260 nm (absorbancia de 1 ng de RNA /  $\mu$ L a 260 nm = 0.025). Para hacer el blanco de la medida de RNA se puso 1 mL de agua libre de RNAsas en una cubeta de cuarzo, cuya absorbancia a 260 nm se nombra como  $A_b$ . Para la medida se diluyó en esta agua 2  $\mu$ L del RNA aislado, cuya absorbancia a 260 nm se nombra como  $A_m$ . Con los valores obtenidos se realizó el siguiente cálculo:

$$(A_m - A_b) \times 40 \times 1000 / 2 = \text{ng} / \mu\text{L de la disolución del RNA aislado}$$

También se comprobó la pureza del RNA dividiendo el valor de la absorbancia a 260 nm entre el valor de la absorbancia a 280 nm. Se obtuvo una relación  $A_{260}/A_{280}$  comprendida entre 1.8 y 2.0, indicando que se trataba de RNA de gran pureza. Además, y con el fin de asegurar la integridad del RNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa.

Finalmente, el RNA se guardó en alícuotas a -80 °C para su conservación hasta su utilización.

## **2.2- Retrotranscripción-amplificación cuantitativa del RNA (RT-PCR en tiempo real)**

### 2.2.1- Fundamento

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) es actualmente el método más sensible y exacto para la detección de niveles de RNA mensajeros (mRNA).

Este método, a diferencia de la PCR semicuantitativa, permite la detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción, mediante el empleo de compuestos fluorescentes que sólo emiten fluorescencia cuando el DNA está en forma de doble

cadena, de modo que determinando el incremento de fluorescencia se puede calcular la cantidad de producto formado. La sustancia fluorescente utilizada en nuestros experimentos fue SYBR Green I (Sigma-Aldrich, Inc.). Así, este método nos permite seguir la reacción a medida que transcurre a través del incremento de fluorescencia, y nos permite controlar la reacción en todo momento. El software del ordenador construye las curvas de amplificación a partir de los datos de emisión de fluorescencia recogidos durante la reacción en tiempo real. De esta manera, al final obtenemos una gráfica en la que el eje de ordenadas es la fluorescencia y el eje de abscisas es el número de ciclos transcurridos (figura I). A continuación, el eje de ordenadas se transforma en logarítmico (logaritmo decimal) para su mejor interpretación (figura II).

En el caso de la PCR cuantitativa, el parámetro de medida de la expresión de un determinado gen no es la fluorescencia, sino el ciclo en el que la amplificación comienza a ser exponencial. Este ciclo se denomina ciclo umbral o Ct (“threshold cycle”), pues es el ciclo a partir del cual la amplificación empieza a ser realmente apreciable. Los valores de ciclo umbral decrecerán linealmente conforme mayor sea la cantidad de cDNA (DNA copia) de partida, puesto que cuanto más copias de mRNA de partida del gen estudiado haya, más cDNA se obtendrá en la retrotranscripción, y antes comenzará la amplificación a ser exponencial.

Se pueden realizar dos tipos de cuantificación: absoluta y relativa. La cuantificación absoluta utiliza diluciones seriadas de RNA de concentración conocida para construir una curva patrón, que permite la determinación de la concentración del RNA de partida de las muestras problema basándose en sus valores de Ct. En la cuantificación relativa, la expresión del gen problema se define en función de la de un gen de expresión constitutiva, es decir, que no varía según diferentes condiciones, y que por tanto sirve de control interno. Existen diferentes métodos para la cuantificación relativa; en esta tesis se ha utilizado el método comparativo de Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), que se detalla en el apartado 2.2.3 de "Cálculos".

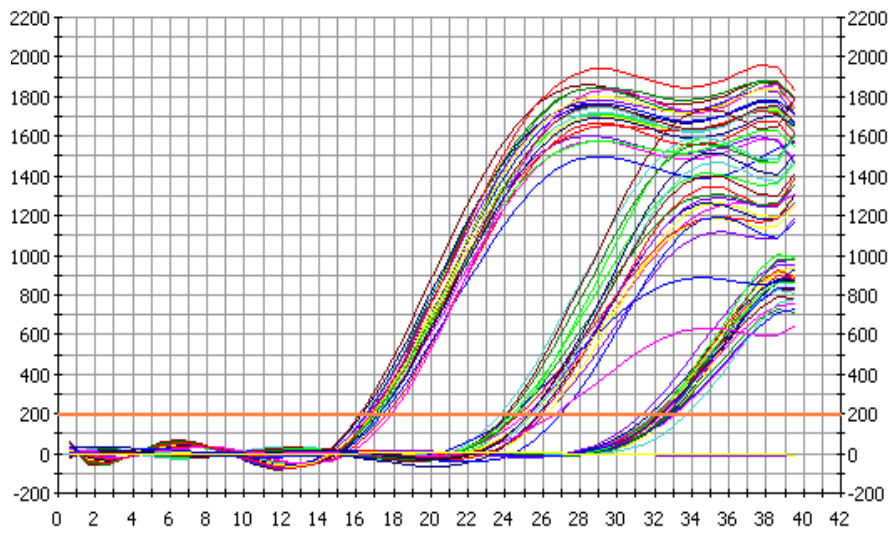


Figura I. Curvas de amplificación obtenidas mediante PCR en tiempo real

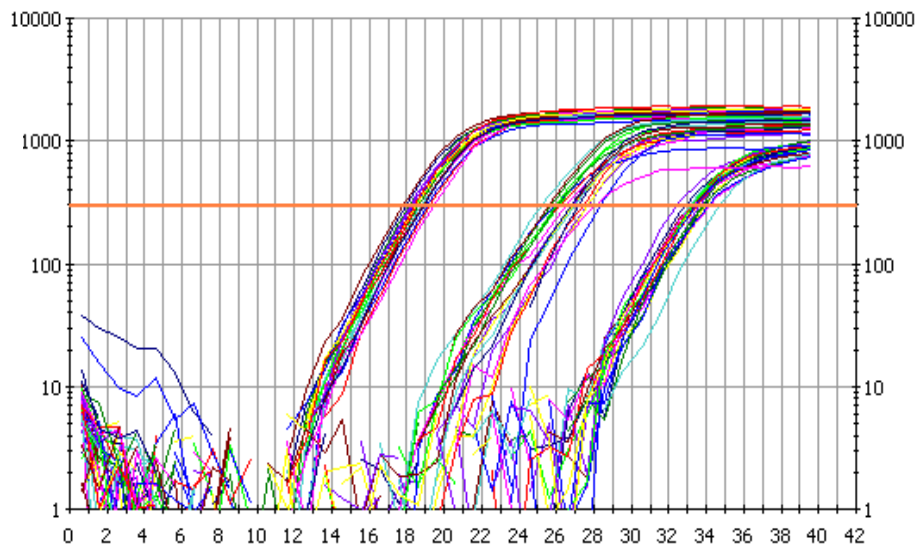


Figura II. Curvas de amplificación tras transformar el eje de ordenadas en logarítmico



### 2.2.2- Procedimiento

#### **Mezcla de reacción:**

La reacción se llevó a cabo utilizando el kit SYBR<sup>®</sup> Green Quantitative RT-PCR (Sigma-Aldrich, Inc.), según el protocolo recomendado por el fabricante. El volumen de cada reacción fue de 50  $\mu$ L y los reactivos y sus concentraciones finales fueron las siguientes:

- SYBR Green Taq Ready Mix \* ..... 1x
- RNA ..... 2 ng/ $\mu$ L
- Primers .....400 nM (cada primer)
- eAMV RT<sup>†</sup> ..... 0.04 U/ $\mu$ L
- Agua DEPC hasta completar los 50  $\mu$ L

\*SYBR Green Taq Ready Mix: Mezcla ya preparada a concentración 2x, que se suministra con el kit comercial. Se compone de:

- Tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8.3
- KCl 100 mM
- MgCl<sub>2</sub> 6 mM
- Desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), cada uno a concentración 0.4 mM
- Inhibidor de RNAsas, 1 U/ $\mu$ L
- Taq DNA polimerasa "Jump Start"
- Anticuerpo Taq "Jump Start", que inactiva a la Taq DNA polimerasa a temperaturas inferiores a 70 °C, evitando la formación de dímeros entre los primers y de productos no específicos.
- Colorante SYBR Green I

<sup>†</sup>eAMV RT: Transcriptasa reversa aviar mejorada ("Enhanced avian reverse transcriptase")

#### **Condiciones de amplificación:**

- Retrotranscripción: 50 °C durante 30 minutos
- Desnaturalización previa: 94 °C durante 3 minutos
- Amplificación (40 ciclos):
  - Desnaturalización: 94 °C durante 30 segundos
  - Unión o "annealing": 58.8 °C durante 30 segundos
  - Extensión: 72 °C durante 30 segundos
- Extensión final: 72 °C durante 7 minutos

La amplificación del gen de referencia (actina) se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que el gen problema.

### 2.2.3- Cálculos

Se realizó una cuantificación relativa del gen problema. La fórmula que permite la cuantificación por este método viene dada por:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

donde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_1 - \Delta Ct_2$

siendo  $\Delta Ct_1 = Ct_{\text{gen problema}} - Ct_{\text{gen referencia}}$  de la muestra 1

$\Delta Ct_2 = Ct_{\text{gen problema}} - Ct_{\text{gen referencia}}$  de la muestra 2

Para que la determinación a través de esta fórmula sea válida, debe cumplirse que la eficiencia de la reacción para el gen problema y para el gen de referencia sea aproximadamente igual. Este requisito se comprueba realizando curvas estándar de concentraciones de RNA conocidas para cada uno de los genes, el problema y el de referencia. Una vez obtenidas las curvas de amplificación se representa el logaritmo decimal de la concentración frente al Ct, tanto para el gen problema como para el de referencia, y se calcula la pendiente de la recta para cada una de las representaciones obtenidas.

La eficiencia de la reacción de amplificación viene dada por la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia} = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$$

Según esta fórmula, para que las eficiencias sean similares, las pendientes de ambas rectas deben ser similares.

Para una pendiente de  $-3.322$  obtenemos una eficiencia del 100 %; esto significa que el aumento de un ciclo de amplificación durante la fase exponencial de la reacción supone exactamente la duplicación del material amplificado. Una reacción de amplificación debe tener una eficiencia lo más cercana al 100 % para estar optimizada.

Después de comprobar que las eficiencias son comparables, se llevan a cabo las reacciones de amplificación para ambos genes (problema y referencia) y para cada tratamiento (cámara filtrada, cámara no filtrada y cámara fumigada) por triplicado, y se aplica la ecuación de

comparación de Ct mencionada anteriormente ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) para el cálculo de la expresión del gen  $\gamma$ -GCS en las muestras tratadas con aire no filtrado y fumigado en relación a las muestras control (crecidas en las cámaras filtradas).



- BIBLIOGRAFÍA -



- Akashi K, Miyake C, Yokota A** (2001) Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger. *FEBS Letters* **508**, 438-442.
- Alberti A, Macciantelli D, Predieri S, Rossi F** (2000) Monitoring the physiological activity of plants by means of EPR spectroscopy. Mn(II) signals in *Pinus nigra* Arnold. *Trees* **14**, 312-315.
- Alscher RG, Donauhe JL, Cramer CL** (1997) Reactive oxygen species and oxidants: relationships for green cells. *Physiologia Plantarum* **100**, 233-244.
- Asada K** (1994) Production and action of active oxygen in photosynthetic tissue. En: Foyer CH, Mullineaux PL (eds). *Causes of Photooxidation and Amelioration of Defense Systems in Plants*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, García de la Asunción J, Estrela JM, Viña J** (1994) A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Analytical Biochemistry* **217**, 323-328.
- Astorino G, Margani I, Tripodo P, Manes F** (1995) The response of *Phaseolus vulgaris* L. cv Lit to different dosage of the antiozonant ethylenediurea (EDU) in relation to chronic treatment with ozone. *Plant Science* **111**, 237-248.
- Atherton NM, Hendry GAF, Möbius K, Rohrer M, Törring JT** (1993) A free radical ubiquitously associated with senescence in plants: evidence for a quinone. *Free Radical Research Communications* **19**, 297-301.
- Bastrup-Birk A, Mortensen L** (1997) Effects of Ozone on Vegetation. En: Fenger J (ed). *Photochemical Air Pollution, NERI Technical Report, No. 199*. 103-133.
- Bender J, Weigel HJ, Wegner U, Jäger HJ** (1994) Response of cellular antioxidants to ozone in wheat flag leaves at different stages of plant development. *Environmental Pollution* **84**, 15-21.
- Bestwick CS, Brown IR, Bennett MHR, Mansfield JW** (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *The Plant Cell* **9**, 209-221.
- Biehler K, Fock H** (1996) Evidence for the contribution of the Mehler-peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat. *Plant Physiology* **112**, 265-272.
- Bindi M, Hacour A, Vandermeiren K, Craigon J, Ojanperä K, Selldén G, Högy P, Finnan J, Fibbi L** (2002) Chlorophyll concentration of potatoes grown under elevated carbon dioxide and/or ozone concentrations. *European Journal of Agronomy* **17**, 319-335.
- Boone R, Westwood, R** (2003) *A forest health study of bur oak (Quercus macrocarpa Michx.) and trembling aspen (Populus tremuloides Michx.) stands near the Manitoba Hydro Selkirk generating station, Manitoba*. Centre for Forest Interdisciplinary Research, University of Winnipeg (<http://www.gov.mb.ca/conservation/envapprovals/pubs/selkgenstn/index.html>).

- Borden S, Higgins VJ** (2002) Hydrogen peroxide plays a critical role in the defence response of tomato to *Cladosporium fulvum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **61**, 227-236.
- Bortier K, Ceulemans R, DeTemmerman L** (2000) Effects of tropospheric ozone on woody plants. En: Agrawal SB, Agrawal M (eds). *Environmental Pollution and Plant Responses*. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, 153-182.
- Bowler C, Van Montagu M, Inzé D** (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**, 276-287.
- Brey EM, Lalani Z, Johnston C, Wong M, McIntire LV, Duke PJ, Patrick Jr. CW** (2003) Automated selection of DAB-labeled tissue for immunohistochemical quantification. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **51**, 575-584.
- Brigelius R, Muckel C, Akerboom TP, Sies H** (1983) Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochemical Pharmacology* **32**, 2529-2534.
- Bussotti F, Bottacci A, Bartolesi A, Grossoni P, Tani C** (1995) Morpho-anatomical alterations in leaves collected from beech trees (*Fagus sylvatica* L.) in conditions of natural water stress. *Environmental and Experimental Botany* **35**.
- Buwalda F, De Kok LJ, Stulen I, Kuiper PJC** (1988) Cysteine,  $\gamma$ -glutamylcysteine and glutathione contents of spinach leaves as affected by darkness and application of excess sulfur. *Physiologia Plantarum* **74**, 663-668.
- Böhm M, McCune B, Vandetta T** (1991) Diurnal curves of tropospheric ozone in the western United States. *Atmospheric Environment* **25A**, 1577-1590.
- Calvo E** (2003) *Efectos del ozono sobre algunas hortalizas de interés de la cuenca mediterránea occidental*. Tesis Doctoral. Valencia: Universidad de Valencia.
- CAPA** (2007) *Superficies y producciones de los principales cultivos de la Comunidad Valenciana. Año 2005*. Página web de la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación (<http://www.gva.es>).
- Carrasco-Rodríguez JL** (2000) *Impacto del ozono ambiental en la actividad fotosintética del fotosistema II en cultivos agrícolas*. Tesis Doctoral. Valencia: Universidad de Valencia.
- Carrasco-Rodríguez JL, Del Valle-Tascón S** (2001) Impact of elevated ozone on chlorophyll *a* fluorescence in field-grown oat (*Avena sativa*). *Environmental and Experimental Botany* **45**, 133-142.
- Casano ML, Lascano HR, Trippi VS** (1994) Hydroxyl radicals and thylakoid-bound endopeptidase are involved in light and oxygen-induced proteolysis in oat protoplasts. *Plant and Cell Physiology* **35**, 145-152.
- Castagna A, Nali C, Ciompi S, Lorenzini G, Soldatini GF, Ranieri A** (2001) Ozone exposure affects photosynthesis of pumpkin (*Cucurbita pepo*) plants. *New Phytologist* **152**, 223-229.



- Castillo FJ, Greepin H** (1988) Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum alba* L. leaves after ozone exposure. *Environmental and Experimental Botany* **28**, 231-238.
- CCAE, Confederación de Cooperativas Agrarias de España** (2004) *Caracterización del mercado y de la comercialización de la patata en las cooperativas agrarias*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- Chaudière J, Ferrari-Iliou R** (1999) Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology* **37**, 949-962.
- Clarke BB, Greenhalgh-Weidman B, Brennan EG** (1990) On assessment of the impact of ambient ozone on field grown crops in New Jersey using the EDU method: part 1- white potato (*Solanum tuberosum*). *Environmental Pollution* **66**, 351-360.
- Cobbett CS** (1999) A family of phytochelatin synthase genes from plant, fungal and animal species. *Trends in Plant Science* **4**, 335-337.
- Collins WJ, Stevenson DS, Johnson CE, Derwent RG** (2000) The european regional ozone distribution and its links with the global scale for the years 1992 and 2015. *Atmospheric Environment* **34**, 255-267.
- Conklin PL, Pallanca JE, Last RL, Smirnoff W** (1997) Ascorbic acid metabolism in the ascorbate-deficient *Arabidopsis thaliana* mutant vtc1. *Plant Physiology* **115**, 1277-1285.
- Craigon J, Fangmeier A, Jones M, Donnelly A, Bindi M, DeTemmerman L, Persson K, Ojanperä K** (2002) Growth and marketable-yield responses of potato to increased CO<sub>2</sub> and ozone. *European Journal of Agronomy* **17**, 273-289.
- Darrall NM** (1989) The effect of air pollutants on physiological processes in plants. *Plant, Cell and Environment* **12**, 1-30.
- Davison AW, Barnes JD** (1998) Effects of ozone on wild plants. *New Phytologist* **139**, 135-151.
- De Temmerman L, Karlsson GP, Donnelly A, Ojanperä K, Jager HJ, Finnan J, Ball G** (2002) Factors influencing visible ozone injury on potato including the interaction with carbon dioxide. *European Journal of Agronomy* **17**, 291-302.
- Decoteau DR, Grant L, Cracker LE** (1986) Failure of ozone susceptibility test to predict yield reduction in wheat. *Field Crops Research* **13**, 185-191.
- Del Rio LA, Corpas J, Sandalio LM, Palma JM, Gómez M, Barroso JB** (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1255-1272.
- Del Valle-Tascón S, Carrasco-Rodríguez JL**. (2004) Impact of ozone on crops. En: Dris R, Mohan Jain S (eds). *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops, Vol. I Preharvest Practices*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 189-208.

- Derwent RG, Stevenson DS, Collins WJ, Johnson CE** (2004) Intercontinental transport and the origins of the ozone observed at surface sites in Europe. *Atmospheric Environment* **38**, 1891-1901.
- Donnelly A, Craighon J, Black CR, Colls JJ, Landon G** (2001) Does elevated CO<sub>2</sub> ameliorate the impact of O<sub>3</sub> on chlorophyll content and photosynthesis in potato (*Solanum tuberosum*)? *Physiologia Plantarum* **111**, 501-511.
- Eckardt N, Pell E** (1994) O<sub>3</sub>-induced degradation of Rubisco protein and loss of Rubisco mRNA in relation to leaf age in *Solanum tuberosum* L. *New Phytologist* **127**, 741-748.
- Edwards EA, Enard C, Creissen GP, Mullineaux PM** (1994) Synthesis and properties of glutathione-reductase in stressed peas. *Planta* **192**, 137-143.
- Edwards R, Dixon DP, Walbot V** (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* **5**, 193-8.
- European Environment Agency** (2007) *Air pollution by ozone in Europe in summer 2006*. Copenhagen. EEA Technical report No 5/2007.
- Elfving DC, Gilbert MD, Edgerton LJ, Wilder MH, Lisk DL** (1976) Antioxidant and antitranspirant protection of apple foliage against ozone injury. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **15**, 336-341.
- FAO** (2000) Página web de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (<http://www.fao.org>).
- Fiala J, Cernikovskiy L, De Leeuw F, Livorova, H** (2002) *Air pollution by ozone in Europe in summer 2002*. Report Number: 6/2002, 1-23.
- Finlayson-Pitts BJ, Pitts JN.** (1986) *Atmospheric chemistry: fundamentals and experimental techniques*. New York: Wiley.
- Fiscus EL, Booker FL, Burkey KO** (2005) Crop responses to ozone: uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning. *Plant, Cell and Environment* **28**, 997-1011.
- Fowler D, Flechard C, Cape JN, Storeton-West RL, Coyle M** (2001) Measurements of ozone deposition to vegetation quantifying the flux, the stomatal and non-stomatal components. *Water, Air and Soil Pollution* **130**, 63-74.
- Foyer CH, Noctor G** (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* **28**, 1056-1071.
- Foyer CH, Theodoulou FL, Delrot S** (2001) The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends in Plant Science* **6**, 486-492.
- Fridovich I** (1986) Biological effects of superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **247**, 1-11.

- Fuhrer J, Booker FL** (2003) Ecological issues related to ozone: agricultural issues. *Environment International* **29**, 141-154.
- Fuhrer J, Skärby L, Ashmore MR** (1997) Critical levels for ozone: effects on vegetation in Europe. *Environmental Pollution* **97**, 91-106.
- Fumagalli I, Gimeno BS, Velissariou D, De Temmerman L, Mills G** (2001) Evidence of ozone-induced adverse effects on crops in the Mediterranean region. *Atmospheric Environment* **35**, 2583-2587.
- Geigenberger P, Stitt M** (2000) Diurnal changes in sucrose, nucleotides, starch synthesis and AGPS transcript in growing potato tubers that are suppressed by decreased expression of sucrose phosphate synthase. *The Plant Journal* **23**, 795-806.
- Gimeno BS, Porcuna JL, Jiménez A, Bermejo V, Jordá C.** (1999) Ozone exposure modifies the sensitivity of tomato plants to virus infestations. En: Fuhrer J, Achermann B (eds). *Critical Levels for Ozone - Level II. Environmental documentation No. 115*. Bern: Swiss Agency for Environment, Forest and Landscape, 115-120.
- Goodman BA** (1995) Do EPR spectra show the presence of a unique and ubiquitous quinone-derived free radical that is associated with senescence in plants? *Free Radical Research* **23**, 187-190.
- Goodman BA, Reichenauer TG** (2003) Formation of paramagnetic products in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) as a result of ozone-induced stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**, 1248-1255.
- Govindjee, Amesz J, Fork DC.** (1986) *Light emission by plants and bacteria*. Orlando: Academic Press.
- Grantz DA, Yang S** (2000) Ozone impacts on allometry and root hydraulic conductance are not mediated by source limitation nor developmental age. *Journal of Experimental Botany* **51**, 919-927.
- Gravano E, Giulietti V, Desotgiu R, Bussotti F, Grossoni P, Gerosa G, Tani C** (2003) Foliar response of an *Ailanthus altissima* clone in two sites with different levels of ozone-pollution. *Environmental Pollution* **121**, 137-146.
- Griffith OW** (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry* **106**, 207-212.
- Grimes HD, Perkins KK, Boss WF** (1983) Ozone degrades into hydroxyl radical under physiological conditions. A spin trapping study. *Plant Physiology* **72**, 1016-1020.
- Guderian R, Tingey DT, Rabe R.** (1985) Effects of photochemical oxidants on plants. En: Guderian R (ed). *Air pollution by photochemical oxidants. Formation, transport, control and effects on plants*. Berlin: Springer-Verlag, 127-333.
- Guidi L, Degl'Innocenti E, Soldatini GF** (2002) Assimilation of CO<sub>2</sub>, enzyme activation and photosynthetic electron transport in bean leaves, as affected by high light and ozone. *New Phytologist* **156**, 377-388.

- Guidi L, Nali C, Ciompi S, Lorenzini G, Soldatini GF** (1997) The use of chlorophyll fluorescence and leaf gas exchange as methods for studying the different responses to ozone of two bean cultivars. *Journal of Experimental Botany* **48**, 173-179.
- Günthardt-Goerg MS, Matyssek R, Scheidegger C, Keller T** (1993) Differentiation and structural decline in the leaves and bark of birch (*Betula pendula*) under low ozone concentrations. *Trees* **7**, 104-114.
- Günthardt-Goerg MS, McQuattie CJ, Maurer S, Frey B** (2000) Visible and microscopic injury in leaves of five deciduous tree species related to current critical ozone levels. *Environmental Pollution* **109**, 489-500.
- Günthardt-Goerg MS, Vollenweider P** (2007) Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: New diagnostic perspectives. *Environmental Pollution* **147**, 467-488.
- Guri A** (1983) Variation in glutathione and ascorbic acid content among selected cultivars of *Phaseolus vulgaris* prior to and after exposure to ozone. *Canadian Journal of Plant Science* **63**, 733-738.
- Hagar H, Ueda N, Shah SU** (1996) Role of reactive oxygen metabolites in DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury to LLC-CK1 cells. *American Journal of Physiology- Renal Physiology* **271**, 209-215.
- Halliwell B, Gutteridge JM.** (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press.
- Harada E, Kusano T, Sano H** (2000) Differential expression of genes encoding enzymes involved in sulfur assimilation pathways in response to wounding and jasmonate in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* **156**, 272-276.
- Hassan IA** (2006) Physiological and biochemical response of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Kara) to O<sub>3</sub> and antioxidant chemicals: possible roles of antioxidant enzymes. *Annals of Applied Biology* **148**, 197-206.
- Hausladen A, Madamanchi NR, Fellows S, Alscher RG, Amundson RG** (1990) Seasonal changes in antioxidants in red spruce as affected by ozone. *New Phytologist* **1990**, 447-458.
- Heagle AS** (1989) Ozone and crop yield. *Annual Review of Phytopathology* **27**, 397-423.
- Heagle AS, Miller JE, Booker FL** (1998) Influence of ozone stress on soybean response to carbon dioxide enrichment: I. Foliar properties. *Crop Science* **38**, 113-121.
- Heagle AS, Philbeck RB, Letchworth MB** (1979) Injury and yield responses of spinach cultivars to chronic doses of ozone in open-top field chambers. *Journal of Environmental Quality* **8**, 368-373.
- Heath RL** (1988) Biochemical mechanism of pollutant stress. En: Hech WW, Taylor OC, Tingey DT (eds). *Assessment of Crop Loss from Air Pollutants*. London: Elsevier, 259-286.
- Heath RL** (1994a) Alteration of plant metabolism by ozone exposure. En: Alscher AR, Wellburn AR (eds). *Plant Responses to Gaseous Environment*. London: Chapman and Hall, 121-145.

- Heath RL** (1994b) Possible mechanisms for inhibition of photosynthesis by ozone. *Photosynthesis Research* **39**, 439-451.
- Heath RL, Taylor GE.** (1997) Physiological processes and plant responses to ozone exposure. En: Sandermann H, Wellburn AS, Heath RL (eds). *Ozone and Forest Decline: A Comparison of Controlled Chamber and Field Experiments*. Berlin: Springer-Verlag, 317-368.
- Hepburn HA, Goodman BA, McPhail DB, Matthews S, Powell AA** (1986) An evaluation of EPR measurements of the organic free radical content of individual seeds in the non-destructive testing of seed viability. *Journal of Experimental Botany* **37**, 1675-1684.
- Hernández JA, Ferrer MA, Jiménez A, Ros Barceló A, Sevilla F** (2001) Antioxidant systems and O<sub>2</sub> /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology* **127**, 817-831.
- Herschbach C, Rennenberg H** (1994) Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulphate and sulphate transport in tobacco plants. *Journal of Experimental Botany* **45**, 1069-1076.
- Horemans N, Foyer CH, Potters G, Asard H** (2000) Ascorbate function and associated transport system in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 531-540.
- Horsfall JG, Barratt RW** (1945) An improved gradient system for measuring plant diseases. *Phytopathology* **35**, 655.
- Iqbal M, Abdin MZ, Mahmooduzzafar, Yunus M, Agrawal M.** (1997) Resitance mechanisms in plants against air pollution. En: Yunus M, Iqbal M (eds). *Plant response to air pollution*. Chichester: John Wiley & Sons, 195-240.
- Iranzo J.** (1986) *Manual de técnicas de histología vegetal*. Publicaciones Universidad de León.
- Jahnke LS, Hull MR, Long SP** (1991) Chilling sensitivity stress and oxygen metabolising enzymes in *Zea mays* and *Zea diploperensis*. *Plant, Cell and Environment* **14**, 97-104.
- Kalyanaraman B, Karoui H, Singh RJ, Felix CC** (1996) Detection of thiyl radical adducts formed during hydroxyl radical- and peroxyxynitrite-mediated oxidation of thiols - a high resolution ESR spin-trapping study at Q-band (35 GHz) . *Analytical Biochemistry* **241**.
- Kangasjärvi J, Jaspers P, Kollist H** (2005) Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant, Cell and Environment* **28**, 1021-1036.
- Kangasjärvi J, Talvinen J, Utriainen M, Karjalainen R** (1994) Plant defence systems induced by ozone. *Plant, Cell and Environment* **17**, 783-794.
- Kanofsky JR, Sima PD** (1995) Singlet oxygen generation from the reaction of ozone with plant leaves. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 7850-7852.
- Kärenlampi L, Skärby L** (1996) Critical Levels of Ozone in Europe: Testing and Finalizing the Concepts. En: Kärenlampi L, Skärby L (eds). *UN-ECE Workshops Reports*. Finland: University of Kuopio, 363.

- Kawasaki S, Miyake C, Kohchi T, Fujii S, Uchida M, Yokota A** (2000) Responses of wild watermelon to drought stress: accumulation of an ArgE homologue and citrulline in leaves during water deficits. *Plant and Cell Physiology* **41**, 864-873.
- Kirtikara K, Talbot D** (1996) Alteration in protein accumulation, gene expression and ascorbate-glutathione pathway in tomato (*Lycopersicon esculentum*) under paraquat and ozone stress. *Journal of Plant Physiology* **148**, 752-760.
- Kley D, Kleinmann M, Sandermann H, Krupa SV** (1999) Photochemical oxidants: state of science. *Environmental Pollution* **100**, 19-42.
- Knudson LL, Tibbitts TW, Edwards GE** (1977) Measurement of ozone injury by determination of leaf chlorophyll concentration. *Plant Physiology* **60**, 606-608.
- Kolb TE, Fredericksen TS, Steiner KC, Skelly JM** (1997) Issues in scaling tree size and age responses to ozone: a review. **98**, 195-208.
- Kostka-Rick R, Manning WJ** (1992) Partitioning of biomass carbohydrates in field-grown radish under ambient concentrations of ozone, and treated with the anti-ozonant ethylenediurea (EDU). *New Phytologist* **121**, 187-200.
- Kovtun Y, Chiu W, Tena L, Sheen J** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 2940-2945.
- Kuik OJ, Helming JFM, Dorland C, Spaninks FA** (2000) The economic benefits to agriculture of a reduction of low level ozone pollution in the Netherlands. *European Review of Agricultural Economics* **27**, 75-90.
- Kurczynska EU, Dmuchowski W, Wloch W, Bytnerowicz A** (1997) The influence of air pollutants on needles and stems of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees. *Environmental Pollution* **98**, 325-334.
- Laisk A, Kull O, Moldau H** (1989) Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero. *Plant Physiology* **90**, 1163-1167.
- Lamb C, Dixon RA** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 251-275.
- Langebartels C, Schraudner M, Heller W, Ernst W, Sandermann H.** (2002a) Oxidative stress and defense reactions in plants exposed to air pollutants and UV-B radiation. En: Inzé D, Van Montagu M (eds). *Oxidative stress in plants*. London: Taylor and Francis, 105-135.
- Langebartels C, Wohlgemuth H, Kschieschan S, Grün S, Sandermann H** (2002b) Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 567-575.
- Lee EH, Bennett JH** (1982) Superoxide dismutase. A possible protective enzyme against ozone injury in snapbean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiology* **69**, 1444-1449.

- Lee EH, Jersey JA, Gilford C, Bennett JH** (1984) Differential ozone tolerance in soybean and snapbeans: analysis of ascorbic acid in O<sub>3</sub>-susceptible and O<sub>3</sub>-resistant cultivars by high-performance liquid chromatography. *Environmental and Experimental Botany* **24**, 331-341.
- Leipner J, Oxborough K, Baker NR** (2001) Primary sites of ozone-induced perturbations of photosynthesis in leaves: identification and characterization in *Phaseolus vulgaris* using high resolution chlorophyll fluorescence imaging. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1689-1696.
- Lichtenthaler HK** (1987) Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Methods in Enzymology* **148**, 350-382.
- Lorenzini G, Guidi L, Nali C, Franco G** (1999) Quenching analysis in poplar clones exposed to ozone. *Tree Physiology* **19**, 607-612.
- MacFarlane GR, Burchett MD** (2001) Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Pollution Bulletin* **42**, 233-240.
- Madamanchi NR, Anderson JV, Alscher RG, Cramer CL, Hess JL** (1992) Purification of multiple forms of glutathione reductase from pea (*Pisum sativum*) seedlings and enzyme levels in ozone-fumigated pea leaves. *Plant Physiology* **100**, 138-145.
- Malhotra SS, Khan AH** (1984) Biochemical and Physiological Impact of Major Pollutants. En: Treshow M (ed). *Air Pollution and Plant Life*. Chichester: Springer-Verlag, 113-157.
- Maly FE, Nakamura M, Gauchat JF, Urwyler A, Walker G, Dahinden CA, Cross AR, Jones OTG, Weck AL** (1989) Superoxide-dependent nitroblue tetrazolium reduction and expression of cytochrome *b*<sub>245</sub> components by human tonsillar lymphocytes and B cell lines. *Journal of Immunology* **142**, 1260-1267.
- Manning WJ** (2000) Use of Protective Chemicals to Assess the Effects of Ambient Ozone on Plants. Agrawal SB, Agrawal H (eds). *Environmental Pollution and Plant Responses*. Boca Raton: Lewis, 247-259.
- Manning WJ, Krupa SV** (1992) Experimental methodology for studying the effects of ozone on crops and trees. En: Lefohn AS (ed). *Surface level ozone exposures and their effects on vegetation*. Chelsea: Lewis Publishers, 93-156.
- Mansfield TA, Pearson M** (1996) Distribution in stomatal behaviour in plants exposed to air pollution. En: Yunus M, Iqbal M (eds). *Plant Response to Air Pollution*. Chichester: Wiley.
- Marshner H** (1986) *Mineral nutrition of higher plants*. London: Academic Press.
- Matyssek R, Günthardt-Goerg MS, Maurer S, Christ R** (2002) Tissue structure and respiration of stems of *Betula pendula* under contrasting ozone exposure and nutrition. *Trees-Structure and Function* **16**, 375-385.
- Maurer S, Matyssek R, Günthardt-Goerg MS, Landolt W, Einig W** (1997) Nutrition and the ozone sensitivity of birch (*Betula pendula*), I. Responses at the leaf level. *Trees* **12**, 1-10.

- Mauzerall DL, Wang XP** (2001) Protecting agricultural crops from the effects of tropospheric ozone exposure: Reconciling science and standard setting in the United States, Europe and Asia. *Annual Review of Energy and the Environment* **26**, 237-268.
- May MJ, Leaver C** (1993) Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiology* **103**, 621-627.
- Mehler AH** (1951) Studies on the reactions of illuminated chloroplasts. II. Stimulation on inhibition of the reaction with molecular oxygen. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **34**, 339-351.
- Mehlhorn H, Cottam DA, Lucas PW, Wellburn AR** (1987) Induction of ascorbate peroxidase and glutathione reductase activities by interaction of mixtures of air pollutants. *Free Radical Research Communications* **3**, 193-197.
- Mehlhorn H, Seufert G, Schmidt A, Kunert KJ** (1986) Effect of SO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> on production of antioxidants in conifers. *Plant Physiology* **82**, 336-338.
- Mehlhorn H, Tabner BJ, Wellburn AR** (1990) Electron spin resonance evidence for the formation of free radicals in plants exposed to ozone. *Physiologia Plantarum* **79**, 377-383.
- Meister A** (1973) On the enzymology of amino acid transport. *Science* **180**, 33-39.
- Meyer U, Köllner B, Willenbrink J, Krause G** (1997) Physiological changes on agricultural crops induced by different ambient ozone exposure regimes. I. Effects on photosynthesis and assimilate allocation in spring wheat. *New Phytologist* **136**, 645-652.
- Miller JE, Heagle AS, Pursley WA** (1998) Influence of ozone stress on soybean response to carbon dioxide enrichment. II. Biomass and development. *Crop Science* **38**, 122-128.
- Millán M, Mantilla E, Salvador R, Carratalá A, Sanz MJ** (2000) Ozone cycles in the Western Mediterranean basin: interpretation of monitoring data in complex coastal terrain. *Journal of Applied Meteorology* **39**, 487-508.
- Morgan PB, Ainsworth EA, Long SP** (2003) How does elevated ozone impact soybean? A meta-analysis of photosynthesis, growth and yield. *Plant, Cell and Environment* **26**, 1317-1328.
- Mudd JB** (1982) Effects of Oxidants on Metabolic Functions. En: Unsworth MH, Ormrod DP (eds). *Effects of Gaseous Pollutants in Agriculture and Horticulture*. London: Butterworths, 197-205.
- Mudd JB** (1996) Biochemical Basis for the Toxicity of Ozone. En: Yunus M, Iqbal M (eds). *Plant Response to Air Pollution*. Chichester: John Wiley, 267-283.
- Murillo I, Henderson LM** (2005) Expression of gp91<sup>phox</sup>/Nox2 in COS-7 cells: cellular localization of the protein and the detection of outward proton currents. *Biochemical Journal* **385**, 649-657.
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 249-279.



- Oksanen E, Häikiö E, Sober J, Karnosky DF** (2003) Ozone-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in field-grown aspen and birch is linked to foliar ultrastructure and peroxisomal activity. *New Phytologist* **161**, 791-799.
- Papadoupalou-Mourkidou E** (1991) Postharvest-applied agrochemicals and their residues in fresh fruits and vegetables. *Journal Association of Official Analytical Chemists* **74**, 745-765.
- Pasqualini S, Batini P, Ederli L, Porceddu A, Piccioni C, De Marchis F, Antonielli M** (2001) Effects of short-term ozone fumigation on tobacco plants: response of the scavenging system and expression of the glutathione reductase. *Plant, Cell and Environment* **24**, 245-252.
- Pasqualini V, Robles C, Garzino S, Greff S, Bousquet-Melou A, Bonin G** (2003) Phenolic compounds content in *Pinus halepensis* Mill. needles: a bioindicator of air pollution. *Chemosphere* **52**, 239-248.
- Pastor-Bárceñas O, Soria-Olivas E, Martín-Guerrero JD, Camps-Valls G, Carrasco-Rodríguez JL, Del Valle-Tascón S** (2005) Unbiased sensitivity analysis and pruning techniques in neural networks for surface ozone modelling. *Ecological Modelling* **182**, 149-158.
- Pell EJ, Eckhardt N, Eniyedi AJ** (1992) Timing of ozone stress and resulting status of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase and associated net photosynthesis. *New Phytologist* **120**, 397-408.
- Pell ES, Schlaghauser CD, Arteca RN** (1997) Ozone-induced oxidative stress: mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum* **100**, 264-273.
- Pellinen R, Palva T, Kangasjärvi J** (1999) Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *The Plant Journal* **20**, 349-356.
- Pirker KF, Goodman BA, Pascual EC, Kiefer S, Soja G, Reichenauer TG** (2002) Free radicals in fruits of three strawberry cultivars exposed to drought stress in the field. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 709-717.
- Pirker KF, Reichenauer TG, Pascual EC, Kiefer S, Soja G, Goodman BA** (2003) Steady state levels of free radicals in tomato fruit exposed to drought and ozone stress in a field experiment. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**, 921-927.
- Plazek A, Rapacz M, Skoczowski A** (2000) Effects of ozone fumigation on photosynthesis and membrane permeability in leaves of spring barley, meadow fescue and winter rape. *Photosynthetica* **38**, 409-413.
- Porcuna JL** (1997) *El ambiente y la predisposición de las plantas de tomate a la infección de dos virosis en el Levante Español*. Tesis Doctoral. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.

- Prather M, Ehhalt D, Dentener F, Bernsten, Smith SJ** (2001) Atmospheric chemistry and greenhouse gases. En: Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguera M, Van der Linden PJ, Dai X, Maskell K, Johnson CA (eds). *Climate Change 2001: the Scientific Basis Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 239-287.
- Puckette MC, Weng H, Mahalingam R** (2007) Physiological and biochemical responses to acute ozone-induced oxidative stress in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**, 70-79.
- Pääkkönen E, Metsärinne S, Holopainen T, Kärenlampi L** (1995) The ozone sensitivity of birch (*Betula pendula*) in relation to the developmental stage of leaves. *New Phytologist* **132**, 145-154.
- Ranieri A, D'Urso G, Nali C., Lorenzini G, Soldatini GF** (1996a) Ozone stimulates apoplastic antioxidant systems in pumpkin leaves. *Physiologia Plantarum* **97**, 381-387.
- Ranieri A, Nali C, Amoroso S, Lorenzini G, Soldatini GF.** (1996b) Are peroxidase systems related to different ozone resistance of poplar clones. En: Obinger C, Burner U, Ebermann R, Penel C, Greppin H (eds). *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. University of Geneva, 352-357.
- Rao MV, Koch JR, Davis KR** (2000) Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. *Plant Molecular Biology* **44**, 345-358.
- Rao MV, Davis KR** (1999) Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *The Plant Journal* **17**, 603-614.
- Rao MV, Hale BA, Ormrod DP** (1995) Amelioration of ozone-induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide. Role of antioxidant enzymes. *Plant Physiology* **109**, 421-432.
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP** (1996) Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **110**, 125-136.
- Real Decreto 1796/2003**, de 26 de diciembre de 2003, relativo al ozono en el aire ambiente. BOE nº 11, de 13 de enero de 2004, 1071-1081.
- Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW** (1980) High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Analytical Biochemistry* **106**, 55-62.
- Reichenauer TG, Bolhar-Nordenkamp HR, Erhilich U, Soja G, Postl WF, Halbwachs F** (1997) The influence of ambient and elevated ozone concentrations on photosynthesis in *Populus nigra*. *Plant, Cell and Environment* **20**, 1061-1069.
- Reichenauer TG, Goodman BA** (2001) Stable free radicals in ozone-damaged wheat leaves. *Free Radical Research* **35**, 93-101.

- Reig-Armiñana J, Calatayud V, Cerveró J, García-Breijo FJ, Ibars A, Sanz MJ** (2004) Effects of ozone on the foliar histology of the mastic plant (*Pistacia Lentiscus* L.). *Environmental Pollution* **132**, 321-331.
- Reiling K, Davison AW** (1994) Effects of exposure to ozone at different stages in the development of *Plantago major* L. on chlorophyll fluorescence and gas exchange. *New Phytologist* **128**, 509-514.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G** (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* **2**, 152-159.
- Rinnan N, Holopainen T** (2004) Ozone effects on the ultrastructure of peatland plants: sphagnum mosses, *Vaccinium oxycoccus*, *Andromeda polifolia* and *Eriophorum vaginatum*. *Annals of Botany* **94**, 623-634.
- Rossetti S, Medeghini-Bonatti P** (2001) In situ histochemical monitoring of ozone- and TMV-induced reactive oxygen species in tobacco leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**, 433-442.
- Runeckles VC** (1992) Uptake of ozone by vegetation. En: Lefohn AS (ed). *Surface level ozone exposures and their effect on vegetation*. Chelsea: Lewis Publishers, 157-188.
- Runeckles VC, Chevone BI.** (1992) Crop Responses to Ozone. En: Lefohn AS (ed). *Surface Level Ozone Exposures and their Effects on Vegetation*. Chelsea: Lewis Publishers, 189-270.
- Runeckles VC, Vaartnou M** (1997) EPR evidence for superoxide anion formation in leaves during exposure to low levels of ozone. *Plant, Cell and Environment* **20**, 306-314.
- Ruzin SE.** (1999) *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford: University Press.
- Sagi M, Fluhr R** (2006) Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology* **141**, 336-340.
- Salt DE, Rauser WE** (1995) MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiology* **107**.
- Sanz MJ, Martín C, Calvo E, Cámara PV, Jiménez A, Porcuna JL** (2001) Daños visibles por ozono en distintos cultivos mediterráneos I. *Phytoma España* **131**, 14-26.
- Scalet M, Federico R, Guido MC, Manes F** (1995) Peroxidase activity and polyamine changes in response to ozone and simulated acid rain in Aleppo pine needles. *Environmental and Experimental Botany* **35**, 417-425.
- Scebba F, Pucciarelli I, Soldatini GF, Ranieri A** (2003) O<sub>3</sub>-induced changes in the antioxidant systems and their relationship to different degrees of susceptibility of two clover species. *Plant Science* **165**, 583-593.
- Schafer FQ, Buettner GR** (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine* **30**, 1191-1212.

- Schmidt A, Kunert KJ** (1986) Lipid peroxidation in higher plants: the role of glutathione reductase. *Plant Physiology* **82**, 700-702.
- Schneider S, Bergmann L** (1995) Regulation of glutathione synthesis in suspension cultures of parsley and tobacco. *Botanica Acta* **108**, 34-40.
- Schraudner M, Langebartels C, Sandermann HJr** (1997) Changes in the biochemical status of plant cells induced by the environmental pollutant ozone. *Physiologia Plantarum* **100**, 274-280.
- Schubert KR** (1986) Products of biological nitrogen fixation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* **37**, 539-74.
- Seinfeld JH** (1989) Urban air pollutants. State of the science. *Science* **243**, 745-752.
- Sen Gupta A, Alscher R, McCune D** (1991) Response of photosynthesis and cellular antioxidants to ozone in *Populus* leaves. *Plant Physiology* **96**, 650-655.
- Shen B, Jensen RG, Bohnert HJ** (1997) Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiology* **115**, 527-532.
- Shumejko P, Ossipov V, Neuvonen S** (1996) The effect of simulated acid rain on the biochemical composition of Scots pine needles (*Pinus sylvestris* L.) needles. *Environmental Pollution* **92**, 315-321.
- Sillman S** (1999) The relation between ozone, NO<sub>x</sub> and hydrocarbons in urban and polluted rural environments. *Atmospheric Environment* **33**, 1821-1845.
- Smirnoff N, Cumbes QJ** (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**, 1057-1060.
- Soja G, Soja AM** (1995) Ozone effects on dry matter partitioning and chlorophyll fluorescence during plant development of wheat. *Water, Air and Soil Pollution* **85**, 1461-1466.
- Stegmann HB, Schuler P, Ruff HJ** (1989) Investigation of damage in forest by EPR spectroscopy in vivo. *Photochemistry and Photobiology* **50**, 209-211.
- Stokes NJ, Terry GM, Hewitt CN** (1998) The impact of ozone, isoprene and propene on antioxidant levels in two leaf classes of velvet bean (*Mucuna pruriens* L.). *Journal of Experimental Botany* **49**, 115-123.
- Stone BA, Clarke AE.** (1992) *Chemistry and biology of (1,3)-β-D-glucans*. Victoria, Australia: La Trobe University Press.
- Strohm M, Jouanin L, Kunert KJ, Pruvost C, Polle A, Foyer CH, Rennenberg H** (1995) Regulation of glutathione synthesis in leaves of transgenic poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing glutathione synthetase. *The Plant Journal* **7**, 141-145.
- Styring S, Jegersschöld G** (1994) Light-Induced Reactions Impairing Electron Transfer through Photosystem II. En: Baker NR, Bowyer JR (eds). *Photoinhibition of Photosynthesis: from Molecular Mechanisms to the Field*. Oxford: Bios Scientific, 51-74.

- Takahara K, Yoshino A, Akashi K, Yokota A** (2006) Regulation of metabolic pathways for the massive accumulation of citrulline during drought/strong light stress in wild watermelon. *Interdrought-II, Rome*. Oxford: Oxford University Press.
- Tanaka K, Saji H, Kondo N** (1988) Immunological properties of spinach glutathione reductase and inductive biosynthesis of the enzyme with ozone. *Plant and Cell Physiology* **29**, 637-642.
- Tietze F** (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry* **27**, 502-522.
- Tingey DT, Reinert RA, Carter HB** (1972) Soybean cultivars: acute foliar response to ozone. *Crop Science* **12**, 268-270.
- Torres MA, Dangl JL, Jones JDG** (2002) Arabidopsis gp91 (phox) homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**, 517-522.
- Trebst A, Depka B, Holländer-Czytko H** (2002) A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quencher in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters* **516**, 156-160.
- Tuominen H, Overmyer K, Keinänen M, Kollist H, Kangasjärvi J** (2004) Mutual antagonism of ethylene and jasmonic acid regulates ozone-induced spreading cell death in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **39**, 59-69.
- UNECE** (2000) *Review of strategies and policies for air pollution abatement*. UNECE Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution (<http://www.unece.org/env/lrtap/conv/conclusi.htm>).
- Ursini F, Maiorino M, Brigelius R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohe L** (1995) Diversity of glutathione peroxidases. *Methods in Enzymology* **252**, 38-53.
- US Environmental Protection Agency** (1986) *Air quality criteria for ozone and related photochemical oxidants*. Office of Research and Development, Washington DC. EPA 600-P93-004bF.
- US Environmental Protection Agency** (1996) *Air quality criteria for ozone and other photochemical oxidants, Vol. III*. Office of Air Quality Planning and Standards Research, Triangle Park, NC. EPA 600-P-93-004bF.
- US Environmental Protection Agency** (1998) *National air quality and emissions trends report*. Office of Air Quality Planning and Standards Research, Triangle Park, NC. EPA 45-4R-28-005.
- Vahala J, Keinänen M, Schützendübel A, Polle A, Kangasjärvi J** (2003) Differential effects of elevated ozone on two hybrid aspen genotypes predisposed to chronic ozone fumigation. Role of ethylene and salicylic acid. *Plant Physiology* **132**, 196-205.

- Valavanidis A, Zymi M, Stathopoulou D, Georgiou P, Ganotidis M** (2004) Monitoring of ozone pollution and the physiological activity of *Pinus halepensis* (Mill.) by electron paramagnetic resonance and other parameters. *Trees* **18**, 630-638.
- Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D** (1998) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO: redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Science* **3**, 330-334.
- Velissariou D** (1999) Toxic effects and losses of commercial value of lettuce and other vegetables due to photochemical air pollution in agricultural areas of Attica, Greece. En: Fuhrer J, Achermann B (eds). *Critical Levels for Ozone - Level II. Environmental documentation No. 115*. Bern: Swiss Agency for Environment, Forest and Landscape, 253-256.
- Viña J, Sastre J, Asensi M, Packer L** (1995) Assay of blood glutathione oxidation during physical exercise. *Methods in Enzymology* **251**, 237-243.
- Vingarzan R** (2004) A review of surface O<sub>3</sub> background levels and trends. *Atmospheric Environment* **38**, 3431-3442.
- Vollenweider P, Ottiger M, Günthardt-Goerg MS** (2003) Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. *Environmental Pollution* **124**, 101-118.
- Vorne V, Ojanperä K, De Temmerman L, Bindi M, Högy P, Jones MB, Lawson T, Persson K** (2002) Effects of elevated carbon dioxide and ozone on potato tuber quality in the European multiple-site experiment 'CHIP-project'. *European Journal of Agronomy* **17**, 369-381.
- Walker EH** (1967) Evaluation of foliar sprays from control of weather fleck on flue-cured tobacco. *Canadian Journal of Plant Science* **47**, 99-108.
- Wang Z, Dilley DR** (2000) Initial low oxygen stress controls superficial scald of apples. *Postharvest Biology and Technology* **18**, 201-213.
- Wellburn FAM, Creissen GP, Lalke JA, Mullineaux PM, Wellburn AR** (1998) Tolerance to atmospheric ozone in transgenic tobacco over-expressing glutathione synthetase in plastids. *Physiologia Plantarum* **104**, 623-629.
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W** (1997) Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C<sub>3</sub> plants. *EMBO Journal* **16**, 4806-4816.
- Wohlgemuth H, Mittlstrass K, Kschieschan S, Bender J, Weigel HS, Oermeyer W, Kangasjärvi J, Sandermann H, Langebartels C** (2002) Action of an oxidative burst as a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant, Cell and Environment* **25**, 717-726.
- World Health Organization Regional Office for Europe** (2000) *Air Quality Guidelines for Europe, Second Edition*. Copenhagen: WHO Regional Publications, European Series, No. 91.
- Wun YX, Von Tiedermann A** (2002) Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to ozone. *Environmental Pollution* **116**, 37-47.

**Xiang C, Oliver DJ** (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **10**, 1539-1550.