



TESIS DOCTORAL

**RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y MOLECULARES DE *DITTRICHIA VISCOSA*
Y *SOLANUM LYCOPERSICUM* A LA TOXICIDAD POR ANTIMONIO**

FRANCISCO LUIS ESPINOSA VELLARINO

**PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR,
BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA**

Conformidad de los directores:

Inmaculada Garrido Carballo

Alfonso Ortega Garrido

Esta tesis cuenta con la autorización del director/a y codirector/a de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

2024

Agradecimientos

Al finalizar esta Tesis Doctoral, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas e instituciones que han hecho posible la culminación de este arduo pero gratificante trabajo.

En primer lugar, agradezco a mi directora de Tesis, la Dra. Inmaculada Garrido Carballo por su apoyo, guía y paciencia a lo largo de estos años. También agradezco a mi co-director, el Dr. Alfonso Ortega Garrido, por su valiosa contribución, conocimientos y constante asesoramiento durante este trabajo. No puedo obviar al Dr. Francisco Espinosa Borreguero, mi padre, por su infinita ayuda y paciencia durante esta Tesis y durante toda mi vida.

Quiero extender mi gratitud al grupo de investigación Fisiología y Biología Celular y Molecular de Plantas, por proporcionarme los recursos y el ambiente académico necesario para el desarrollo de esta Tesis. Especialmente a Carmen Gloria Relinque Román, Ilda de Jesús Casimiro Felicio, y José Luis Llerena Ruiz. También quiero agradecer el apoyo y buenos consejos de José Martín Gallardo, José Cabezas Fernández y Vicente Vicente Rivera, investigadores del Área de Ecología. Por supuesto, también quiero expresar mi gratitud hacia Caty Pulido Muñoz, con quien he compartido muy buenos momentos y ha hecho más llevadero este camino.

Un agradecimiento especial a todos los compañeros, con los que he compartido tantos ratos a lo largo de estos años. Especialmente quiero agradecer a José Antonio De Mera Rodríguez, Nuria Del Valle Del Pino, y Javier García Fernández su amistad y constante apoyo.

Agradezco también a la Universidad de Extremadura, y al Servicio Público de Empleo Estatal la oportunidad brindada por la concesión del *Programa Investigo*, el cual financió parte de mi investigación.

A mi familia, por su cariño, paciencia y comprensión durante todos estos años. Especialmente a mis padres, Francisco y María Luz, a mi abuela África y a mi tía Remedios por su apoyo incondicional, constante aliento, e infinita paciencia.

Finalmente, a todos mis amigos, que han estado desde el principio apoyándome en este proyecto, tanto en los buenos como en los malos ratos. Su presencia en mi vida ha sido un pilar fundamental para llegar a este logro.

A todos, mi más sincero agradecimiento.

Francisco Luis Espinosa Vellarino

A mis padres.

ÍNDICE

Resumen/Abstract	1
1. Introducción	7
1.1. Antimonio, aspectos generales	9
1.1.1. Características químicas y origen del Sb	9
1.1.2. Efectos adversos del Sb en el medio ambiente	13
1.1.3. Absorción de Sb en plantas	18
1.1.4. Hiperacumulación de Sb en plantas	23
1.2. Implicación de ROS, RNS y RSS en la defensa frente al estrés en plantas	24
1.2.1. Especies reactivas del oxígeno (ROS)	25
1.2.2.1. Generalidades, tipos y biosíntesis	25
1.2.2.2. Sistema antioxidante	30
1.2.2. Especies reactivas del nitrógeno (RNS)	42
1.2.2.1. Generalidades y tipos	42
1.2.2.2. Biosíntesis y movilización de •NO	47
1.2.3. Especies reactivas del azufre (RSS)	51
1.2.3.1. Generalidades y tipos	51
1.2.3.2. Biosíntesis de H ₂ S	53
1.2.4. Interacción entre ROS, RNS y RSS en el estrés por metales y metaloides	58
1.3. Plantas de estudio	66
2. Objetivos	71
3. Material y Métodos	75

4. Resultados y Discusión	93
4.1. Respuesta fisiológica de <i>Solanum lycopersicum</i> a la toxicidad de Sb	95
4.1.1. Resultados	97
4.1.2. Discusión	112
4.2. Respuesta molecular de <i>Solanum lycopersicum</i> a la toxicidad de Sb	121
4.2.1. Resultados	123
4.2.2. Discusión	132
4.3. Evaluación de <i>Dittrichia viscosa</i> como planta bioacumuladora de Sb	141
4.3.1. Resultados	143
4.3.2. Discusión	160
5. Conclusiones	171
6. Bibliografía	175
7. Abreviaturas	227
8. Anexo	233

Resumen/Abstract

En plantas de *Solanum lycopersicum* cultivadas hidropónicamente y sometidas a toxicidad por Sb (0,5 y 1,0 mM) se observa una reducción del crecimiento y de la producción de biomasa, una disminución del contenido hídrico de las hojas mientras que el de prolina aumenta. El Sb absorbido se acumula mayoritariamente en las raíces. La toxicidad por Sb altera la absorción de otros elementos minerales, así se observa un descenso en el contenido de Fe, Mg y Mn, mientras que el Cu y Zn aumentan. El contenido en clorofila a y b y la eficiencia fotosintética disminuyen, por el contrario, el contenido en carotenoides aumenta, indicando una posible actuación como antioxidantes y protectores frente al Sb. Los compuestos fenólicos no se alteran, no pareciendo estar implicados en la respuesta de defensa frente al estrés por Sb. Se produce un aumento en la producción de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet NO$ y $ONOO^-$, pero no de RSNOs. La toxicidad de Sb induce cambios en las actividades antioxidantes enzimáticas, así, SOD, POX, APX y GR muestran una clara activación en raíces, en hojas solo la SOD, APX y GSNOR aumentan. La actividad DHAR es inhibida en raíces y no sufre cambios en las hojas, al igual que las actividades POX y GR. Respecto a los sistemas antioxidantes no enzimáticos, el AsA se incrementa mientras que GSH disminuye en raíces. El contenido total AsA+DHA aumenta en raíces; por el contrario, el contenido total de GSH+GSSG disminuye, en hojas no se encuentra alteración de ninguno. Además, se observa que el patrón de crecimiento de las células a nivel de la zona de elongación se modifica, con células más pequeñas y desorganizadas. Todos estos efectos parecen estar relacionados con la capacidad del Sb para formar complejos con los grupos tiol, entre ellos el GSH, alterando con ello tanto los niveles de auxinas en las raíces y el centro quiescente, como la homeostasis redox. A nivel molecular, los resultados muestran que las enzimas involucradas en el ciclo AsA-GSH presentan cambios en su nivel de expresión bajo el estrés causado por Sb tanto en respuesta al nivel de toxicidad como al tiempo de exposición a la misma. La respuesta es fuertemente dependiente del órgano, así mientras con 0,5 mM Sb se produce un aumento en la expresión de SOD, APX y GR_{cyt} , en hojas disminuyen, aumentando sólo la expresión de DHAR. En raíces sometidas a toxicidad por 1,0 mM Sb la respuesta es diferente, aumenta la expresión de SOD y DHAR, sin alteración en la expresión del resto de genes de enzimas antioxidantes; por el contrario, en hojas se produce un descenso en la expresión de SOD y GST. Estos resultados evidencian una respuesta dependiente del grado de toxicidad, tiempo de exposición y órgano.

El Sb induce en plantas de *Dittrichia viscosa* un descenso en el crecimiento y producción de biomasa, con una gran acumulación de este metaloide en sus raíces. El Sb altera la absorción de otros elementos minerales, así Fe y Cu disminuyen, mientras que Mn sólo lo hace en raíces, pero no en hojas. El contenido de clorofilas disminuye mientras que el de carotenoides aumenta, la eficiencia fotosintética se ve poco afectada, solo una leve disminución con 1,0 mM Sb. La producción de $O_2^{\bullet-}$ aumenta ligeramente, mientras que la peroxidación lipídica sólo lo hace en raíces, donde se acumula la mayor cantidad de Sb. H_2O_2 , $\bullet NO$, $ONOO^-$, RSNOs y H_2S aumentan de forma significativa alterando el sistema antioxidante enzimático. En las raíces, las actividades SOD y MDHAR disminuyen, mientras que DHAR, GST, GSNOR y L-DES aumentan y APX, POX y GR no se ven afectadas. En hojas, las actividades SOD, POX, GR, GSNOR y L-DES aumentan, MDHAR y GST disminuyen y APX no se altera. Los componentes del ciclo AsA-GSH disminuyen. La gran capacidad de las raíces de *Dittrichia* para acumular Sb podría ser la razón del diferente comportamiento observado en los sistemas enzimáticos antioxidantes de los dos órganos. El Sb parece actuar uniéndose a grupos tiol, lo que puede alterar el contenido de GSH libre y las actividades de SOD, GSNOR y GST. La actividad de CA-POX aumenta, posiblemente para lignificar las paredes celulares de las raíces, sirviendo como barrera física de retención del metaloide. Sb altera el equilibrio de ROS, especialmente con respecto al H_2O_2 . Estas alteraciones producen un aumento de $\bullet NO$ y H_2S , que junto al H_2O_2 actúan sobre el sistema antioxidante para limitar el desequilibrio redox inducido por Sb. La interacción $\bullet NO$, H_2S y H_2O_2 parece clave en la respuesta al estrés inducido por Sb. La interacción entre ROS, $\bullet NO$ y H_2S parece estar involucrada en la respuesta a Sb. *Dittrichia viscosa* a pesar de acumular una mayor cantidad de Sb en sus raíces que *Solanum lycopersicum*, muestra menos alteraciones fisiológicas y parece presentar buenas características para su potencial uso como planta acumuladora de Sb.

Hydroponically-grown *Solanum lycopersicum* plants subjected to Sb toxicity (0.5 and 1.0 mM), a reduction in growth and biomass production is observed, along with a decrease in leaf water content while proline content increases. The absorbed Sb mainly accumulates in the roots. Sb toxicity alters the absorption of other mineral elements, resulting in a decrease in Fe, Mg, and Mn content, while Cu and Zn increase. The chlorophyll a and b content and photosynthetic efficiency decrease; conversely, carotenoid content increases, indicating a possible role as antioxidants and protectors against Sb. Phenolic compounds remain unchanged, appearing not to be involved in the defense response against Sb stress. There is an increase in the production of $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot NO$, and $ONOO^-$, but not in RSNOs. Sb toxicity induces changes in enzymatic antioxidant activities. SOD, POX, APX, and GR activities show clear activation in roots, while in leaves only SOD, APX, and GSNOR increase. DHAR activity is inhibited in roots and remains unchanged in leaves, similar to POX and GR activities. Regarding non-enzymatic antioxidant systems, AsA increases while GSH decreases in roots. The total AsA+DHA content increases in roots; conversely, the total GSH+GSSG content decreases, with no alteration in leaves. Additionally, cell growth patterns in the elongation zone are modified, with smaller and disorganized cells. All these effects seem to be related to Sb's ability to form complexes with thiol groups, including GSH, thereby altering both auxin levels in roots and the quiescent center as well as redox homeostasis. At the molecular level, the results show that enzymes involved in the AsA-GSH cycle exhibit changes in their expression levels under Sb-induced stress, depending on the toxicity level and exposure time. The response is strongly organ-dependent, as 0.5 mM Sb increases the expression of SOD, APX, and GR_{cyt} in roots, while in leaves, their expression decreases with an increase only in DHAR expression. In roots exposed to 1.0 mM Sb, the response differs, with increased expression of SOD and DHAR and no alteration in the expression of other antioxidant enzyme genes; conversely, in leaves, there is a decrease in the expression of SOD and GST. These results indicate a response dependent on the degree of toxicity, exposure time, and organ.

Sb induces a decrease in growth and biomass production in *Dittrichia viscosa* plants, with significant accumulation of this metalloid in their roots. Sb alters the absorption of other mineral elements, with Fe and Cu decreasing, while Mn decreases only in roots but not in leaves. Chlorophyll content decreases while carotenoid content increases, and photosynthetic efficiency is slightly affected, showing only a slight decrease with 1.0 mM

Sb. $O_2^{\bullet-}$ production increases slightly, while lipid peroxidation occurs only in roots, where most Sb accumulates. H_2O_2 , $\bullet NO$, $ONOO^-$, RSNOs, and H_2S significantly increase, altering the enzymatic antioxidant system. In roots, SOD and MDHAR activities decrease, while DHAR, GST, GSNOR, and L-DES increase, and APX, POX, and GR remain unaffected. In leaves, SOD, POX, GR, GSNOR, and L-DES activities increase, MDHAR and GST decrease, and APX remains unchanged. Components of the AsA-GSH cycle decrease. The high capacity of *Dittrichia* roots to accumulate Sb could explain the different behavior observed in the enzymatic antioxidant systems of the two organs. Sb seems to act by binding to thiol groups, which may alter free GSH content and the activities of SOD, GSNOR, and GST. CA-POX activity increases, possibly to lignify root cell walls, serving as a physical barrier for metalloid retention. Sb alters ROS balance, especially regarding H_2O_2 . These alterations lead to an increase in $\bullet NO$ and H_2S , which, along with H_2O_2 , act on the antioxidant system to limit Sb-induced redox imbalance. The interaction between $\bullet NO$, H_2S , and H_2O_2 appears to be key in the response to Sb-induced stress. Despite accumulating a greater amount of Sb in its roots than *Solanum lycopersicum*, *Dittrichia viscosa* shows fewer physiological alterations and seems to have good potential as an Sb accumulator plant.

1. Introducción

1.1. Antimonio, aspectos generales

1.1.1. Características químicas y origen del Sb

El antimonio (Sb) forma parte de un grupo de elementos denominados metaloides o semimetales que muestra un comportamiento geoquímico y características similares al Arsénico (As), al pertenecer al mismo subgrupo de la tabla periódica (Feng et al., 2009). El Sb pertenece al grupo 15 de la tabla periódica, con configuración electrónica de estado fundamental $[Kr]4d^{10} 5s^2 5p^3$. Posee dos isótopos estables; el Sb^{121} (57,21% de abundancia) y el Sb^{123} (42,7% de abundancia). El Sb puede presentar varios estados de oxidación (+5, +3, 0, -3, y -5), pero generalmente se encuentra en estado +3 y +5. (Herath et al., 2017) con un número atómico de 51, un peso atómico de 122 y una densidad de 6697 kg/m^3 a $26 \text{ }^\circ\text{C}$ (Anderson, 2012).

El Sb tiene una abundancia promedio estimada de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ en la corteza terrestre (Smith & Huyck, 1999) y concentraciones $< 0,3$ a $8,4 \text{ mg kg}^{-1}$ en los suelos (Crommentuijn et al., 2000). En plantas vasculares terrestres, los niveles de Sb oscilan entre $0,2$ y $50 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ (Baroni et al., 2000). El Sb se encuentra en el medio ambiente de forma natural, y antropogénica (Figura 1):

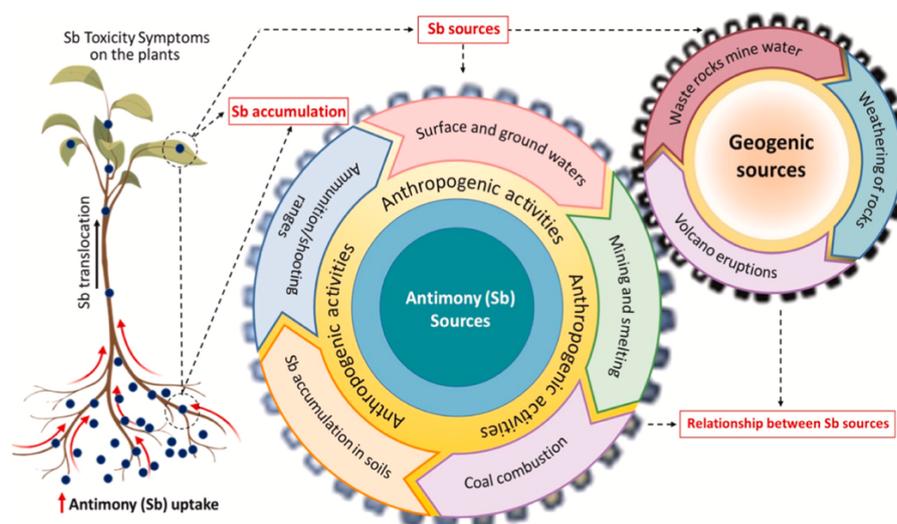


Figura 1: Fuentes de entrada de Sb en el suelo. El Sb entra en el suelo a través de fuentes geogénicas y actividades antropogénicas y, como resultado, provoca toxicidad por Sb en las plantas y, posteriormente, en los seres humanos al ingerir alimentos contaminados con Sb (Tang et al., 2023).

- Natural: Forma parte de rocas y minerales, como es el caso de la estibina (Sb_2S_3) y la jamesonita ($\text{Pb}_4\text{FeSb}_6\text{S}_{14}$) (Anderson, 2012). También puede encontrarse como una impureza en otros minerales derivados de metales preciosos, de los cuales se libera a través de una lixiviación de sulfuro alcalino (Celep et al., 2011).

El Sb también está presente en otros compartimentos del medio ambiente, debido a la meteorización de las rocas y minerales que lo contienen (He et al., 2019). Estos procesos son naturales y provocan que el Sb pase a formar parte de otras rocas, agua, y suelos en niveles de 0,15 a 2 mg/kg, < 1 mg/mL y 0,3 a 8,6 mg/kg, respectivamente (Pierart et al., 2015). Estas concentraciones se consideran bajas y no constituyen un problema grave de salud pública, ni para el entorno natural.

La meteorización de la roca madre es la principal fuente natural de Sb en el suelo. No obstante, existen otras fuentes naturales de Sb, como son las erupciones volcánicas, los aerosoles marinos y los incendios forestales (Figura 1) (Sundar & Chakravarty, 2010).

- Antropogénico: Existen diversas actividades humanas que provocan directa o indirectamente el incremento de la contaminación por Sb en el medio ambiente (Figura 1). El Sb es un elemento muy demandado por diversos sectores, lo que provoca que sea necesaria su extracción en minas, y su posterior tratamiento. Cada vez hay más pruebas de que las actividades humanas influyen mucho en la geoquímica ambiental del Sb (Shotyk et al., 2005). Su presencia y efectos contaminantes han ido aumentando considerablemente debido al crecimiento de la minería y de los procesos industriales que lo utilizan (García-Lorenzo et al., 2015; Li et al., 2017; Okkenhaug et al., 2011; Wen et al., 2018).

En 2020, la producción mundial de Sb se situó en 153000 t y el 14% de esta producción fue utilizada por el Servicio Geológico de Estados Unidos (2021). Cada día se libera al medio ambiente una gran cantidad de Sb debido a su uso sustancial en diversos productos (Hu et al., 2021) que está suponiendo una grave amenaza para el medio ambiente (He et al., 2019).

Las principales fuentes de contaminación antropogénica por Sb son las explotaciones mineras de este metaloide con residuos mal gestionados (Intrakamhaeng et al., 2020). Estos residuos se acaban dispersando por el entorno, contaminándolo con éste y otros elementos. Un residuo bastante común en este tipo de yacimientos es la estibina, la cual, debido a sus características lixivia fácilmente Sb (Wilson et al., 2004) habiéndose encontrado que la disolución de este mineral produce hasta 55 mg L^{-1} de Sb (Ashley et al., 2003). La concentración de Sb en suelos afectados por actividades mineras presenta valores medios que oscilan en el rango $225\text{-}2243 \text{ mg kg}^{-1}$, habiéndose llegado a encontrar concentraciones de Sb superiores a 15100 mg kg^{-1} (Baroni et al., 2000; Murciego et al., 2007).

La industria más importante en cuanto a la generación de residuos que contienen Sb es la metalurgia, concretamente la fundición. En esta industria se generan gran cantidad de residuos contaminantes, que acaban afectando a su entorno (Ainsworth et al., 1990b; Baroni et al., 2000; Filella et al., 2002; Ragaini et al., 1977; Wilson et al., 2010). El Sb suele estar presente junto con el As en minerales de sulfuro. La extracción y fundición de estos minerales puede causar contaminación conjunta de As y Sb (Filella et al., 2002). Otra industria que emplea Sb es la industria electrónica, para la fabricación de baterías de plomo-ácido (Berndt & Nijhawan, 1976), para la fabricación de circuitos impresos y diodos, presentes en automóviles, ordenadores, móviles, etc. (Sundar & Chakravarty, 2010). La industria farmacéutica para la producción de fármacos, y la industria química para la producción de pesticidas, abrasivos, lacas y pigmentos (Ahmad et al., 2014; Okkenhaug et al., 2016; Rajapaksha et al., 2015; Wang et al., 2011). La industria cerámica y del vidrio utiliza Sb para producir esmaltes cerámicos y decolorantes de vidrio. La industria plástica, para la producción de plásticos, como el tereftalato de polietileno (PET), así como materiales ignífugos (Chu et al., 2021; Dupont et al., 2016). La eliminación de fibras de residuos de PET liberó 1108 t de Sb en vertederos, mientras que los procesos químicos, de incineración y mecánicos liberaron 25, 284 y 794 t de Sb, respectivamente, en el medio ambiente (Chu et al., 2021). La industria textil, también hace uso del Sb para la fabricación de tejidos, suponiendo un peligro durante el proceso industrial para la salud de los trabajadores (Anderson, 2012; Shotyk et al., 2005; Sundar & Chakravarty, 2010).

Además, existe una preocupación emergente en la industria nuclear en todo el mundo debido a la presencia de isótopos radiactivos de Sb (Velmurugan et al., 2011). El Sb tiene tres isótopos radiactivos, dos nucleidos activados (^{122}Sb y ^{124}Sb) y un producto de fisión (^{125}Sb). La industria balística emplea aleaciones Pb-Sb en la fabricación de munición. La degradación de estas balas en los campos de tiro provoca la contaminación del suelo con Sb (Shtangeeva et al., 2011). Se ha documentado que se acumulan 12 t de Sb al año en el campo de tiro militar de Noruega (Mariussen et al., 2017). Por otra parte, el uso de aleaciones de Sb en diversos componentes de vehículos ha provocado un aumento significativo de las emisiones de Sb en el medio ambiente, medible de forma más evidente en zonas de mucho tráfico (Arditsoglou & Samara, 2005; Weckwerth, 2001). Los suelos próximos a las carreteras suelen presentar contaminación por Sb proveniente de las pastillas de freno, el utilizado en el vulcanizado de neumáticos y el procedente de los combustibles (Belzile et al., 2011; Filella et al., 2012, 2013a, 2013b). La quema de combustibles fósiles y la incineración de residuos son importantes fuentes antropogénicas de Sb (Pacyna & Pacyna, 2001; Qi et al., 2008). La incineración de residuos sólidos urbanos (RSU), de plásticos, o de los residuos industriales generados en la producción de otros metales, como el plomo y el cobre (Dupont et al., 2016).

Debido a las similitudes geológicas e industriales entre diferentes países, cabe esperar que la presencia de Sb esté más extendida de lo que se cree, ya que no se ha descrito hasta ahora. Por lo tanto, la determinación de la exposición real de la población global requiere de mayor atención (Okkenhaug et al., 2012; Telford et al., 2009).

1.1.2. Efectos adversos del Sb en el medio ambiente

La existencia de niveles elevados de Sb en suelos, sedimentos, aguas superficiales/subterráneas y sistemas biológicos ha recibido una considerable atención en todo el mundo debido a sus consecuencias adversas en la cadena alimentaria, el agua potable y el agua de riego, así como en la productividad de los cultivos agrícolas (Ahmad et al., 2014). Varios estudios publicados hacen referencia a las altas concentraciones de Sb en suelos y vegetación, así como en mamíferos herbívoros e insectívoros en sitios alrededor de las fundiciones de Sb (Ainsworth et al., 1990a, 1990b; De Gregori et al., 2003; Wilson et al., 2004).

La precipitación de Sb también induce su movilización en aguas subterráneas y superficiales, lo que disminuye la calidad del agua potable. Los cultivos acumulan una enorme cantidad de Sb que, puede entrar en la cadena alimentaria provocando diversos problemas de salud en los seres humanos (Mbadugha et al., 2020).

Se considera que el nivel de Sb disminuye conforme aumenta la distancia a la que se encuentran las zonas mineras y de procesamiento (Macgregor et al., 2015). La contaminación de las aguas subterráneas con Sb es el resultado de diversas actividades, como la meteorización de los materiales básicos, la lixiviación, la deposición húmeda, la minería, la aplicación de plaguicidas y los efluentes industriales (Etim, 2017).

En las aguas subterráneas, el Sb existe como Sb(III) y como Sb(V), las cuales pueden sufrir procesos de oxidación y reducción. La forma soluble del Sb se transfiere al agua, mientras que su forma menos soluble es absorbida por los fragmentos de arcilla (Etim, 2017). Además, el Sb también se lixivia de los vertederos y de los lodos de depuradora, transportándose después a las aguas subterráneas y superficiales y causando graves problemas de salud en los seres humanos (Campos et al., 2019; Intrakamhaeng et al., 2020). Otra posibilidad es que el Sb se lixivie en los sedimentos por acción microbiana, lo que también es una de las principales razones de la contaminación por Sb (Intrakamhaeng et al., 2020).

El Sb y los compuestos que derivan de él están catalogados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) y la

Unión Europea (UE) (UE, 1998; USEPA, 1979). Sin embargo, existe una diferencia significativa entre los valores de referencia establecidos de Sb para agua, sedimentos y suelos a nivel mundial (Nishad & Bhaskarapillai, 2021). Estas directrices se han elaborado teniendo en cuenta diferentes factores; socioculturales, biológicos, políticos, científicos y geográficos (Bagherifam et al., 2019). La concentración máxima de Sb en el agua potable establecida por la USEPA y la Organización Mundial de la Salud (OMS) es de 6 y 20 ppb, respectivamente (He et al., 2012; Nishad et al., 2017). Sin embargo, China había establecido límites más estrictos: 5 ppb (He et al., 2012). A pesar de ello, ha sido en los últimos años cuando realmente ha surgido una importante preocupación por las concentraciones de Sb, debido a que han experimentado un importante ascenso en el medio ambiente. Este aumento en la contaminación se debe principalmente a actividades antropogénicas y al uso extensivo de compuestos de Sb (Brun et al., 2008; Shoty et al., 2005).

Efectos en animales

El Sb provoca graves problemas en todos los animales, aunque la mayoría de estudios se centran en los problemas ocasionados en humanos. El Sb favorece la genotoxicidad y la citotoxicidad, además de estar involucrado en la aparición de diversos tipos de cáncer (Bolan et al., 2022). La exposición al Sb por vía oral, dérmica o por inhalación causa graves efectos en los seres humanos (Bagherifam et al., 2019). El Sb altera la actividad enzimática y causa alteraciones a nivel cardiovascular, hepático, renal y respiratorio (Wang et al., 2018). La inhalación de Sb puede provocar cáncer de pulmón, anomalías en el desarrollo, enfermedades genotóxicas, neurológicas y reproductivas (Figura 2) (Atsdr, 2019). Por otro lado, la contaminación por Sb suele ir acompañada de toxicidad por As, que provoca graves problemas de salud en los seres humanos (Nishad & Bhaskarapillai, 2021). La toxicidad del Sb en los seres humanos depende en gran medida de la dosis, duración, vía de entrada, sexo, edad, rasgos genéticos y exposiciones ocupacionales (Cooper & Harrison, 2009).

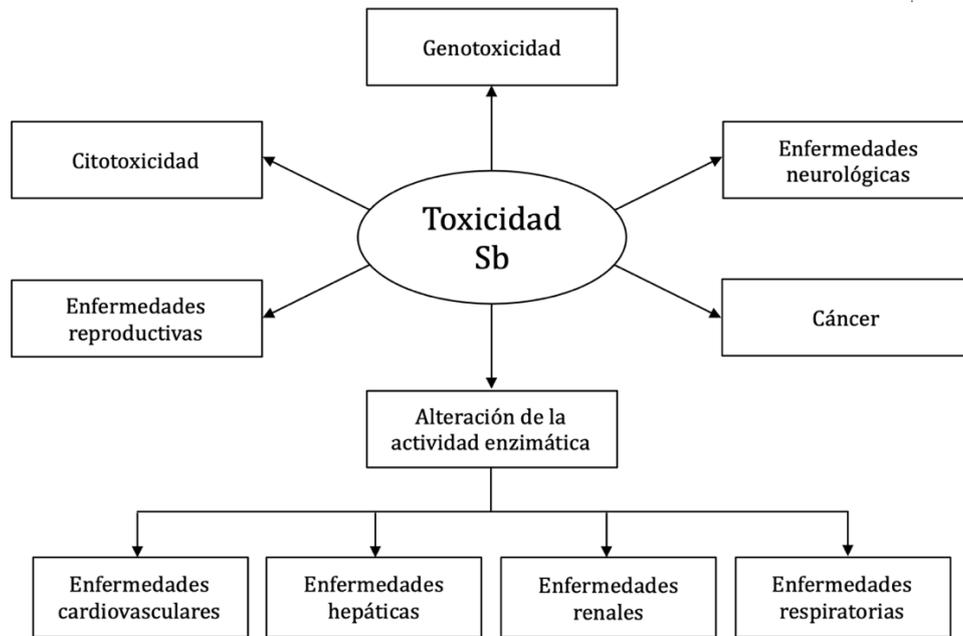


Figura 2: Efectos de la toxicidad por Sb en humanos.

Un grupo especialmente vulnerable es el constituido por los trabajadores de minas e industrias de Sb, que durante su jornada laboral están expuestos a este metaloide, lo cual conlleva un grave peligro para su salud (Belzile et al., 2011; Filella et al., 2012, 2013a, 2013b). En China se han datado 114 minas de Sb, localizadas en las zonas de Guangxi, Guizhou, Yunnan y Hunan, todas ellas gravemente afectadas por la contaminación por Sb en agua, suelo, y plantas (He et al., 2012). Se sospecha que la contaminación por Sb está causando problemas de salud en estas regiones, siendo la cirrosis hepática la principal causa de muerte en zonas de exposición prolongada, como es el sur de Guizhou (Cen et al., 2007). También se han realizado estudios en Hunan, donde se sitúa la mina de Xikuangshan, la mina de Sb más grande del mundo. En esta zona, se realizaron estudios midiendo los niveles de Sb en aire y agua, la hipótesis que se plantea es que los niveles elevados de Sb son la causa de la dermatitis y la neumoconiosis que, con frecuencia se da, en la población cercana (He & Yang, 1999).

El consumo de alimentos contaminados con Sb es una de las principales razones de la entrada de Sb en el cuerpo humano (Pascaud et al., 2014). Para comprobar si el Sb estaba afectando directamente a la población se analizaron cabellos de los habitantes de las poblaciones expuestas al Sb, encontrándose concentraciones de 16 mg kg^{-1} , lo cual podría deberse, en parte, al consumo de alimentos que habían acumulado Sb (Wu et al., 2011).

Hay diferentes cultivos que tienen la capacidad para acumular Sb, lo que supone una amenaza potencial para los seres humanos al consumirlos (Pierart et al., 2015).

La ingesta diaria de Sb que los humanos pueden tolerar es de 360 μg , siendo 554 μg la cantidad que ingerían los residentes de estas zonas contaminadas. El arroz es la principal fuente de exposición a Sb, que representa el 33% de la ingesta total de Sb, seguida de verduras (hojas), agua potable y carne/aves de corral, que representan el 26%, 19% y el 19%, respectivamente. Para reducir el riesgo para la salud de Sb, se debe controlar la acumulación de Sb en los cultivos. Por lo tanto, comprender los comportamientos de Sb en suelos, agua y plantas es crucial (Wu et al., 2011).

Efectos en plantas

El Sb no es un elemento esencial para las plantas, pero pueden absorberlo y transportarlo (Baroni et al., 2000). La capacidad de las plantas para absorber este metaloide depende de la forma en que se encuentre en el suelo y de su biodisponibilidad, así como de la especie vegetal (Natasha et al., 2019; Shtangeeva et al., 2013; Zhu et al., 2020b). Si la absorción de Sb es elevada, los problemas de toxicidad se traducen en reducción del crecimiento, absorción deficiente de otros elementos minerales, ralentización de la fotosíntesis, desarrollo de estrés oxidativo, etc. (Figura 3) (Chai et al., 2016; Espinosa-Vellarino et al., 2020; Feng et al., 2020; Shtangeeva et al., 2014; Zhong et al., 2020).

Los valores normales de Sb en plantas varían entre 0,0001-0,2 mg kg^{-1} (Alloway, 1995). En general, la exposición a concentraciones elevadas de Sb, por encima de 5-10 mg kg^{-1} , resulta tóxica para las plantas comunes, (Kabata-Pendias & Pendias, 2010), aunque estas cifras pueden fluctuar, ya que, para algunas plantas, estas concentraciones podrían ser tolerables. Se han identificado plantas que pueden acumular cantidades extremadamente altas de Sb en sus tejidos ($> 1000 \text{ mg kg}^{-1}$) sin mostrar signos de toxicidad (Baroni et al., 2000; Murciego et al., 2007; Okkenhaug et al., 2011). Generalmente, estas plantas son originarias de áreas mineras, por lo que están adaptadas a vivir en ambientes muy contaminados. La concentración de Sb en sus tejidos suele ser dependiente de la concentración de Sb soluble en el suelo (Tschan et al., 2009a, 2009b).

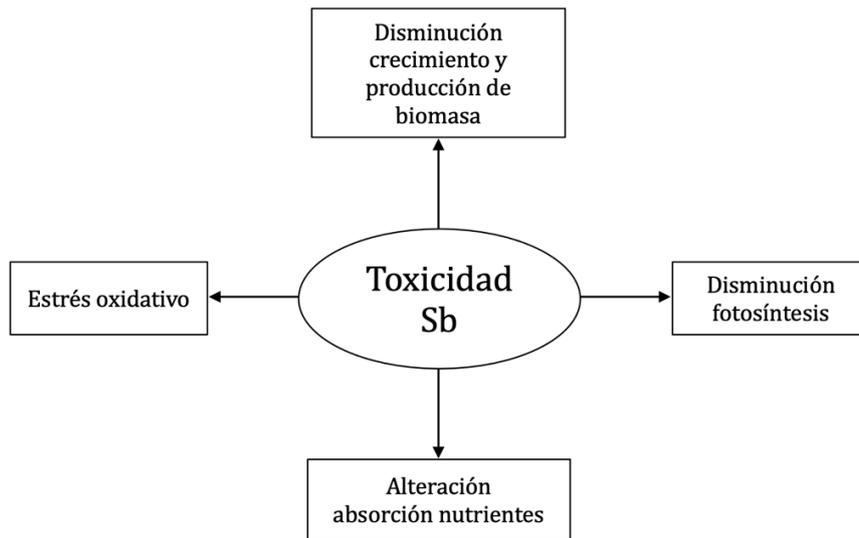


Figura 3: Efectos de la toxicidad por Sb en plantas.

El principal problema que causa la toxicidad por Sb en plantas es la reducción de biomasa (Ortega et al., 2017). La acumulación de Sb puede provocar el aumento de especies reactivas del oxígeno (ROS), que causa estrés oxidativo, y un aumento de la peroxidación lipídica (Feng et al., 2009, 2011; Pan et al., 2011). El exceso de ROS está controlado por los sistemas de defensa enzimáticos y no enzimáticos.

Los sistemas antioxidantes enzimáticos se componen de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), y glutatión reductasa (GR). Los sistemas antioxidantes no enzimáticos están formados por compuestos de bajo peso molecular, como el ascorbato (AsA), glutatión (GSH), compuestos fenólicos, carotenoides, y tocoferoles (Feng et al., 2013b).

En relación con el proceso de fotosíntesis mencionado, la exposición al exceso de Sb puede afectar a la fotosíntesis, puesto que inhibe la síntesis de clorofila y disminuye la eficiencia fotosintética, como describen Pan et al. (2011) y Zhang et al. (2010) en *Synechocystis sp.* Además, la exposición al Sb puede alterar la absorción y distribución de elementos esenciales en las plantas, como indican Shtangeeva et al. (2011) donde el Sb provoca una reducción significativa en las concentraciones de calcio (Ca), potasio (K), sodio (Na) y cobre (Cu) en trigo. Del mismo modo, en arroz, el Sb disminuye las concentraciones de Ca, magnesio (Mg), K, hierro (Fe), manganeso (Mn), Cu y zinc (Zn).

Los niveles altos de Sb también disminuyen el contenido de sustancias, como la proteína soluble en la cáscara de arroz (Weiyou402) y el azúcar y el almidón solubles en la mostaza dulce (Feng et al., 2013c).

1.1.3. Absorción de Sb en plantas

Aunque el Sb no es un elemento esencial para las plantas, numerosos estudios han demostrado que las plantas que se encuentran en entornos contaminados por Sb pueden absorber una gran cantidad de este elemento (Ainsworth et al., 1991; Qi et al., 2011; Telford et al., 2009). Se comprobó cómo en las plantas de *Raphanus sativus* (rábano) que crecían cerca de una fundición de Sb contenían concentraciones de Sb de hasta 121,4 mg kg⁻¹ de Sb en sus hojas (He, 2007). Baroni et al. (2000) encontraron que las plantas que crecían alrededor de fundiciones de Sb en Idaho contenían concentraciones de Sb de hasta 900 mg kg⁻¹. Los altos niveles de Sb en suelos (u otros medios de crecimiento) no necesariamente dan como resultado una acumulación significativa de Sb en los tejidos vegetales. La concentración de Sb en plantas depende de varios factores:

- Biodisponibilidad de Sb en los suelos. El Sb se considera poco activo e inmóvil en los suelos (Flynn et al., 2003). La movilidad y la biodisponibilidad de Sb en los suelos se han estimado midiendo las fracciones de Sb que pueden extraerse con agua (Flynn et al., 2003; Murciego et al., 2007) o soluciones de electrolitos como Na₂HPO₄ (Nakamaru et al., 2006) o NH₄NO₃ (Hammel et al., 2000; Nakamaru et al., 2006).

La concentración de metales o metaloides en las plantas se correlaciona positivamente con su solubilidad (Hammel et al., 2000; Song et al., 2004), y a su vez la solubilidad de estos elementos en los suelos se emplea para estimar biodisponibilidad (Singh et al., 2010). Para comprobar esto, Hammel et al. (2000), realizaron un experimento en el cual eligieron un suelo rico en Sb de manera natural. En este suelo, a pesar de tener unas elevadas concentraciones de Sb, sólo una pequeña fracción era soluble. Al realizar los análisis a las plantas localizadas en ese suelo, pudieron comprobar que apenas habían acumulado Sb en sus tejidos. Sin embargo, cuando se trataba de suelos contaminados artificialmente con

concentraciones relativamente altas de Sb soluble, las plantas acumulaban gran cantidad de Sb en sus hojas, hasta 400 mg kg⁻¹.

Teniendo en cuenta la capacidad de extracción se distinguen tres categorías de biodisponibilidad de Sb en suelos: fácilmente biodisponible (fracción soluble en agua capaz de intercambiar cationes), moderadamente biodisponible (fracción carbonatada, fracción de (oxihidr)óxidos de Fe/Mn y Sb ligado a sulfuros/orgánicos) y no biodisponible (fracción residual); concluyéndose que 2,1-11,8% del Sb total en las muestras de suelo de campo era fácil y moderadamente biodisponible (He, 2007). Se encontró que la solubilidad de Sb en los suelos de cinco zonas mineras y de fundiciones cerradas en Reino Unido era muy baja, y las proporciones de Sb soluble en agua fueron en su mayoría inferiores al 1% (Flynn et al., 2003).

- Especie de Sb. Las especies orgánicas de Sb son menos tóxicas que las inorgánicas, y dentro de estas últimas el Sb(III) es más tóxico que el Sb(V) (Wilson et al., 2010). En un estudio llevado a cabo por Shtangeeva et al. (2012) observaron que el centeno (*Secale cereale* L.) expuesto a SbCl₅ acumulaba más Sb en los tejidos y semillas que el expuesto a SbCl₃. Sin embargo, se observó el resultado opuesto en el trigo (*Triticum aestivum* L.) bajo las mismas condiciones, lo que sugiere que el efecto de la absorción de la especie de Sb varía en función de la especie vegetal. Wan et al. (2013) también encontraron que *Lolium perenne* L. mostró una alta afinidad por Sb(III), mientras que *Holcus lanatus* L. tenía una alta afinidad por Sb(V).

El agua del suelo puede influir en la fracción móvil de diferentes especies de Sb, lo que afecta la absorción de este metaloide en las plantas. Wan et al. (2013) realizaron una experiencia en la cual comprobaron que en suelos encharcados disminuye el potencial de oxidación-reducción, y en consecuencia provocaba una mayor reducción de Sb(V) a Sb(III), lo que provoca una mayor acumulación de Sb en los brotes de plantas de *L. perenne*.

- Variaciones en las concentraciones de iones. En suelos contaminados con Sb se observó que la adición de fosfato (PO₄³⁻) movilizaba eficazmente el Sb (Spuller

et al., 2007). El fosfato provoca que el Sb se adhiera a las partículas del suelo, provocando que, al entrar en contacto con el agua, se solubilice, y pueda ser absorbido por las plantas (Xi et al., 2011). Cuando el Sb(V) se presenta unido a calcio (Ca), suele aparecer en forma de $\text{Ca}[\text{Sb}(\text{OH})_6]_2$ que es bastante insoluble. Esto indica que el Ca afecta negativamente a la solubilidad del Sb, permaneciendo en el suelo, pero no estando disponible para la absorción por las plantas (Okkenhaug et al., 2011). Sin embargo, Evangelou et al. (2012) encontraron que las plantas que crecían en suelos calcáreos acumularon 1,5–2,6 veces más Sb que las que crecen en suelos débilmente ácidos. En ese estudio se propuso que el valor de pH (8,5) en los suelos calcáreos era el factor principal que promueve la liberación de Sb de las partículas del suelo, lo que provoca un aumento en su movilidad en comparación con los suelos débilmente ácidos.

Existen pocos datos sobre los mecanismos de absorción del Sb en plantas, siendo la mayor parte debidos a la comparación que se hace con el comportamiento de otros metaloides con los que guarda gran relación y similitud. El metaloide que más se asemeja al Sb es el As, perteneciendo al mismo grupo de la tabla periódica, junto al fósforo (P). Existen numerosos estudios sobre los mecanismos de absorción del As en plantas, y debido a las similitudes químicas que presenta con el Sb, se propone que el As y el Sb utilizan los mismos sistemas de absorción (Vidya et al., 2022).

Se han descrito diferentes sistemas para la absorción de Sb en las células vegetal, todos basados en sus similitudes con el As, aunque existen resultados contradictorios en algunos casos. Se ha propuesto que su absorción puede realizarse a través de transportadores iónicos, de hexosas y de aquagliceroporinas y aquaporinas (Tschan et al., 2008).

La entrada de Sb(V) del suelo a la raíz puede realizarse bien a través del simplasto mediante transportadores de baja selectividad, en los que los aniones Sb sustituyen a aniones como cloruro (Cl^-) y nitrato (NO_3^-), o bien a través del apoplasto hasta la endodermis (Figura 4). Algunas experiencias indican que las plantas no utilizan la vía del P(V), que sí parece utilizar el As(V), para absorber Sb(V). Así, Tschan et al., (2008) observan que la adición de P(V) al medio en el que crecen *Zea mays* L. y *Helianthus annuus* L. no disminuye la absorción de Sb(V).

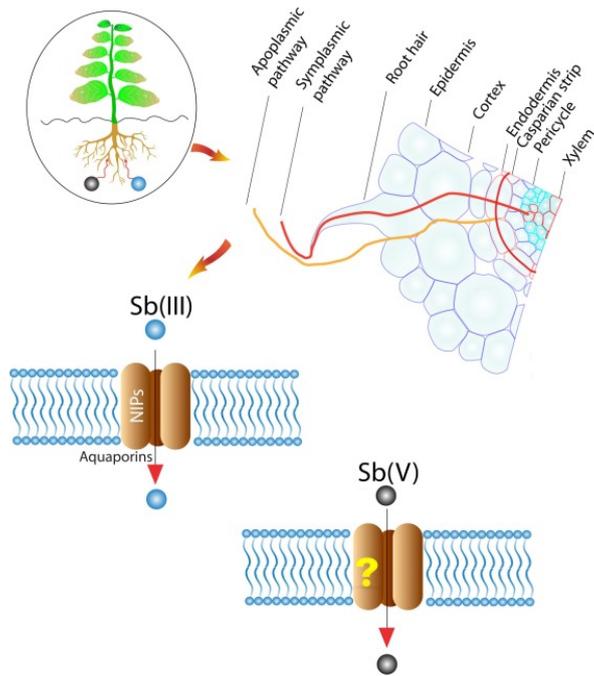


Figura 4: Mecanismos de absorción de Sb por las plantas. El Sb puede ser absorbido y transportado a través de los tejidos radiculares por vía apoplástica o simplástica. El Sb(III) se absorbe a través de las membranas celulares mediante aquaporinas (principalmente NIPs), mientras que el transporte de Sb(V) a través de las membranas aún no está claro (Vidya et al., 2022).

Otra posible entrada del As y el Sb en las células es través de los transportadores de hexosas. Además, el As(V) se comporta como un análogo químico del fosfato inorgánico (Pi), siendo absorbido mediante los transportadores de fosfato (Ali et al., 2009; Wysocki & Tamás, 2010). Se comprobó cómo en ausencia de fosfato, la absorción de As aumenta, lo que parece indicar que comparten el mismo transportador (Lei et al., 2012). Sin embargo, el Sb(V) existe como anión $[Sb(OH)_6]^-$ y no compete con la absorción de fosfato (Brochu et al., 2003; Tschan et al., 2008).

Las variaciones estructurales podrían ser las responsables de este diferente comportamiento. Así, mientras el Sb(V) tiene una estructura octaédrica, el P(V) y el As(V) tienen una estructura tetraédrica (Ngo et al., 2016; Pauling, 1933). No obstante, se ha descrito que el As(V) potencia la acumulación de Sb en tejidos vegetales, sobre todo en las raíces de helechos hiperacumuladores de As como *Pteris cretica* L. y *Pteris vittata* L. (Feng et al., 2011; Müller et al., 2013). Según Müller et al. (2013), el As(V) altera la integridad y la permeabilidad de la membrana celular, lo que provoca un aumento de la absorción de Sb. No se ha determinado aún la vía de entrada de Sb(V) a las células.

A diferencia del Sb(V), el Sb(III) es una molécula neutra que se asemeja al As(III) en estructura y tamaño. Tanto el As(III) como el Sb(III) tienen propiedades de transporte similares y pueden entrar y salir de la célula por una vía pasiva o activa. Se ha observado competencia entre Sb(III) y As(III) en arroz (*Oryza sativa* L.) (Meharg & Jardine, 2003), lo que indica un mecanismo de absorción similar. En solución acuosa y a pH fisiológico, tanto el As(III) como el Sb(III) existen en las formas trihidroxiladas sin carga, As(OH)₃ y Sb(OH)₃, muy similares estructuralmente al glicerol (Porquet & Filella, 2007; Ramírez-Solís et al., 2004). Su absorción puede realizarse mediante las aquagliceroporinas, una familia ubicua de proteínas de membrana permeables al agua y al glicerol (Bhattacharjee et al., 2008; Bienert et al., 2008).

Las aquaporinas vegetales responsables de la absorción de metaloides se clasifican en cuatro subfamilias correspondientes a distintas localizaciones subcelulares (Jian et al., 2006; Ma & Yamaji, 2006; Maurel, 2007; Takano et al., 2006):

1. SIP: pequeñas proteínas intrínsecas, localizadas en el retículo endoplásmico
2. PIP: proteínas intrínsecas de membrana plasmática
3. TIP: proteínas intrínsecas del tonoplasto
4. NIP: proteínas intrínsecas de membrana similares a la Nodulina26, localizadas en el plasmalema y en membranas intracelulares. Parece que este tipo de aquaporina serían las responsables de la absorción de As(OH)₃ y Sb(OH)₃.

Bienert et al. (2008) han demostrado que en *O. sativa* la OsNIP2;1 y en *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) la AtNIP5;1 son permeables para los metaloides As(III) y Sb(III), ambos se localizan en la membrana plasmática de las células de la endodermis de *A. thaliana* (Takano et al., 2006), y en la endodermis y exodermis de *O. sativa* (Ma & Yamaji, 2006). Suponiendo estas capas celulares la frontera para el transporte apoplásmico. El primer transportador de Sb(III) identificado es la proteína facilitadora de la captación de glicerol (GlpF), perteneciente a la subfamilia de aquagliceroporinas (Bienert et al., 2008). Kamiya & Fujiwara (2009) descubrieron que NIP1;1 es el determinante de la tolerancia al Sb(III), y que el transporte de Sb(III) está mediado por él en *A. thaliana*. Estos trabajos demostraron que la mayoría de los transportadores de Sb en plantas pertenecen a NIPs y se expresan en las raíces (Azad et al., 2018).

1.1.4. Hiperacumulación de Sb en plantas

Algunas plantas tienen la capacidad de crecer en entornos contaminados con metales o metaloides, y acumularlos en sus tejidos aéreos y/o raíces, siendo predominante su acumulación en la parte aérea. Estas plantas se conocen como plantas hiperacumuladoras. (Baker, 1981; Reeves & Baker, 2000). La principal diferencia entre las plantas comunes y las plantas hiperacumuladoras radica en la mayor capacidad enzimática para hacer frente al estrés oxidativo (Cao et al., 2004; Srivastava et al., 2005). Las enzimas antioxidantes tienen como objetivo eliminar el exceso de ROS manteniendo su concentración en niveles adecuados (Assche Van & Clijsters, 1990; Baker & Orlandi, 1995; Foyer & Noctor, 2000). Entre estas enzimas se encuentra la SOD (Foyer & Noctor, 2000; Thompson et al., 1987), peroxidasas (POX) y catalasas (CAT) (Foyer & Noctor, 2000; Pereira et al., 2002). Aunque se han detectado altas concentraciones de Sb en los tejidos de varias plantas, los mecanismos de absorción, asimilación, toxicidad y desintoxicación de Sb en plantas aún son mucho menos claros que los de animales y humanos (Gebel, 1997).

Los criterios, según Chaney et al., (1997) y Reeves & Baker (2000) para considerar a una planta como hiperacumuladora de Sb son:

1. Debe ser capaz de absorber Sb.
2. La concentración de Sb a la que debe estar expuesta debe ser $> 1000 \text{ mg kg}^{-1}$.
3. No debe manifestar síntomas de toxicidad

Se han identificado una serie de plantas que reúnen esas características; *Achillea ageratum* L. (1367 mg kg^{-1} en las hojas basales), *Plantago lanceolata* L. (1150 mg kg^{-1} en las raíces) y *Silene vulgaris* (Moench) (1164 mg kg^{-1} en los brotes) (Baroni et al., 2000) *P. cretica* (6405 mg kg^{-1} en raíces), *Pteris Fauriei* (Hieron) (5112 mg kg^{-1} en raíces), *Pteris ensiformis* (Burm) (2635 mg kg^{-1} en raíces), *Humata tyermanii* (Moore) (2360 mg kg^{-1} en raíces) (Feng et al., 2013a), *Trifolium pratense* L. (2151 mg Kg^{-1} Sb en sus brotes) (Tschan et al., 2009a). Los helechos, como *P. cretica* tienen una alta tolerancia al Sb(III), relacionada con los sistemas de eliminación de ROS (Feng et al., 2009). Además, tiene la capacidad de acumular simultáneamente As y Sb debido a la compartimentalización del Sb en el citosol y su inmovilización en la pared celular (Feng et al., 2011).

1.2. Implicación de las especies reactivas del oxígeno, nitrógeno y azufre en la defensa frente al estrés en plantas

El concepto estrés en plantas se relaciona con cualquier factor externo a la planta que sea capaz de inducir en ella alteraciones a nivel fisiológico, bioquímico y/o molecular, modificando su ciclo de vida normal (Chaki, 2007).

La sensibilidad o tolerancia ante el estrés viene determinada por factores como la especie, el genotipo y el propio estado fisiológico de la planta. Los factores que provocan estrés pueden tener origen biótico o abiótico. Dentro de los factores bióticos encontramos la alelopatía (producción de compuestos bioquímicos que influyen en el crecimiento, supervivencia o reproducción de otros organismos), los virus, las bacterias y los hongos, los animales y los factores antropogénicos (producción industrial, empleo de pesticidas y herbicidas, compactación de los suelos por la agricultura, fuego o radiación iónica debido a los cables eléctricos). Entre los factores abióticos causante de estrés están la sequía, el encharcamiento, altas y bajas temperaturas, la salinidad, la luz extrema, el ozono, los metales pesados, metaloides, el pH del suelo y, efectos mecánicos (por ejemplo, la acción del viento). Todos estos estreses causan en las plantas alteraciones muy diversas que afectan tanto su crecimiento como a su productividad (Chaki, 2007).

En las plantas, como consecuencia de los procesos fisiológicos normales y las condiciones de estrés, se producen diferentes especies reactivas en los distintos compartimentos celulares. Entre ellas se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ROS), nitrógeno (RNS) y azufre (RSS) (Apel & Hirt, 2004; Corpas & Barroso, 2013; Gill & Tuteja, 2010; Hasanuzzaman et al., 2019).

La presencia de metales pesados y/o metaloides en el medio de crecimiento a concentraciones tóxicas, supone un estrés para la planta. Este estrés promueve un gran aumento en la producción de ROS, RNS, y RSS, que conduce a una alteración del equilibrio redox celular (Chai et al., 2016; Corpas & Barroso, 2014b; Ortega et al., 2017; Santisree et al., 2019). Para hacer frente al daño causado por la alteración de este equilibrio redox y para eliminar el exceso de ROS, las plantas han desarrollado un sistema antioxidante con componentes enzimáticos y no enzimáticos (Ahsan et al., 2009; Gill & Tuteja, 2010; Mittler, 2002; Verma & Dubey, 2003; Zhang et al., 2007).

Las ROS y las RNS se producen en el apoplasto, el citoplasma, los cloroplastos, las mitocondrias y los peroxisomas (Apel & Hirt, 2004; Groß et al., 2013; Waszczak et al., 2018). Las RSS se sintetizan en el citoplasma, en los cloroplastos y en las mitocondrias (Singh et al., 2020).

1.2.1. Especies reactivas del oxígeno (ROS)

1.2.1.1. Generalidades, tipos, y biosíntesis

Las ROS son compuestos altamente reactivos que se producen como consecuencia de procesos metabólicos y como respuesta a diferentes estreses (Apel & Hirt, 2004; Halliwell & Gutteridge, 2015).

El aumento de ROS constituye un marcador del estrés oxidativo que puede tener efectos perjudiciales en la célula, aunque las plantas tienen también el potencial de utilizar ROS para regular la detección y la señalización en estas condiciones de estrés (Demidchik, 2015).

Las células vegetales, al igual que en todos los organismos aerobios, necesitan O_2 para la producción de energía (Apel & Hirt, 2004). En estos procesos la reducción del O_2 a H_2O es la fuente energía necesaria para el desarrollo y crecimiento de las plantas. La reducción completa del O_2 hasta una molécula de H_2O se realiza en cuatro etapas que requieren del aporte de 4 electrones, y esta reducción puede ocurrir en pasos univalentes, dando lugar a la aparición de ROS (Figura 5) (Hippeli et al., 1999).

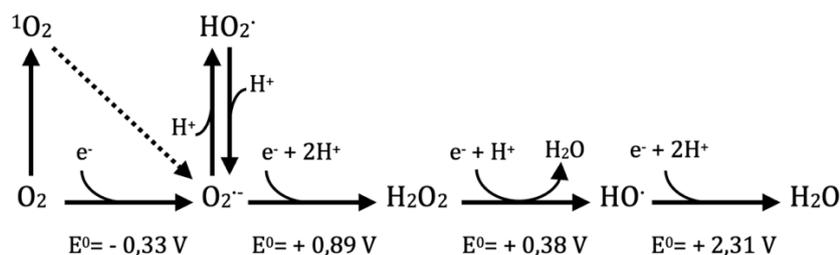


Figura 5: Interconversión de las ROS. A partir de Hippeli et al., 1999 y Halliwell & Gutteridge, 2015.

La producción de ROS como subproductos de procesos metabólicos como la respiración y la fotosíntesis es consecuencia de los procesos aeróbicos que ocurren en diferentes compartimentos celulares (Figura 6) (Waszczak et al., 2018). Cuando ocurre un aumento de estas ROS pueden provocar daños a nivel del DNA, proteínas, carbohidratos, lípidos y en último caso, pueden producir la muerte celular (Foyer & Noctor, 2005). Por ello, los mecanismos enzimáticos y no enzimáticos actúan de forma coordinada para mantener la homeostasis redox y evitar el estrés oxidativo. Las ROS se forman en diferentes compartimentos subcelulares como apoplasto, cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas. (Del Río, 2015; Mittler et al., 2004; Scandalios, 2005), tanto en condiciones normales como de exposición a estreses.

En los cloroplastos, las ROS se generan en la fotorreducción de oxígeno (O_2) hasta H_2O mediante el transporte de electrones del fotosistema I, cuyo producto principal es el $O_2^{\bullet-}$ (anión superóxido), y en reacciones fotodinámicas que ocurren bajo condiciones que limitan la transferencia de electrones a través de los fotosistemas, como la alta intensidad luminosa y condiciones de baja concentración de dióxido de carbono (CO_2) (Apel & Hirt, 2004; Mittler et al., 2004). El $O_2^{\bullet-}$ también puede producirse mediante el escape de electrones al O_2 desde las cadenas de transporte electrónico en los fotosistemas I y II (Sgherri et al., 1996). Finalmente, la disipación de energía durante la fotosíntesis produce la formación de un estado triplete de clorofila que puede generar singlete de oxígeno (1O_2) mediante transferencia de energía al oxígeno en estado fundamental, y su producción aumenta durante el estrés lumínico excesivo (Apel & Hirt, 2004; Asada, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2015).

En mitocondrias, en la cadena de transporte electrónico se genera $O_2^{\bullet-}$ que puede dismutar a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la SOD. En este orgánulo se producen ROS bajo condiciones normales de respiración, pero aumentan en condiciones de estrés (Czarnocka & Karpínski, 2018). Los peroxisomas producen ROS principalmente en el proceso de fotorrespiración y la oxidación de ácidos grasos, donde se produce H_2O_2 . Las ROS producidas en estos orgánulos son esenciales para distintos procesos fisiológicos, pero también tienen un importante papel frente a diferentes estreses bióticos y abióticos (Czarnocka & Karpínski, 2018). Las ROS también se generan en el apoplasto, fundamentalmente por una familia de proteínas, las NADPH oxidasas del plasmalema,

que producen $O_2^{\bullet-}$, utilizando NADPH como donador de electrones. El $O_2^{\bullet-}$ puede producir posteriormente H_2O_2 mediante dismutación enzimática por la SOD o no enzimática. Además, un miembro de esta familia, la NOX4 es una excepción, produciendo H_2O_2 directamente. En menor medida, también se producen ROS en el apoplasto, mediante la peroxidasa apoplástica, que además de eliminar H_2O_2 , pueden generar ROS, o por xantina deshidrogenasa u oxalato oxidasa. Estas ROS producidas en el apoplasto median la respuesta a estreses (Novaković et al., 2018).

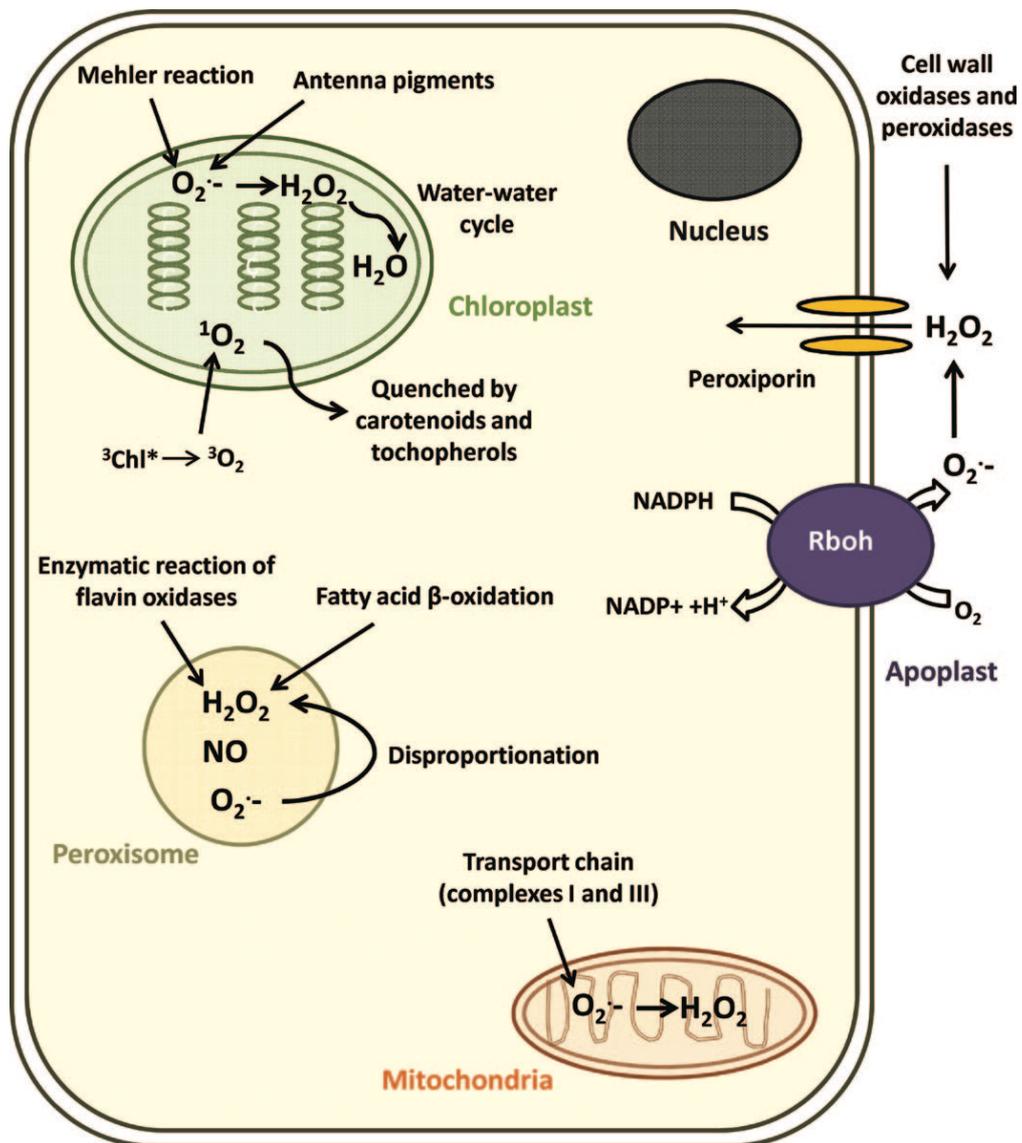


Figura 6. Principales lugares de producción de ROS en las células vegetales y medios por los que se controlan sus niveles (Bose et al., 2014).

Las ROS son moléculas señalizadoras implicadas en varios procesos fisiológicos como son: el ciclo celular, la percepción y respuesta al estrés tanto biótico como abiótico, la regulación génica, la inducción de la muerte celular programada, así como la respuesta hipersensible y la senescencia (Apel & Hirt, 2004; Gill & Tuteja, 2010; Miller et al., 2008; Waszczak et al., 2018). En todos estos casos, para desempeñar esta faceta de transducción de señales en las plantas, es necesario que los niveles de ROS se puedan regular o mantener en niveles determinados. Por ejemplo, la señalización que se desencadena por interacción con microorganismos con los que las plantas establecen una relación de simbiosis, tales como la nodulación (bacterias, por ejemplo, *Rhizobium sp.*) y la micorrización (hongos, como *Rhizophagus sp.*). Las ROS son las encargadas de modular la respuesta, que inicialmente es un choque oxidativo muy rápido y brusco, pero que después, tras el reconocimiento se atenúa mediante los sistemas antioxidantes, permitiendo el establecimiento de la simbiosis (Espinosa et al., 2014).

Las principales ROS son:

- Singlete de oxígeno ($^1\text{O}_2$): Es el O_2 en estado electrónico activado (Figura 5). Se origina en altas cantidades en el cloroplasto, por transferencia de energía de excitación desde un pigmento fotoactivado provocando la inversión del espín de uno de los electrones desapareados. Presenta una vida muy corta pudiendo inactivar tanto a proteínas de los fotosistemas como a las clorofilas. Puede actuar como iniciador de la peroxidación de lípidos causando daños en las membranas tilacoidales, provocar daños en el DNA, o estimular la formación de otras ROS y radicales hidropéroxilo e hipoclorito. (Foyer & Harbinson, 2019).
- Anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$): Es el primer producto de reducción del O_2 (Figura 5). Se produce mediante la enzima NADPH oxidasa de la membrana plasmática (RBOH-NOX) o por la acción de la xantina oxidasa en el peroxisoma y de la cadena de transporte de electrones dependiente de NADPH en la membrana del peroxisoma. Además, también es producido de forma continua en los tilacoides de los cloroplastos (Del Rio et al., 1992, 1996; López-Huertas et al., 1996). La familia de genes *RBOH* ha sido caracterizada en *A. thaliana*, donde se describen 10 miembros (Figura 7) (Baxter et al., 2014; Chapman et al., 2019).

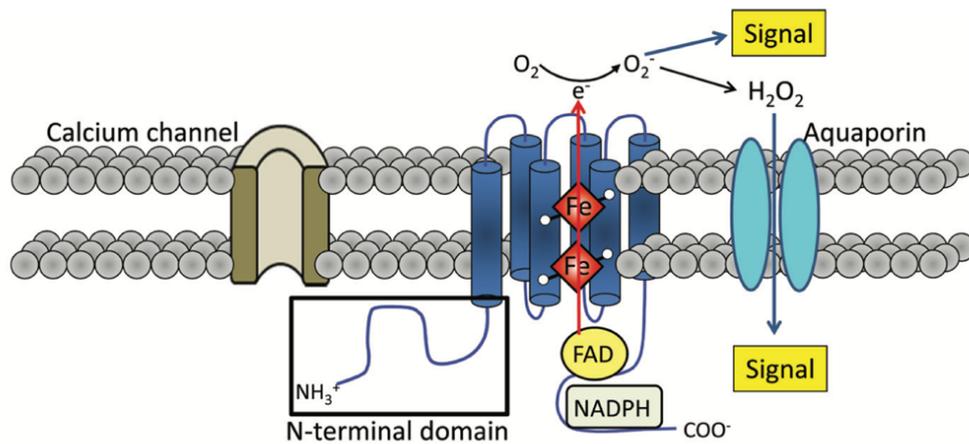


Figura 7: Estructura de la RBOH implicada en la formación de $O_2^{\bullet-}$ (Baxter et al., 2014).

- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2): Es el segundo producto de reducción del O_2 , obtenido a partir del $O_2^{\bullet-}$ (Figura 5). Es muy importante como molécula señalizadora, tanto en plantas como en animales, ya que es la ROS más estable, y puede difundir libremente por los compartimentos acuosos y las membranas inactivando algunas enzimas mediante la oxidación de sus grupos tiol. La producción de H_2O_2 se induce tras la exposición de plantas a varios estreses bióticos y abióticos (temperaturas extremas, radiación ultravioleta, ozono, deshidratación, heridas, patógenos, entre otros) (Guan et al., 2000; Mackerness et al., 2001; Orozco-Cardenas & Ryan, 1999; Pei et al., 2000; Prasad et al., 1994) y su síntesis tiene lugar durante la β -oxidación de ácidos grasos y en la reacción de la glicolato oxidasa en peroxisoma durante la fotorrespiración (Foyer & Noctor, 2000). Enzimas como las oxalato oxidasas, las POX de la pared celular y la NADPH oxidasa del plasmalema pueden producir H_2O_2 . POX y NADPH oxidasa son especialmente importantes en la respuesta a estrés (Berna & Bernier, 1999; Bolwell, 1999; Sagi & Fluhr, 2001). El H_2O_2 está implicado en la expresión de genes relacionados con las respuestas de defensa de la planta y reacciones hipersensibles (Desikan et al., 2000; Kovtun et al., 1999). También está involucrado en la biosíntesis de fitoalexina (Degousee et al., 1994), en el proceso de lignificación y en la transcripción de proteínas de defensa. Su acumulación es dañina para la planta, ya que conlleva daño oxidativo (Levine et al., 1994).

- Radical hidroxilo (HO \cdot): Es el tercer producto de oxidación del O $_2$ (Figura 5). Se forma en el cloroplasto por la adición de un electrón al H $_2$ O $_2$, siendo la especie de oxígeno más reactiva y tóxica que se produce. El HO \cdot reacciona con la mayoría de los compuestos presentes en los sistemas biológicos provocando daño oxidativo en proteínas y en ácidos nucleicos, además de la rotura de las cadenas de estos (Foyer & Noctor, 2005).

1.2.1.2. Sistema antioxidante

El término antioxidante hace referencia a compuestos químicos o sistemas enzimáticos que interactúan con radicales libres y son capaces de neutralizarlos o eliminarlos, lo que les impide causar daño en las células. Los sistemas antioxidantes pueden inducir cambios en el metabolismo y actuar regulando la expresión de determinadas proteínas, actuando tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. A nivel subcelular esta maquinaria está presente en todos los orgánulos celulares en los que se forman ROS (Figura 8) (Chaudière & Ferrari-Iliou, 1999).

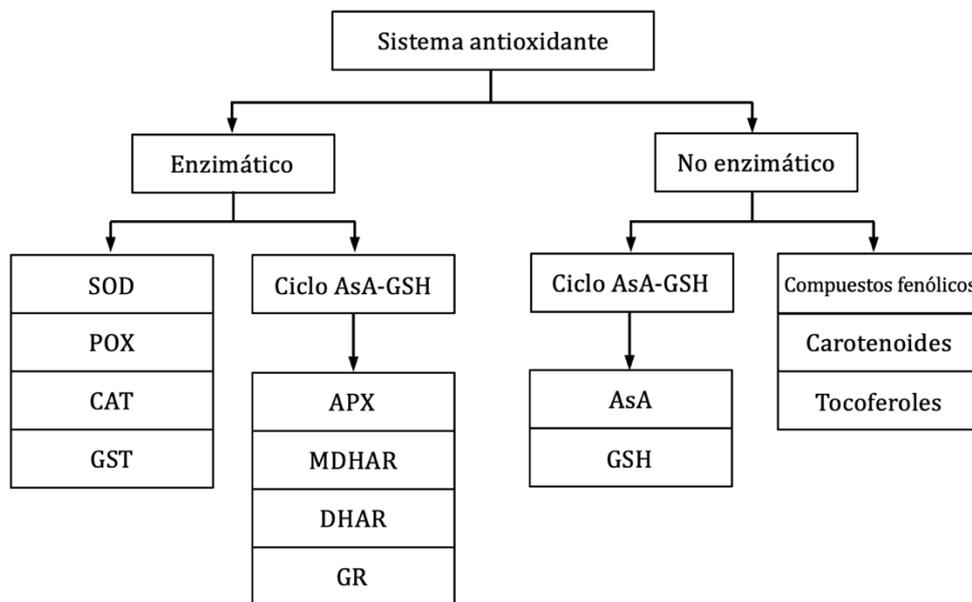


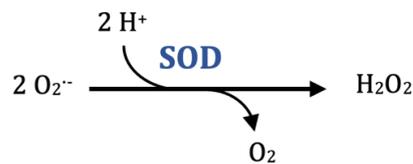
Figura 8: Principales sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en vegetales. APX, ascorbato peroxidasa; MDHAR: monodehidroascorbato reductasa; DHAR, dehidroascorbato reductasa; GR, glutatión reductasa; SOD: superóxido dismutasa; POX: peroxidasa; CAT, catalasa; GST: glutatión *S*-transferasa; AsA: ascorbato; GSH: glutatión reducido.

Sistema antioxidante enzimático

Formando parte del sistema antioxidante enzimático presente en las células vegetales se encuentran las siguientes enzimas SOD, CAT, POX, APX, MDHAR, DHAR, y GR (Figuras 8, 9, y 10) (Apel & Hirt, 2004; Bowler et al., 1992; Gill & Tuteja, 2010; Waszczak et al., 2018; Willekens et al., 1997)

- Superóxido Dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1)

Fue descubierta en 1969 por McCord y Fridovich, y constituye una de las principales defensas antioxidantes enzimáticas en células procariontas y eucariotas, siendo las primeras en la defensa contra los efectos tóxicos del $O_2^{\bullet-}$ (Fridovich, 1986; Halliwell & Gutteridge, 2015). Son metaloproteínas catalizadoras de la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ para formar O_2 y H_2O_2 en todos los organismos aerobios y algunos anaerobios (Hassan, 1989). La reacción que cataliza la SOD es:



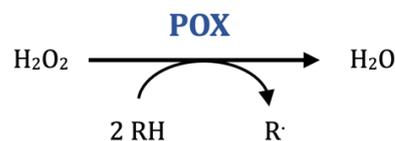
Se conocen tres familias en función del cofactor metálico que presenta la enzima en su sitio activo:

- Cu/Zn-SOD: se encuentra generalmente en los cloroplastos (Ogawa et al., 1995) en el citosol (Bowler et al., 1994), peroxisomas, apoplasto, y núcleo (Corpas et al., 2006; Ogawa et al., 1996). Este tipo es predominante en plantas superiores.
- Fe-SOD: se encuentran en cloroplastos (Bowler et al., 1994) y peroxisomas (Droillard & Paulin, 1990).
- Mn-SOD: se encuentran en mitocondrias (Bowler et al., 1994) y peroxisomas (Corpas et al., 2006; Del Río et al., 2003; Sandalio et al., 1987). Este tipo de SOD fueron las únicas que mostraron ser esenciales para la vida aerobia (Carlioz & Touati, 1986).

En situaciones de estrés generado por diversos factores abióticos, el $O_2^{\bullet-}$ aumenta su concentración. La SOD, primera línea de defensa frente a los efectos tóxicos de la elevada producción de ROS, elimina este radical evitando la formación de otras especies de oxígeno más reactivas como el 1O_2 o el HO^{\bullet} , cuyos mecanismos detoxificadores para eliminarlos aún no han sido totalmente esclarecidos.

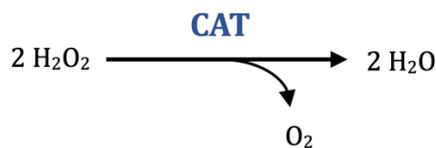
- Peroxidasa (POX; EC 1.11.1.7)

En plantas, las peroxidasas vegetales son glicoproteínas que participan en el mecanismo de elongación celular, formación y diferenciación de la pared celular y en la defensa contra patógenos. En angiospermas constituyen grandes familias multigénicas (Passardi et al., 2004). Pueden clasificarse en 3 clases: clase I, son las intracelulares; clase II, liberadas por los hongos durante la interacción planta-hongo; y la clase III, que son las secretadas a la pared celular, el apoplasto o la vacuola (Valério et al., 2004). Estas últimas son miembros de una gran familia multigénica con 138 miembros en *O. sativa* y 73 en *A. thaliana* (Passardi et al., 2004; Valério et al., 2004). Están involucradas en muchos procesos debido a su versatilidad catalítica y al gran número de isoformas (pueden formar y degradar ROS). Están estructuralmente relacionadas con proteínas que contienen grupo hemo. La función clave de las peroxidasas vegetales es la oxidación de sustratos de naturaleza fenólica con el consumo de H_2O_2 produciendo radicales (R^{\bullet}) que podrían intervenir en procesos de polimerización. Catalizan la reacción:



- Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6)

Son hemoproteínas con estructura tetramérica, que previenen la difusión de H_2O_2 a otros compartimentos celulares, constituyendo un mecanismo de defensa frente a distintos tipos de estrés (Scandalios, 2005; Willekens et al., 1997), siendo consideradas indispensables para la detoxificación de las ROS generadas en distintas situaciones de estrés abiótico, como estrés por metales pesados, salinidad, sequía o radiaciones ultravioletas. Se han identificado diferentes isoformas de esta enzima en plantas (Corpas et al., 1999; Eising et al., 1990; Havir et al., 1996). La actividad CAT se encuentra, sobre todo, en los peroxisomas, constituyendo un buen marcador de estos orgánulos (Corpas et al., 2006). También se ha descrito esta actividad, aunque en menor medida en el citosol y en las mitocondrias. Las CAT utilizan el H_2O_2 generado por la acción de la SOD en la dismutación del $\text{O}_2^{\bullet-}$. Una de las moléculas de H_2O_2 se reduce a H_2O , y la otra se oxida, formando O_2 (Chance et al., 1979).



La reacción de la CAT se ve favorecida cuando hay gran concentración de H_2O_2 (Chance et al., 1979). Además, son capaces de realizar reacciones peroxidásicas a pH básico actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como sustrato, en presencia de H_2O_2 (Halliwell & Gutteridge, 2015).

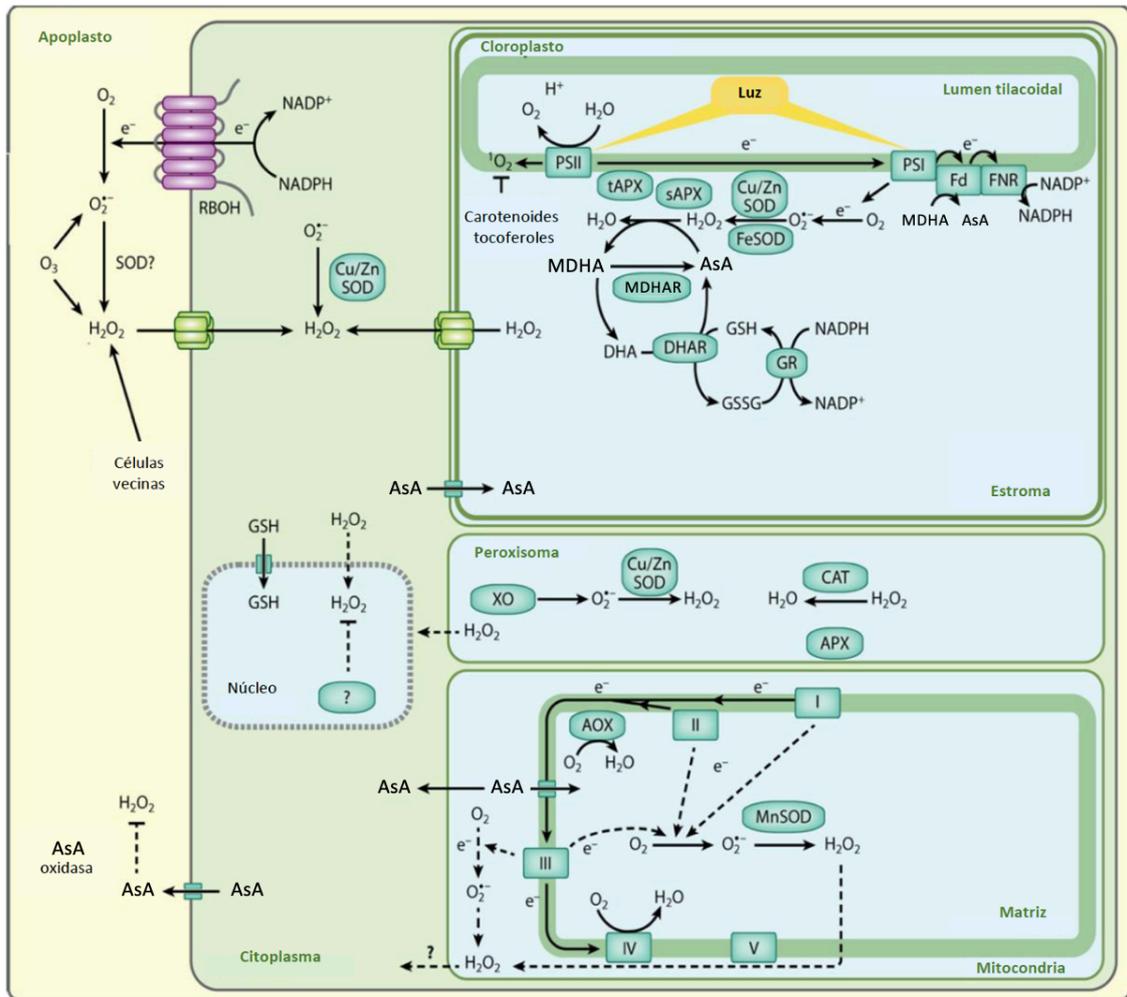


Figura 9: Esquema general de la producción y eliminación de ROS en plantas. Los $O_2^{\bullet-}$ se forman durante procesos en los que se producen altos flujos de electrones, como las cadenas de transporte de electrones mitocondriales y cloroplásticas, y como resultado de múltiples enzimas reacciones, y también en el apoplasto en respuesta a la llegada de factores externos inductores de estrés, “elicitors”. La producción de H_2O_2 ocurre por la dismutación enzimática y/o espontánea de los $O_2^{\bullet-}$. Abreviaturas: AOX, oxidasa alternativa; APX, ascorbato peroxidasa; AsA, ascorbato; CAT, catalasa; DHA, dehidroascorbato; DHAR, dehidroascorbato reductasa; Fd, ferredoxina; FNR, ferredoxina NADP reductasa; GR, glutatión reductasa; MDHA, monodehidroascorbato; MDHAR, mono-dehidroascorbato reductasa; PSI/II, fotosistema I/II; RBOH, homólogo de la NADPH oxidasa respiratoria; ROS, especies reactivas de oxígeno; SOD, superóxido dismutasa; XO, xantina oxidasa (Modificado de Waszczak et al., 2018).

- Enzimas del ciclo Ascorbato-Glutatión

En las células vegetales, el H_2O_2 es eliminado mediante un mecanismo antioxidante, llamado ciclo del ascorbato-glutatión o ciclo de Foyer-Halliwell-Asada (Figura 10), que implica sucesivas oxidaciones y reducciones del glutatión, ácido ascórbico y NADPH. En este ciclo intervienen APX, MDHAR, DHAR, y GR (Gill & Tuteja, 2010).

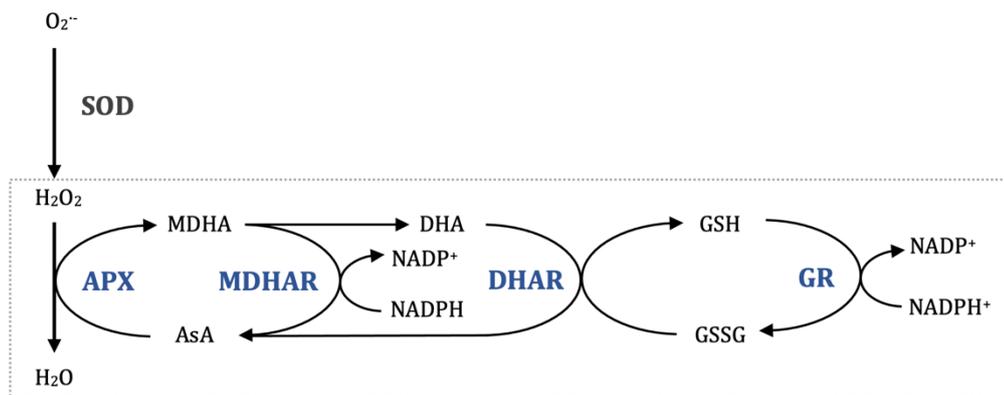
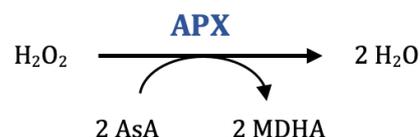


Figura 10: Sistema de defensa antioxidante: Ciclo del Ascorbato-Glutatión o Ciclo de Foyer-Halliwell-Asada (Señalado con recuadro).

- Ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11)

Es una proteína monomérica de tamaño molecular entre 30-40 KDa (Ishikawa et al., 1996; Tanaka et al., 1991). Se encuentra en diferentes compartimentos, como en los cloroplastos, tanto en el estroma (sAPX), como en los tilacoides (tAPX), en el citosol (cAPX), en mitocondrias (mitAPX), y en peroxisomas (pAPX) (Foyer et al., 1997; López-Huertas et al., 1999; Shigeoka et al., 2002). Esta enzima tiene un cometido importante en la eliminación del H_2O_2 de las plantas, llevando a cabo la primera reacción del ciclo AsA-GSH. Cataliza la transformación de H_2O_2 en H_2O mediante la oxidación del AsA a MDHA, según la reacción:

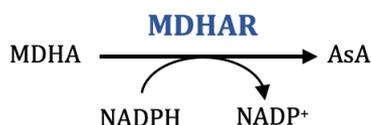


La expresión de la APX se incrementa cuando es sometida a condiciones de altas concentraciones de H₂O₂, como son las inducidas por los diferentes tipos de estreses bióticos y abióticos, lo cual parece indicar que la producción de H₂O₂ regula en cierta forma la expresión de esta enzima (Dat et al., 2000; De Gara et al., 1997).

Se ha descrito un papel regulador para el AsA en la actividad de la APX durante la diferenciación celular, y bajo condiciones experimentales de déficit o enriquecimiento de AsA (De Gara et al., 1997). Además, el control de la expresión de los genes que codifican las APX es sensible a diversos estímulos, como al estrés provocado por el déficit hídrico, la salinidad, las altas temperaturas, la congelación, el ataque por patógenos, el tratamiento con H₂O₂, y ácido abscísico (ABA) (Mittler et al., 1998; Teixeira et al., 2006; Yoshimura et al., 2000). También la expresión de las distintas isoformas puede variar de un tejido a otro (Teixeira et al., 2006).

- **Monodehidroascorbato reductasa (MDHAR; EC 1.6.5.4)**

La MDHAR reduce el MDHA a AsA utilizando NAD(P)H como donador de electrones (Asada, 2006). Contiene FAD (Flavín adenín dinucleótido) y es la única enzima cuyo sustrato es un radical orgánico. Además, tiene la capacidad de reducir los radicales fenoxilo (Sakihama et al., 2000). La reacción que cataliza es la siguiente:

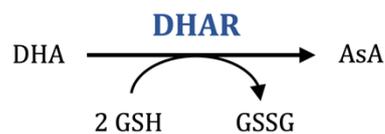


Se encuentra en los cloroplastos (Hossain & Asada, 1984b; Sano et al., 2005), en el citosol, en las mitocondrias (Jimenez et al., 1997; Mittova et al., 2003), en los glioxisomas (Bowditch & Donaldson, 1990), y en los peroxisomas

(Jimenez et al., 1997; Leterrier et al., 2005; López-Huertas et al., 1999; Mittova et al., 2003). Se ha comprobado que, en los cloroplastos la MDHAR puede tener dos funciones fisiológicas: la regeneración del AsA a partir del MDHA, y mediar en la fotorreducción del O_2 a $O_2^{\bullet-}$ cuando el sustrato MDHA está ausente (Miyake et al., 1998). En los peroxisomas, está localizada en la matriz y en la membrana, y sufre cambios de expresión frente a determinados estreses medioambientales, lo cual indica su implicación en los procesos de defensa (Leterrier et al., 2005).

- Dehidroascorbato reductasa (DHAR; EC 1.8.5.1)

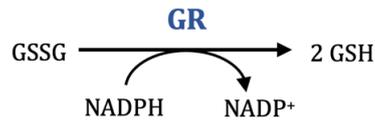
Es una proteína monomérica de unos 23 kDa (Hossain & Asada, 1984a). Es poco estable, lo cual ha dificultado su caracterización (Trümper & Follmann, 1994), lo que, unido a su escasa afinidad de sustrato, hace pensar que no tiene un papel fundamental en el mantenimiento del AsA en su forma reducida. Cataliza la reducción divalente del DHA a AsA usando GSH como fuente de poder reductor (Hossain & Asada, 1984b; Villalba et al., 1996), según la siguiente reacción:



- Glutati6n reductasa (GR; EC 1.6.4.2)

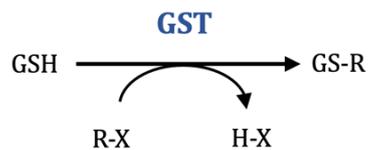
Es una flavoproteína dimérica con FAD en el centro activo de cada subunidad (Halliwell & Gutteridge, 2015). Se encuentra en el citosol y en los cloroplastos, y juega un papel importante en la protección de la planta frente a distintas situaciones de estrés.

Interviene en la regeneración de la forma reducida del glutatión, catalizando la conversión de GSSG a GSH, empleando NAD(P)H como donador de electrones, según la siguiente reacción:



- **Glutatión S-transferasa (GST; EC 2.5.1.18)**

Es una familia de enzimas que cataliza la conjugación de GSH con sustratos potencialmente xenobióticos (R-X), facilitando su detoxificación, según la siguiente reacción:



Están involucradas en procesos de eliminación de sustancias tóxicas, y su actividad está vinculada al citocromo P₄₅₀. Su expresión está codificada por una gran familia de genes, presentando diferentes isoformas en función de su localización subcelular: GST citosólica, mitocondrial y microsomal (Belford et al., 2004; Thatcher et al., 2007).

También, se relaciona su actividad con procesos de estrés abiótico, biótico, procesos fisiológicos, como el crecimiento, desarrollo, metabolismo de fitohormonas, procesos de señalización celular, regulación de la homeostasis redox, transporte de metabolitos secundarios, y apoptosis. (Dalle-Donne et al., 2007; Dixon et al., 2005; Zaffagnini et al., 2012).

Sistema antioxidante no enzimático

Los sistemas antioxidantes no enzimáticos más relevantes están compuestos por vitaminas y micronutrientes, actuando generalmente a concentraciones elevadas (Sies & Stahl, 1995). Entre estos compuestos destacan el AsA y el GSH, compuestos fenólicos, carotenoides, y tocoferoles (Gill & Tuteja, 2010; Ortega et al., 2017).

- **Ascorbato**

El ascorbato, o L-ácido ascórbico (AsA, L-AA, L-treo-hexenon-1,4-lactona, o vitamina C) es uno de los compuestos antioxidantes más abundantes en las células y es uno de los responsables de evitar o controlar el daño causado por ROS en plantas. Suele estar más concentrado en hojas, si bien es cierto que los niveles de AsA dependen de la edad del organismo o tejido (Potters et al., 2002). Cuando la planta es joven y se encuentra en fase de crecimiento, los niveles de AsA son elevados, ya que su síntesis se produce de manera continua (De Gara et al., 2000; De Pinto et al., 1999, 2000). Sin embargo, a medida que la planta va envejeciendo, el contenido de AsA del apoplasto se ve disminuido sustancialmente (Takahama et al., 1999). El metabolismo del AsA está relacionado con la regulación del ciclo celular, debido a que la división celular necesita AsA, y éste promueve el progreso del ciclo celular (Potters et al., 2002), favoreciendo la transición a la fase S.

Para que el AsA funcione correctamente, y sea capaz de eliminar el H_2O_2 , es necesario que se encuentre en estado reducido. Es capaz de donar electrones en una serie de reacciones enzimáticas y no enzimáticas, eliminando directamente el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y OH^- formando la primera forma oxidada del AsA, el MDHA, que es un radical poco reactivo (Bielski et al., 1975), que posteriormente dará lugar a una molécula de AsA, y otra de DHA. La regeneración del AsA es vital para el mantenimiento de la homeostasis redox celular, ya que el DHA tiene una vida media corta, y desaparece si no se reduce nuevamente hasta AsA (Anjum et al., 2014; Mittler, 2002). El sistema redox de AsA está formado por AsA, MDHA y DHA. El DHA puede ser reducido por GSH hasta AsA, interconectando este ciclo con el del otro compuesto antioxidante vital en las células, el GSH.

- **Glutación**

El Glutación (GSH, γ -L-glutamyl-L-cisteinyl-glicina) es un tripéptido de glutamato (glu), cisteína (cys) y glicina (gly) no proteico con grupo tiol. Es muy abundante en el citoplasma de las células, donde tiene gran importancia en la defensa antioxidante, participando en el ciclo AsA-GSH (Foyer, 2001; Noctor & Foyer, 1998). Puede encontrarse en forma reducida (GSH) o en forma oxidada (GSSG), es decir, puede donar o aceptar electrones. Su oxidación provoca que dos moléculas de GSH se unan por un puente disulfuro, dando lugar al GSSG (Foyer & Noctor, 2011; Mittler, 2002; Noctor et al., 2012)

El GSH es uno de los metabolitos de las plantas considerados clave en la defensa intracelular contra el daño oxidativo inducido por ROS, presentando una alta capacidad para donar electrones (Foyer & Noctor, 2011; Mittler, 2002; Noctor et al., 2012). La mayor parte del glutación total de la célula se encuentra como GSH. Las células se protegen del estrés oxidativo y nitrosativo aumentando los niveles basales de GSH (Chatterjee et al., 2000). La subida o bajada en los niveles de GSH puede incrementar la susceptibilidad al estrés oxidativo y puede facilitar la señalización redox en procesos importantes como la interacción de incompatibilidad planta-patógeno o en la muerte celular programada (PCD) (Foyer & Noctor, 2005).

La regeneración de la forma reducida, GSH, depende del consumo de NAD(P)H. También actúa como compuesto de transporte a larga distancia de azufre reducido, y está implicado en los procesos de transducción de señales (Puppo et al., 2005).

La síntesis de GSH tiene lugar en el citosol y en el cloroplasto, y en ella intervienen dos enzimas: la γ -glutamylcisteína sintasa (γ -ECS), y glutación sintasa (GS). En primer lugar, la γ -ECS sintetiza γ -glutamylcisteína a partir de glutamato, cisteína, y ATP; y, posteriormente, la GS cataliza la adición de una molécula de glicina al extremo C-terminal del dipéptido anterior, con la consiguiente formación de GSH. Se localiza en todos los compartimentos celulares, incluido el apoplasto y desempeña un papel central en diferentes procesos fisiológicos:

eliminando ROS, actuando como señalizador endocelular y también regulando la expresión de genes sensibles al estrés. El GSH es el compuesto no proteico más abundante en las células eucariotas. El balance GSH/GSSG es un componente central en el mantenimiento del estado redox celular. El GSH es necesario para mantener el estado reducido normal de las células, a fin de contrarrestar los efectos inhibidores del estrés oxidativo inducido por ROS. GSH es capaz de eliminar la totalidad de especies de ROS y actúa también en el sistema de regeneración de AsA, mediante el ciclo AsA-GSH. En el ciclo AsA-GSH actúa como antioxidante, eliminando H₂O₂ intracelular, pero también puede reaccionar directamente con ¹O₂ y OH[·]. Finalmente, el GSH es precursor de las fitoquelatinas, claves para el control de la concentración de metales pesados a nivel celular (Seregin & Kozhevnikova, 2023).

- **Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos tienen actividad antioxidante (Michalak, 2006). Así, los polifenoles pueden eliminar directamente ROS, y pueden inhibir la peroxidación lipídica de las membranas mediante la eliminación de radicales alcoxilos. Los compuestos fenólicos, especialmente los flavonoides (Gill & Tuteja, 2010), tienen una gran capacidad de modificar el empaquetamiento de los lípidos y disminuir la fluidez de las membranas (Arora et al., 2000). Estos cambios afectan a la capacidad de ROS para difundir a través de ellas, y de esta manera disminuyen las reacciones de peroxidación. Los flavonoides pueden eliminar directamente ROS debido a su capacidad de donar electrones o átomos de hidrógeno. Los flavonoides y fenilpropanoides son oxidados por peroxidasas (APX y POX), y de esa manera, eliminan el H₂O₂ por medio de sistema formado por compuestos fenólicos/AsA/POX (Jung et al., 2003; Winkel-Shirley, 2002).

- **Carotenoides**

Los carotenoides también se conocen como vitamina E. Son compuestos antioxidantes fenólicos que están presentes tanto en plantas como en animales.

Son compuestos liposolubles capaces de detoxificar diversas formas de ROS (Gill & Tuteja, 2010). Contienen una cadena de residuos de isopreno con numerosos dobles enlaces conjugados que permiten la captura de moléculas excitadas como ROS. Se forman en los cloroplastos y desempeñan funciones de protección del fotosistema. Actúan como inhibidores de la peroxidación lipídica, y se encuentran en los lípidos de membrana y en lipoproteínas de baja densidad, debido a su carácter hidrofóbico (Soll et al., 1985).

- **Tocoferoles**

Son antioxidantes solubles en lípidos capaces de actuar secuestrando ROS y radicales lipídicos altamente reactivos. Se les considera como antioxidantes de las biomembranas, a las que confieren estabilidad al evitar los daños por peroxidaciones lipídicas. Los tocoferoles se localizan en la membrana tilacoidal de las plantas (Gill & Tuteja, 2010).

1.2.2. Especies reactivas del nitrógeno (RNS)

1.2.2.1. Generalidades y tipos

Las RNS constituyen un conjunto de radicales libres y no radicales, que derivan del óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$). Se producen en condiciones de estrés, dando lugar al estrés nitrosativo. Intervienen en la regulación de procesos fisiológicos (germinación, desarrollo, crecimiento, reproducción, senescencia), de interacción con microorganismos como la simbiosis leguminosa-*Rhizobium*, la respuesta a factores bióticos y el estrés nitrosativo (Chamizo-Ampudia et al., 2017; Fu et al., 2018)

El $\bullet\text{NO}$ y sus derivados intervienen en las respuestas de las plantas a multitud de estreses abióticos como la salinidad, la alta intensidad luminosa, baja y alta temperatura, luz continua, oscuridad continua, daño mecánico (Corpas et al., 2008a; Corpas et al., 2009; Valderrama et al., 2007), sequía, y metales pesados (Domingos et al., 2015; Fu et al., 2018; Yu et al., 2014).

Se considera que la planta sufre un estrés nitrosativo cuando hay una síntesis desregulada o sobreproducción de $\cdot\text{NO}$ y sus derivados que pueden tener consecuencias fisiológicas tóxicas (Corpas et al., 2007). El aumento en la nitración de la tirosina (tyr) de las proteínas podría ser un buen marcador para evaluar un proceso de estrés nitrosativo (Chaki et al., 2011; Corpas et al., 2008a; Valderrama et al., 2007).

Las principales RNS en plantas incluyen radicales libres como $\cdot\text{NO}$, dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$), y no radicales; como S-nitrosotioles (RSNOs), peroxinitrito (ONOO^-), anión nitroxilo (NO^-), catión nitrosonio (NO^+), trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), tetróxido de dinitrógeno (N_2O_4), y ácido nitroso (HNO_2) (Figura 11 y 12A) (Augusto et al., 2002; Del Río, 2015; Halliwell, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2015; Khan et al., 2023).

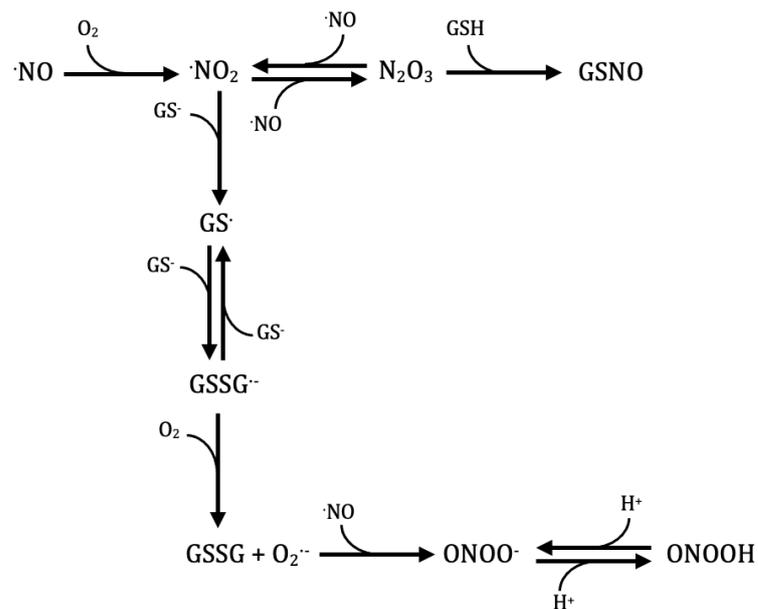


Figura 11: Especies reactivas del nitrógeno (RNS). $\cdot\text{NO}$, óxido nítrico; $\cdot\text{NO}_2$, dióxido de nitrógeno; N_2O_3 , trióxido de dinitrógeno; GSNO, S-nitrosoglutatión; ONOO^- , peroxinitrito; ONOOH , ácido peroxinitroso. (Modificado de Halliwell & Gutteridge, 2015).

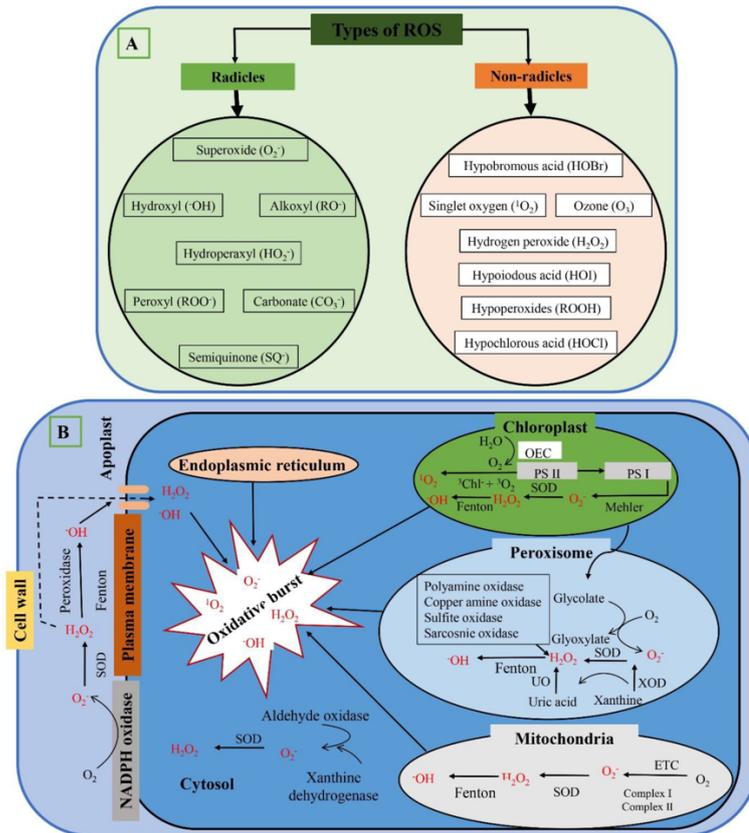


Figura 12. (A) Tipos de RNS. (B) Rutas de síntesis de •NO y (C) lugar de producción del •NO (Khan et al., 2023).

- Óxido nítrico (•NO)

Es un gas inorgánico incoloro y muy lábil, de bajo peso molecular, con un electrón desapareado en su capa exterior, por lo que posee las características de un radical, y explica su elevada reactividad y su tendencia a unirse con hemoproteínas reducidas. El •NO es inestable en medio acuoso, mientras que en presencia de O₂ se oxida a nitritos y nitratos, formas más estables. Es ligeramente soluble en H₂O y algo más soluble en solventes orgánicos, tiene una vida media de menos de 6 segundos (Thomas et al., 2001). Puede encontrarse en tres formas convertibles entre sí: •NO, NO⁻ y NO⁺ (Wojtaszek, 2000).

En mamíferos, el •NO se genera a partir de la arginina (arg) por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). En plantas, el •NO se puede sintetizar por rutas enzimáticas

oxidativas o reductoras que se detallarán más adelante. Este proceso se desarrolla en cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas, citoplasma o apoplasto (Figura 12) (Khan et al., 2023). El $\cdot\text{NO}$ tiene funciones importantes en el crecimiento y desarrollo, germinación de semillas, crecimiento de las raíces primarias y laterales, floración, maduración de frutos, senescencia y estrés abiótico, además de ser una molécula señal en procesos intracelulares (Besson-Bard et al., 2008; Lamattina et al., 2003; Neill et al., 2008).

El $\cdot\text{NO}$ puede interactuar con diferentes biomoléculas causando cambios postraduccionales, como los que se citan a continuación. La S-nitrosación, que es la unión del $\cdot\text{NO}$ al grupo tiol de la cisteína, formando RSNO. La S-nitrosilación de metales, cuando el $\cdot\text{NO}$ reacciona con metales de transición. La nitración de tirosina mediada por el ONOO^- , y la nitración de ácidos grasos insaturados formando ácidos nitrograsos (Figura 13) (Sun et al., 2021). Estos cambios postraduccionales pueden modificar la formación de un gran número de proteínas (Lindermayr & Durner, 2009; Wang et al., 2006). Especialmente importante es la S-nitrosilación GSH para formar el GSNO, ya que esta molécula puede funcionar como reserva móvil del $\cdot\text{NO}$ y puede regular el equilibrio entre GSNO y las proteínas nitrosiladas por un proceso de transnitrosilación (Barroso et al., 2006).

- **Peroxinitrito (ONOO^-)**

Se produce por una reacción no enzimática entre el $\cdot\text{NO}$ y el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), y tiene un papel importante en procesos fisiológicos tanto en células animales como en plantas (Halliwell & Gutteridge, 2015; Vandelle & Delledonne, 2011).

El ONOO^- es un oxidante fuerte, actúa sobre los tioles de los residuos de cisteína que forman parte de las proteínas (Pacher et al., 2007), inhibiendo, la tirosina fosfatasa, que contiene tioles, antioxidantes enzimáticos y cisteín-proteasas. El ONOO^- , como se indicó anteriormente, también modifica las proteínas mediante la nitración de la tirosina (Chaki et al., 2011; Corpas et al., 2009).

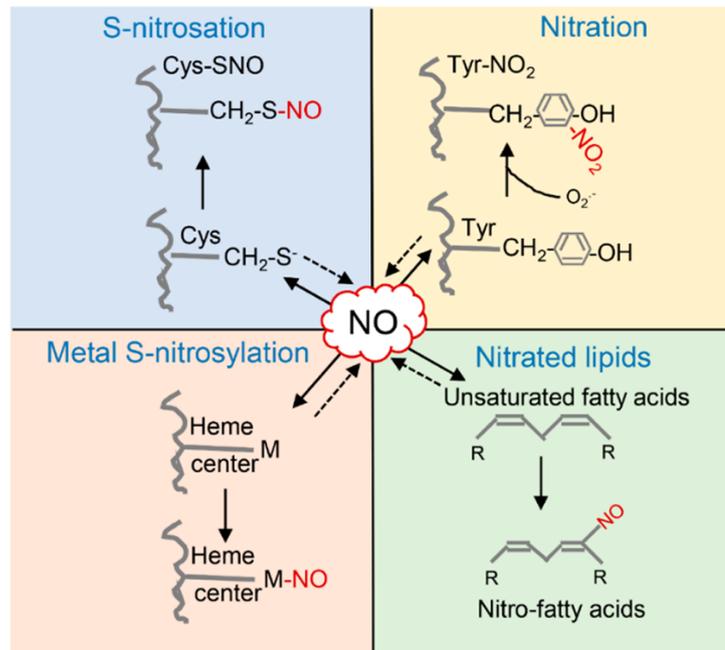


Figura 13. Modificaciones postraduccionales dependientes de $\bullet\text{NO}$ (Sun et al., 2021).

- S-nitrosotioles (RSNOs)

Los S-nitrosotioles (RSNOs) son producto de la interacción postraduccionales del $\bullet\text{NO}$ con los grupos tiol (-SH) presentes en los residuos de cisteína de péptidos y proteínas (Figura 12) (Broniowska & Hogg, 2012; Jourdeuil et al., 2005). Constituyen un mecanismo de señalización fisiológico esencial (Gow et al., 2004), que ocurre a través de la nitrosación, altamente regulada (Wynia-Smith & Smith, 2017), no tienen carácter permanente y constituyen una etapa en la formación de enlaces disulfuro (Wolhuter & Eaton, 2017).

La formación de RSNOs provoca la activación/inactivación de algunas vías biológicas mediante la supresión, la activación y la modulación alostérica de la función enzimática (Molina y Vedia et al., 1992), el inicio de la apoptosis (Hara et al., 2005), la promoción/supresión de la degradación proteosómica (Brüne & Zhou, 2007; Hara et al., 2005), y la regulación de la actividad de factores de transcripción (Hausladen et al., 1996; Matthews et al., 1996), así como alteraciones epigenéticas mediante metilación de DNA (Sen & Snyder, 2011) y acetilación de histonas (Nott et al., 2008).

Las funciones esenciales de señalización del RSNO son ubicuas en todos los reinos, habiéndose demostrado su participación en señalizaciones tan diversas como la transcripción bacteriana (Hausladen et al., 1996), la inmunología vegetal (Yu et al., 2012), la transmisión nerviosa en mamíferos (Fang et al., 2000) y las vías apoptóticas dependientes e independientes de las mitocondrias (Hara et al., 2005; Kim & Tannenbaum, 2004). Se ha demostrado que la terminación del efecto RSNO por desnitrosación ocurre fácilmente *in vivo* (Beigi et al., 2012; Sengupta et al., 2007). A pesar del gran número de residuos de cisteína que existe en los compartimentos celulares, la S-nitrosilación es un proceso altamente selectivo (Iyer et al., 2014).

La complejidad de la señalización por RSNO puede apreciarse considerando los efectos de la S-nitrosilación en las vías celulares. Esto es más evidente en los procesos de muerte celular, que pueden ser tanto activados como inactivados por el \bullet NO a través de la S-nitrosilación (Iyer et al., 2014).

El GSNO es producto de la nitrosación del GSH. Además, es el RSNO de bajo peso molecular más abundante en plantas, y constituye una reserva celular de \bullet NO. El \bullet NO es capaz de unirse a proteínas mediante los grupos tiol, formando proteína-RSNO (Fruñillo et al., 2014). La enzima implicada en la movilización de \bullet NO desde la reserva del GSNO es la S-nitrosoglutatión reductasa (GSNOR).

1.2.2.2. Biosíntesis y movilización de \bullet NO

Existen varias vías enzimáticas propuestas para la formación de \bullet NO en plantas, unas reductoras y otras oxidativas (Figura 12B y 14). En cuanto a las rutas reductoras, destacan; Nitrato reductasa (NR), y Nitrito-NO reductasa (NiNOR). En las rutas oxidativas, destaca la NO sintasa (NOS) (Rockel et al., 2002; Tun et al., 2006).

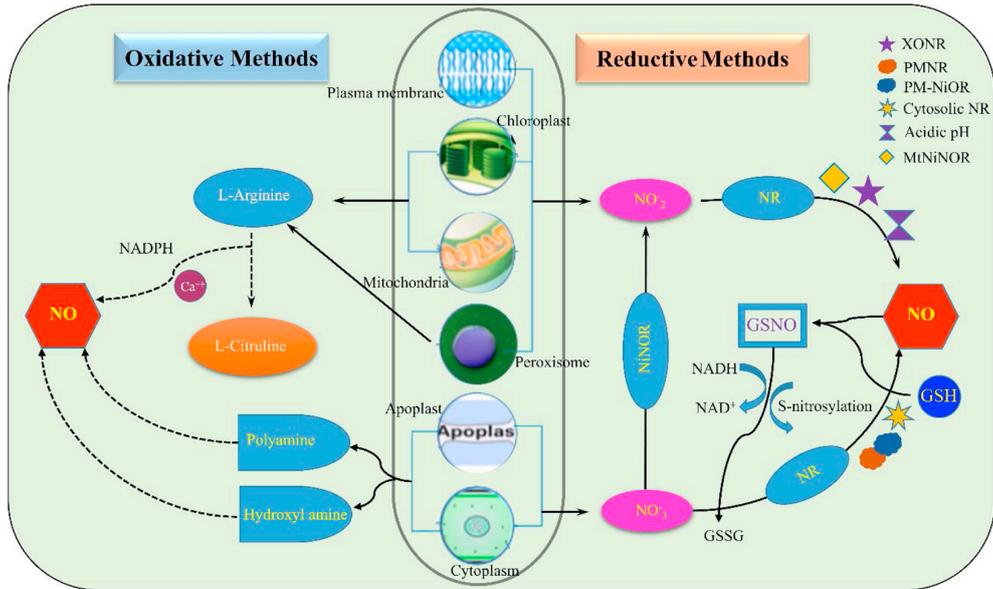
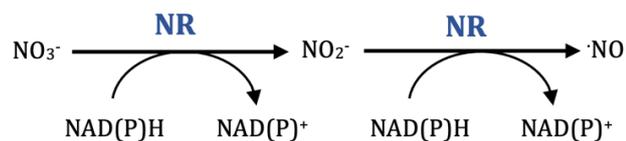


Figura 14: Principales fuentes de \bullet NO y los diferentes mecanismos implicados en su síntesis (Nabi et al., 2019).

- Nitrato reductasa (NR)

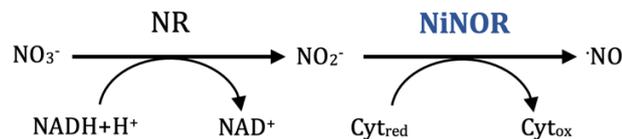
Es una enzima clave en la asimilación de nitrógeno. Es un homodímero, donde cada monómero posee tres dominios de unión a grupos prostéticos, que tienen función en la transferencia electrónica: FAD (dinucleótido de adenina y flavina), Hemo y MoCo (Pterina complejo de molibdeno) (Campbell, 1999). La enzima NR se localiza en el citosol, y genera \bullet NO tras catalizar la reducción de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), y de NO_2^- a \bullet NO, empleando NAD(P)H como donador de electrones (Yamasaki, 2000).



Es la principal enzima para la síntesis de \bullet NO en condiciones normales de O_2 . Interviene en procesos de desarrollo, movimientos estomáticos y estrés biótico y abiótico (Astier et al., 2018; Chamizo-Ampudia et al., 2017; Yu et al., 2014).

- Nitrito NO-reductasa (NiNOR)

Se ha identificado una NR unida a la membrana plasmática (PM-NR) específica de la raíz y una Nitrito NO-reductasa (NiNOR) que participan en la producción de •NO bajo condiciones de hipoxia o anoxia. El NO_2^- formado por la NR pasa a •NO en el apoplasto de las células, no utilizando NAD(P)H como donante de electrones. Esta actividad se ha estudiado en *Nicotiana tabacum* L., observándose producción de •NO a partir de NO_2^- en raíces, pero no en hojas. En estudios realizados *in vitro*, NiNOR utiliza el citocromo c como donante de electrones, pero aún no ha sido clonado y completamente identificado (Moreau et al., 2010; Stöhr & Stremlau, 2006; Stöhr & Ullrich, 2002; Wilson et al., 2008).



Su actividad depende de una baja presión de O_2 y funcionaría junto con una NR apoplástica unida a una membrana que proporcionaría NO_2^- a partir de NO_3^- (Stöhr & Stremlau, 2006; Stöhr & Ullrich, 2002). Es posible que el sistema NR:NiNOR unido a la membrana plasmática esté involucrado en la detección de la disponibilidad de nitratos en el suelo (Meyer & Stöhr, 2002). Además, recientemente se han descrito evidencias de que NiNOR interviene en la producción de •NO durante la interacción raíz-hongos micorrízicos (Moche et al., 2010).

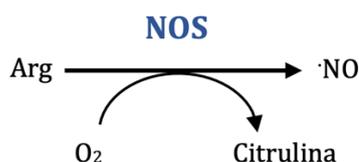
- Óxido nítrico sintasa (NOS)

La primera NOS del reino vegetal se identificó en *Ostreococcus tauri*, un alga verde. Esta enzima presenta homología de secuencia con la NOS humana, y contiene sitios de unión para FAD, FMN (flavín mononucleótido) y CaM (calmodulina), así como para L-arg, además de un sitio de unión a NADPH. Esta enzima produce •NO a partir de L-arg, de manera similar a las NOS animales,

habiéndose demostrado su papel en la respuesta al estrés en *O. tauri* (Foresi et al., 2010).

Mediante análisis genómicos en más de 1300 plantas, se han identificado las secuencias que contienen las características de NOS en animales y los sitios de unión de los cofactores. Sin embargo, no se han encontrado homólogos de la secuencia de NOS en ninguno de los más de 1000 transcriptomas de plantas terrestres estudiados (Jeandroz et al., 2016). Estos resultados, junto con su falta de purificación, indican que las NOS canónicas probablemente no existan en embriófitos, habiéndose perdido en las plantas terrestres (Jeandroz et al., 2016; Santolini et al., 2017).

La ausencia de NOS canónico en las plantas terrestres cuestiona la existencia de la actividad de NOS en las plantas. De hecho, varios estudios sugirieron la existencia de una ruta oxidativa para la producción de $\cdot\text{NO}$, la llamada actividad similar a la NOS. Se ha descrito la existencia de una actividad similar a la NOS en varias plantas, como maíz, guisantes, tabaco y altramuza (Astier et al., 2018). Sin embargo, estos resultados han sido cuestionados por la metodología que fue empleada, similar en todos los casos. Posteriormente, esta actividad se confirmó en plantas utilizando otras técnicas que miden directamente la producción de $\cdot\text{NO}$ (Astier et al., 2018). Se concluyó que esta actividad depende de la presencia de arginina y NADPH, y de varios cofactores de NOS. Se ha propuesto su localización en los cloroplastos o en los peroxisomas, pero aún no se ha obtenido una información clara con respecto a la actividad enzimática. Más importante aún, aún quedan por identificar las enzimas correspondientes (Barroso et al., 1999; Corpas & Barroso, 2014a; Jasid et al., 2006).



- S-Nitrosoglutatión reductasa (GSNOR)

Se trata de una enzima alcohol deshidrogenasa de tipo III, conservada en procariontes y eucariotes. Es la encargada de promover la movilización del $\bullet\text{NO}$. Cataliza la reducción dependiente de NADH de GSNO a GSSG y NH_3 , regulando el nivel de GSNO y, en consecuencia, la homeostasis celular del RSNO (Leterrier et al., 2011; Sakamoto et al., 2002). Esta actividad es necesaria para el desarrollo normal en condiciones óptimas de crecimiento (Kubienová et al., 2013; U. Lee et al., 2008; Xu et al., 2013).

1.2.3. Especies reactivas del azufre (RSS)

1.2.3.1. Generalidades y tipos

Las especies reactivas del azufre (RSS) son compuestos redox capaces de reducir u oxidar biomoléculas en condiciones fisiológicas (Giles & Jacob, 2002). Estas RSS se producen también en condiciones de estrés oxidativo e interaccionan con proteínas celulares, provocando que la fisiología celular se vea alterada (Gruhlke, 2019). Se consideran especies reactivas de segunda generación ya que mediante la interacción con ROS los átomos de azufre unidos a moléculas celulares se oxidan.

Hay una gran variedad de estados de oxidación del azufre, desde -2 a +6, dando lugar a las diferentes especies reactivas (Figura 15) entre las que encontramos radicales como el radical tiilo (R-S), sulfinilo (R-S-O) y sulfoxilo (R-S=O) y no radicales como el tiol (R-SH). A partir del mismo se forman diversas RSS como tiolato (R=S-), ácido sulfénico (R-S-OH), ácido sulfinico (RSO(OH)) y ácido sulfónico ($\text{H-S(=O)}_2\text{-OH}$) conteniendo todos ellos un único átomo de azufre. Por el contrario, contienen dos átomos de azufre el disulfuro (S_2^{2-}), el tiosulfinato (RS(=O)-SR) o disulfuro-S-monóxido, el tiosulfonato ($\text{R-SO}_2\text{-SR}$) o disulfuro-S-dióxido, el disulfuro-trióxido ($\text{R-SO}_2^-(\text{O=})\text{-SR}$) y la disulfona ($\text{R-SO}_2^-\text{SO}_2\text{-R}$) (Gruhlke, 2019).

En células que no están en condiciones de estrés, la mayoría del azufre libre se encuentra en estado reducido, en forma de tioles, aunque también puede encontrarse formando

puentes disulfuro, en estado (más) oxidado (Gruhlke, 2019). Las RSS pueden ser generadas desde el sulfuro de hidrógeno (H_2S), que es un transmisor gaseoso que, a altas concentraciones, se considera perjudicial para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Sin embargo, a bajas concentraciones, desarrolla funciones beneficiosas (Li, 2013). El H_2S está involucrado en procesos fisiológicos, como la germinación de semillas, crecimiento, organogénesis, conductancia estomática y senescencia. Además, es posible su aplicación exógena, favoreciendo procesos metabólicos y antioxidantes en plantas sometidas a estrés (Hancock, 2019; Huang et al., 2021b; Liu et al., 2024). Esta molécula interactúa con las fitohormonas; auxinas, ácido abscísico, etileno, giberelinas, etc., participando en transducción de señales de moléculas como el $\cdot\text{NO}$, CO , H_2O_2 , etc. (Arif et al., 2021).

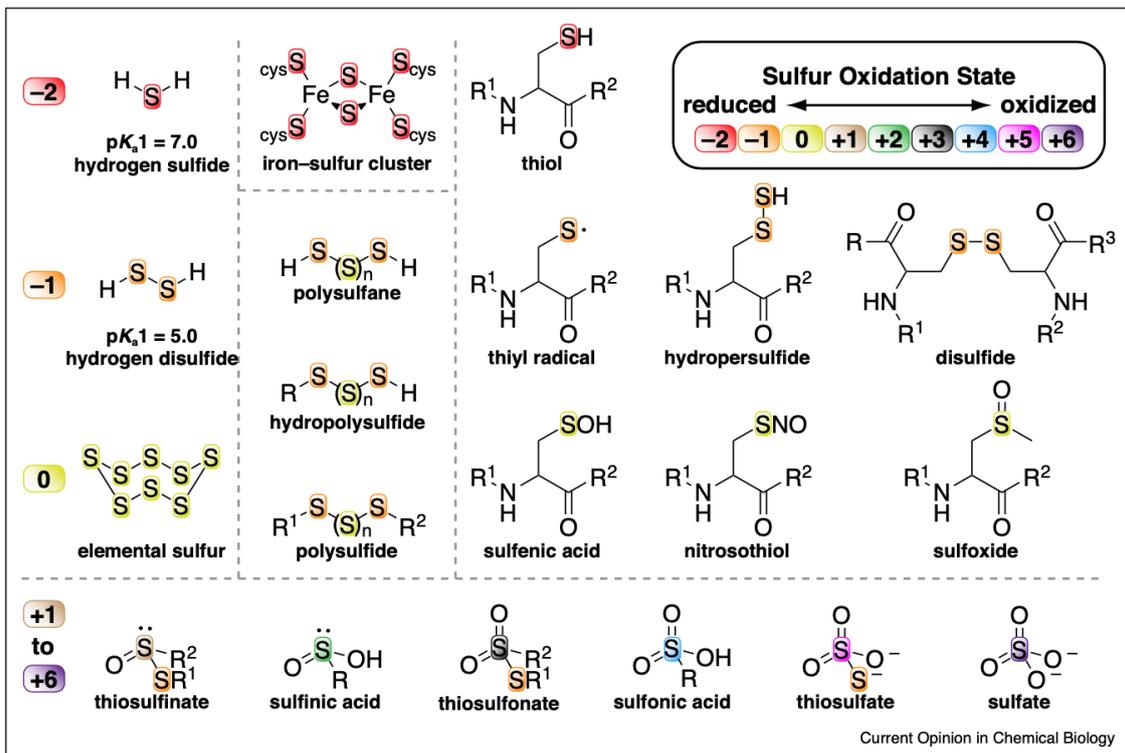


Figura 15. Estados de oxidación del azufre de las RSS más relevantes (Lau & Pluth, 2019).

1.2.3.2. Biosíntesis de H₂S

La biosíntesis de H₂S en la planta ocurre por la vía de asimilación de sulfato (SO₄²⁻). La principal forma de obtener azufre por las plantas es mediante la absorción de SO₄²⁻ del suelo a través de las raíces, aunque también pueden absorber H₂S atmosférico a través de las hojas (Liu et al., 2021; Saito, 2004). Una vez en el interior de la planta, el SO₄²⁻ puede ser almacenado en las vacuolas de las células de las raíces y hojas, o bien ser asimilado en el cloroplasto. La cantidad de SO₄²⁻ que se almacena o se asimila está controlada por las concentraciones de cisteína y GSH (Bolchi et al., 1999). En la figura 16 se muestra la absorción del SO₄²⁻ y su utilización en la célula vegetal hasta la formación de H₂S, indicando la compartimentalización.

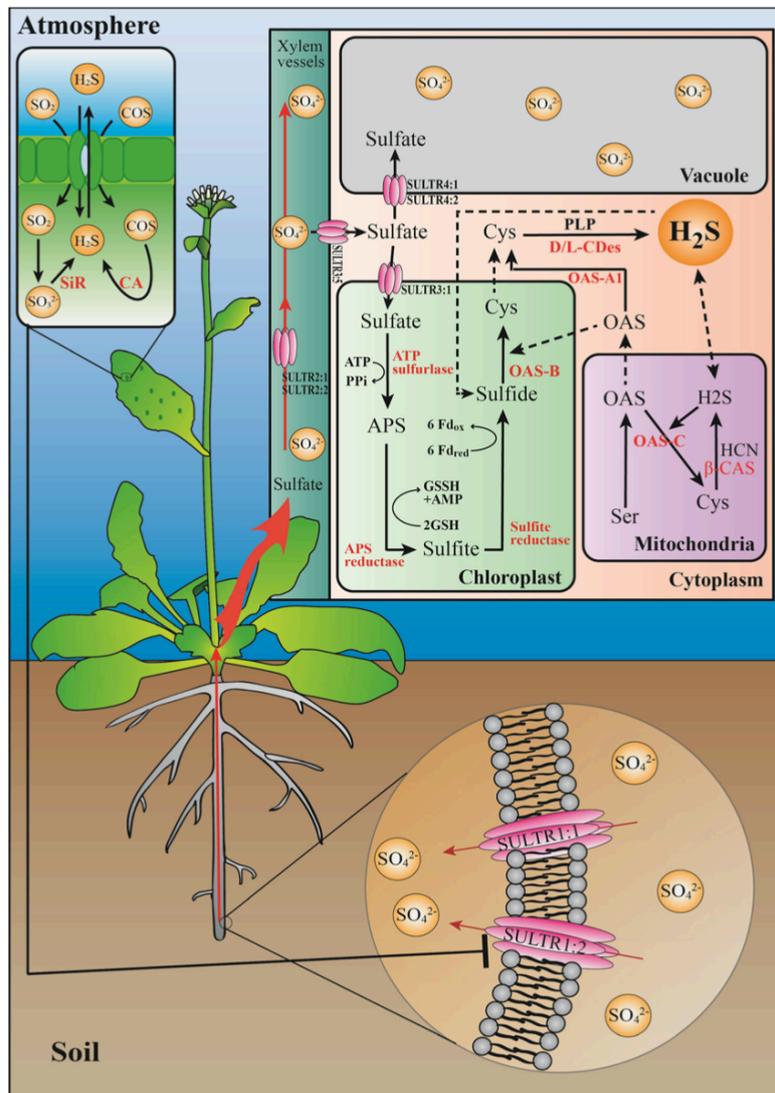


Figura 16: Esquema de la absorción de SO₄²⁻ y H₂S procedente del suelo y la atmósfera, y la biosíntesis de H₂S por parte de la planta (Liu et al., 2021)

El SO_4^{2-} se activa mediante la ATP-sulfurilasa (ATPS; EC 2.7.7.4), obteniéndose adenosina 5'-fosfato (APS). Posteriormente se reduce a SO_3^{2-} gracias a la actividad de la APS-reductasa (APR; EC 1.8.99.2) con GSH como molécula reductora (Figura 17). A partir del SO_3^{2-} se puede obtener H_2S por diferentes sistemas enzimáticos.

- **Sulfito reductasa (SiR; EC 1.8.7.1)**

Es una hemoproteína formada por 2-4 subunidades de 70 kDa idénticas, y cada una de ellas contiene un grupo sirohemo y un centro Fe/S como grupo prostético (Krueger & Siegel, 1982). Sólo existe una isoforma de SiR en casi todos los organismos fotosintéticos (Khan et al., 2010), se expresa de forma constitutiva (Bork et al., 1998) y su secuencia peptídica está muy conservada entre todas las plantas (Bermúdez, 2011). Se encuentra en el interior de los cloroplastos (Li et al., 2024; Nakayama et al., 2000).

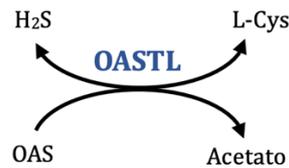
Cataliza la reducción de SO_3^{2-} para dar lugar a H_2S , mediante la transferencia de 6 electrones procedentes de la Fd. En raíces, el donador de electrones es el NADPH, puesto que la fuente principal de Fd es la fotosíntesis (Leustek et al., 2000; Nakayama et al., 2000).



- **O-acetilserin(tiol)liasa (OASTL; EC 2.5.1.47)**

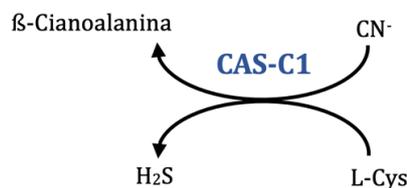
Esta enzima también conocida como cisteína sintasa (CS; EC 4.2.99.8), aunque esta nomenclatura está prácticamente en desuso. Es un homodímero de 60-70 KDa que requiere piridoxal 5'-fosfato (PLP) como cofactor para su actividad catalítica (Saito, 2004). Las proteínas de esta familia poseen dominios conservados, involucrados en la unión al PLP, en la unión al sustrato O-acetil serina (OAS), en la incorporación del H_2S y en la interacción con serina acetil transferasa (SAT).

Las isoformas OASTL mayoritarias son OAS-A1, OAS-B y OAS-C, implicadas en la biosíntesis de cisteína a partir de OAS y H₂S (Bonner et al., 2005). Se encuentran en el citosol, cloroplastos, y mitocondrias. Recientes estudios indican que, aunque su función principal es la síntesis de L-cys, a partir de H₂S, también puede catalizar la reacción inversa (Arif et al., 2021; Li et al., 2024).



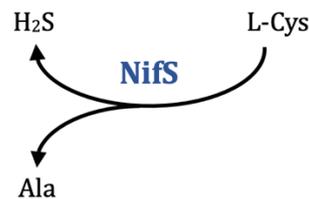
- **β-Cianoalanina sintasa (CAS-C1; EC 4.4.1.9)**

Se localiza en las mitocondrias y se caracteriza por poseer actividad β-cianoalanina sintasa (CAS) (Hatzfeld et al., 2000; Li et al., 2024; Yamaguchi et al., 2000). Cataliza la conversión de cisteína (L-cys) y cianuro (CN⁻), que es un inhibidor de la respiración mitocondrial, en H₂S y β-cianoalanina. El H₂S producido en esta reacción es utilizado como sustrato para la formación de cisteína por la OAS-C en mitocondrias. Así, se genera un ciclo donde la OAS-C sintetiza L-cys, que es usada a su vez por la CAS-C1 para detoxificar el CN⁻ y en cuya reacción se forma H₂S, que cierra el ciclo incorporándose a la ruta de síntesis de cisteína por OAS-C (Álvarez, et al., 2012c; Arif et al., 2021).



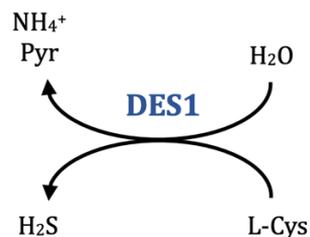
- Cluster de proteínas nitrogenasas Fe-S (NifS-like proteins)

Es un grupo de proteínas con actividad cisteína desulfurasa. Catalizan la conversión de cisteína en alanina (ala), y H₂S, empleando PLP como cofactor (Zheng et al., 1993). Se encuentran en mitocondrias, cloroplastos y citosol. Proporcionan azufre para la biosíntesis de las agrupaciones sulfo-férricas de algunas proteínas y para la formación de biotina, tiamina y el cofactor de molibdeno (Heidenreich et al., 2005; Kushnir et al., 2001; León et al., 2002; Pilon-Smits et al., 2002).



- L-cisteína desulfhidrasa (L-DES; EC 4.4.1.1)

DES1 es una L-DES localizada en el citosol. Cataliza la desulfuración de la cisteína, liberando H₂S, piruvato (pyr) y NH₄⁺ (Álvarez et al., 2010). Se ha demostrado que es esencial para mantener la homeostasis de cisteína, así como para modular la concentración de H₂S en el citosol, importante en procesos de señalización celular (Álvarez, et al., 2012a, 2012b; Romero et al., 2013). La acción coordinada de OAS-A1 y DES1 en el citosol es esencial para mantener una baja concentración de cisteína en la célula, ya que a elevadas concentraciones puede ser tóxica, debido a su alto poder reductor (Romero et al., 2014).

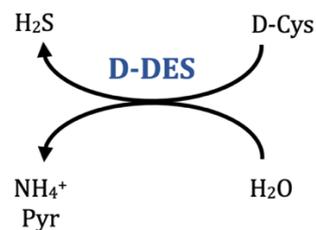


En condiciones alcalinas en el estroma del cloroplasto, las plantas transportan espontáneamente HS⁻ (una forma disociada de H₂S) al citoplasma (citosol). Con

PLP como cofactor, la L/D-cisteína es catalizada por la L/D-DES para producir piruvato, NH_4^+ y H_2S en el citoplasma, los cloroplastos y las mitocondrias (Yang et al., 2022).

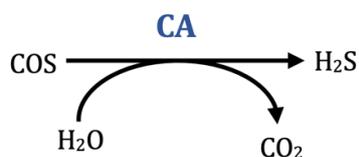
- **D-cisteína desulfhidrasa (D-DES; EC 4.4.1.15)**

Se encuentra en el citoplasma y las mitocondrias. Tiene funciones similares a la L-DES, pero diferentes propiedades fisiológicas. Está codificada por el gen DCD1 que aumenta su expresión y, en consecuencia, incrementa el contenido de H_2S , al sufrir estrés por metales pesados y salinidad (da-Silva et al., 2018). La degradación de la cisteína en diferentes compartimentos subcelulares requiere la participación de PLP, que produce H_2S , NH_4^+ y piruvato en una proporción de 1:1:1. El papel fisiológico de la D-cys y de la actividad D-DES están todavía por clarificar (Papenbrock et al., 2007).



- **Anhidrasa carbónica (CA; EC 4.2.1.1)**

Cataliza la hidrólisis de sulfuro de carbonilo (COS) para producir CO_2 y H_2S . Las plantas absorben COS del aire y logran un uso eficiente de la asimilación de azufre a través de CA, que también puede ser una fuente de H_2S endógeno en la planta (Bloem et al., 2011; Li et al., 2024; Yamasaki & Cohen, 2016).



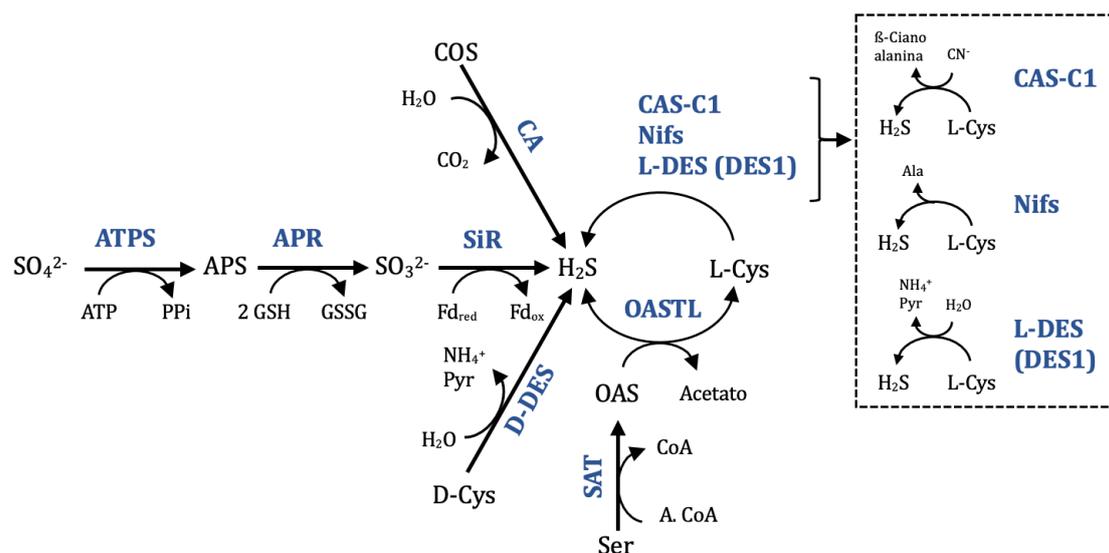


Figura 17: Enzimas implicadas en la formación del sulfuro de hidrógeno (H_2S). La enzima ATP sulfurilasa (ATPS) activa el ión sulfato (SO_4^{2-}) absorbido por las raíces, dando lugar a adenosina 5'-fosfosulfato (APS), con consumo de ATP, y liberación de PPi. La enzima APS-reductasa (APR) emplea GSH para reducir el APS a sulfito (SO_3^{2-}), que a su vez es reducido a H_2S por la sulfito reductasa (SiR), gracias a la ferredoxina (Fd). La D-cisteína desulfhidrasa (D-DES) cataliza la síntesis de H_2S a partir de la hidrólisis de D-cisteína (D-cys), amonio (NH_4^+) y piruvato (pyr). La anhidrasa carbónica (CA) cataliza la hidrólisis del sulfuro de carbonilo (COS), produciendo H_2S , y liberando CO_2 . La enzima serina acetil transferasa (SAT) consume Acetil coenzima A (A. CoA), para catalizar la conversión de serina (ser) en CoA, y O-Acetil serina (OAS), que, junto con el H_2S , será empleado por la O-Acetil serina(tiol)liasa (OASTL), liberando acetato y L-cisteína (L-cys). La OASTL puede catalizar también la síntesis de H_2S a partir de L-cys. Esa L-cys será utilizada por la β -cianoalanina sintasa (CAS-C1), clúster de proteínas nitrogenasas Fe-S (Nifs), y L-cisteína desulfhidrasa (L-DES) para producir H_2S . La enzima CAS-C1 emplea L-cys y cianuro (CN^-) para producir β -cianoalanina y H_2S . Las Nifs transforman la L-cys en Ala, liberando como producto de reacción H_2S . Por último, la L-DES, provoca la desulfuración de la L-cys, mediante hidrólisis, produciendo H_2S , NH_4^+ y pyr.

1.2.4. Interacción entre ROS, RNS y RSS en el estrés por metales y metaloides

Las plantas han desarrollado estrategias únicas para responder al estrés abiótico mediante adaptación de sus sistemas metabólicos con el objetivo de mantener la homeostasis celular (Apel & Hirt, 2004; Gill & Tuteja, 2010). Como consecuencia, diversos estreses ambientales activan vías de señalización de la célula y respuestas celulares, como son ROS (Miller et al., 2008; Mittler, 2002; Mittler et al., 2004). El estrés oxidativo sucede debido a una acumulación excesiva de ROS bajo varias condiciones de estrés abiótico y puede provocar daño oxidativo, lo que conduce a la muerte celular (Tanou et al., 2009).

El exceso de ROS puede provocar alteraciones a nivel postraduccional como son sulfonilación, carbonilación, glutationilación y nitrosación (Choudhury et al., 2017). La sulfonilación, uno de los principales mecanismos que regula la actividad de muchas enzimas y factores de transcripción (TF) en las plantas, es la oxidación de los grupos sulfhidrilo. Esta oxidación es inducida principalmente por H_2O_2 , que genera ácido sulfénico (R-SOH) que puede conducir a la formación de enlaces disulfuro (S-S) entre los residuos de cisteína que, a su vez, derivan en cambios conformacionales que alteran la actividad proteína/enzima. La "recuperación" de una proteína de este estado oxidado está mediada principalmente por tiorredoxinas (TRX; EC 1.8.1.9), peroxirredoxina (PRX, EC 1.11.1.15) y el sistema GSH, que responden al estrés y regulan la homeostasis redox. Las cadenas laterales que contienen ácido sulfénico son altamente reactivas y pueden formar enlaces covalentes con tioles de bajo peso molecular, como el GSH que da lugar a la S-glutationilación. Esta modificación puede actuar como un regulador redox de las cascadas de transducción de señales y las vías metabólicas (Fratelli et al., 2004). La S-glutationilación puede ser de importancia fisiológica para amortiguar el sistema GSSG/GSH, además de tener funciones reguladoras (Schafer & Buettner, 2001; Simplicio et al., 1998). La carbonilación es la oxidación de residuos, como arg, histidina (his), lisina (lys), prolina (pro) y treonina (Thr), y es otra forma de oxidación de proteínas. La carbonilación de proteínas también puede estar mediada por reacciones indirectas de productos de lipoperoxidación, productos directos de ROS (Tola et al., 2021). La S-nitrosilación, la unión covalente de $\cdot NO$ a los grupos tiol de cisteína, es otra modificación postraduccional que puede regular la función de algunas proteínas durante el estrés. La S-nitrosilación también induce cambios en algunos TF, que afectan su unión al DNA, así como también inactivan la RBOH (Tavares et al., 2014; Yun et al., 2011). Las ROS también pueden actuar como moléculas señalizadoras, las cuales pueden interaccionar con otras vías de señalización, afectando varios procesos fisiológicos de la planta (Mittler et al., 2004; Tola et al., 2021).

El desequilibrio bajo condiciones adversas en la producción y eliminación de RNS lleva a un estrés nitrosativo, muy interrelacionado con ROS a través del $ONOO^-$ y del GSNO (Figura 18) (Corpas et al., 2011; Corpas & Barroso, 2013; Sahay & Gupta, 2017; Wang et al., 2013). Las plantas utilizan ROS y RNS como moléculas también de transducción de la señal durante procesos fisiológicos y celulares fundamentales (Blokhina & Fagerstedt, 2010). La relación entre ROS y RNS es muy estrecha, lo que hace pensar en

la producción de un estrés nitro-oxidativo más que en un estrés oxidativo o un estrés nitrosativo (Corpas & Barroso, 2013). Recientemente, Kohli et al., (2019) han propuesto un modelo de interacción entre el H₂O₂ y el •NO en plantas. Además de la formación de ONOO⁻, el •NO actúa modulando la actividad de enzimas antioxidantes responsables del control de ROS, como la APX, CAT, DHAR, etc. El aumento de •NO, puede reaccionar con ROS y grupos tiol, regulando con ello la expresión de genes de defensa implicados en la eliminación de ROS, y restableciendo el equilibrio redox (Correa-Aragunde et al., 2015; Qiao et al., 2014; Rizwan et al., 2018). Además, el aumento de la producción de ROS y RNS y su interacción podrían actuar sobre los sistemas antioxidantes implicados en la respuesta a los metales pesados, potenciando su actividad y la expresión de genes implicados en estos sistemas de defensa antioxidante (Sahay & Gupta, 2017).

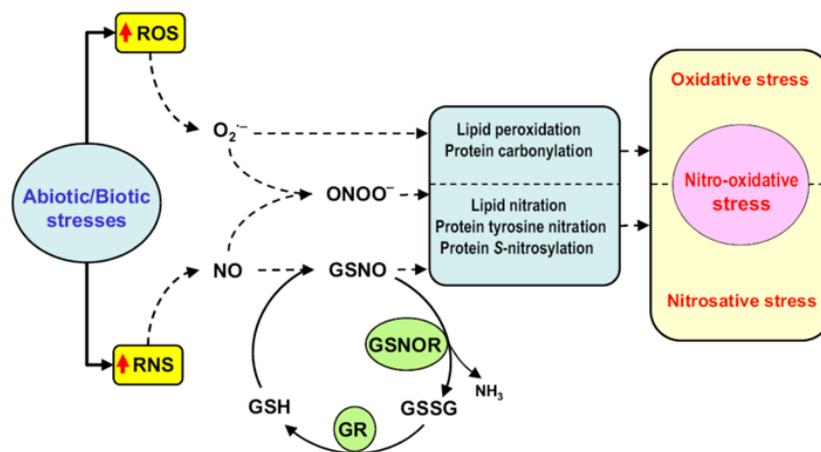


Figura 18: Interacción entre ROS y RNS en respuesta a estreses bióticos y abióticos en células vegetales, que podrían tener asociado un estrés nitro-oxidativo (Corpas & Barroso, 2013).

En cuanto a la interacción RNS y RSS, aunque el •NO es un radical libre y el H₂S es un ácido débil, ambas son moléculas lipofílicas que pueden difundir a través de las membranas celulares y reaccionar con los grupos tiol (-SH). Debido a esto, pueden provocar nitrosación y persulfidación de residuos cisteína de las proteínas. Este proceso depende de reacción previa con H₂O₂ (Figuras 18 y 19). Se considera que el grupo tiol de los residuos de cisteína son interruptores redox que no solo regulan las enzimas susceptibles, sino que también son sensores biológicos efectivos del estado nitrooxidativo celular (Klomsiri et al., 2011; Spadaro et al., 2010).

Los residuos cisteína de las proteínas contienen grupos tiol (-SH) que pueden ser modificados por la unión covalente de $\cdot\text{NO}$ dando lugar a la nitrosación de proteínas (Figura 20). Esta unión depende de factores como la presencia de metales pesados y grupos tiol y AsA. Este proceso de nitrosilación afecta a la funcionalidad de las proteínas (Begara-Morales et al., 2014, 2015; Corpas et al., 2019b). En el caso de la persulfidación de proteínas la reacción se produce con el H_2S , formándose cys-SSH. Las enzimas antioxidantes son dianas de estas reacciones, habiéndose observado cómo la actividad de la APX se ve activada por la nitrosilación y persulfidación, mientras que, por el contrario, la CAT es inhibida por estas modificaciones (Begara-Morales et al., 2014; Yang et al., 2015), lo que evidencia el control del sistema antioxidante por RNS y RSS. Evidenciando de esta forma la actuación de RNS y RSS para aumentar la capacidad de tolerancia al estrés en la planta. También a otras enzimas como la RBOH, la S-nitrosoglutatión reductasa (GSNOR) y la L-DES sufren estas modificaciones (Figura 21) (Corpas et al., 2023).

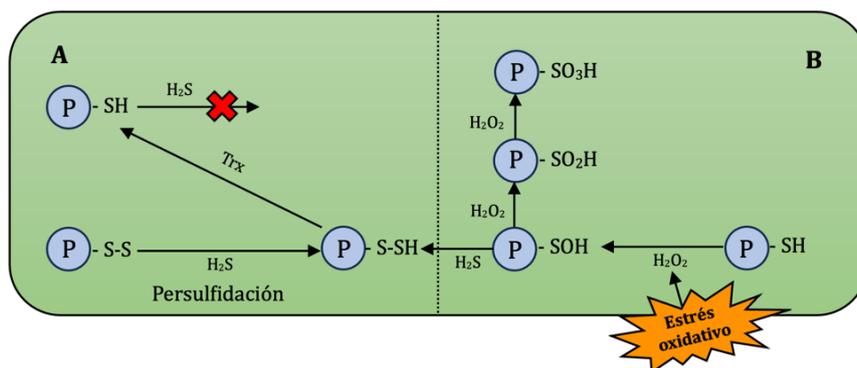


Figura 19: Participación del H_2O_2 en la persulfidación inducida por H_2S bajo estrés oxidativo. (A) El H_2S no puede reducir directamente los residuos de cisteína (-SH); logra la persulfidación reaccionando directamente con los enlaces disulfuro (-S-S) de la cisteína. (B) El estrés oxidativo induce la producción de H_2O_2 , que a su vez oxida a -SH, a -SOH, y el H_2S puede reaccionar directamente con -SOH para sufrir persulfidación. Sin embargo, un aumento sostenido en la concentración de H_2O_2 continuará oxidando -SOH a $-\text{SO}_2\text{H}$ (sulfenilación), e incluso provocará una mayor oxidación irreversible a $-\text{SO}_3\text{H}$ (sulfonación) (Modificado de Liu et al., 2024).

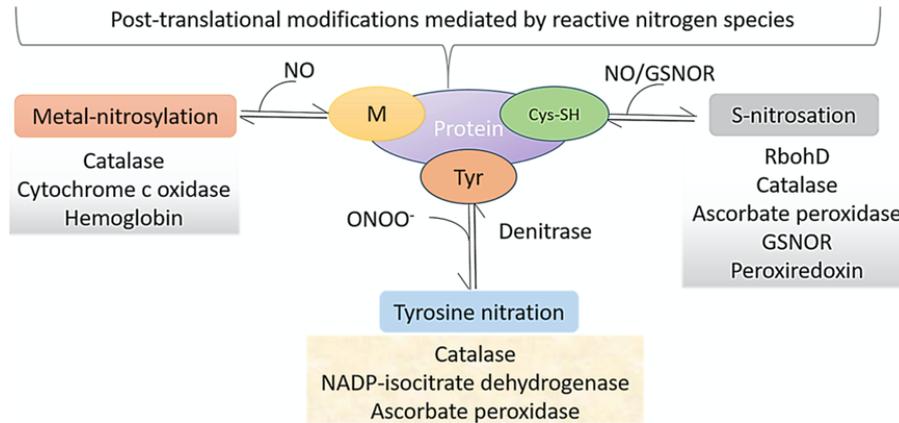


Figura 20: Esquema de modificaciones postraduccionales (PTMs) mediadas por $\bullet\text{NO}$, de proteínas involucradas en vías de señalización, y algunos ejemplos de objetivos identificados en células vegetales (Prakash et al., 2019).

El estado de oxidación de las proteínas es crucial para su funcionalidad. Así, un incremento en ROS/RNS hace que el estado de oxidación de los S de las cisteínas cambie desde la forma tiol (-2) hasta la forma ácido sulfónico (+4), pasando previamente por la forma de ácido sulfénico (0), pasando de un estado reversible a irreversible (Corpas et al., 2019a) (Figura 21). La interacción entre $\bullet\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\bullet-}$ produciendo ONOO^- también actúa modulando la actividad de proteínas mediante la nitración (Corpas et al., 2021; Prakash et al., 2019) (Figura 20). Estas alteraciones en el estado de oxidación, funcionalidad, de las proteínas evidencia la interacción entre ROS, RNS y RSS. La interacción entre estos tres grupos de radicales libres parece ser clave en los procesos de resistencia a los estreses, por lo que su comprensión puede ayudar a un mejor manejo de estos procesos en plantas. Si bien es cierto que la interconexión de estas especies reactivas a nivel del peroxisoma ha sido descrita y establecida (Corpas et al., 2019a; Corpas & Barroso, 2015).

Aunque la capacidad reductora del H_2S podría contrarrestar directamente la capacidad oxidante de $\bullet\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\bullet-}$, la acción antioxidante directa del H_2S en condiciones fisiológicas no parece particularmente relevante. Esto se deriva de la volatilidad y reactividad del H_2S , lo que lo convierte en una especie química de vida corta en las células, con HS^- y otras RSS más abundantes. Por lo tanto, la acción antioxidante del H_2S es indirecta, a través de las interacciones entre RSS, RNS y ROS (Giles et al., 2017; Li & Lancaster, 2013).

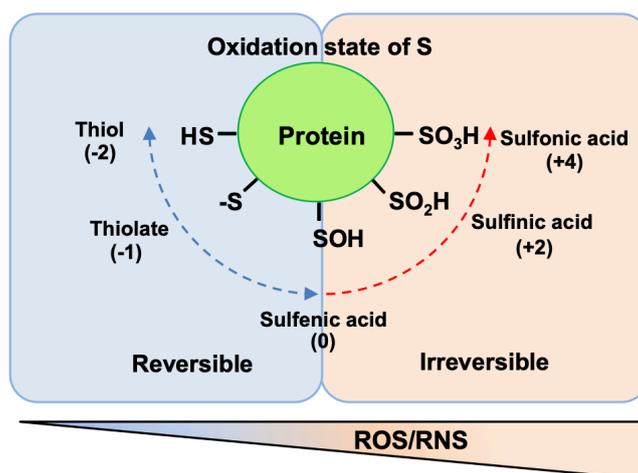


Figura 21. Diferentes estados de oxidación del S en proteínas. En condiciones normales de aumento de contenido de ROS/RNS, los estados de oxidación del S en los residuos de cisteína pueden cambiar de tiol (-2) a ácido sulfónico (+4). Este proceso es reversible hasta el ácido sulfénico (0), pero si el contenido de ROS/RNS continua aumentando, provocando una mayor oxidación, el proceso puede volverse irreversible (Corpas et al., 2019a).

Se ha demostrado que se produce interacciones entre RSS, RNS y ROS; (Figura 22) principalmente entre las moléculas de señalización $\bullet\text{NO}$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2S (Zhou et al., 2022). De esta manera, el H_2O_2 induce la síntesis de $\bullet\text{NO}$ que, en su vez, causa la del H_2S . En *A. thaliana* tratadas con H_2O_2 se observa cómo se produce un aumento del $\bullet\text{NO}$; lo que provoca el incremento de las actividades CAT, APX y GR, para controlar y eliminar el exceso de H_2O_2 , reduciendo así el riesgo de daño oxidativo (Wu et al., 2015). Se ha demostrado cómo el aumento del H_2S endógeno mediante la aplicación de NaHS aumenta la actividad y la expresión génica de la CAT, SOD y POX, reduciendo el daño oxidativo inducido por el estrés osmótico (Zhao et al., 2020), toxicidad del Cd (Zhang et al., 2015) o estrés Cr (Ahmad et al., 2020).

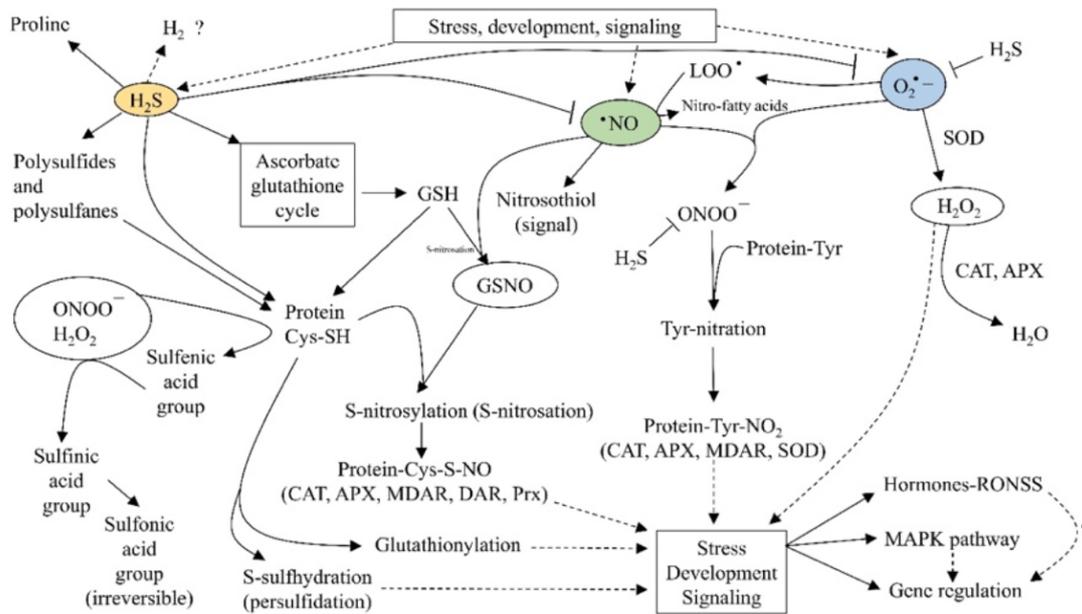


Figura 22: Modelo simplificado de la acción interactiva de ROS, RNS y RSS (RONSS) en las respuestas de las plantas durante eventos de desarrollo o desafíos ambientales que inducen estrés (Medrano-Macías et al., 2022).

El H₂S afecta a la producción, la percepción y la señalización de ROS y RNS (Hancock & Whiteman, 2016), además de ser una parte esencial del metabolismo del azufre y aumentando los niveles de GSH (Calderwood & Kopriva, 2014; De Kok et al., 1985). La alta relación de GSH respecto a GSSG es crítica para la eliminación de ROS, ya que son una parte integral del ciclo de AsA-GSH. El GSH es uno de los principales antioxidantes, fundamental para regular los niveles y la señalización de H₂O₂ en las células (Hancock & Whiteman, 2016). El GSH influye en la actividad de las proteínas a través de la S-glutathionación con grupos de tiol (Hancock & Whiteman, 2016; Sun et al., 2013). Los H₂S también influyen en los niveles de AsA que nuevamente participan activamente en la eliminación de ROS y, por lo tanto, se considera un protector a niveles bajos (Shan et al., 2011).

Además, las ROS y RNS también se ven directamente afectados por H₂S. Las especies de •NO y O₂^{•-} producen ONOO⁻, que genera nuevas señales en las células cuando reaccionan con H₂S (Carballal et al., 2011). El H₂S tiene la capacidad de reaccionar con los HO•, H₂O₂ para producir varios intermediarios, lo que reduce los niveles de ROS (Barroso et al., 2006; Li & Lancaster, 2013). Hay evidencias que demuestran cómo el

ONOO⁻ y •NO tienen la capacidad de reaccionar con GSH, produciendo GSNO. Este compuesto también sirve como reserva y donante de •NO. La enzima GSNOR reduce los niveles de •NO en plantas sometidas a estrés abiótico, mediante la conversión de GSNO a GSSG y NH₃, reduciéndose el GSSG a GSH (Barroso et al., 2006; Lee et al., 2008; Leterrier et al., 2012). La formación de GSH permite un más eficaz funcionamiento del ciclo de AsA-GSH (Fatma et al., 2016).

La mayor acumulación de GSH inducida por H₂S altera el equilibrio redox de la célula, lo que en consecuencia puede aumentar la tolerancia de las plantas al estrés ambiental (Noctor et al., 2012). El H₂S aumenta la producción de •NO, que posteriormente regula la retroalimentación de la biosíntesis de H₂S (Figura 23). El aumento de ROS puede desencadenar la acumulación de H₂S y •NO, lo que puede inducir la actividad de las enzimas implicadas en su síntesis. Tanto el H₂S como el •NO podrían reducir el estrés oxidativo al inhibir la producción de ROS, promoviendo las defensas antioxidantes para eliminar el exceso de ROS e incrementando su producción (Huang et al., 2021a).

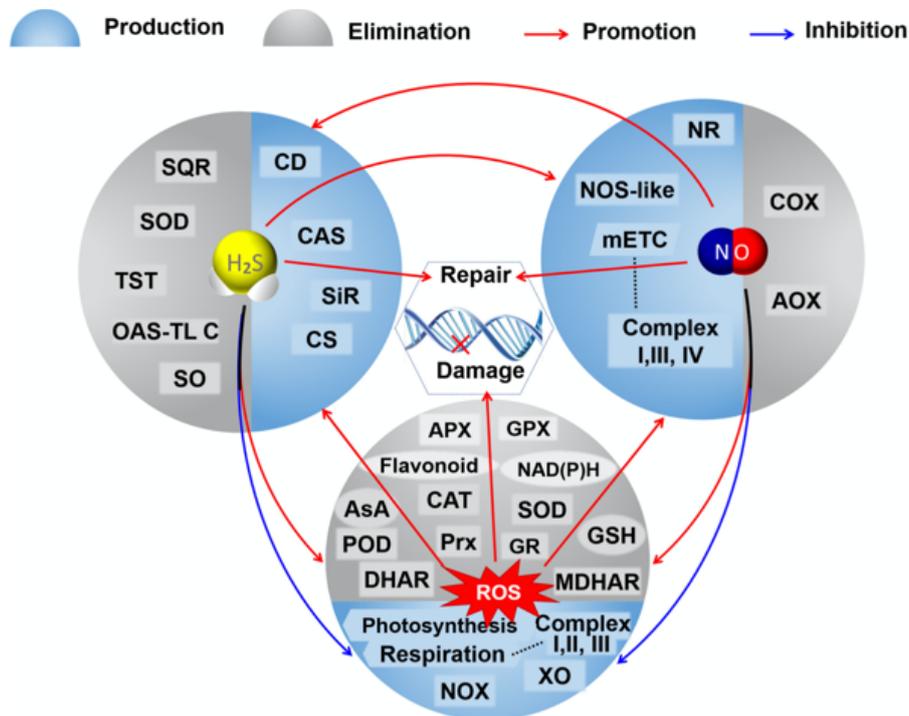


Figura 23: Interacción H₂S, •NO, y ROS en su metabolismo, y la respuesta al daño oxidativo. El aumento de las ROS en respuesta al estrés podría desencadenar la acumulación de H₂S y •NO al promover la actividad de las enzimas implicadas en su biosíntesis. Tanto el H₂S como el •NO, además de promover mutuamente su producción, podrían reducir el estrés oxidativo al inhibir la producción de ROS, activando las defensas antioxidantes para eliminar el exceso de ROS (Huang et al., 2021b).

La interacción entre ROS, \bullet NO y H₂S se ha demostrado en diferentes plantas y ante diferentes estreses (Huang et al., 2021b; Liu et al., 2021). Así, la interacción entre el H₂S y el \bullet NO en respuesta al estrés por metales pesados (Jia et al., 2020; Li et al., 2012) permite la eliminación eficaz de ROS, con restablecimiento del equilibrio redox. Se ha demostrado cómo el H₂S tiene un efecto estimulante de la respuesta del sistema antioxidante (Kushwaha & Singh, 2020b) y sobre la expresión génica de sus componentes (Pandey & Gautam, 2020). Además, esta interacción puede modificar las proteínas mediante persulfidación y S-nitrosación (Luo et al., 2020), alterando su actividad. Juntos, el \bullet NO y el H₂S controlan los componentes del ciclo AsA-GSH y los niveles de ROS, especialmente de H₂O₂ (Da Silva et al., 2017). La relación entre H₂S y GSH es especialmente importante (Keyster et al., 2020). El GSH muestra una gran afinidad para unirse a metales pesados y metaloides, además de formar fitoquelatinas que pueden actuar secuestrando estos elementos. Se ha demostrado en diferentes especies vegetales y para el estrés inducido por diversos metales pesados (Jia et al., 2020; Kaya et al., 2020a; Mostofa et al., 2015) que la interacción entre H₂S y GSH reduce la producción de ROS a través de la inducción del sistema antioxidante.

1.3. Plantas de estudio

Las plantas que se han utilizado como objeto de estudio han sido *Solanum lycopersicum* L. (tomate) y *Dittrichia viscosa* L. (olivarda). *S. lycopersicum* es recurrentemente empleada como planta modelo en gran cantidad de estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares. *D. viscosa* ha sido estudiada por su gran capacidad de absorción y acumulación de metales pesados y metaloides.

El tomate pertenece a la familia Solanaceae. Es una planta herbácea, originaria de la región Andina (Peralta & Spooner, 2006). Su domesticación comenzó antes de ser introducida en Europa en el siglo XV, intensificándose los siglos posteriores (Bai & Lindhout, 2007). En la actualidad, según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), es la segunda hortaliza más cultivada en el mundo, por lo que es una especie de cultivo de gran interés agroeconómico.

El sistema radicular es robusto, con una longitud de 1,2 a 1,8 m, raíz pivotante y muchas raíces secundarias y adventicias. Los tallos son ligeramente angulosos, semileñosos, de grosor mediano (\approx 4 cm en la base) y con tricomas simples y glandulares. Sobre ellos se disponen hojas de tamaño medio a grande (10 a 50 cm), alternas, pecioladas, imparipinnadas con 7-9 folíolos divididos y con numerosos tricomas simples y glandulares (Esquinas Alcázar & Nuez Viñals, 1995). En los tallos, usualmente cada tres hojas, más o menos, se presentan flores agrupadas en una inflorescencia cimosa que semeja a un racimo. Cada racimo usualmente tiene entre 4 a 12 flores, aunque esta característica puede variar entre las distintas variedades.

Las flores son hipóginas y regulares, con 5 o más sépalos verdes que siguen creciendo una vez cuajado el fruto, y con 5 o más pétalos de color amarillo intenso que se alternan con los sépalos. Las anteras de los estambres forman un cono que rodea y cubre el estilo y estigma del ovario que está formado por dos o más carpelos. En el momento de antesis, el polen de las anteras pasa al estigma y mediante el proceso de autofecundación lleva a la fertilización de los óvulos y a la formación de semillas. Desde la polinización hasta la maduración transcurren entre 6-10 semanas.

El interés económico y la expansión del cultivo del tomate deriva tanto por las características organolépticas, como de las propiedades nutritivas que presenta su fruto, rico en vitaminas y antioxidantes como licopeno, β -caroteno y ácido ascórbico (Rosales et al., 2006).

La planta de tomate ha sido utilizada como planta de experimentación en numerosos estudios relativos a respuesta a estreses, tanto bióticos como abióticos, siendo también utilizada en estudios de maduración. Pero, además, el tomate presenta una serie de características que la hacen una planta “modelo” para la realización de estudios fisiológicos y moleculares. Entre estas características se encuentra la relativa facilidad con que puede ser transformado con *Agrobacterium tumefaciens* (Cortina & Culiáñez-Macià, 2005; Qiu et al., 2007), su capacidad para ser injertado en diferentes combinaciones con otras plantas (Rivero et al., 2003; Ruiz et al., 2005), y poseer un genoma relativamente pequeño (950 Mpb) que ha sido secuenciado completamente (Consortium tomato, 2012).

Dittrichia viscosa L. Greuter es un arbusto ruderal perenne (Parolin et al., 2014), clasificada como nanofanerófita (Conesa et al., 2011) que pertenece a la familia Asteraceae (=Compositae), siendo comúnmente llamada “Olivarda”. Es una planta robusta, perenne, de base leñosa, glandulosa-pegajosa, y de olor fuerte, alcanzando hasta 1,5 m de altura.

Las raíces pueden ser bastante grandes, incluso en plantas pequeñas, y la relación entre la biomasa subterránea y aérea es de 0,24 (Stavrianakou et al., 2006). Presenta tallos erguidos, con bifurcación que comienza en la parte baja del tallo. Las ramas son numerosas, extendidas y con ángulos irregulares. Puede alcanzar 1,50 m de altura, y presenta un dosel muy denso. Presenta gran cantidad de pelos glandulares. Las hojas son alternas, oblongo-lanceoladas o lineares, aserradas y, a veces, dentadas o enteras. Las hojas basales son linear-oblongas, acuminadas y con dientes espaciados en el borde, las hojas superiores carecen de peciolo y abrazan al tallo. Alcanzan un tamaño promedio de 7 x 1,8 cm y el grosor de 197 μm (Stavrianakou et al., 2006). Los capítulos florales son amarillos, numerosos y están agrupados en un racimo compuesto, presentando inflorescencias largas, con corola de 2 cm de diámetro. Las flores del disco (centrales) son tubulares de un color amarillo-anaranjado y las de la parte externa son liguladas (flor de las compuestas con los pétalos de la corola soldados en forma de lengüeta), de color amarillo. Los capítulos se sitúan en la parte superior del tallo. El fruto es de tipo aquenio (fruto seco de una sola semilla) con vilano amarillo (conjunto de pelos o escamas situados en el extremo del fruto de algunas compuestas). Se distribuye por todo el Mediterráneo excepto Chipre. Habita en cunetas, terrenos baldíos, colinas pedregosas, lechos de torrentes y zonas de suelo alterado (Parolin et al., 2014).

Presenta una alta capacidad de crecer en suelos pobres, degradados y con altas concentraciones de metales pesados, y sometidos a actividades antrópicas invasivas como la minería y la industria (Conesa et al., 2011). Se ha descrito cómo es capaz de colonizar espontáneamente suelos pobres en nutrientes y contaminados por contaminantes orgánicos e inorgánicos. Es capaz de absorber y translocar Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn, los cuales absorbe del suelo y transporta muy eficazmente hasta los brotes (Barbafieri et al., 2011; Jiménez et al., 2011). Murciego et al. (2007) describen la presencia de *D. viscosa* y su capacidad de acumular de Sb en suelos degradados y contaminados por lodos con este metaloide de origen minero. Resultados similares, aunque con fuertes variaciones

entre los diferentes individuos y localizaciones obtienen Pérez-Sirvent et al. (2012). Garrido et al. (2021) describen cómo en *D. viscosa*, en suelos de una zona minera de Sb, acumula grandes cantidades de este metaloide sin sufrir daños oxidativos severos. Presenta un alto factor de transferencia para varios elementos minerales (Conesa et al., 2011; Nogales & Benítez, 2006), por lo que parece ser apta para la fitoestabilización (Nogales & Benítez, 2006). Por otro lado, Jiménez et al. (2011) indican su potencial uso como fitoestabilizador en ambientes contaminados para estabilizar las escombreras y evitar la dispersión de contaminantes por lixiviación o dispersión aérea (Hashimoto et al., 2008).

2. Objetivos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es dilucidar los efectos que la toxicidad por Sb tiene sobre parámetros fisiológicos y moleculares de dos especies: *Solanum lycopersicum*, como planta “modelo” y *Dittrichia viscosa* como potencial planta “fitorremediadora”.

De este objetivo general, surgen una serie de objetivos particulares:

1. Respuesta fisiológica de *S. lycopersicum* a la toxicidad de Sb, alteraciones en el crecimiento, actividad fotosintética y acumulación de elementos minerales, así como la implicación de las ROS y RNS y del sistema antioxidante en la respuesta de defensa.
2. Respuesta a nivel molecular de *S. lycopersicum* a la toxicidad de Sb, alteraciones en el patrón de expresión de genes implicados en la respuesta antioxidante de defensa.
3. Evaluación de *D. viscosa* como planta bioacumuladora de Sb. Implicación de ROS, $\cdot\text{NO}$ y H_2S , y del sistema antioxidante en respuesta a la toxicidad de Sb.

3. Material y Métodos

Material vegetal, condiciones de crecimiento y tratamientos

Semillas de *S. lycopersicum*, cv Tres Cantos (Batlle) o *D. viscosa* (Semillas Silvestres S.L.) se esterilizan superficialmente durante 15 min en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 10% (40 g L⁻¹), se lavan 3 veces con H₂O destilada estéril y, se someten a imbibición en H₂O destilada estéril, con agitación y aireación durante 2 h a temperatura ambiente. Después, las semillas se germinan en recipientes de plástico (30 cm x 20 cm x 10 cm) sobre un sustrato de perlita esterilizada humedecida con solución nutritiva basal formado por KNO₃ 4 mM, Ca(NO₃)₂·4H₂O 3 mM, MgSO₄·7H₂O 2 mM, KH₂PO₄· 6 mM, NaH₂PO₄·2H₂O 1 mM, ZnSO₄·7H₂O 10 μM, MnCl₂·4H₂O 2 μM, CuSO₄·5H₂O 0,25 μM, Na₂MoO₄·2H₂O 0,1 μM, H₃BO₃ 10 μM y NaFeIII-EDTA 20 μM, pH 5,8, a 27 °C, en oscuridad durante 3 días/10 días, para *S. lycopersicum* y *D. viscosa*, respectivamente. Después de la germinación, las plántulas se cultivan durante 5 días/10 días a 27 °C con 85% de humedad relativa (HR%) y bajo iluminación constante con una intensidad de 350 μmol m⁻² s⁻¹.

Las plantas se cultivan hidropónicamente en la solución nutritiva basal anteriormente descrita en contenedores de polipropileno negro (30 cm x 20 cm x 10 cm; 4 plantas por contenedor) (Figura 24). Se cultivan durante 7 días/10 días, en las mismas condiciones ambientales que las empleadas en la etapa de germinación (excepto la HR%, que es del 50%). Para los tratamientos, el Sb se añade en forma de KSb(OH)₆: 0,0 (control), Sb 0,5 mM y Sb 1,0 mM. En todos los tratamientos el pH se ajusta a un valor de 5,8. El medio de cultivo se airea continuamente, renovándose cada 4 días. Las plantas son expuestas al Sb durante 14 días/17 días.

Se separan las raíces de la parte aérea de cada una de las plantas y se pesan para obtener el peso fresco (PF), posteriormente se lavan con H₂O destilada, se secan sobre papel de filtro. Parte de este material se seca en una estufa de aire forzado a 70 °C durante 72 h para obtener el peso seco (PS) y determinar, posteriormente el contenido en Sb y otros elementos minerales; el resto se utiliza para la realización de los análisis microscópicos, bioquímicos y moleculares, algunos de estos análisis se realizan directamente en fresco, otros en el material almacenado a -80 °C.

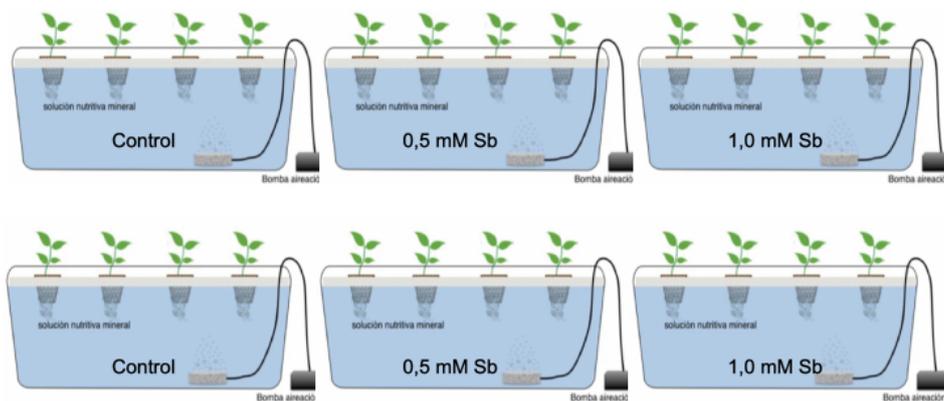


Figura 24. Sistema de cultivo hidropónico establecido para el cultivo de plántulas sometidas a diferentes tratamientos de Sb.

Determinación del contenido de Sb y otros elementos minerales

Para determinar las concentraciones de Sb y otros elementos minerales en raíces y parte aérea, las muestras como se indica en el apartado anterior, se mantienen en una estufa a 70 °C durante 72 h, triturándose en un mortero cerámico, siendo posteriormente sometidas a una digestión oxidante ácida con HNO₃ (65%) y H₂O₂ (30%), en un horno microondas Start D de alta presión de la marca Milestone. Se utiliza un programa de digestión en un rango de potencias y temperaturas, con una duración total de 1h 50 min (5 min a 500 W y 100 °C, 15 min a 700 W y 170 °C, 5 min a 900 W y 200 °C, 15 min a 900 W y 200 °C, y finalmente se dejan enfriar 1 h 10 min). El contenido mineral se determina mediante espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). El contenido de Sb y resto de elementos minerales se determina en un laboratorio certificado UNE-EN ISO/IEC 17025 utilizando un equipo Agilent ICP-MS, modelo NexION 300, Perkin Elmer, de acuerdo con (Lehotai et al., 2012). El control de calidad de los ensayos se realiza mediante calibraciones frente a estándares comerciales certificados, llevándose también a cabo controles de deriva para garantizar la fiabilidad de los análisis.

El factor de bioacumulación (FB) se calcula a partir de la relación entre la concentración del elemento en las raíces o en la parte aérea y la presente en la solución de cultivo. El factor de translocación (FT) se calcula a partir de la relación entre la concentración del elemento en la parte aérea y en las raíces.

Determinación del contenido hídrico relativo (CHR %)

Para determinar el contenido hídrico relativo (CHR %) de las hojas se toma el material fresco de acuerdo con el método descrito por (Smart & Bingham, 1974). Se recolectan discos de hojas procedentes de los diferentes tratamientos, determinándose el PF de cada uno de ellos. Posteriormente se sumergen en H₂O destilada durante 1 h, se secan superficialmente con papel de filtro y se pesan para obtener el peso turgente (PT). Finalmente, se secan en una estufa (J.P. Selecta Conterm) a 70 °C durante 24 h, pesándose para obtener el PS. El CHR % se calculó:

$$\text{CHR \%} = \frac{(\text{PF} - \text{PS})}{(\text{PT} - \text{PS})} \cdot 100$$

Determinación del área foliar

Se realizan fotografías de todas las hojas de cada una de las plantas con una cámara DXM 1200C (Nikon® Corp., Japón). Cada fotografía se analiza con el software gratuito Fiji Image J (Wayne Rasband, NIH, USA). Al menos, se utilizan 15 plantas, con tres repeticiones por tratamiento. El área total se calcula utilizando las herramientas de polígono y medida en todas las hojas de cada planta.

Determinación del contenido de proteínas, aminoácidos solubles totales y prolina

El material vegetal almacenado a -80 °C (raíces y hojas) de los tratamientos control y con Sb se homogeneiza (0,2 g mL⁻¹) en tampón fosfato (PBS) 50 mM, pH 7,0, filtrándose a través de muselina y centrifugándose a 12360 g durante 15 min. El sobrenadante se utiliza para los ensayos de cuantificación de proteínas y aminoácidos solubles. Para la determinación de proteínas se utiliza el método de Bradford (1976) expresándose los resultados como mg g⁻¹ PF frente a una curva estándar de seroalbúmina bovina. Para la determinación de aminoácidos se utiliza el método de Yemm et al. (1955) con el reactivo de ninhidrina y los resultados se expresan en mg g⁻¹ PF frente a una curva patrón de glicina.

El contenido de prolina se determina según el método de Bates et al. (1973). Se homogenizan 0,5 g/1,0 g de raíces/hojas en 2,5 mL de ácido sulfosalicílico al 3%, se filtran y centrifugan a 10000 g durante 10 min, posteriormente, 500 μ L del sobrenadante se añaden a una mezcla de los mismos volúmenes de ácido acético glacial y ninhidrina. La mezcla resultante se incuba a 100 °C durante 1 h, colocándose después en hielo para detener la reacción. A cada tubo de reacción se le añaden 1,5 mL de tolueno, agitándose durante 20 s y, tras 5 min de reposo, se mide la A_{520} , expresándose el resultado como μ g de prolina g^{-1} PF.

Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos y de la eficiencia fotosintética

Se toman discos de hojas adultas (0,125 g) y se incuban en 10 mL metanol durante 24 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Los contenidos de clorofila a, clorofila b y carotenoides se determinan espectrofotométricamente midiendo la A_{666} , A_{653} y A_{470} . Los contenidos totales de clorofila y carotenoides se calculan de acuerdo con Wellburn (1994), expresándose como μ g g^{-1} PF.

La determinación de los parámetros fotosintéticos se realiza en la zona media de hojas superiores y completamente expandidas, al final de cada tratamiento, siendo previamente adaptadas a la oscuridad durante 10 min, midiéndose después la fluorescencia mínima (F_0), la fluorescencia máxima (F_M) y la eficiencia fotosintética máxima (F_V/F_M) con un fluorómetro portátil (Chlorophyll Fluorometer, OS-30p, Opti-Sciences). Se calculan también la fluorescencia variable (F_V) y las constantes de velocidad de desactivación fotoquímica y no fotoquímica de las moléculas excitadas de clorofila (F_V/F_0).

Determinación de la peroxidación lipídica, producción de $O_2^{\cdot-}$ y contenido de H_2O_2 , $\cdot NO$ y H_2S

La peroxidación de los lípidos de membrana se determina espectrofotométricamente a partir de la formación de malondialdehído (MDA) formado a partir de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). Para ello, se homogenizan raíces/hojas (almacenadas a -80 °C) en

TBA 0,25% y ácido tricloroacético (TCA) 10%, se incuban a 95 °C durante 30 min, filtrándose y centrifugándose a 8800 g durante 10 min. La cantidad de MDA se determina a partir de $A_{532}-A_{600}$ ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), expresándose el resultado como $\mu\text{mol MDA g}^{-1} \text{ PF}$ (Fu & Huang, 2001)

La producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ se cuantifica a partir de la formación de adrenocromo. Se homogenizan raíces y hojas almacenadas a -80 °C, ($0,5 \text{ g mL}^{-1}$) a 4 °C en 1 mL de PBS 50 mM (pH 6,0), EDTA 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,5 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, polivinil polipirrolidona (PVPP) al 1%. El homogeneizado se filtra y centrifuga a 39000 g durante 30 min a 4 °C, utilizándose el sobrenadante. La producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ se mide a partir de la oxidación de epinefrina a adrenocromo a A_{480} ($\epsilon = 4,02 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en un medio de reacción que contiene epinefrina 1 mM, tampón acetato 25 mM (pH 5,0) y el extracto enzimático (Garrido et al., 2012; Misra & Fridovich, 1972).

El contenido de H_2O_2 se determina de acuerdo con (Alexieva et al., 2001). Se homogenizan raíces/hojas frescas (0,5 g) en frío con 5 mL de TCA al 0,1% (p:v). El homogeneizado se centrifuga a 12000 g durante 15 min a 4 °C. Se añaden 500 μL del sobrenadante a 500 μL de PBS 10 mM (pH 7,0) y 1 mL de KI 1 M. Se determina la A_{390} y el contenido de H_2O_2 se calcula a partir de una curva estándar.

El $\cdot\text{NO}$ se determina de acuerdo con el método descrito por Zhou et al. (2005). Así, se homogenizan raíces/hojas frescas (0,5 g) en 3 mL de tampón de ácido acético glacial 50 mM (pH 3,6) que contiene acetato de zinc al 4%. El homogeneizado se centrifuga durante 15 min a 11500 g y 4 °C, y el sobrenadante se toma y se neutraliza añadiendo 100 mg de carbón vegetal. Después de agitar y filtrar, el filtrado se lixivia y recoge, mezclándose 1 mL con 1 mL de reactivo de Griess. Tras incubr la mezcla 30 min, se mide la absorbancia a A_{540} . El contenido de $\cdot\text{NO}$ se estima a partir de una curva de calibración de nitrito de sodio como estándar, expresándose el contenido en $\text{nmol g}^{-1} \text{ PF}$.

Para la determinación del contenido de H_2S , raíces/hojas frescas (1 g) se trituran en nitrógeno líquido, extrayéndose con 1 mL de PBS 50 mM (pH 6,8), EDTA 0,1 M y ácido ascórbico 0,2 M, centrifugándose a 14000 g, 15 min a 4 °C. Posteriormente, se mezclan 400 μL del sobrenadante en 200 μL de acetato de zinc al 1% y 200 μL de HCl 1 N, y se incuba 30 min. Después se añaden a 100 μL de dimetil-p-fenilendiamina 5 mM disueltos

en HCl 7 mM y 100 μ L de sulfato férrico de amonio 50 mM en HCl 200 mM. Tras 15 min de incubación a temperatura ambiente, se mide A_{670} (Zhang et al., 2008). El contenido de H_2S se calcula a partir de la curva patrón de Na_2S y se expresa como $nmol\ g^{-1}\ PF$.

Determinación de actividades enzimáticas

La mayor parte de las actividades enzimáticas (SOD, POX, CA-POX, APX, DHAR, GR y GSNOR) se realizan en un extracto realizado homogeneizando raíces u hojas almacenadas a $-80\ ^\circ C$ ($0,5\ g\ mL^{-1}$) a $4\ ^\circ C$ en PBS 50 mM (pH 6,0), PMSF 0,5 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, PVPP al 1%. El homogeneizado se filtra y centrifuga a 39000 g durante 30 min a $4\ ^\circ C$, el sobrenadante se utiliza para los ensayos enzimáticos. Para la determinación de la actividad MDHAR, el material almacenado a $-80\ ^\circ C$ se homogeneiza a $4\ ^\circ C$ en PBS ($0,5\ g\ mL^{-1}$) 50 mM (pH 7,8) y PVPP al 2%, filtrándose y centrifugándose a 20000 g durante 15 min a $4\ ^\circ C$, finalmente el sobrenadante se utiliza para las medidas de actividad. La actividad GST se determina en un homogenizado de material fresco en un tampón Tris-HCl 250 mM (pH 7,8) ($0,15\ g\ mL^{-1}$ y $0,5\ g\ mL^{-1}$ para hojas y raíces, respectivamente), se filtra y centrifuga a 39000 g durante 30 min a $4\ ^\circ C$, el sobrenadante se utiliza para el ensayo enzimático. La actividad L-DES se determina en un extracto enzimático obtenido a partir de 1 g de raíces/hojas (almacenadas a $-80\ ^\circ C$) molidas en un mortero con nitrógeno líquido y se homogeneiza en 1 mL de Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), centrifugándose a 15000 g durante 15 min a $4\ ^\circ C$. Para la actividad polifenoloxidasas (PPO; EC 1.14.18.1), se obtiene un extracto enzimático del material vegetal almacenado a $-80\ ^\circ C$ (0,2 g) que se homogeneiza a $4\ ^\circ C$ en 1 mL de PBS 50 mM (pH 6,5) y 1% de PVPP, filtrándose y centrifugándose a 20000 g durante 130 min a $4\ ^\circ C$, y el sobrenadante obtenido se utiliza para medir esta actividad. El contenido de proteínas se determina mediante el método de Bradford (1976)

La actividad SOD se determina en un medio que contiene PBS 50 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM, riboflavina $1,3\ \mu M$, metionina 13 mM y tetrazolio 4-nitro azul (NBT) $63\ \mu M$ y el extracto enzimático (Beauchamp & Fridovich, 1971), La actividad se cuantifica mediante el porcentaje de inhibición de la reducción del NBT (A_{560}) por la presencia de SOD, expresándose el resultado como $U\ SOD\ min^{-1}\ mg^{-1}\ prote\acute{i}na$, definiéndose una

unidad de SOD como la cantidad de enzima necesaria para provocar un 50% de inhibición de la reacción.

La actividad POX se determina midiendo los cambios de A_{590} ($\epsilon = 47,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Ngo & Lenhoff, 1980) en un medio que contiene ácido 3-dimetilaminobenzoico (DMAB) 3,3 mM, 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona clorhidrato (MBTH) 66,6 μM en PBS 50 mM (pH 6,0) y el extracto enzimático, y expresado como $\text{nmol DMAB-MBTH min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

La actividad coniferil-alcohol peroxidasa (CA-POX) se determina midiendo la disminución de A_{265} en un medio de reacción compuesto por CA 0,1 mM en tampón acetato 25 mM (pH 5,0) ($\epsilon = 7,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y el extracto enzimático. Una unidad de CA-POX se define como la cantidad de enzima necesaria para provocar la oxidación de 1 nmol de CA min^{-1} a 25 °C, pH 5,0. (Kotaniemi et al., 2005)

La actividad APX se determina siguiendo la disminución de A_{290} durante 3 min ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en PBS 0,1 M (pH 7,5), AsA 0,5 mM, H_2O_2 0,2 mM, y el extracto enzimático (Rao et al., 1996), expresando el resultado como $\mu\text{mol de AsA min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

La actividad DHAR se determina a partir de la oxidación de DHA midiéndose a A_{265} ($\epsilon = 14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (De Gara et al., 2003) en un medio que contiene PBS 0,1 M (pH 6,5), EDTA 0,5 mM, GSH 2,5 mM, DHA 0,5 mM y el extracto enzimático. La actividad de DHAR se expresa como $\text{nmol de AsA min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

La actividad MDHAR se determina a partir de la oxidación de NADH a A_{340} ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Hossain et al., 1984) en un medio que contiene tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,8), AsA 10 mM, NADPH 0,2 mM, 0,5 unidades de ascorbato oxidasa y el extracto enzimático, expresando el resultado como $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

La actividad GR se determina a A_{340} a partir de la oxidación de NADPH ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (De Gara et al., 2003) en un medio que contiene PBS 0,1 M (pH 7,5), EDTA 0,5 mM, GSSG 0,5 mM, NADPH 0,2 mM y el extracto enzimático, expresándose el resultado como $\text{nmol NADPH min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

La actividad GSNOR se determina espectrofotométricamente a A_{340} a partir de la oxidación de NADH (Sakamoto et al., 2002) en un medio de reacción que contiene Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), EDTA 0,5 mM, NADH 0,2 mM, GSNO 400 μ M y el extracto enzimático. La actividad GSNOR se expresa como $\text{nmol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

La actividad GST se determina a A_{340} durante 6 min en un medio de reacción que contiene PBS 0,1 M (pH 7,0), GSH 0,2 mM, 1-cloro, 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 0,1 mM ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) y el extracto enzimático, expresándose como $\text{nmol CDNB min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína (Hossain et al., 2009).

La actividad L-DES se determina, de acuerdo con el método descrito por Riemenschneider et al. (2005). en 1 mL de ditionitrotol 2,5 mM, L-cys 0,8 mM, Tris-HCl 100 mM (pH 9,0) y 0,1 mL de extracto enzimático, iniciándose la reacción por la adición de L-cys, y tras una incubación de 15 min a 37 °C, la reacción se para por la adición de 100 μ L de FeCl_3 30 mM en HCl 1,2 N y 100 μ L de diclorhidrato de N,N-dimetil-p-fenilendiamina 20 mM en HCl 7,2 N. La formación de azul de metileno se determina a A_{670} y la actividad enzimática se estimó a partir de una curva de calibración, utilizando Na_2S como patrón estándar, expresándose como $\text{nmol H}_2\text{S min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

Finalmente, la actividad PPO se determina con los cambios en A_{390} a 30 °C en un medio que contiene el extracto enzimático, PBS 100 mM, Tritón X-100, y ácido cafeico (Thipyapong et al., 1995), expresando el resultado como U PPO mg^{-1} proteína.

Determinación de los componentes del ciclo AsA-GSH

Para determinar el contenido de AsA, DHA, GSH y GSSG, se homogenizan raíces/hojas almacenadas a -80 °C (1 g mL^{-1}) en ácido metafosfórico al 5% en un mortero de porcelana. El homogeneizado se filtra y centrifuga a 16000 g, 20 min a 4 °C. La determinación del AsA total y GSH total se realizan de acuerdo con De Pinto et al. (1999). Así, el AsA total se determina en un medio de reacción que contiene el extracto, PBS 150 mM (pH 7,4) y EDTA 5 mM, incubándose 15 min en la oscuridad. Después, se añade NEM (N-etilmaleimida) al 0,5%, TCA al 10%, ácido ortofosfórico al 44%, dipiridilo al 4% y FeCl_3 110 mM, incubándose a 40 °C durante 40 min, también en oscuridad. La

reacción se detiene con hielo y se determina la A_{525} . Para medir la cantidad de AsA, se añade DTT 10 mM (DL-ditioneitol) al medio de reacción antes de la incubación en oscuridad, y para determinar el AsA total se añaden 100 μL de H_2O . La concentración de DHA se estima a partir de la diferencia entre el AsA total (AsA + DHA) y AsA.

El GSH se determina añadiendo 0,4 μL de extracto a 0,6 μL de PBS 0,5 mM (pH 7,5) (De Pinto et al., 1999). El medio de reacción contiene el extracto, NADPH 0,3 mM, PBS 150 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM y ácido 5,5'-ditiobis[2-nitrobenzoico] (DTNB) 0,6 mM agitándose y dejándose reposar durante 4 min, tras los que se añaden 2 U GR mL^{-1} y se mide la variación de A_{412} durante 1 min. Para determinar el contenido de GSSG, la mezcla se incuba durante 1 h en oscuridad con 2-vinilpiridina (20 μL) para eliminar el GSH y, para determinar el contenido total de glutatión, se agregan 20 μL de H_2O . La cantidad de GSH se obtiene como la diferencia entre el contenido total (GSH + GSSG) y la cantidad de GSSG.

Determinación del contenido fenólico

Los fenoles, flavonoides y fenilpropanoides glicósidos (PPGs) se extraen mediante la homogenización de raíces/hojas almacenadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ en una mezcla de metanol, cloroformo y NaCl al 1% (1:1:0.5), filtrándose y centrifugándose a 3200 g durante 10 min.

Los fenoles totales se determinan a A_{765} en un medio de reacción que contiene 0,5 mL del sobrenadante, 1,5 mL de Na_2CO_3 al 2%, 0,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 2,75 mL de H_2O destilada (Singleton et al., 1985), expresándose el resultado como μg de ácido caféico g^{-1} PF a partir de una curva patrón.

El contenido total de flavonoides se mide de acuerdo con el método de Kim et al. (2003). A 0,5 mL de un alícuota del extracto previamente obtenido, se añaden 0,15 mL de NaNO_2 al 5% y 2 mL de H_2O destilada, incubándose 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añaden 0,15 mL de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 10% y 1 mL de NaOH 1 M, agitándose e incubándose durante 15 min a temperatura ambiente, midiéndose la A_{415} . El resultado calculándose a partir de una curva patrón como μg de rutin g^{-1} PF.

Finalmente, los PPGs se determinan añadiendo 1 mL del sobrenadante a un medio de reacción que contiene 2 mL de HCl 0,5 M, 2 mL de NaNO₃ al 10% y Na₂MoO₄·2H₂O al 10%, y 10 mL de H₂O destilada, tras 10 min de incubación se mide la A₅₂₅ (Gálvez et al., 2005), expresándose el resultado como µg verbascósido g⁻¹ PF a partir de la correspondiente curva patrón.

Visualización y determinación de ROS, RNS y H₂S

Las raíces (20 mm) de las plantas control y tratadas con Sb se incuban 30 min en la oscuridad a 37 °C con 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) 25 µM (sonda de H₂O₂) o dihidroetidio (DHE) 10 µM (sonda de O₂⁻) en 10 Tris-HCl mM, pH 7,4, lavándose tres veces durante 15 min con el mismo tampón sin las sondas (Valderrama et al., 2007).

Para determinar •NO y ONOO⁻, las raíces se incuban 60 min en la oscuridad a 25 °C con Diaminofluoresceína diacetato (DAF-2DA) 10 µM (sonda de •NO) o 3'-(p-aminofenil) fluoresceína (APF) 10 µM (para de ONOO⁻) en Tris HCl 10 mM, pH 7,4. Después se lavan tres veces durante 15 min cada vez con el mismo tampón (Valderrama et al., 2007).

Para detectar RSNO, las muestras de raíces intactas se incubaron 60 min en la oscuridad a 25 °C con NEM 10 mM, lavándose tres veces (15 min cada vez) con Tris-HCl 10 mM, pH 7,4. Posteriormente se incuban en Alexa-Fluor 488-Hg 10 µM (sonda de RSNO) durante 60 min en oscuridad a 25 °C (Corpas et al., 2008b). Finalmente, se lavan con el mismo tampón tres veces (15 min cada vez).

Para detectar H₂S, las raíces se incuban 40 min en 7-azido-4-metilcumarina (AzMC) 100 µM en PBS 10 mM (pH 7,4) en la oscuridad y a temperatura ambiente (Liu et al., 2017), lavándose tres veces con el mismo tampón (15 min cada vez).

En todos los casos, las raíces enteras (no fijadas) se colocan en un portaobjetos y se examinan bajo microscopía de fluorescencia (microscopio Axioplan-Zeiss). En cada caso, λ_{exc} y λ_{em} se ajustan a la sonda respectiva.

Se utilizan, al menos, cinco raíces para cada uno de los tratamientos, con tres repeticiones independientes. Las imágenes se procesan y analizan utilizando el programa ImageJ, expresándose la intensidad de la fluorescencia en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF).

Las cantidades de ROS y RNS también se determinan espectrofluorométricamente. Brevemente, se trituran muestras de 1 g de raíces de cada tratamiento en nitrógeno líquido y se homogenizan en 5 ml de EDTA 1 mM, DTT 2 mM, PMSF 1 mM, Triton X-100 al 0,2% y Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 y en oscuridad. Posteriormente se centrifuga a 17000 g durante 30 min a 4 °C, desechándose el precipitado. Para cada muestra, el medio de reacción contiene 100 µL de extracto crudo (sobrenadante) y 900 µL de Tris-HCl 10 mM, pH 7,2 sin (blanco) o con la sonda fluorescente respectiva (DCF-DA 25 µM, DHE 10 µM, DAF-10 µM). 2DA, APF 10 µM o Alexa-Fluor 488-Hg 10 µM). Como controles negativos se utilizan los respectivos eliminadores de la especie reactiva diana. La mezcla de reacción se incuba a 37 °C durante 1 h midiéndose la fluorescencia en un espectrofluorímetro (Eppendorf®, Alemania). En cada caso, λ_{exc} y λ_{em} se ajustan a cada sonda (Airaki et al., 2012; Corpas et al., 2008b; Gaupels et al., 2011; Signorelli et al., 2016; Valderrama et al., 2007). La fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) μg^{-1} de proteína.

Extracción de RNA y transformación de cDNA

Se recolectan raíces y hojas de plantas cultivadas en las diferentes condiciones experimentales (control, 0,5 mM Sb y Sb 1,0 mM Sb). A nivel de hojas, este análisis se realiza en primer lugar en muestras foliares de verticilos más basales, por tanto, más maduros a tiempo final (14 días después de estar sometido al estrés abiótico; t3). También se toman muestras foliares de verticilos más apicales, más jóvenes, a 1, 7 y 14 días de exposición a la toxicidad por Sb (t1, t2 y t3, respectivamente). El material vegetal se congela en nitrógeno líquido y el RNA se extrae y purifica en el kit Spectrum Plant Total RNA (Sigma-Aldrich®, Milwaukee, EE. UU.) y RNase-Free DNase (Qiagen® (Alemania) N° 79254). La cantidad y calidad del RNA en la solución resultante se determina utilizando un biofotómetro Eppendorf D30 (Eppendorf®, Alemania). La integridad del RNA extraído se evalúa mediante electroforesis en gel con tampón TBE

1x Invitrogen™, Massachusetts, EE. UU.) y con GelStar™ (LonzaRockland Inc., Maine, EE. UU.) como agente intercalante, cargando 2,5 µL de RNA de cada muestra en 10 µL de H₂O libre de RNasa (Invitrogen™, Massachusetts, EE.UU.) y 2 µL de tampón de carga (Invitrogen™, Massachusetts, EE.UU.). Los resultados se visualizan en un transiluminador Azure Imaging System C200 (Azure Biosystems® Inc., California, EE. UU.). Posteriormente, muestras de 1-2 µg del RNA purificado se someten a la acción de la transcripción inversa con el kit de transcripción inversa de cDNA de alta capacidad de Applied Biosystems® (California, EE. UU.), realizándose la reacción en un termociclador (Eppendorf, Hauppauge, NY, EE. UU.) con una primera etapa a 25 °C durante 10 min, seguida de una segunda etapa a 37 °C durante 120 min, y una tercera etapa final a 85 °C durante 5 min, obteniéndose finalmente el cDNA monocatenario.

PCR y qRT-PCR

En primer lugar, se realiza una PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) utilizando la versión Taq Hot Start Premix de Takara Bio Inc. (Shiga, Japón) con los cebadores que se muestran en la Tabla 1, para verificar que cada par de cebadores no producen amplificaciones no específicas. El protocolo para la realización de la PCR desarrollada consiste en la activación de la polimerasa a 95 °C durante 5 min; un ciclo térmico con 3 pasos: 95 °C durante 30 s, 57 °C durante 30 s, alargamiento 72 °C durante 30 s y 40 ciclos; y una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos de la PCR se revelan en agarosa al 1% mediante electroforesis en gel con tampón TBE 1x Invitrogen™, Massachusetts, EE. UU.) y con GelStar™ (LonzaRockland Inc., Maine, EE. UU.) como agente intercalante. Los resultados se visualizan en un transiluminador Azure Imaging System C200 (Azure Biosystems® Inc., California, EEUU).

Tabla 1. Cebadores empleados para la síntesis de cDNA de *S. lycopersicum*. Se indican los nombres de los genes, su identificación (ID), su secuencia en sentido (5' → 3'), y su tamaño (pb)

Gen	ID	Cebadores (5' → 3')	Tamaño (pb)
<i>Actina</i>	Solyc04g011500.2.1	GAAATAGCATAAGATGGCAGACG	159
		ATACCCACCATCACACCAGTAT	
<i>TUB (β-tubulina)</i>	Solyc04g081490.2.1	AACCTCCATTGAGGAGATGTTT	180
		TCTGCTGTAGCATCTGGTATT	
<i>APX</i>	Solyc06g005150.3	TCTGGTTTTGAGGGACCTTG	113
		GCTTTGTCTGATGGCAACTG	
<i>DHAR</i>	Solyc05g054760.2	TGAGCTTGGCTCCAAAAGT	144
		CTTCAGCCTTGGTTTTCTGG	
<i>GR_cyt</i>	Solyc09g091840.3	AAAGTGTGGAGCAACCAAGG	86
		CTGAACGCATGGTCACAAAC	
<i>GR_chl</i>	Solyc09g065900.3	TAGCAAAGTTCTGGGCTTGC	84
		AACCTGCTTTGACTGCAAC	
<i>GSNOR</i>	Solyc09g064370.3	TCCATTTGAGTGGTACTG	81
		AGGGAAGGAACTTGTGATCG	
<i>SOD</i>	Solyc02g021140.3	GGATTGGCTTGTCTTGAGC	99
		CGATCAGGGGATATCATT	
<i>GST</i>	Solyc01g099590.3	TGGGCTCGTTTTGTTGATG	80
		CCCTCTGCTTTGTTTCTCC	
<i>GST TCHQD</i>	Solyc04g057890.3	TTCCTGAACAGCCAGAAGG	138
		ACAGGAACTTTCGCACTGG	

La amplificación en tiempo real se monitoriza con SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.) en un instrumento de detección y amplificación QuantStudio 1 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific R, Massachusetts, EE. UU.). Cada gen diana se empareja con dos genes de referencia diferentes: actina [Solyc04g011500.2.1] y β-tubulina [Solyc04g081490.2.1]). Ambos se utilizan como genes de mantenimiento ya que en estudios relacionados con el estrés abiótico (Løvdal & Lillo, 2009) se recomiendan para normalizar la expresión genética de los genes diana. La expresión de cada gen diana en relación con la expresión del gen de referencia se calcula utilizando el método 2-ΔΔCt.

Análisis bioinformático

Se analizan las secuencias codificantes y peptídicas de las enzimas GR y GST (Tabla 2). Las secuencias se obtuvieron en las bases de datos GRAMENE (www.gramene.org) y Solgenomics (<https://solgenomics.net/>) (Fernandez-Pozo et al., 2015). El análisis consiste en un alineamiento global de la secuencia codificante de nucleótidos y la secuencia de

aminoácidos utilizando el software Geneious Prime 2023 (Geneious Biologics 2023 (<https://www.geneious.com/biopharma>)). Para estos alineamientos se utiliza la matriz Blosum90 (BLOcks of amino acid Substitution Matrix; con una identidad máxima del 90%) con "free end gaps", y la distancia genética se calcula con el modelo de Jukes-Cantor (Ortega et al., 2019). Los dominios, motivos y residuos conservados de proteínas se identifican y se asignan a las proteínas deducidas. El análisis filogenético se realiza utilizando el modelo Jukes-Cantor y Neighbor-Joining como modelo estadístico (Saitou & Nei, 1987). La interacción de las proteínas diana se predice utilizando la base de datos STRING versión 11.0 (<https://string-db.org/>) (Szklarczyk et al., 2019)

Análisis estadístico

Para los valores de longitud, peso, contenido mineral, actividades enzimáticas, compuestos antioxidantes se realiza el U-test de Mann-Whitney, siendo los valores representados las medias y desviación típica de, al menos 10 réplicas, obtenidas de tres experimentos independientes. Para los valores obtenidos del área foliar se realiza una prueba t de Student para análisis estadístico con Microsoft Excel (Microsoft® Corp., Albuquerque, EE.UU.). Las diferencias significativas se presentan como * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. Los datos presentados son las medias y desviación típica de, al menos 15 réplicas obtenidas de tres experimentos independientes.

A todos los valores obtenidos en los estudios moleculares se les realiza una prueba de Shapiro-Wilk para determinar si los datos muestran una distribución normal. La prueba ANOVA unidireccional o la prueba de Kruskal-Wallis se realizan con RStudio versión 4.3.2 (RStudio, Inc., Boston, Massachusetts, EE. UU.). En ambos casos, estas pruebas se utilizan para determinar la significación estadística (las diferencias significativas se presentan como * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$). Los datos presentados son las medias y error típico de, al menos 15 réplicas obtenidas de tres experimentos independientes.

Tabla 2. Genes empleados para el estudio bioinformático.

Gen	ID	Localización	Información
<i>APX</i>	Solyc06g005150.3	Cromosoma 6: 170,183-173,377	Ascorbato peroxidasa
<i>DHAR</i>	Solyc05g054760.2	Cromosoma 5: 65,455,922-65,460,219	Dehidroascorbato reductasa 1 (DHAR1)
<i>GR_{cyt}</i>	Solyc09g091840.3	Cromosoma 9: 71,517,454-71,527,429	Glutación reductasa citosólica
<i>GR_{chl}</i>	Solyc09g065900.3	Cromosoma 9: 64,425,969-64,432,963	Glutación reductasa
<i>GSNOR</i>	Solyc09g064370.3	Cromosoma 9: 61,781,099-61,785,732	S-(Hidroximetil)glutación deshidrogenasa
<i>SOD</i>	Solyc02g021140.3	Cromosoma 2: 22,261,065-22,263,375	Superóxido dismutasa
<i>GST</i>	Solyc01g099590.3	Cromosoma 1: 89,654,694-89,655,730	Glutación-S-transferasa
<i>GST TCHQD</i>	Solyc04g057890.3	Cromosoma 4: 54,949,331-54,955,349 cadena reversa.	Glutación S-transferasa TCHQD (GST2)

4. Resultados y Discusión

4.1. Respuesta fisiológica de *Solanum lycopersicum* a la toxicidad de Sb

4.1.1. Resultados

Efecto del Sb sobre el crecimiento, área foliar, peroxidación lipídica, contenido en prolina y contenido hídrico relativo de plantas de tomate

En las plantas de tomate cultivadas durante 14 días en presencia de 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, se observa una significativa reducción en la longitud de las raíces, respecto del control (Tabla 3, Figura 25). Esta disminución para ambas concentraciones de Sb es del 12%, mientras que la longitud de la parte aérea apenas se ve afectada. En cuanto al PF, se observa una disminución en las raíces de un 25% en ambas concentraciones. Este efecto es mayor en la parte aérea, sobre todo con 1,0 mM Sb con una reducción del 35%, mientras que con 0,5 mM Sb es del 27%. El Sb induce la alteración en la relación $PF_{Raíces}/PF_{Parte\ aérea}$ con valores más altos que los grupos control. Este resultado indica una mayor afectación en la parte aérea en respuesta a la toxicidad por Sb. En cuanto al PS, la disminución en las raíces es del 20% y del 25% en la parte aérea, sin diferencias entre ambas concentraciones. No se produce alteración en la relación de $PS_{Raíces}/PS_{Parte\ aérea}$. El fenotipo de las plantas sometidas a toxicidad por Sb (Figura 25A,B) muestra clorosis y lesiones necróticas en las hojas, mientras que en las raíces se observa junto al menor desarrollo la aparición de tonalidades parduzcas, especialmente en 1,0 mM Sb. También se observa una fuerte alteración del área foliar (Figura 26), con descensos del 37% y 63% para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente.

La peroxidación lipídica, determinada por la cantidad de MDA detectada en las raíces, muestra el desarrollo de un daño oxidativo inducido por el cultivo en el medio con Sb. Así, se produce un incremento en los niveles de MDA del 8% y 29% cuando el medio de cultivo contiene 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb respectivamente, en comparación con los valores control. Sin embargo, en las hojas el efecto sobre la peroxidación lipídica es menor, sin alteración para 0,5 mM Sb y con tan sólo un 9% de incremento de MDA en presencia de 1,0 mM Sb (Tabla 4). Esta respuesta es la contraria a la observada para el contenido en prolina. Como puede verse en la Tabla 4, el contenido en prolina no se ve alterado en las raíces de forma significativa, pero sí en las hojas, observándose un incremento de este osmolito que puede llegar a ser un 50% superior (0,5 mM Sb) respecto al control. El CHR % disminuye, del 93% al 84% (descenso del 10% valor control) y 75% (descenso del 20% valor control) para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb respectivamente.

Tabla 3. Efecto de Sb en la longitud, peso fresco (PF) y peso seco (PS) de las raíces y tallos de plantas de tomate. Los datos son medias de, al menos cuatro experimentos independientes \pm SD. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Tratamiento	Longitud (cm)			PF (mg)			PS (mg)		
	Raíces	Parte aérea	Raíces	Parte aérea	Raíces	Parte aérea	Raíces	Parte aérea	
Control	29,05 \pm 2,25 ^a	17,33 \pm 1,61 ^a	1840 \pm 450 ^a	9371 \pm 678 ^a	85,87 \pm 7,14 ^a	589,89 \pm 43,78 ^a			
0,5 mM Sb	25,77 \pm 1,74 ^b	16,45 \pm 1,49 ^a	1390 \pm 200 ^b	6882 \pm 798 ^b	64,50 \pm 7,55 ^b	436,15 \pm 50,22 ^b			
1,0 mM Sb	24,49 \pm 1,91 ^b	16,73 \pm 1,97 ^a	1691 \pm 130 ^{ab}	6145 \pm 839 ^b	69,88 \pm 6,33 ^b	466,74 \pm 49,67 ^b			

Tabla 4. Efecto del Sb sobre la peroxidación de lípidos de membrana, contenido en prolina y CHR en plantas de tomate. Los datos son medias de, al menos cuatro experimentos independientes \pm SD. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Tratamiento	Peroxidación lipídica (μ mol MDA g ⁻¹ PF)			Contenido en prolina (μ g g ⁻¹ PF)			CHR (%)		
	Raíces	Hojas	Raíces	Hojas	Raíces	Hojas	Raíces	Hojas	
Control	3,95 \pm 0,68 ^b	29,74 \pm 2,32 ^a	9,46 \pm 0,42 ^a	18,37 \pm 1,53 ^b	93,40 \pm 2,5 ^a				
0,5 mM Sb	4,27 \pm 0,66 ^{ab}	29,45 \pm 3,36 ^a	8,09 \pm 1,56 ^a	27,58 \pm 3,21 ^a	85,51 \pm 2,07 ^b				
1,0 mM Sb	5,10 \pm 0,99 ^a	32,41 \pm 2,69 ^a	8,66 \pm 1,30 ^a	21,59 \pm 3,02 ^b	74,83 \pm 1,78 ^c				

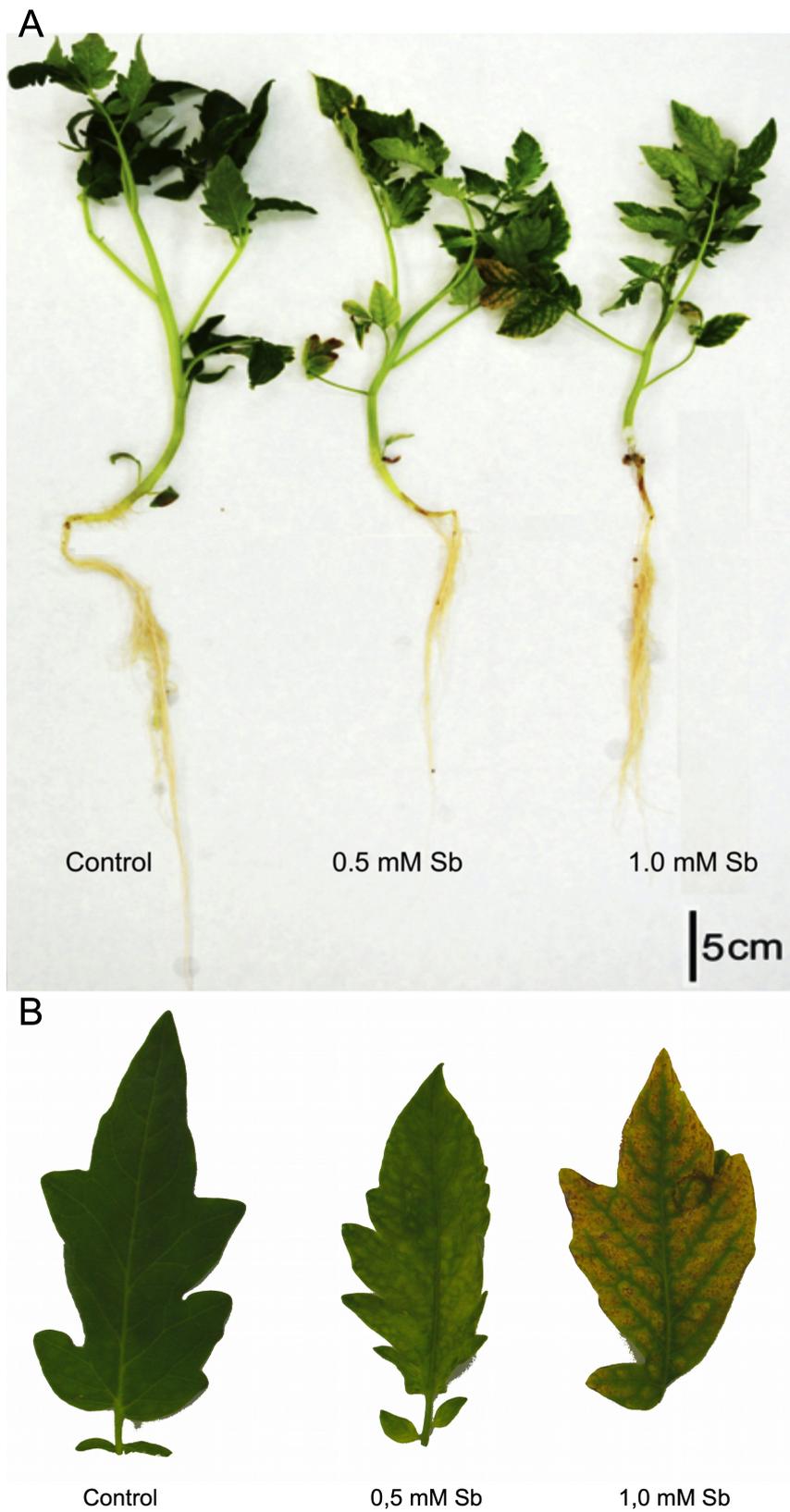


Figura 25. (A) Plantas enteras de tomate y (B) hojas procedentes de plantas control y tratadas con 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb (14 días de tratamiento con Sb).

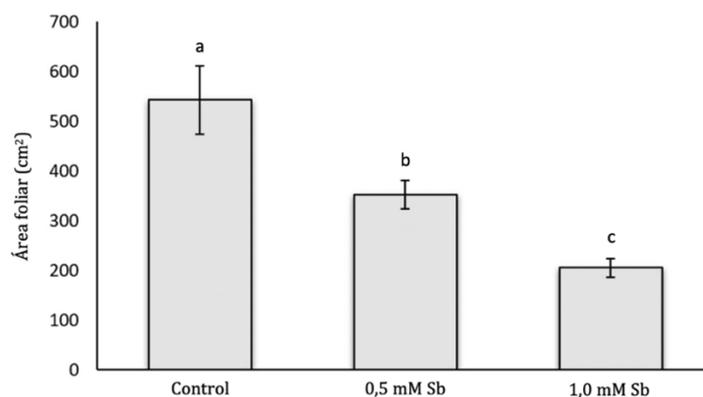


Figura 26. Índice de área foliar en plantas control y tratadas con 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb. Los datos son medias de, al menos cuatro experimentos independientes \pm SD. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Efecto del Sb en la acumulación de Sb y otros elementos minerales

En la Tabla 5 se muestra que el incremento en la cantidad de Sb en el medio de cultivo provoca un significativo y fuerte aumento en la absorción y acumulación de este elemento, tanto en raíces como en la parte aérea. Cuanto mayor es la cantidad de Sb presente en el medio, mayor es la absorción y el transporte hasta la parte aérea. En ambas concentraciones se observa cómo la capacidad de acumulación es mucho mayor en raíces. Los valores del FB obtenidos muestran claramente la gran capacidad de absorción y acumulación de Sb, tanto en la aérea como radicular, sobre todo con 0,5 mM Sb. La absorción muestra una tendencia a la saturación, tal y como se pone de manifiesto observando los valores del FB. En cuanto a los valores de FT, se observa que aumentan de forma proporcional a la concentración de Sb, (0,03 y 0,42 para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente).

La presencia de Sb en el medio, y su absorción por los tejidos altera también la absorción y acumulación de otros elementos minerales esenciales. En la Tabla 6 se muestran las concentraciones de Fe, Mg, Mn, Cu y Zn, en parte aérea y radicular. El contenido en Fe, Mn y Mg disminuye drásticamente en las raíces por valor de 80%, 35% y 37%, respectivamente, en 1,0 mM Sb. Por el contrario, el contenido en Cu y Zn de las raíces se incrementa significativamente hasta el 82% y 26%, respectivamente, en 1,0 mM Sb. El contenido en la parte aérea de Fe y Mg disminuye, no viéndose alterado el contenido en Mn y Zn. Por el contrario, el Cu incrementa su contenido (x2) en ambos tejidos.

Tabla 5. Contenido de Sb en raíces y hojas y los correspondientes valores de factor de bioacumulación (FB) y factor de translocación (FT) en plantas de tomate. Los datos proceden de 10 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado (letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0,05$, prueba U de Mann-Whitney).

Tratamiento	Sb ($\mu\text{g Sb g}^{-1}\text{PF}$)		FB		FT	
	Raíces	Parte aérea	Raíces	Parte aérea	Raíces	Parte aérea
Control	$4,1 \pm 1,1^c$	nd	nd	nd	nd	nd
0,5 mM Sb	$11332,0 \pm 450,4^b$	$327,4 \pm 28,2^b$	$182,3^a$	$5,46^a$	$0,030^b$	
1,0 mM Sb	$13183,1 \pm 375,3^a$	$554,9 \pm 48,3^a$	$109,6^b$	$4,74^a$	$0,042^a$	

Tabla 6. Efecto del Sb sobre el contenido en Fe, Mn, Cu, Mg y Zn en raíces y parte aérea de plantas de tomate. Los datos proceden de 10 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado (letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0,05$, prueba U de Mann-Whitney).

Tratamiento	Fe		Mn		Cu	
	Raíces	Parte aérea	Raíces	Parte aérea	Raíces	Parte aérea
Control	$633,5 \pm 70,3^a$	$84,9 \pm 6,1^a$	$368,3 \pm 40,1^a$	$43,8 \pm 3,9^b$	$15,7 \pm 2,1^b$	$4,8 \pm 1,1^c$
0,5 mM Sb	$234,7 \pm 22,6^b$	$89,9 \pm 9,1^a$	$307,0 \pm 33,5^a$	$50,6 \pm 6,2^a$	$15,3 \pm 1,3^b$	$6,4 \pm 1,3^b$
1,0 mM Sb	$112,6 \pm 12,8^c$	$69,4 \pm 8,5^b$	$239,6 \pm 21,8^b$	$45,1 \pm 2,7^{ab}$	$28,6 \pm 2,9^a$	$10,2 \pm 1,9^a$

Tratamiento	Mg		Zn	
	Raíces	Parte aérea	Raíces	Parte aérea
Control	$8,2 \pm 0,5^a$	$9,5 \pm 0,7^a$	$45,0 \pm 0,8^b$	$37,5 \pm 0,4^a$
0,5 mM Sb	$6,8 \pm 0,7^b$	$8,0 \pm 0,9^b$	$46,7 \pm 1,0^b$	$33,4 \pm 0,4^c$
1,0 mM Sb	$5,2 \pm 0,6^c$	$4,9 \pm 0,4^c$	$56,6 \pm 1,2^a$	$35,0 \pm 0,5^b$

Efecto del Sb sobre el contenido en pigmentos fotosintéticos y la eficiencia fotosintética

El contenido en clorofila a y clorofila b disminuye en las hojas procedentes de las plantas cultivadas con Sb, tanto más cuanto mayor es la concentración de Sb del medio (Tabla 7). El contenido total en clorofilas desciende un 32% en 0,5 mM Sb y un 40% con 1,0 mM Sb. Se observa una disminución tanto de clorofila a como de b, aunque en esta última, la disminución es mayor. Este cambio se traduce en un aumento en la relación clorofila a/b, que pasa de 1,98 a 2,27 y 2,35 para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente. Los niveles de carotenoides no se alteran en presencia de 0,5 mM Sb y se incrementan un 20% por la presencia de 1,0 mM Sb en el medio. En consecuencia, la relación carotenoides/clorofilas también se incrementa (F_v/F_M). En cuanto a la eficiencia fotosintética (EF), el cultivo en Sb provoca una disminución de este parámetro de aproximadamente el 24%. Todos estos resultados muestran una alteración del sistema fotosintético debido al Sb.

Efecto del Sb sobre las actividades oxidantes y antioxidantes

La producción de $O_2^{\bullet-}$ se ve fuertemente incrementada en las raíces bajo condiciones de toxicidad por Sb (Figura 27A), llegando a un aumento del 72,9% por el cultivo en 0,5 mM Sb, respecto del control. Sin embargo, en las hojas la producción de $O_2^{\bullet-}$ no es significativamente diferente al control.

La actividad SOD se ve incrementada tanto en raíces como en hojas por el tratamiento con Sb (Figura 27B). Las plantas cultivadas con 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb muestra un aumento del 29,9% y 40% para la actividad SOD en las raíces, mientras que estos aumentos en hojas son del 74,8% y 58,2%, comparados con los valores que se obtienen en raíces y hojas control.

La actividad POX (Figura 27C) se ve influenciada sólo por el tratamiento con 0,5 mM Sb en las raíces, donde se observa un aumento del 65,5%. No se observa alteración alguna a nivel de la actividad POX en hojas.

Tabla 7. Efecto de Sb sobre los contenidos de clorofila a y b y clorofila total ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF), relación clorofila a/b, carotenoides totales (Car) ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF), relación carotenoides/clorofilas totales y eficiencia fotosintética (F_v/F_m) en hojas de tomate. Los datos proceden de 10 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado (letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0,05$, prueba U de Mann-Whitney).

Tratamiento	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila a+b	Clorofila a/b	Carotenoides	Carotenoides/ clorofilas totales	F_v/F_m
Control	1947,0 \pm 77,7 ^a	979,8 \pm 109,4 ^a	2947,8 ^a	1,98 ^b	185,4 \pm 12,9 ^b	0,070 ^c	0,771 \pm 0,045 ^a
0,5 mM Sb	1375,6 \pm 76,2 ^b	607,47 \pm 38,7 ^b	1968,3 ^b	2,27 ^a	178,2 \pm 38,7 ^b	0,095 ^b	0,605 \pm 0,058 ^b
1,0 mM Sb	1221,4 \pm 65,2 ^c	523,2 \pm 38,4 ^c	1796,5 ^c	2,35 ^a	225,3 \pm 23,2 ^a	0,132 ^a	0,586 \pm 0,036 ^c

En cuanto a las enzimas relacionadas con el ciclo AsA-GSH, la actividad APX (Figura 27D) los resultados muestran cómo en raíces sólo se produce un aumento de esta actividad en las raíces obtenidas de plantas crecidas en 1,0 mM Sb, con un aumento del 27%. Con 0,5 mM Sb, no se observan diferencias significativas en la actividad APX respecto a las plantas control. Por el contrario, en las hojas se producen aumentos en la actividad APX tanto en las sometidas a 0,5 mM Sb (12,6%) como a 1,0 mM Sb (49,7%). La actividad DHAR (Figura 27E) disminuye en las raíces por el tratamiento con Sb, con valores que descienden un 22% y 34,3%, para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente, respecto de los grupos control. No se ve afectada la actividad DHAR a nivel de las hojas por Sb. En cuanto a la GR (Figura 27F), en raíces se observa un ligero incremento (12%), aunque significativo de su actividad en ambos tratamientos de Sb. En las hojas la actividad GR muestra una ligera, aunque significativa disminución por los tratamientos con Sb. En cuanto a la actividad GSNOR (Figura 27G) no se producen cambios en su actividad en raíces, pero en hojas esta actividad muestra un aumento de casi el 50 %, para 1,0 mM Sb.

Se ha determinado el contenido en fenoles totales, flavonoides y PPGs, que pueden considerarse incluidos dentro del sistema antioxidante no enzimático. Este contenido no se ve alterado por los tratamientos con Sb ni en raíces ni en hojas (Figura 28A-C), sólo el contenido total de flavonoides en hojas sometidas a 0,5 mM Sb muestran un descenso significativo de su contenido. En cuanto a la actividad PPO, enzima relacionada con el metabolismo fenólico (Figura 28D), se observa cómo en las raíces el Sb no afecta a esta actividad, pero en hojas se produce un incremento dependiente de la concentración de Sb.

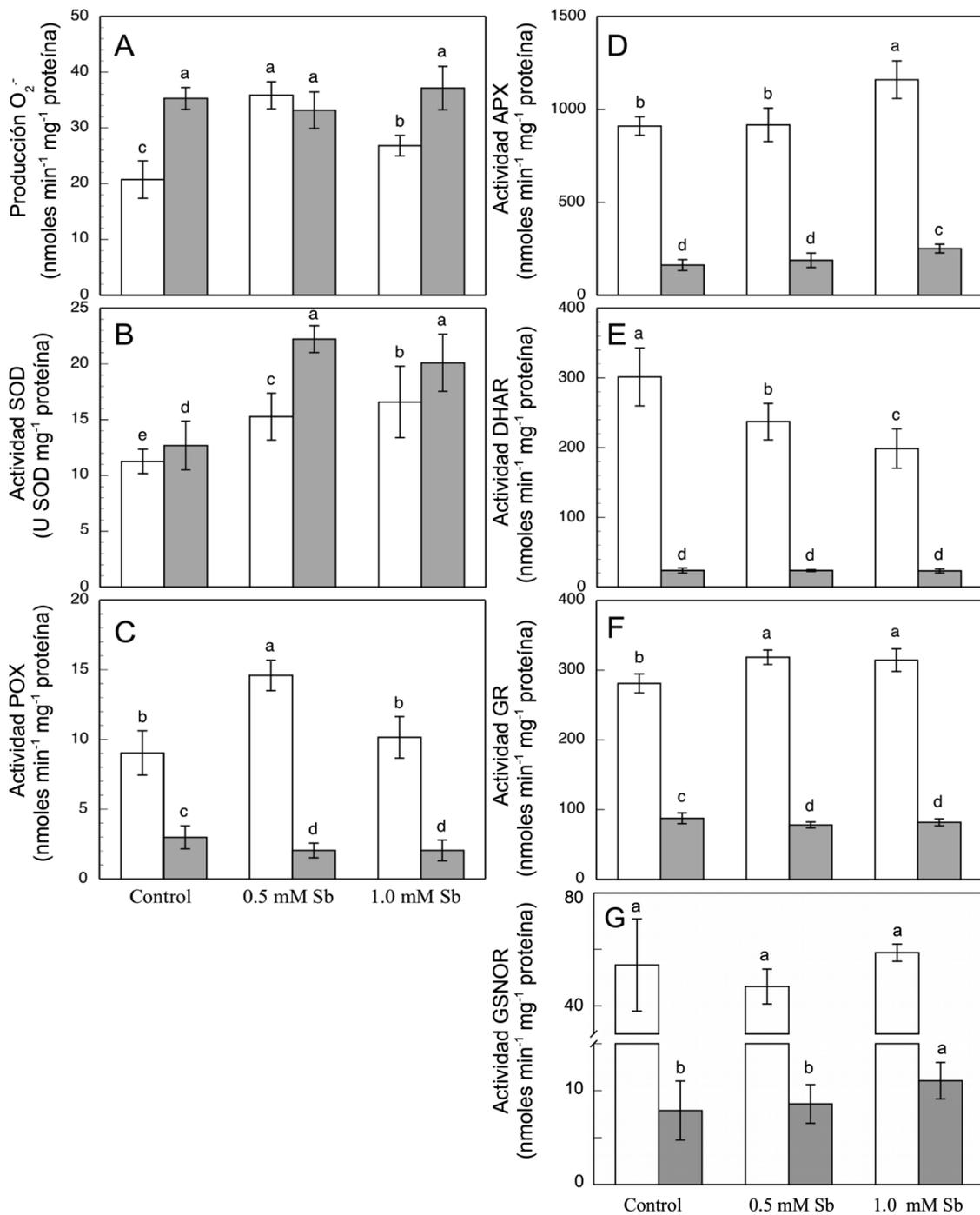


Figura 27. Efecto de Sb sobre la producción de O₂⁻ (A) y sobre las actividades de SOD (B), POX (C), APX (D), DHAR (E), GR (F) y GSNOR (G), en raíces (blanco) y hojas (gris) de tomate. Los datos proceden de 10 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado (letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$, prueba U de Mann-Whitney).

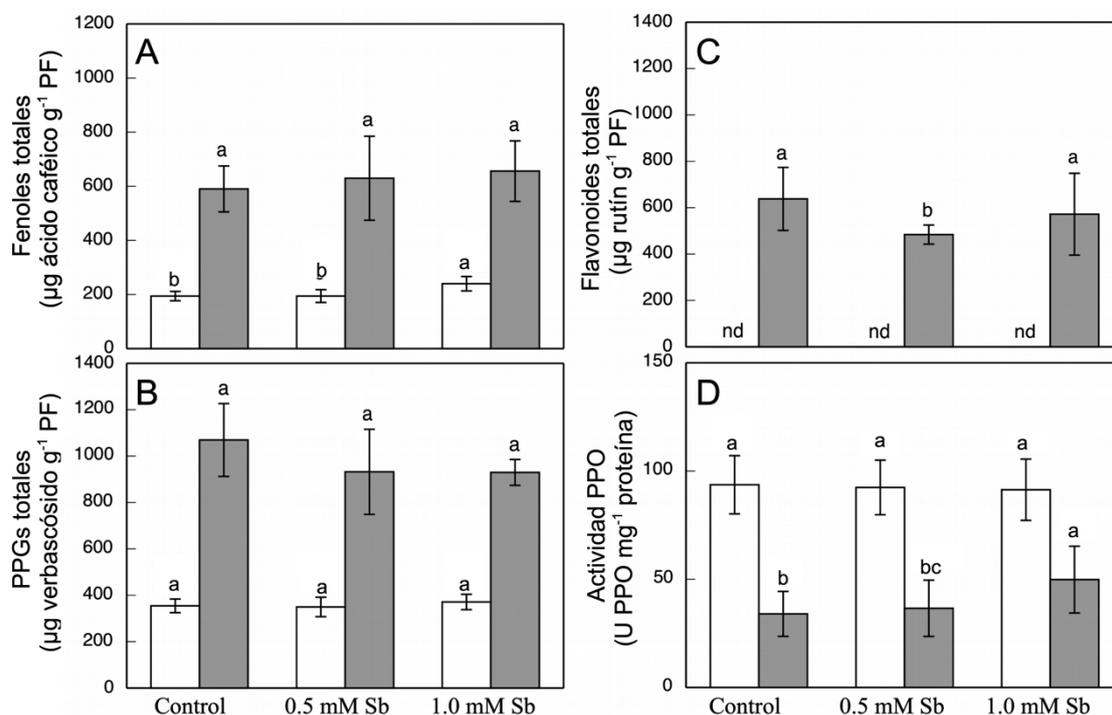


Figura 28. Efecto del Sb sobre el contenido total de fenoles (A), flavonoides (B) y PPGs (C) y actividad PPO (D) en raíces (blanco) y hojas (gris) de tomate. Los datos provienen de 10 experimentos independientes, cada uno llevado a cabo por triplicado (diferentes letras indican diferencias significativas a $P < 0.05$, prueba U de Mann-Whitney).

Algunos de los sistemas antioxidantes no enzimáticos más importantes en las células, son el AsA y el GSH. El tratamiento con 0,5 mM Sb provoca una disminución en el contenido de AsA en las raíces, aunque el tratamiento con 1,0 mM no altera este contenido (Tabla 8). Por el contrario, en las hojas ambos tratamientos de Sb producen un aumento en el contenido de AsA. Un comportamiento contrario tiene el contenido en DHA, que aumenta en raíces bajo 1,0 mM Sb sin que se vea alterado en 0,5 mM Sb, disminuyendo en hojas para las dos concentraciones utilizadas. Estas alteraciones provocan que el contenido total de AsA+DHA disminuya tanto en raíces como en hojas para 0,5 mM Sb y aumente para 1,0 mM Sb. El cociente AsA/DHA, se considera un sensor del estrés oxidativo, observándose una disminución de esta relación en raíces y un aumento en hojas, dependiente en ambos casos del aumento de contenido en Sb. Estos cambios únicamente son significativos en la concentración más alta de Sb.

El nivel de GSH (Tabla 8) disminuye en raíces, mientras que aumenta en hojas, mostrando nuevamente un comportamiento diferente en 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb. En raíces, el GSH

disminuye un 33% para 0,5 mM Sb y un 27% para 1,0 mM Sb. En hojas aumenta un 24%, con 1,0 mM Sb, sin verse modificado de forma significativa con 0,5 mM Sb. En cuanto al contenido de GSSG en respuesta al tratamiento con Sb, en raíces disminuye con 0,5 mM Sb (44%), y con 1,0 mM Sb (30%), sin que haya alteraciones significativas en hojas. Estas alteraciones a nivel del contenido en GSH y GSSG hacen que el contenido total de ambos no se vea alterado en hojas, pero sí en raíces. En raíces se produce un descenso en ambos tratamientos, siendo más acusado en el caso de 0,5 mM Sb. La relación GSH/GSSG en raíces aumenta para 0,5 mM Sb, pasando de 0,316 a 0,385, aunque este aumento no es significativo, para la concentración mayor, no hay cambio alguno respecto al grupo control. En hojas, esta la relación disminuye para la menor concentración de Sb, (aunque no significativamente) y aumenta de forma significativa para 1,0 mM Sb.

El crecimiento de las raíces bajo toxicidad de 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb durante 14 días induce un aumento en la cantidad de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet NO$ y $ONOO^-$ en raíces intactas. Estas especies reactivas se han determinado a partir de las imágenes de fluorescencia de las raíces incubadas con los fluorocromos DCF-DA, DAF-2DA y APF, respectivamente, realizando su cuantificación mediante la intensidad de píxel de estas imágenes. También se ha determinado la fluorescencia emitida en extractos obtenidos a partir de raíces incubadas previamente con los fluorocromos anteriormente citados (Figura 29A-J). Este incremento en el caso de la acumulación de $O_2^{\bullet-}$, $\bullet NO$ y $ONOO^-$ sólo es significativamente diferente para 1,0 mM Sb, pero no para 0,5 mM Sb (Figura 29A,B,E-H). En el caso del contenido en H_2O_2 (Figura 29C,D) sí hay un fuerte incremento para ambas concentraciones de Sb. En cuanto a la producción de RSNOs se observa un leve aumento en respuesta al Sb.

En la zona de elongación (ZE), especialmente en las raíces sometidas a 1,0 mM Sb, se observa una clara alteración en el tamaño y disposición de las células (Figura 29K). Estas alteraciones consisten en una desorganización de esta zona, lo que lleva a una menor elongación celular, observándose células mucho más cortas que las observadas en las raíces control en esta misma zona, y produciéndose la desorganización de las columnas de células, lo que provoca el engrosamiento anormal de la ZE.

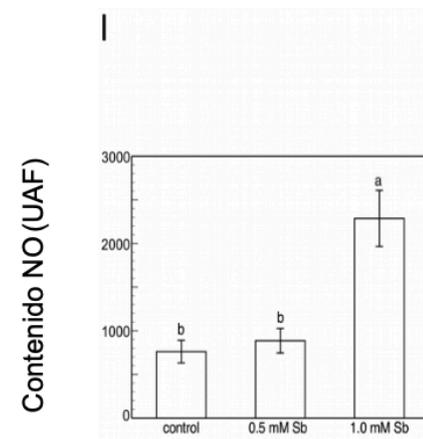
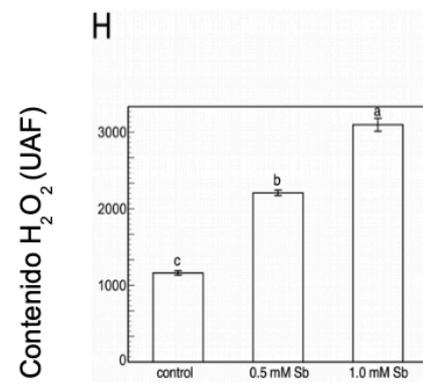
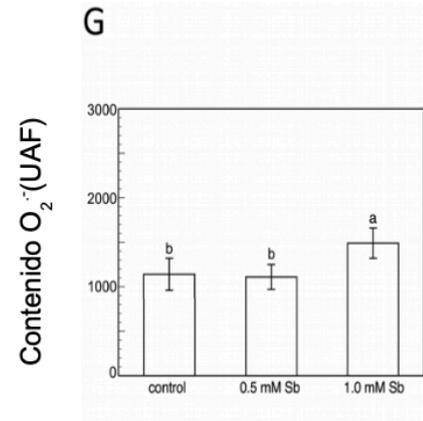
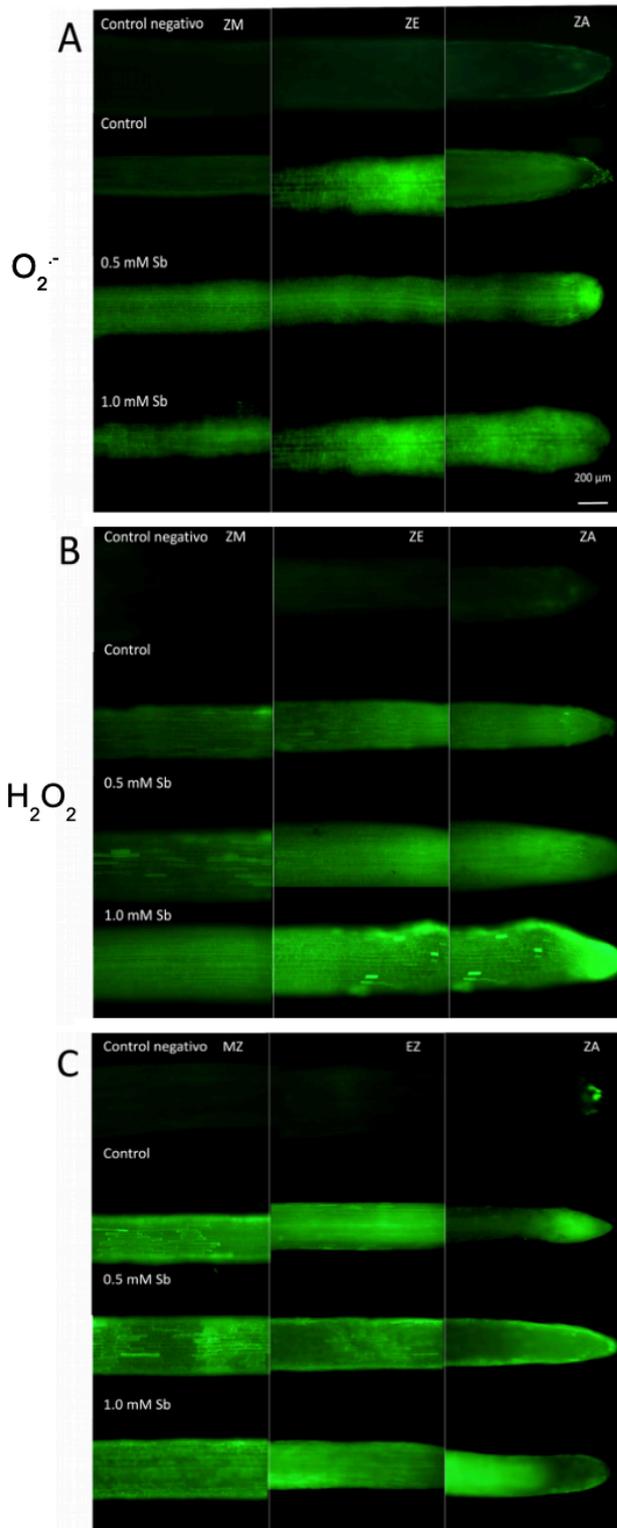
Tabla 8. Efecto de Sb en el contenido de AsA, DHA y Ascorbato total (AsA + DHA), la relación AsA/DHA, el contenido de GSH, GSSG y glutatión total (GSH + GSSG) y la relación GSH/GSSG, en raíces y hojas de plantas de tomate. Los datos proceden de 10 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado (letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0,05$, prueba U de Mann-Whitney).

Tratamiento	AsA		DHA	
	Raíces	Hojas	Raíces	Hojas
Control	95,23 ± 9,73 ^a	223,38 ± 35,36 ^b	388,10 ± 28,17 ^b	2195,65 ± 143,33 ^a
0,5 mM Sb	68,07 ± 5,51 ^b	234,17 ± 38,63 ^b	324,22 ± 34,83 ^b	2127,77 ± 161,99 ^a
1,0 mM Sb	103,63 ± 6,64 ^a	361,95 ± 45,60 ^a	580,94 ± 69,43 ^a	2053,25 ± 270,45 ^a

Tratamiento	AsA + DHA		AsA / DHA	
	Raíces	Hojas	Raíces	Hojas
Control	483,33 ± 51,5 ^b	2419,03 ± 133,36 ^a	0,249 ± 0,011 ^a	0,102 ± 0,089 ^b
0,5 mM Sb	361,14 ± 29,8 ^c	2361,53 ± 208,86 ^a	0,237 ± 0,021 ^a	0,109 ± 0,008 ^b
1,0 mM Sb	684,56 ± 55,7 ^a	2430,20 ± 224,06 ^a	0,179 ± 0,009 ^b	0,180 ± 0,021 ^a

Tratamiento	GSH		GSSG	
	Raíces	Hojas	Raíces	Hojas
Control	13,15 ± 2,0 ^a	18,71 ± 3,1 ^b	43,1 ± 3,9 ^a	79,95 ± 8,2 ^a
0,5 mM Sb	8,83 ± 1,4 ^b	17,62 ± 2,6 ^b	24,24 ± 3,5 ^c	85,84 ± 9,1 ^a
1,0 mM Sb	9,7 ± 1,6 ^b	23,24 ± 3,0 ^a	30,32 ± 2,2 ^b	72,82 ± 6,5 ^a

Tratamiento	GSH + GSSG		GSH / GSSG	
	Raíces	Hojas	Raíces	Hojas
Control	56,25 ± 5,8 ^a	98,66 ± 11,4 ^a	0,316 ± 0,029 ^a	0,247 ± 0,013 ^b
0,5 mM Sb	33,06 ± 4,1 ^c	103,46 ± 8,5 ^a	0,385 ± 0,030 ^a	0,205 ± 0,091 ^b
1,0 mM Sb	40,02 ± 3,6 ^b	96,06 ± 10,5 ^a	0,316 ± 0,025 ^a	0,333 ± 0,021 ^a



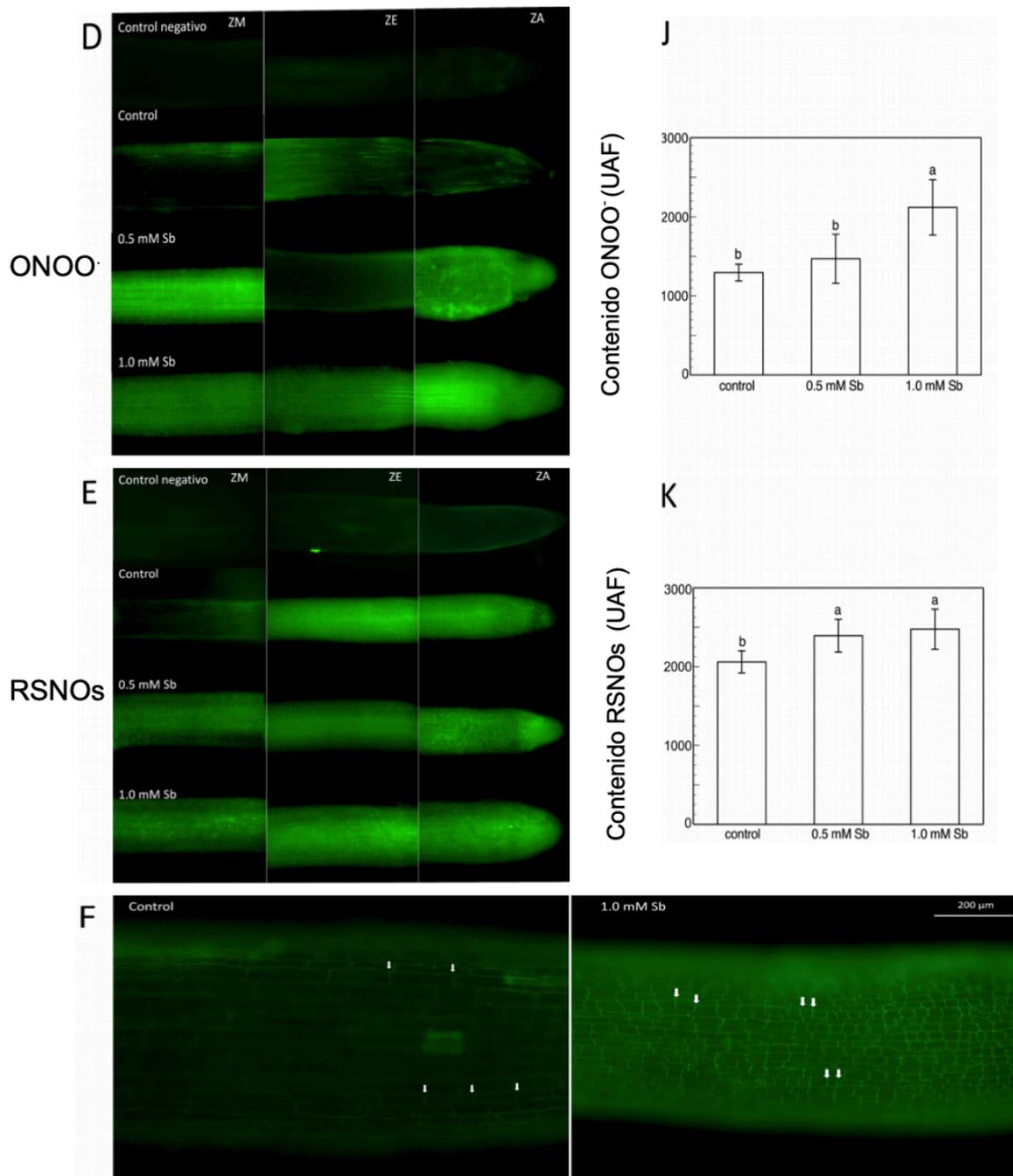


Figura 29. Detección de la producción de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet NO$, $ONOO^-$ y RSNOs en sección longitudinal de las raíces (A, C, E, G, I), y los niveles medios de intensidad de fluorescencia cuantificados en unidades arbitrarias (B, D, F, H, J), respectivamente. Se ensayaron al menos 5 raíces para cada condición experimental y se analizaron 5 repeticiones independientes. Barra: 200 μm .

En la Figura 30 se muestran los valores de ROS y RNS obtenidos mediante espectrofluorometría, utilizando las mismas sondas que en las imágenes de microscopía de fluorescencia para su detección. Se observa cómo la toxicidad de Sb provoca un aumento significativo tanto en ROS como en RNS, coincidiendo con las estimaciones

realizadas a partir de las imágenes de fluorescencia. Así, $O_2^{\bullet-}$ (Figura 30A) aumenta (x1,5 veces) bajo toxicidad de Sb 1,0 mM, mientras que H_2O_2 (Figura 30B) aumenta tanto para 0,5 mM Sb como para 1,0 mM Sb. Tanto el $\bullet NO$ como el $ONOO^-$ aumentan considerablemente con respecto al control (Figuras 30C,D), presentando el $ONOO^-$ valores muy altos para ambas concentraciones de Sb. Por el contrario, los RSNOs (Figura 30E) no sufren ningún cambio, siendo los valores muy similares a los controles. Este comportamiento de los RSNOs podría ser debido a la capacidad del Sb para interactuar con grupos tiol, impidiendo la unión del $\bullet NO$, lo que podría explicar el marcado aumento en la cantidad de $\bullet NO$ detectado bajo la toxicidad del Sb (x3 con respecto a los valores de control).

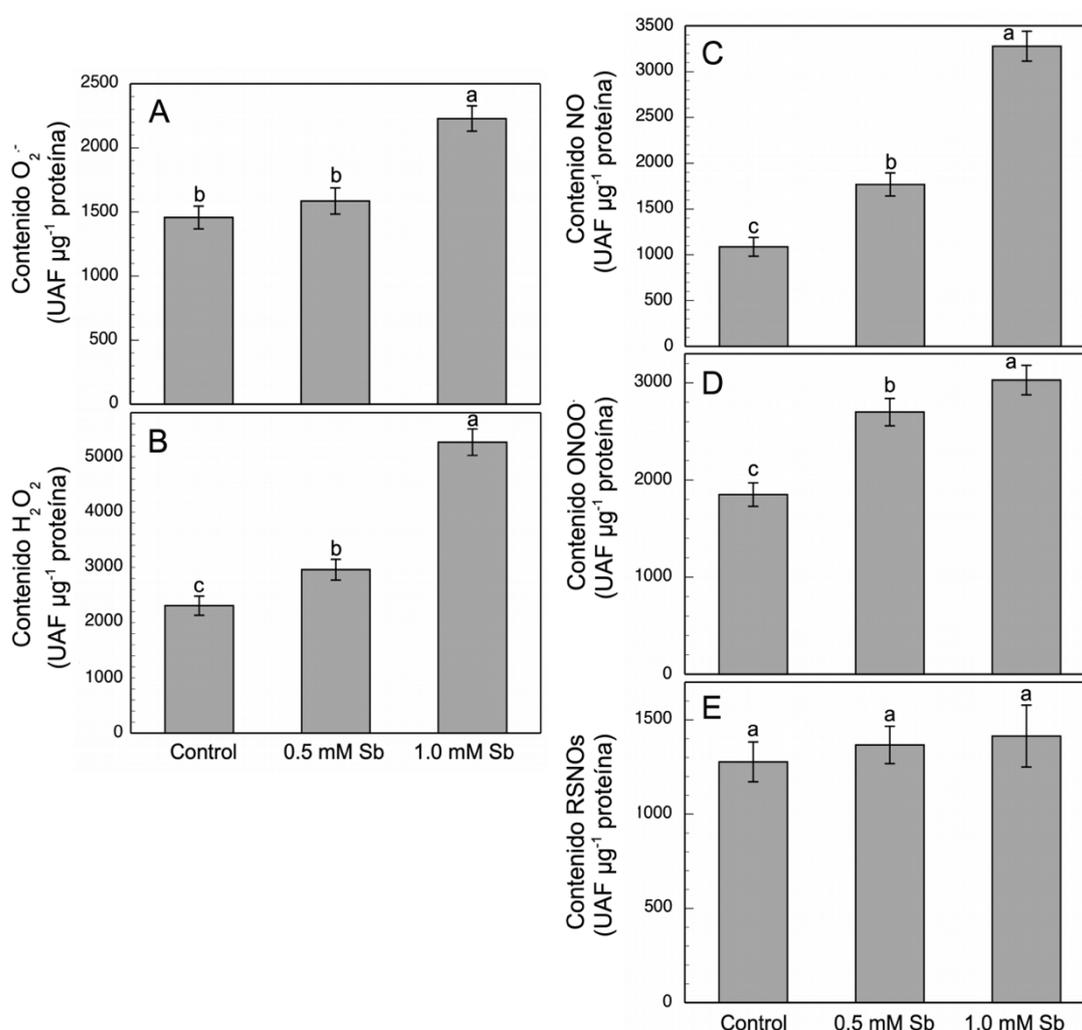


Figura 30. Detección mediante fluorimetría del contenido en $O_2^{\bullet-}$ (A), H_2O_2 (B), $\bullet NO$ (C), $ONOO^-$ (D), y RSNOs (E) en raíces de tomate. La fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) μg^{-1} proteína. Se ha utilizado, al menos 5 raíces para cada tratamiento, con 5 repeticiones independientes.

4.1.2. Discusión

Las plantas de *S. lycopersicum* muestran claramente efectos de la toxicidad inducida por Sb. El PF y el PS tanto de la parte radicular como de la parte aérea, se reduce en las plantas sometidas a toxicidad de Sb, con pesos muy similares para ambas concentraciones. El crecimiento de la parte radicular se ve afectado, aunque en menor medida que el de la parte aérea. Las raíces presentan una mayor acumulación de Sb, con valores muy superiores a los de la parte aérea. Este efecto del Sb sobre el crecimiento en tomate es similar al observado en otras plantas (Bech et al., 2012; Cai et al., 2016; Chai et al., 2017; Ortega et al., 2017; Pan et al., 2011; Shtangeeva et al., 2011; Zhou et al., 2018). Sin embargo, Peško et al. (2016), en *S. lycopersicum*, describen un comportamiento diferente, con aumento en el PS en las concentraciones bajas mientras que las más altas producen una reducción del PS tanto en los tallos como en las raíces. En otros casos, las alteraciones del crecimiento son leves (Feng et al., 2011) o inexistentes, como describen Tschan et al. (2008) en *Z. mays* y *H. annuus*, aunque las concentraciones utilizadas por estos autores son muy inferiores a las del presente estudio. En la ZE se observan alteraciones en el tamaño y la organización celular que podrían deberse al efecto tóxico del Sb a través de su interacción con el GSH. Se ha demostrado claramente la participación del GSH en la regulación de los niveles de auxina en los ápices de las raíces y en la alteración del centro quiescente (Koprivova et al., 2010). Así, cualquier alteración en el contenido de GSH se traduce en una alteración en el desarrollo de estos meristemas radiculares. Vernoux et al. (2000) demuestran cómo los mutantes de *Arabidopsis* que presentan un contenido muy reducido de GSH muestran una disminución drástica en el meristemo de la raíz. La capacidad de Sb para unirse a grupos -SH (Ortega et al., 2017; Sun et al., 2000) para formar fitoquelatinas de Sb (GS-Sb) similares a las GS-Cd observadas para el Cd (Mendoza-Cózatl et al., 2008) como sistema de desintoxicación de Sb pueden actuar reduciendo drásticamente la cantidad de GSH y alterar el desarrollo de las raíces.

En estas plantas los valores del FB obtenidos muestran una clara acumulación de Sb en las raíces (182,3 y 109,6 para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente), valores muy superiores a los niveles de Sb detectados en la parte aérea (5,46 y 4,74 para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente). Los valores del FT también son bajos (0,029 y 0,042 para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente), lo que indica la baja capacidad de translocación del Sb en las plantas de tomate. Estos valores de FT son muy inferiores a

los descritos en otras plantas sometidas a estrés por Sb (Zhou et al., 2018). Además, se ha evidenciado que existe una fuerte dependencia de los FT para el Sb tanto de la especie de planta como de la concentración de Sb del suelo (Pan et al., 2011). Los FT observados son mayores en plantas capaces de soportar altas concentraciones de Sb (Pérez-Sirvent et al., 2012; Zhou et al., 2018).

La toxicidad del Sb también altera la absorción y el transporte de otros elementos minerales. Así, a medida que aumenta la cantidad de Sb en el medio, la absorción y acumulación de Fe y Mg disminuyen tanto en la parte radicular como en la aérea, mientras que el Mn sólo disminuye en la radicular. El contenido de Cu, sin embargo, aumenta por debajo de 1,0 mM Sb, y el Zn es el elemento que presenta menos afectada su absorción ya que sólo muestra un aumento en las raíces. Estos cambios reflejan la interacción entre estos elementos y Sb a nivel de absorción y transporte. Estos resultados concuerdan parcialmente con los observados en otros trabajos. Así, bajo toxicidad de Sb, (Feng et al., 2013c) describen una disminución en el contenido de Mg, Fe, Mn, Cu y Zn. En un estudio anterior con plantas de *H. annuus* (Ortega et al., 2017), observan un aumento en el contenido de Mg y Cu, mientras que Fe y Zn disminuyen. Por otro lado, y en respuesta a la toxicidad de Zn, Feigl et al. (2015) describen un aumento en el contenido de Cu y descensos en los contenidos de Fe y Mn.

El contenido total de clorofilas disminuye, debido al descenso tanto en el contenido de clorofila a como de clorofila b, siendo el descenso de la clorofila b mayor. Esta disminución puede estar relacionada, como el resto de alteraciones ya descritas, con la interacción entre Sb y los grupos -SH. Esta interacción afecta a la funcionalidad de los sistemas enzimáticos implicados en la biosíntesis de las clorofilas y a la estabilidad de los propios cloroplastos (Zhou et al., 2018). Estos resultados coinciden con los observados por Pan et al. (2011) en *Z. mays* y por Xue et al. (2015) en *Miscanthus sinensis*, quienes atribuyen estos descensos en el contenido en clorofilas a un efecto del Sb sobre su biosíntesis. También la alteración en el contenido de cationes como el Mg, que se reduce casi a la mitad en la parte aérea, puede afectar al contenido total de clorofilas. Por otro lado, el aumento de la relación clorofila a/clorofila b es interesante ya que refleja cambios en la funcionalidad de los tilacoides, modificando su estado de apresamiento (Anderson & Aro, 1994). Además, estos cambios en el grado de apresamiento tilacoidal alteran la fluidez de sus membranas y con ello reducen la transferencia de electrones (Chow, 1999)

y pueden provocar fotoinhibición (Zhou et al., 2018). Como consecuencia de estas alteraciones inducidas por la toxicidad de Sb, la eficiencia fotosintética disminuye drásticamente (24%), posiblemente debido al efecto del Sb sobre PSII al alterar la apresión y fluidez de las membranas de los tilacoides (Pan et al., 2011; Zhou et al., 2018). Por el contrario, tanto el contenido de carotenoides como la relación carotenoides/clorofilas aumentan. Esta respuesta coincide con las observaciones de (Chai et al., 2017), quienes reflejan la acción de los carotenoides como antioxidantes y fotoprotectores frente a estreses abióticos. Sin embargo, no coinciden con los resultados de (Zhou et al., 2018), quienes describen descensos en el contenido de carotenoides y en la relación carotenoides/clorofilas en respuesta a la toxicidad de Sb en *Acorus calamus*, si bien en este caso la planta utilizada es descrita como hiperacumuladora de Sb.

El contenido total de compuestos fenólicos se mantiene inalterado tanto en raíces como en hojas, lo que contrasta con la respuesta del *H. annuus* frente a los mismos niveles de toxicidad por Sb (Ortega et al., 2017) en los que aumenta el contenido de compuestos fenólicos, especialmente flavonoides. Rajabpoor et al. (2019) también observan en *Salvia spinosa* grandes aumentos en el contenido total de fenoles y flavonoides, aumentos que podrían haber estado involucrados en la defensa y tolerancia a Sb. Sólo la actividad de la PPO en hojas bajo toxicidad de 1,0 mM Sb parece aumentar, como también lo hizo para esta misma concentración de Sb en *H. annuus* (Ortega et al., 2017). Este resultado indicaría la no intervención de estos compuestos en la maquinaria de defensa antioxidante frente al estrés inducido por Sb.

No hay alteración en los niveles de peroxidación lipídica en hojas, y sólo un ligero aumento en raíces. Estos resultados sugieren que la participación del sistema antioxidante parece prevenir daños a nivel de la peroxidación de las membranas en las hojas, pero no son suficientes para prevenir dichos daños en las raíces, donde la concentración de Sb es mucho mayor. Estos resultados coinciden con los descritos por Feng et al. (2011) y Corrales et al. (2014) quienes señalan la baja incidencia del Sb en la peroxidación lipídica. Otros estudios en diferentes especies muestran un claro aumento de la peroxidación lipídica inducida por Sb, evidenciando daños en las membranas y desequilibrios en la homeostasis redox (Chai et al., 2016, 2017; Ortega et al., 2017; Paoli et al., 2013; Xue et al., 2015).

La toxicidad de Sb induce un aumento en el contenido de prolina de las hojas (Rajabpoor et al., 2019; Xue et al., 2015). El aumento producido en el contenido de este osmolito en las hojas puede estar relacionado con la necesidad de contrarrestar la disminución del potencial de soluto debido a la alteración del CHR % inducido por Sb. El estrés hídrico causado por la reducción de CHR % puede conducir a una mayor síntesis de prolina como sistema de osmoprotección, previniendo la deshidratación y la inactivación de proteínas (Verbruggen & Hermans, 2008). Este aumento en las hojas también podría actuar eliminando directamente el OH⁻ (Signorelli et al., 2014), contribuyendo así a mantener la estabilidad de las membranas (Hayat et al., 2012). También se ha descrito la participación de la prolina en la inducción de enzimas antioxidantes, sin participar en la eliminación de O₂⁻, •NO o ONOO⁻ (Signorelli et al., 2016). Contrastando con nuestros resultados, en *Z. mays* bajo estrés por Sb, se produce un marcado aumento en el contenido de prolina en las raíces (Vaculíková et al., 2014).

El Sb induce un aumento en la producción de O₂⁻ en las raíces del tomate, pero no en las hojas. Este efecto es similar al observado *H. annuus* (Ortega et al., 2017), aunque en este caso el aumento de O₂⁻ se produce tanto en raíces como en hojas. Otros investigadores también describen aumentos en la producción de O₂⁻ bajo la toxicidad de metales pesados. Así, Feigl et al. (2015) observan un aumento similar de O₂⁻ en respuesta a la toxicidad del Zn en *Brassica napus*, pero no en *Brassica juncea*. Srivastava et al. (2014) describen un aumento similar en raíces y hojas de *O. sativa* sometido a toxicidad por Cd. Los incrementos en el contenido de •NO y ONOO⁻ observado en las raíces son muy similares a los descritos para la toxicidad del Zn (Feigl et al., 2015). El aumento del contenido de ONOO⁻ puede explicar el moderado aumento del contenido de NO y O₂⁻ (Feigl et al., 2015). Sin embargo, el contenido de RSNOs se mantiene inalterado, aunque en condiciones de estrés biótico se sabe que aumenta (Chaki et al., 2009). Además, la determinación espectrofluorométrica de ROS y RNS muestra que ambos grupos de especies reactivas aumentan bajo la toxicidad de Sb, lo que podría ser indicativo de que se ha producido un estrés nitrooxidativo (Corpas & Barroso, 2013). Los aumentos en el contenido de •NO y ONOO⁻ que se observan bajo toxicidad de Sb contrastan con los resultados de Rodríguez-Ruiz et al. (2019) para plantas de *Pisum sativum* sometidas a toxicidad de As, donde se observan fuertes disminuciones de estas especies reactivas en raíces, aunque en hojas se produce un aumento del contenido de •NO, mientras que el

contenido de ONOO^- no sufre cambios. El aumento de $\text{O}_2^{\bullet-}$ está de acuerdo con el aumento en la actividad SOD, especialmente bajo toxicidad de 1,0 mM Sb, lo que refleja la inducción del sistema antioxidante. (Feng et al., 2020) observan un efecto similar sobre el aumento de la actividad de SOD en *O. sativa* bajo estrés causado por diferentes formas de Sb. Estos aumentos en la actividad de SOD pueden explicar la baja incidencia de toxicidad de Sb en la peroxidación lipídica de las membranas. Respecto a la actividad POX, aumenta en raíces, pero no en hojas. El aumento en las actividades SOD, POX y APX reflejan la participación de la maquinaria antioxidante en la respuesta a la toxicidad de Sb (Benhamdi et al., 2014; Feng et al., 2009, 2020; Ortega et al., 2017; Vaculíková et al., 2014) y de otros metales pesados (Feigl et al., 2015; Rodríguez-Ruiz et al., 2019; Srivastava et al., 2014). Otras actividades como la DHAR y GR no se alteran significativamente por la toxicidad de Sb en las hojas, pero sí en las raíces, así, la actividad DHAR se inhibe mientras que la GR aumenta ligeramente. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Rodríguez-Ruiz et al. (2019) y Singh et al. (2015) quienes observan aumentos en la actividad GR y la inhibición de la actividad de DHAR. Por el contrario, Feng et al. (2009) describen la inhibición de la actividad de GR como un efecto de Sb. La presencia de Sb induce un aumento tanto del contenido de $\bullet\text{NO}$, ONOO^- y RSNOs, mientras que la actividad GSNOR no se altera en raíces y aumenta en hojas, con descensos del GSH en raíces, pero no en hojas. Nuevamente observamos cómo la respuesta al Sb depende en gran parte del órgano de la planta y muestran una alta variabilidad. Estos resultados en hojas coinciden con los obtenidos por Leterrier et al. (2011) en *A. thaliana* sometidas a estrés de As, que describen aumento de $\bullet\text{NO}$ y de actividad GSNOR en plántulas, a la vez que observan un descenso en el contenido de GSH. El Sb en *H. annuus* y *S. lycopersicum* (Ortega et al., 2017, Ma et al., 2019) también induce aumentos en el contenido de $\bullet\text{NO}$ y ONOO^- y de la actividad GSNOR, aunque estos efectos activadores varían según el órgano. Por el contrario, son discrepantes con los obtenidos en *P. sativum* sometidos a toxicidad de As, en los que la actividad GSNOR está inhibida y no se producen aumentos de $\bullet\text{NO}$ y ONOO^- (Rodríguez-Ruiz et al., 2019). Los aumentos en el contenido de $\bullet\text{NO}$, ONOO^- y RSNOs, y los cambios en la actividad de GSNOR son evidencias de la participación de $\bullet\text{NO}$ en esta respuesta y su interacción con $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y GSH.

Por otro lado, el contenido de los componentes del ciclo AsA-GSH se modifica en respuesta a la toxicidad de Sb. En raíces se produce un aumento del contenido de AsA y DHA, aunque este último lo hace en mayor proporción, provocando una disminución de AsA/DHA. En hojas AsA/DHA aumenta a medida que disminuye el contenido de DHA. En raíces, el GSH y el GSSG disminuyen, mientras que en hojas, el GSH aumenta y el GSSG permanece sin alteración. La relación GSH/GSSG sólo se modifica en las hojas, en las que aumenta. El efecto de Sb sobre AsA y GSH coincide en parte con los resultados obtenidos en respuesta a la toxicidad de Cd (Srivastava et al., 2014) y As (Singh et al., 2015). Las raíces son el órgano más afectado por la toxicidad del Sb. Los resultados muestran un desequilibrio entre los componentes del ciclo AsA-GSH. Mientras que el contenido total Ascorbato (AsA+DHA) aumenta en raíces, el contenido total en glutatión (GSH+GSSG) disminuye, con un claro desequilibrio en el ciclo y con alteración de las actividades enzimáticas relacionadas con el mismo. Estos resultados coinciden con los descritos por (Rodríguez-Ruiz et al., 2019) para el efecto de la toxicidad del As en plantas de *P. sativum* cultivadas hidropónicamente. La toxicidad de As provoca un aumento en las actividades APX y GR tanto en raíces como en hojas, mientras que las actividades DHAR y MDHAR disminuyeron en raíces, pero no se vieron afectadas en hojas; y, en ambos órganos, el contenido de GSH y GSSG disminuye, permaneciendo el contenido de AsA sin cambios, con un marcado aumento de fitoquelatinas. En este trabajo, en plantas de tomate se observa que la toxicidad de Sb induce aumentos tanto en la actividad antioxidante como en el contenido de GSH y GSSG en raíces, con un comportamiento similar al descrito para el As. En raíces con altas cantidades de Sb acumulado se produce un aumento de la actividad de GR y disminución de la actividad DHAR, lo que favorece la disponibilidad de GSH para la formación de quelatos con Sb (Noctor et al., 2012). La formación de estos quelatos de Sb es un mecanismo de protección contra la toxicidad de este metaloide y contra la de otros metales pesados (Hossain et al., 2012; Natasha et al., 2019; Yadav, 2010). La capacidad del Sb para formar complejos con los grupos -SH (Foyer & Noctor, 2005; Sun et al., 2000) podría ser la causa del desequilibrio observado en los componentes antioxidantes, así como de los efectos que sobre el crecimiento presenta.

En conclusión, las plantas de tomate sometidas a toxicidad por Sb (Figura 31) muestran una gran capacidad para acumular este elemento, especialmente en sus raíces, lo que produce una alteración del crecimiento, cambios en la capacidad de absorber otros elementos minerales como Fe y Mg, y disminución del contenido de clorofilas y eficiencia fotosintética. La toxicidad de Sb induce aumentos en la producción de ROS y RNS, y en las actividades de SOD, POX, APX y GR, pero no de DHAR en las raíces, limitando el transporte a las partes aéreas, con alteración de la homeostasis redox. Nuestros resultados sugieren que los efectos inducidos por la toxicidad del Sb pueden deberse a la capacidad de este metaloide para interactuar con los grupos -SH, incluidos los grupos tiol del GSH. El contenido de GSH también interviene en el mantenimiento de los niveles de auxina en las raíces y centro quiescente, por lo que se altera el desarrollo radicular.

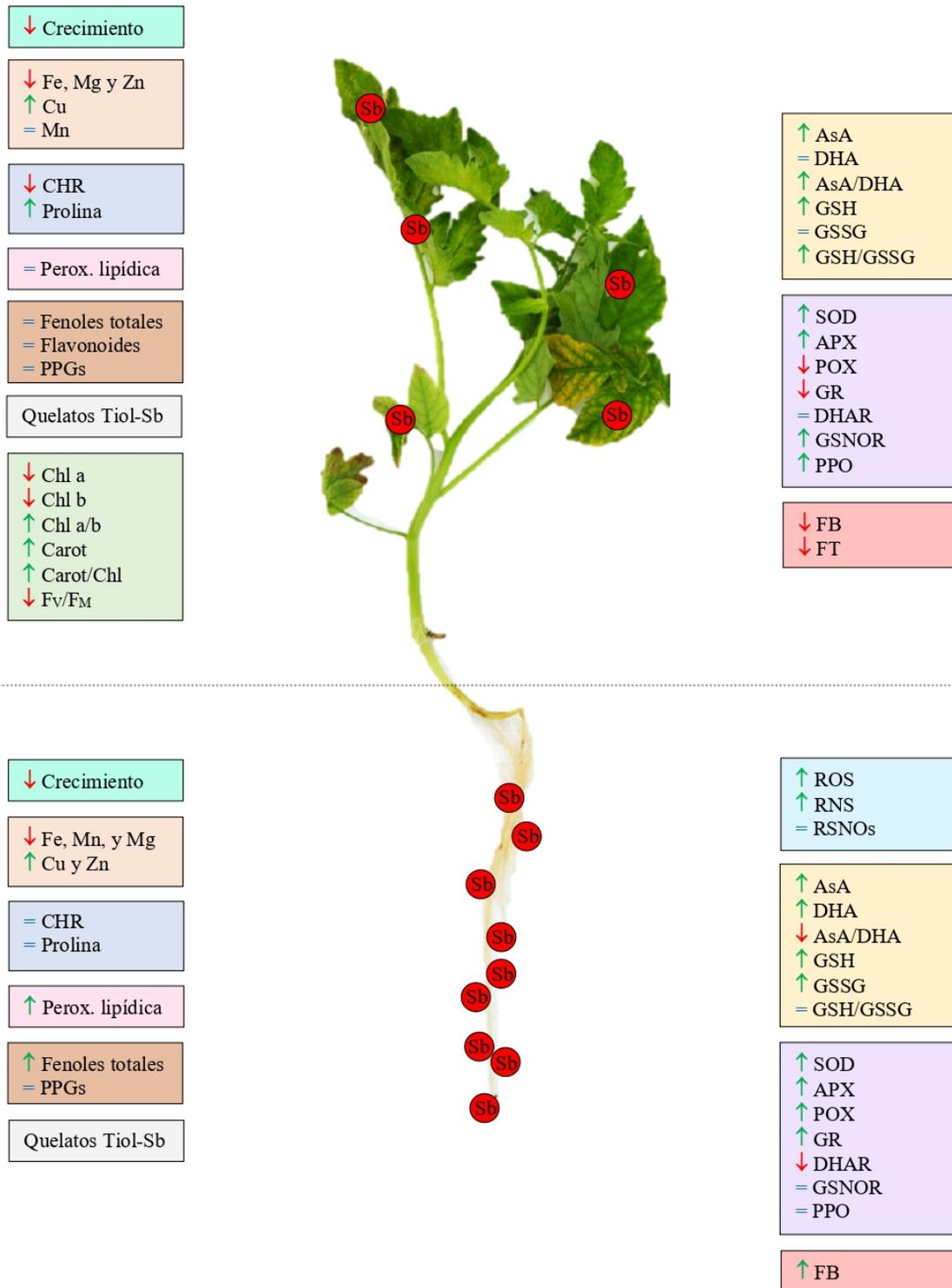


Figura 31. Esquema general de los efectos de la toxicidad de Sb sobre los parámetros de crecimiento, pigmentos y eficiencia fotosintética, acumulación de elementos minerales y Sb, producción de ROS y RNS, actividades antioxidantes, compuestos fenólicos, y componentes del ciclo AsA-GSH en plantas de *S. lycopersicum*.

4.2. Respuesta molecular de *Solanum lycopersicum* a la toxicidad de Sb

4.2.1. Resultados

Análisis de los niveles de expresión de genes que codifican para las enzimas APX, GR_chl, GST y SOD en órganos foliares jóvenes y maduros

Se ha estudiado la expresión de genes codificantes de enzimas implicadas en el ciclo AsA-GSH y en la conjugación de GSH con xenobióticos, como metales y metaloides pesados en respuesta a la toxicidad por Sb.

En hojas del verticilo basal (maduro) (Figura 32A) se observa que la expresión de la *SOD*, así como de la *GR_chl* se incrementa a medida que aumenta la concentración del metaloide, excepto para *GR_chl*, que a 0,5 mM Sb su expresión es inferior a la medida en las plantas control, sin estrés. Por otra parte, la expresión de la APX y de GST es superior a los valores obtenidos en las plantas control, si bien es cierto, que, en ambos casos, el patrón de expresión más alto se obtiene en las plantas sometidas a toxicidad por 0,5 mM Sb. Estos resultados son opuestos a los obtenidos en hojas de verticilos jóvenes (apicales) (Figura 32B). En estos casos, la expresión de la *APX*, *GR_chl*, *GST* y *SOD* es siempre inferior o igual a los valores obtenidos en plantas control. Las hojas procedentes de plantas sometidas a toxicidad de 0,5 mM Sb se presentan valores de expresión inferiores a los de las plantas control. Sin embargo, en hojas sometidas a 1,0 mM Sb sólo se observan valores significativamente inferiores al control para la *SOD*. En las hojas adultas, los patrones de expresión son más uniformes que en las jóvenes, como muestra la desviación típica (SD).

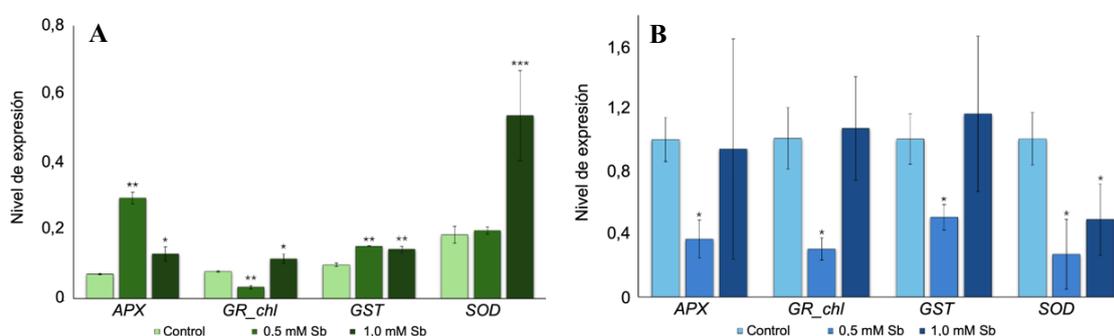


Figura 32. Efecto del Sb en los niveles de expresión de los genes *APX*, *GR_cyt*, *GST* y *SOD* en hojas maduras (A) y jóvenes (B) de plantas de tomate. Los valores que se indican son las medias, y las barras de error muestran la desviación típica (SD). Las diferencias con el grupo control son significativas * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis t-test)

Análisis de los niveles de expresión de genes que codifican enzimas implicadas en el ciclo AsA-GSH

Como muestra la Figura 33A, tanto en t2 como t3, se observa una mayor expresión de *APX* en raíces que en las hojas, en comparación con sus respectivos controles. En t2 y t3, la toxicidad inducida por 0,5 mM Sb muestra diferencias frente a las plantas control, con mayor expresión a nivel foliar y menor a nivel radicular.

En cuanto a la expresión de *DHAR* (Figura 33B), se observa cómo su nivel más alto se produce en t3 en las raíces. Sin embargo, este patrón de expresión difiere en las hojas, excepto en las plantas tratadas con 0,5 mM Sb en t3. En t1, las hojas 0,5 mM Sb muestran una reducción en su nivel de expresión en comparación con el control. Por el contrario, el comportamiento en t3 es el opuesto: con una mayor expresión en las plantas sometidas a toxicidad por Sb.

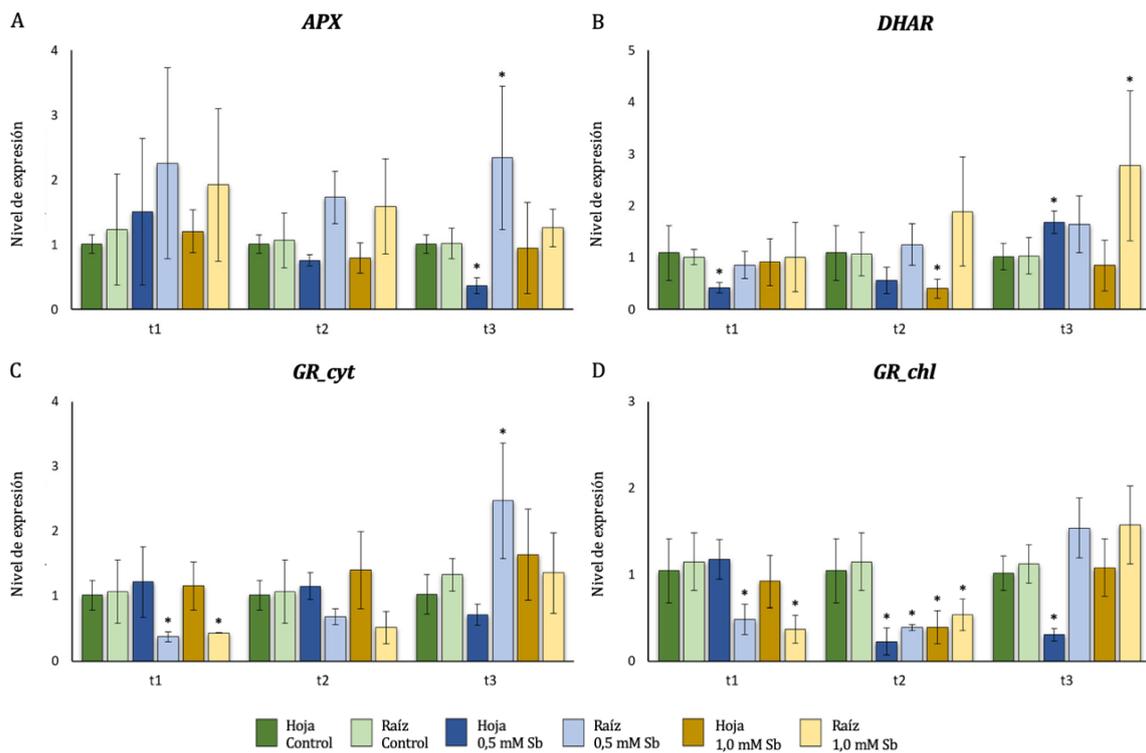


Figura 33. Efecto del Sb en los niveles de expresión de los genes *APX*, *DHAR*, *GR_cyt*, y *GR_chl* en raíces y hojas de plantas de tomate. Los valores que se indican son las medias, y las barras de error muestran la desviación típica (SD). Las diferencias con el grupo control son significativas *p < 0,05 y ** p < 0,01 (Kruskal-Wallis t-test)

En relación con la expresión de *GR* (Figura 33CD), las dos isoformas que se han estudiado *GR_cyt* y *GR_chl*, muestran en t3, como las raíces tratadas con Sb tienen, en general, un mayor nivel de expresión que las raíces del grupo control. No obstante, sólo se encuentran diferencias significativas en el tratamiento con 0,5 mM Sb para el gen *GR_cyt*. Por el contrario, en hojas, en t3, existe un patrón de expresión opuesto en el tratamiento en 0,5 mM Sb para *GR_chl*. Es interesante destacar cómo se observa una reducción en los niveles de expresión de la isoforma *GR_chl* en t2 en ambos órganos y para ambas concentraciones de Sb (0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb).

Análisis de los niveles de expresión de los genes *SOD* y *GST*

El nivel de expresión de *SOD* (Figura 34A) en t2 y t3 es mayor en raíces que en hojas en relación a sus controles, al igual que sucede con la expresión de *APX* (Figuras 33A). La expresión de *SOD* en t2 y t3 en el tratamiento con 0,5 mM Sb disminuye en hojas, pero aumenta en raíces. En plantas tratadas con 1,0 mM Sb se observa un descenso en hojas y un incremento significativo en t3. En t2 el comportamiento es similar, aunque no se determinaron diferencias significativas.

Por lo que respecta a la expresión de las isoformas *GST* estudiadas (Figura 34B,C) se observaron diferencias en raíces y hojas tras el crecimiento durante 24 horas de exposición al estrés por Sb (t1). La expresión de *GST* y *GST TCHQD* (*GST*-Tetraclorohidroquinona deshalogenasa) en hojas aumenta para ambas concentraciones de Sb, mientras que en raíces disminuye. En todos los casos la expresión es superior en hojas que en raíces. En t2, se observa un aumento en la expresión de las dos isoformas, excepto de *GST TCHQD* en 0,5 mM Sb. Por el contrario, en raíces no hay alteración, excepto para *GST TCHQD*, que disminuye en 1,0 mM Sb. En t3, la isoforma *GST TCHQD* presenta niveles de expresión más bajos en las hojas de las plantas tratadas con 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb y en las raíces con 1,0 mM Sb en comparación con los valores de expresión en las plantas control. Además, el patrón de expresión de esta isoforma de *GST* en raíces de plantas bajo toxicidad de 1,0 mM Sb, es destacable que presenta un patrón basal de expresión en todos los puntos temporales (Figura 34B,C)

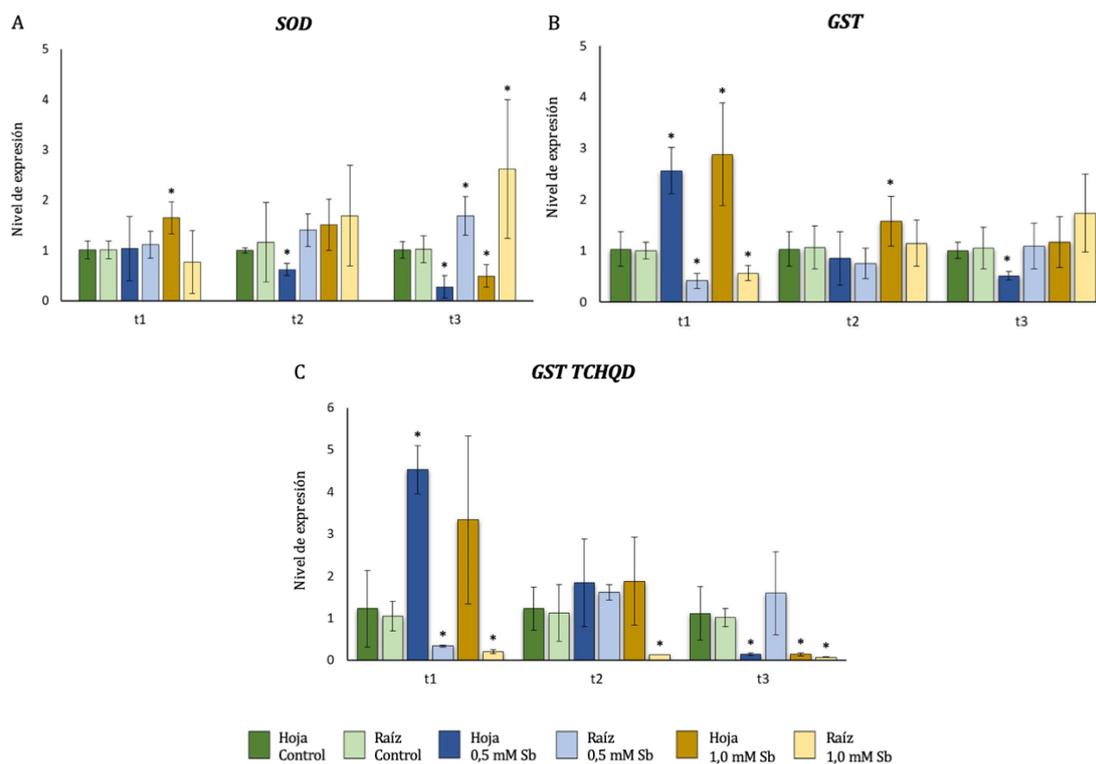


Figura 34. Efecto del Sb en los niveles de expresión génica de *SOD*, *GST*, y *GST TCHQD* en raíces, y hojas de plantas de tomate. Los valores que se indican son las medias, y las barras de error muestran la desviación típica (SD). Las diferencias con el grupo control son significativas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis t-test)

Análisis de los niveles de expresión del gen que codifica la enzima GSNOR

El patrón de expresión de *GSNOR* muestra una reducción significativa en las hojas de las plantas con el tratamiento 0,5 mM Sb frente a las hojas de plantas control, tanto en t2 como t3. Por el contrario, en hojas tratadas con 1,0 mM Sb no se observan cambios significativos en los niveles de expresión en ninguno de los tiempos de exposición. En t1 se observa una tendencia al descenso en la expresión, conforme se incrementa la concentración de Sb (Figura 35), aunque los resultados no son significativos por la gran desviación que existe. En las raíces, tampoco se observan cambios significativos en los niveles de expresión, aunque mostrando una tendencia al descenso de la expresión de *GSNOR* en las plantas sometidas a 1,0 mM Sb a tiempo muy corto, t1. Bajo toxicidad de 0,5 mM Sb sólo se observa un ligero, pero no significativo incremento en t2.

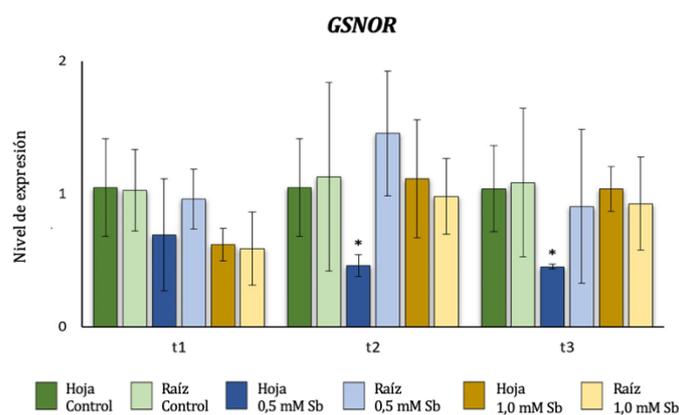


Figura 35. Efecto del Sb en los niveles de expresión génica de *GSNOR* en raíces, y hojas de plantas de tomate. Los valores que se indican son las medias, y las barras de error muestran la desviación típica (SD). Las diferencias con el grupo control son significativas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis t-test)

Análisis de las interacciones entre las enzimas SOD, APX, DHAR, GR, GST y GSNOR

Al analizar las interacciones entre las enzimas estudiadas (Figura 36) puede describirse una estrecha relación entre DHAR, GST, GR_cyt, GR_chl, APX y SOD. En concreto, GR y APX son las enzimas que interactúan con un mayor número de enzimas del sistema de defensa estudiado. Por el contrario, GSNOR (que interacciona con GR_chl y APX) y GST TCHQD (sólo interactúa con DHAR) son las enzimas que menos relaciones presentan con el resto de enzimas analizadas. Por el contrario, GST, GR_chl y DHAR, tienen un alto grado de interacción, sobre todo entre ellas, donde GST parece actuar como intermediario de muchas de esas interrelaciones. Además, APX puede desempeñar un papel similar a la GST en la relación GR_chl-APX-SOD. Por otra parte, APX interactúa con GST, DHAR y GR_cyt, GSNOR, pero en menor grado que con GR_chl y SOD.

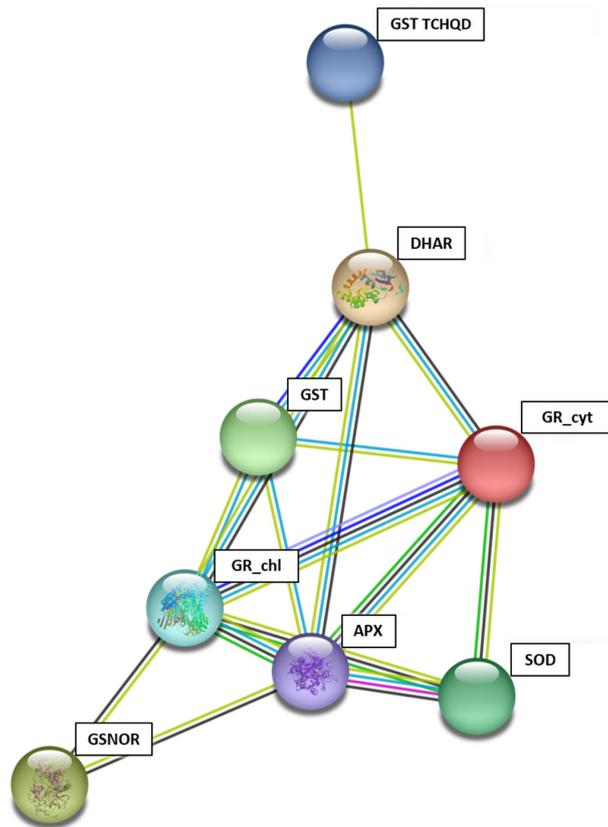


Figura 36. Red de interacción proteína-proteína entre las enzimas APX, DHAR, GR_chl, GR_cyt, GSNOR, GST, y GST TCHQD. Se ha desarrollado utilizando el programa STRING, donde: Rojo- Prueba de fusión. Verde- Prueba de interacción. Azul- Prueba de co-ocurrencia. Línea morada- Prueba experimental. Línea amarilla- Pruebas de bibliografía (teóricamente existe relación). Línea azul claro- Prueba de base de datos. Negro- Prueba de coexpresión.

Análisis filogenético y de las secuencias peptídicas de los motivos de las isoformas de GST y GR

El estudio filogenético revela una estrecha relación entre *GR* de Solanaceae y *A. thaliana*, principalmente entre la isoforma *GRI_A. thaliana* con *GR_cyt* de Solanaceae y *GR_A. thaliana* con *GR_chl* de Solanaceae (Figura 37A).

En cuanto a las isoformas de *GST* en la familia Solanaceae, se determina que existe cierta relación entre *GST* de Solanaceae y *GST Tau 19* de Arabidopsis, pero en menor medida que entre *GST TCHQD* de Solanaceae y *GST phi 8* de Arabidopsis (Figura 37B).

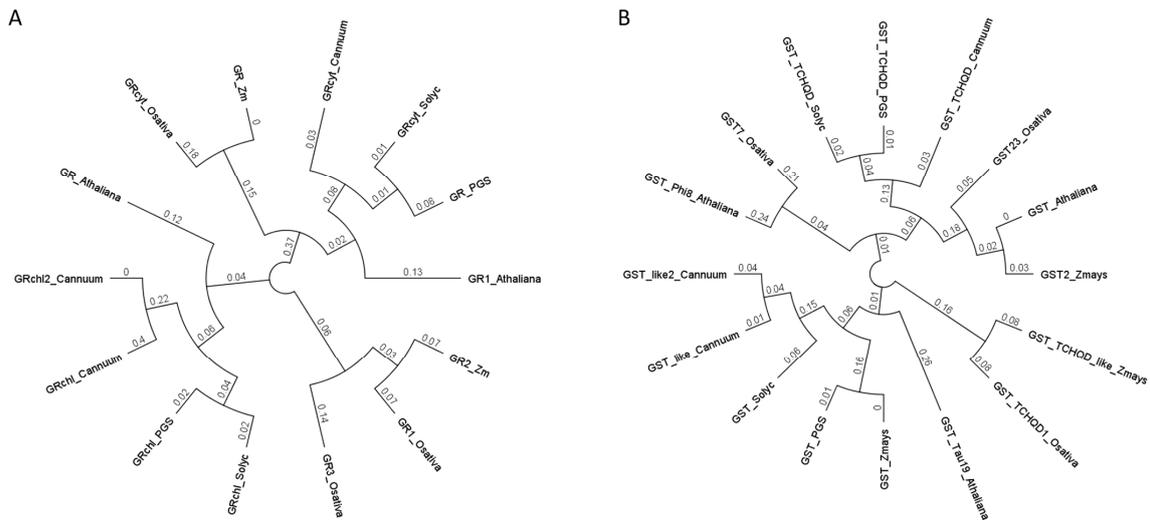


Figura 37. Relaciones filogenéticas basadas en secuencias entre *GR_chl* y *GR_cyt* (A), *GST* y *GST_TCHQD* (B) en *A. thaliana*, *Z. mays*, *O. sativa sp. japonica* y Solanaceae. Las secuencias de proteínas deducidas se obtuvieron de Gramene y se usaron en una alineación global con el programa Genious, utilizando Cost Matrix Blosum90 en la plataforma GENIOUS. El árbol filogenético se construyó con el constructor de árboles de Genious. Athaliana, *Arabidopsis thaliana*; Zm, *Zea mays*; Osativa, *Oriza sativa sp. japonica*; Cannum, *Capsicum annum*; PGS, *Solanum tuberosum*; Solyc, *Solanum lycopersicum*.

El alineamiento de las secuencias peptídicas (Figura 38), permite esclarecer que todas las GR poseen una región de unión a FAD. Este dominio se conserva en todas las especies, excepto en la GR plastidial de *Capsicum annum* (pimiento), donde hay algunas divergencias. Cabe destacar que no se han hallado ortólogos de la GR citosólica descrita en tomate, y en otras solanáceas como GR de pimiento, ni en la GR de *Solanum tuberosum* (patata). Además, todos los residuos implicados en interacciones funcionales o de unión con GSH de GST tau se conservan en *Arabidopsis*, arroz, y otras solanáceas (Figura 39).

4.2.2. Discusión

La expresión de *APX* y *SOD* está altamente controlada por diferentes estreses abióticos como sequía, salinidad, temperaturas extremas o la presencia de metales (Agrawal et al., 2003; Kim et al., 2021; Rosa et al., 2010; Teixeira et al., 2004). Por lo tanto, cabe esperar para ambas actividades un rango de expresión similar.

Al analizar los resultados de las enzimas *APX* y *SOD*, se observa un patrón de expresión parecido en los tiempos t2 y t3 en los dos tejidos estudiados, hojas y raíces. Cuando se evalúan los valores de expresión cuantificados en las raíces de plantas tratadas con Sb, estos son siempre mayores que los detectados en las plantas control. No sucede lo mismo en las hojas jóvenes, en las que los niveles de expresión son siempre más altos en las plantas sin estrés, salvo la expresión de *SOD* en hojas en t2. No obstante, estas diferencias en los patrones de expresión sólo son significativas en t3 bajo toxicidad de 0,5 mM Sb para *APX*, y en t2 y t3 de 0,5 mM Sb y t3 de 1,0 mM Sb para *APX* y *SOD*. Este hecho, a nivel foliar, puede deberse a que estas enzimas están involucradas en el crecimiento vegetativo, por tanto, su expresión en las plantas control es superior a la de las plantas sometidas a estrés por Sb.

En las plantas sometidas a toxicidad por Sb, la expresión de ambas enzimas es superior en las raíces, ya que es la zona de absorción y acumulación de este metaloide. Este comportamiento similar no se produce en t1. Se observa una tendencia al aumento de la expresión de *APX* en ambos órganos bajo condiciones de estrés, aunque este aumento no es significativo. El gen *SOD* en t1 presenta valores de expresión semejantes al control cuando se somete a toxicidad de 1,0 mM Sb. En este caso, se observa un descenso del patrón de expresión a nivel de la raíz y a un incremento significativo de la expresión de *SOD*. Las diferencias en la expresión que se observa en las hojas para ambas enzimas pueden deberse a la gran variabilidad observada en ambos casos. No obstante, la tendencia de una mayor expresión de *APX* y de *SOD* en raíces que en hojas jo toxicidad de Sb, coincide con otros estudios realizados con este metaloide (Benhamdi et al., 2014; Ortega et al., 2017; Vaculíková et al., 2014) u otro metal pesado (Feigl et al., 2015; Rodríguez-Ruiz et al., 2019; Srivastava et al., 2015). Además, en *Arabidopsis*, su tolerancia a metales pesados o metaloides (Zn, Cd, Al, Cu y As) mejora si existe una sobreexpresión de *APX* y *SOD* (Chiang et al., 2014; Lee et al., 2007), quedando patente

la relevancia de estas enzimas en la respuesta de la planta frente a este estrés. Esta restricción de Sb en la raíz puede evitar daños a las flores y hojas y, de ese modo, comprometer los eventos reproductivos y fotosintéticos en las plantas, respectivamente (Horst et al., 2010; Krzesłowska, 2011). Esta hipótesis se puede apoyar en el hecho que en otras investigaciones previas con Zn y Pb se hallan rastros de estos compuestos en las raíces, pero no en los óvulos y el saco embrionario, de modo que las semillas están libres de compuestos tóxicos (Horst et al., 2010). Esta retención en la zona de la raíz podría deberse a la banda de Caspary que actúa interrumpiendo el apoplasto a nivel de la endodermis (Horst et al., 2010; Krzesłowska, 2011).

Por otra parte, considerando el papel del GSH para paliar la toxicidad de metales pesados o metaloides como el Sb (Pasricha et al., 2021; Thakur et al., 2022), se ha analizado la evolución temporal de la exposición de las plantas de tomate a Sb. Así, enzimas como la DHAR, que utiliza GSH para reducir el DHA hasta AsA, la GR, que está implicada en la formación de GSH, y la GST, responsable de la conjugación de GSH con elementos xenobióticos a través del grupo tiol de la cisteína, que también puede eliminar ROS (Khan et al., 2016; Pasricha et al., 2021; Talukdar & Talukdar, 2014; Thakur et al., 2022).

El comportamiento esperado de la GR y de la GST es que su expresión y actividad aumente ante el estrés por Sb y a medida que se incrementa el tiempo de exposición. Los resultados obtenidos para la expresión de ambas isoformas de GR en t3 coinciden con este comportamiento. La expresión de GR en raíz aumenta ($p < 0.05$, 0,5 mM Sb, *GR_cyt*). Este aumento de la expresión en t3 es consistente con los resultados de la actividad enzimática descritos en las experiencias previas (capítulo 4.1.) en hojas adultas en t3 y raíces, en las que también se observa una mayor actividad. Posiblemente, este aumento se deba a que en t3, la planta está tratando de generar la máxima cantidad de GSH posible para paliar el estrés inducido por la presencia de Sb. Este proceso es clave en la raíz, órgano donde este metaloide se acumula preferentemente. Estos resultados de expresión concuerdan con los resultados mencionados anteriormente (capítulo 4.1.). La GR se expresa y actúa continuamente para regenerar GSH, tratando de defender la planta del compuesto tóxico (Pourrut et al., 2013). En las hojas, no hay un patrón claro de expresión como en las raíces, aunque se observa una reducción en los niveles de expresión den respuesta al Sb para la isoforma *GR_chl*. Por otra parte, en los tiempos t1 y t2 los patrones de expresión de ambas isoformas de GR para hojas y raíces o son semejantes a los valores

control, o bien, son inferiores en las raíces de ambas isoformas en t1 y en hojas y raíces de la *GR_chl* en t2.

En relación a la expresión de *DHAR*, se observa un incremento a medida que aumenta el tiempo de exposición al Sb, al menos en raíces (significativo en t3). En las hojas, no se observa el mismo patrón de expresión, excepto para 0,5 mM Sb en t3. En el tratamiento con 1,0 mM Sb se mantiene el nivel de expresión durante todo el tiempo estudiado. Al igual que con *APX*, hay una gran variabilidad, especialmente con 1,0 mM Sb. Bajo condiciones de estrés oxidativo, varios estudios indican que hay un aumento en la actividad de DHAR que conduce a una mejor tolerancia a condiciones de estrés como salinidad y sequía (Kim et al., 2014; Vaish et al., 2020). De hecho, la sobreexpresión de genes de *DHAR* en plantas transgénicas produce mayores niveles de AsA en los tejidos, dando una mayor tolerancia a los diferentes estreses (Das & Roychoudhury, 2014; Pandey et al., 2015). Además, se observan diferencias significativas en el contenido total de AsA en mutantes knockout de *dhar1*, *dhar2* y *dhar3* en Arabidopsis, confirmando este aumento la necesidad de una mayor actividad de DHAR para reducir DHA durante el estrés (Krishna et al., 2021). Además, Bashir & John (2023) describen cómo la aplicación de Silicio (Si) junto con brasinosteroides (BR; 1 mM) mejora la tolerancia de plántulas de tomate bajo estrés por frío. Esta respuesta puede deberse a un aumento en la expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la defensa antioxidante, como CAT, MDHAR, DHAR y GR (Bashir & John, 2023). Por lo tanto, los resultados obtenidos destacan la importancia de DHAR frente al estrés abiótico. Sin embargo, otros estudios describen un descenso considerable en la actividad de DHAR bajo estrés por metales pesados o metaloides. Este es el caso en *O. sativa* y la familia Triticum tratadas con As, donde las actividades de APX y MDHAR aumentan mientras que la de la DHAR disminuye (Hasanuzzaman et al., 2023; Khan et al., 2021). Su comportamiento es semejante al descrito en arroz o trigo, plantas que se consideran fitorremediadoras (Hasanuzzaman et al., 2023; Khan et al., 2021). En *H. annuus*, el tratamiento con Sb también aumenta significativamente la actividad DHAR, especialmente en raíces, lo que posiblemente contribuya a la defensa antioxidante (Ortega et al., 2017). Considerando los resultados de expresión y los resultados previos obtenidos para la actividad enzimática, se puede decir que, aunque hay una mayor expresión de *DHAR* para aumentar la reducción de DHA a AsA utilizando GSH, esta actividad está condicionada por varios factores. Por un lado, DHAR es susceptible a altas concentraciones de H₂O₂, lo que

modifica su actividad. Considerando los altos niveles de expresión de *SOD* y *APX*, puede ocurrir que, bajo la toxicidad de Sb, la alta cantidad de H_2O_2 interfiera con la capacidad funcional de DHAR. Además, la unión de Sb a GSH puede ocurrir como un mecanismo de desintoxicación y, por lo tanto, cuando aumenta la concentración de Sb, hay un mayor consumo de GSH, incluso si se está sintetizando más, lo que puede explicarse por el aumento en la expresión y actividad de GR. El aumento en la expresión de *DHAR* no parece conllevar un aumento en su actividad, posiblemente debido a la falta de GSH disponible al estar participando en la formación de complejos GSH-Sb.

El patrón de expresión de *SOD*, *APX*, *GR_chl* y *GST* bajo diferentes concentraciones de Sb tras 14 días de exposición (t3) en los órganos foliares muestra diferencias dependientes de la edad. De hecho, *SOD*, *GR* y *APX* en hojas jóvenes en t3, tienen un patrón de expresión más bajo que en hojas de plantas control. Solo *GST* parece mostrar un patrón similar en ambos tejidos, aunque sólo a 1,0 mM Sb su expresión es más alta que la de la planta control. Por lo tanto, base a estos resultados, se puede decir que el estado de desarrollo del órgano analizado es un factor clave en la expresión de estas enzimas defensivas bajo el mismo estrés y tiempo de exposición. Las hojas maduras pasan de unas condiciones en un entorno sin estrés alguno a un medio con unas dosis tóxicas de Sb, mientras que las hojas más jóvenes comienzan a desarrollarse bajo estas condiciones estresantes. Además, las hojas maduras están sometidas más tiempo a la toxicidad de Sb. Por esta razón, es posible que el patrón de expresión de *SOD* y *APX* en t1 sea similar al cuantificado en las hojas adultas de plantas sometidas a distintas concentraciones de Sb durante 14 días. Por el contrario, sí se observan diferencias en los niveles de expresión de *GR_chl* y *GST*, debido posiblemente a que la actividad de APX y de SOD se inicie más tarde. Dependiendo de la etapa de desarrollo foliar bajo estrés de estas plantas y el tiempo de exposición al mismo, el patrón de expresión de estas enzimas puede variar.

Además de la diferencia significativa observada en las hojas tratadas con 0,5 mM Sb, no se aprecia ninguna otra diferencia entre plantas control y estresadas por el metaloide. Los niveles de expresión de *GSNOR* no se alteran por la presencia de Sb. Este resultado coincide con el observado por varios autores, que observan una expresión más o menos constante de la *GSNOR*, independientemente de que la planta se halle bajo un estrés o no, como Airaki et al. (2015), en *C. annum*; Martínez et al., (2006), en *Arabidopsis*; o Kubienová et al. (2014) y Jahnová et al. (2019), en tomate.

La GSNOR puede ser regulada tanto a nivel transcripcional como postraduccional. Esta regulación contribuye al ajuste de la señalización de •NO en plantas. Por un lado, la modificación oxidativa reversible de los residuos de cisteína de GSNOR inhibe su actividad enzimática *in vitro*, lo que sugiere una posible interacción entre la señalización de RNS y ROS (Lindermayr, 2018; Tichá et al., 2017). Además, la biosíntesis de •NO en plantas depende del sitio y la naturaleza del estímulo que desencadena su síntesis (Mur et al., 2013; Yu et al., 2014). El •NO puede ser producido por vías oxidativas o reductoras, reacciones enzimáticas o no enzimáticas (Mur et al., 2013; Yu et al., 2014). El aumento del contenido de •NO y los cambios en la actividad de GSNOR muestran la participación de RNS en respuesta al Sb. En tomate, el Sb induce aumentos en el contenido en •NO, pero la actividad y expresión de GSNOR no se alteran significativamente. El choque oxidativo producido en respuesta al Sb altera el equilibrio de ROS, principalmente, por un aumento en la concentración de H₂O₂ que conduce a un aumento de •NO para limitar el desequilibrio redox inducido.

Los resultados obtenidos muestran que la expresión de SOD aumenta de t1 a t3, provocando un aumento de H₂O₂. Una alta cantidad de H₂O₂ es capaz de producir un aumento de •NO en la raíz. El exceso de H₂O₂ también ser utilizado para la síntesis de lignina en las paredes celulares (sobre todo en las raíces), y como un sistema de inmovilización para el Sb (raíces y hojas). A través de mutantes *nox1* (sobrepoducción de •NO con alto nivel de l-arginina y l-citrulina) y *gsnor1-3* (actividad reducida de GSNOR y alto nivel de •NO, nitrato y RSNO) en *A. thaliana* expuesta a concentraciones tóxicas de Cu²⁺ (Feechan et al., 2005; Petó et al., 2013), se ha determinado que un alto nivel de •NO debido a una actividad reducida de GSNOR permite a la planta aumentar su sensibilidad bajo condiciones de estrés leve, favoreciendo la tolerancia a estrés severo (Petó et al., 2013). El mutante *gsnor1-3* tiene un alto nivel de RSNOs y una mayor tolerancia al selenio (Se) (Lehotai et al., 2012). Sin embargo, otro estudio indica que existe un aumento en la actividad de GSNOR y del contenido de •NO en plantas de arroz bajo concentraciones tóxicas de Al (Yang et al., 2013). En Solanaceae, se describe un aumento de •NO, sin que haya cambios en la actividad de GSNOR en la raíz (Arasimowicz-Jelonek & Floryszak-Wieczorek, 2014), bajo estrés abiótico por compuestos xenobióticos que son coherentes con los resultados expuestos para el tomate. Además, en otras especies de otras familias como *P. sativum*, bajo toxicidad por Cd, hay un aumento de •NO junto con una disminución de la actividad de GSNOR (Barroso et al.,

2006). Esta divergencia en el patrón de GSNOR y el contenido de •NO, puede indicar que la respuesta de una planta a la toxicidad por metales pesados depende de la especie de planta y del tipo de metal/metaloide.

Análisis Filogenético y sobre los dominios y residuos proteicos de las isoformas de GST y GR

Mediante un análisis bioinformático profundo sobre las secuencias peptídicas y los motivos de las isoformas estudiadas de las enzimas GR y GST se puede evaluar la evolución de los dominios funcionales de estas enzimas en el tomate y otros miembros de la familia Solanaceae (*C. annuum* y *S. tuberosum*) al compararlos con los ortólogos descritos en especies de referencia de dicotiledóneas (*Arabidopsis*) y monocotiledóneas (*O. sativa* y *Z. mays*). El estudio de las regiones funcionales o reguladoras de estas enzimas es clave, tal y como describe Böyükbasi (2021), que también indican que estas proteínas, GR y GST, pueden ser útiles para programas de mejora de plantas enfocados a desarrollar variedades más tolerantes a estreses bióticos y/o abióticos.

Tras evaluar estos análisis, se observa que existe una alta conservación de los dominios funcionales entre monocotiledóneas y dicotiledóneas, especialmente una alta conservación de todos los residuos y motivos descritos para las isoformas de GR y GST.

Existen diferentes clases de GST descritas en *A. thaliana*, como GSTU τ (tau), GSTF Φ (phi), GST λ (lambda), GST θ (theta), GST Z (zeta), DHAR, TCHQD, EF1B γ (elongación 1B, hemeritrina e Iota) (Liu et al., 2013). Las isoformas GST tau y GST phi son las que tienen mayor relevancia en los procesos de desintoxicación de compuestos xenobióticos, además de ser las más abundantes en las plantas (Kumar & Trivedi, 2018). GST tau tiene una serie de residuos descritos tanto en *A. thaliana* como en *O. sativa* (japónica), dicotiledónea y monocotiledónea, respectivamente, como residuos implicados en la unión de GSH. Estos residuos también se encuentran en las isoformas de GST analizadas en tomate y otras solanáceas (pimiento o patata) (Figura 39). Entre los residuos conservados destacamos dos residuos de arginina (Arg, R): Arg20, responsable de la protonación de GSH; y Arg98, que interviene en el establecimiento de un enlace de hidrógeno que proporciona estabilidad a la enzima. Estos residuos en arroz

(OsGST_TAU_23) son muy importantes porque su eliminación conduce a la pérdida de su región catalítica (Song et al., 2021). Tras analizar las dos isoformas de *GST* descritas en Solanaceae, *GST* y *GST TCHQD*, ambas colaboran en procesos de detoxificación de compuestos xenobióticos y existe evidencias de su papel preponderante en la defensa de las plantas frente al estrés oxidativo inducido por metales pesados o metaloides (Talukdar & Talukdar, 2014). Con respecto a la isoforma *TCHQD*, Warner et al. (2008) describen que en *Sphingobium chlorofenicum* cataliza la deshalogenación reductora de TCHQ para degradar el pentaclorofenol. Sin embargo, la ortología no está clara en *Z. mays*, donde se requiere de más información. Los resultados filogenéticos indican que la isoforma *GST TCHQD* dentro de la familia Solanaceae parece que se diversificó tempranamente del resto de las dicotiledóneas (*Arabidopsis*). Estas diferencias pueden conllevar a que se encuentran regiones específicas dentro de la familia Solanaceae, aunque falta profundizar más en el estudio de esas regiones o dominios específicos. Es posible que el origen de esta divergencia se deba a procesos de duplicación génica. Estos procesos desempeñan un papel importante en la evolución de las plantas y pueden servir para la adquisición de nuevas funciones (Huang et al., 2022). Los procesos de duplicación pueden ser de un genoma completo, de un solo gen o de regiones del genoma (Maere et al., 2005; Paterson et al., 2010); sin embargo, la duplicación de un solo gen sería suficiente para la aparición de nuevos genes (Magadum et al., 2013).

Un tipo de duplicación génica es la duplicación en tándem, que involucra dos o más genes homólogos adyacentes entre sí en el genoma (Jander & Barth, 2007). Tanto en las Brassicaceae (*Arabidopsis*) como en las monocotiledóneas, se han producido duplicaciones en tándem. De hecho, este tipo de regiones representa una proporción significativa de sus genomas: 17% en *Arabidopsis* (Theologis et al., 2000), 14% en *O. sativa* (Matsumoto et al., 2005) y 35% en *Z. mays* (Messing et al., 2004). La familia Solanaceae no es una excepción. Dentro de esta familia, hay muchos fragmentos cromosómicos duplicados. Además del proceso de duplicación experimentado por todas las dicotiledóneas, hace aproximadamente 65 millones de años, las especies de Solanaceae tuvieron otro evento de duplicación (Consortium tomato, 2012). Los genes duplicados se separaron posteriormente. Por lo tanto, esto puede explicar por qué las regiones de GR y GST están conservadas en algunos residuos. Los residuos conservados pueden permitirles desempeñar su función, pero la divergencia en esos residuos en otras familias o especies puede llevar a diferentes comportamientos cuando se exponen a los

mismos estreses. Esto puede explicar la existencia de los diferentes tipos de GR o GST descritos.

En resumen, el desarrollo foliar parece ser un factor clave en la expresión de los genes codificantes de enzimas de defensa, observándose diferencias en los patrones de expresión de las enzimas *APX*, *GR_chl*, *GST* y *SOD* entre las hojas de verticilos más apicales (hojas jóvenes) frente a las hojas de verticilos más basales (hojas más adultas) a t3. En general, ante el estrés por Sb, se observa una clara tendencia al aumento de la expresión de *APX* y *SOD* en raíces y hojas adultas, pero no en hojas jóvenes.

La expresión de las dos isoformas de *GR* evaluadas es mayor en t3 y a medida que aumenta concentración de Sb, excepto en las hojas de plantas sometidas a 0,5 mM Sb. El incremento de la expresión en t3 es consistente con los resultados de la actividad enzimática descritos en las experiencias previas sobre hoja adulta y raíz en t3, posiblemente porque sea necesario para la regeneración de GSH. *GST* muestra un patrón de expresión similar en raíces y hojas jóvenes a tiempo final (t3), a pesar de que su expresión en hojas disminuye a medida que aumenta el tiempo de exposición. La isoforma *GST TCHQD* muestra un patrón de expresión que disminuye con el tiempo de exposición al metaloide, siendo significativamente inferior en raíces y hojas a tiempo final (excepto en raíces bajo 0,5 mM Sb). *DHAR* muestra una mayor expresión sin que aumente su actividad. El aumento de expresión de *DHAR* junto al de *SOD* y *APX*, puede indicar la existencia de unas condiciones de alto contenido de ROS en respuesta al Sb. Este aumento de ROS afecta a la actividad de la DHAR. No hay una concordancia entre la expresión del gen codificante de la enzima GSNOR y la variación del contenido de •NO en la raíz de plantas sometidas a concentraciones tóxicas de Sb. La respuesta de GSNOR puede estar condicionada por el tipo de estrés y especie vegetal. La expresión de estos genes depende del desarrollo, órgano y del grado de estrés (Figura 40).

El análisis filogenético revela una alta conservación de los dominios funcionales y residuos descritos para las diferentes isoformas de GR y GST de especies modelos de monocotiledóneas, dicotiledóneas y otras solanáceas. Por otra parte, posibles eventos de duplicación parcial o total del genoma de las diferentes especies pueden explicar diferencias entre las zonas funcionales definidas.

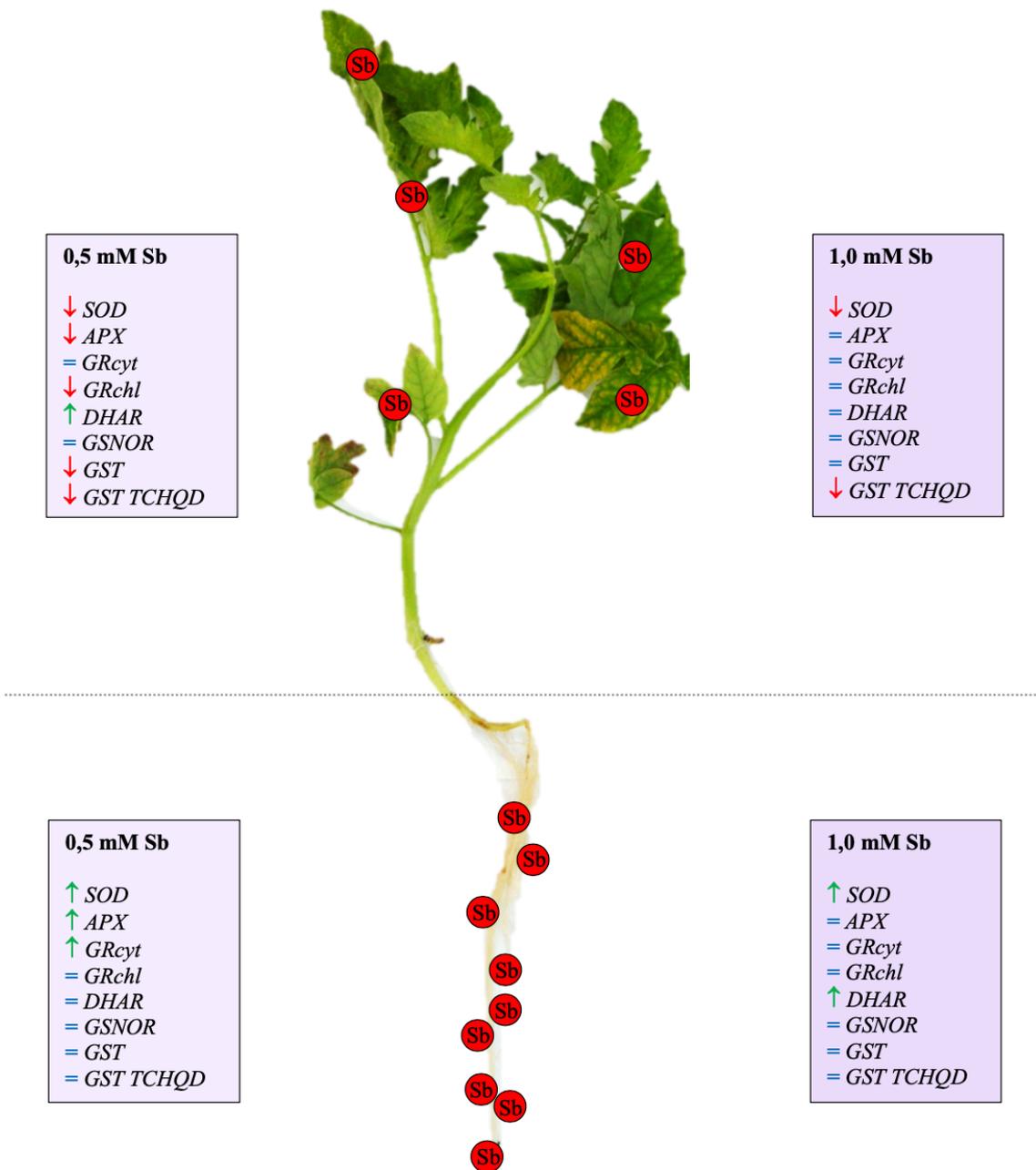


Figura 40: Esquema general de los efectos de la toxicidad de Sb sobre la expresión de genes relacionados con las actividades antioxidantes en plantas de *S. lycopersicum*

4.3. Evaluación de *Dittrichia* *viscosa* como planta bioacumuladora de Sb

4.3.1. Resultados

Efecto del Sb sobre el crecimiento de plantas de *Dittrichia viscosa*

Las plantas de *D. viscosa* cultivadas durante 17 días (27 días de edad) bajo toxicidad de 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, muestran una significativa reducción en la longitud de la parte radicular y de la parte aérea en relación con las plantas control, así como del área foliar y de los PF y PS (Figuras 41 y 42, Tabla 9).

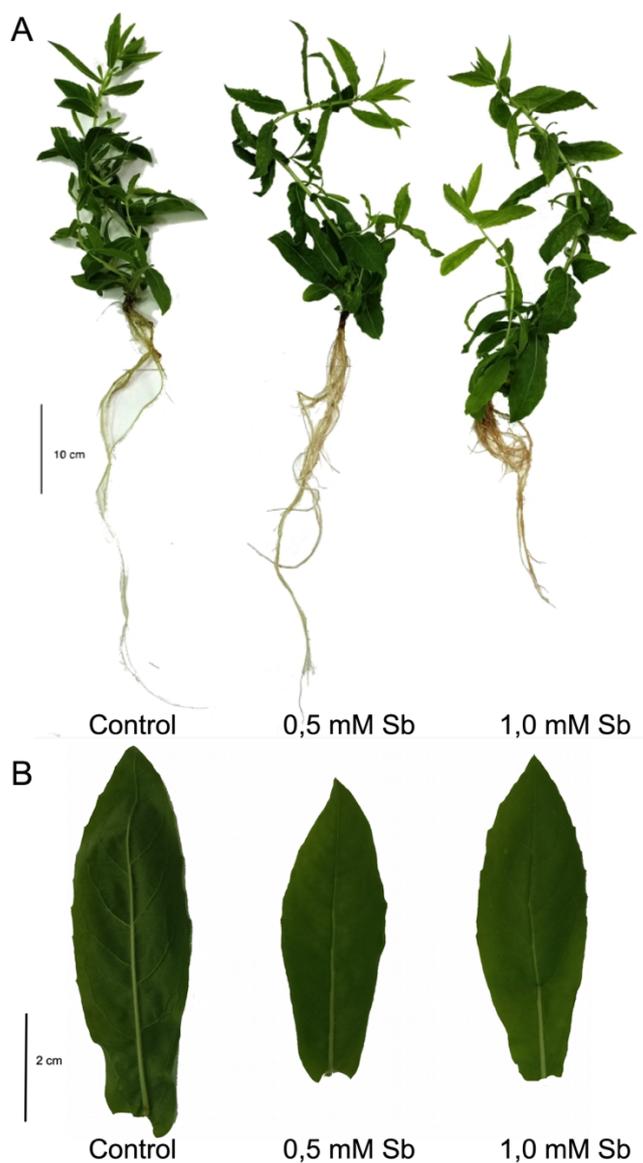


Figura 41. (A) Plantas enteras de *D. viscosa* y (B) hojas procedentes de plantas control y tratadas con 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb (17 días de tratamiento con Sb).

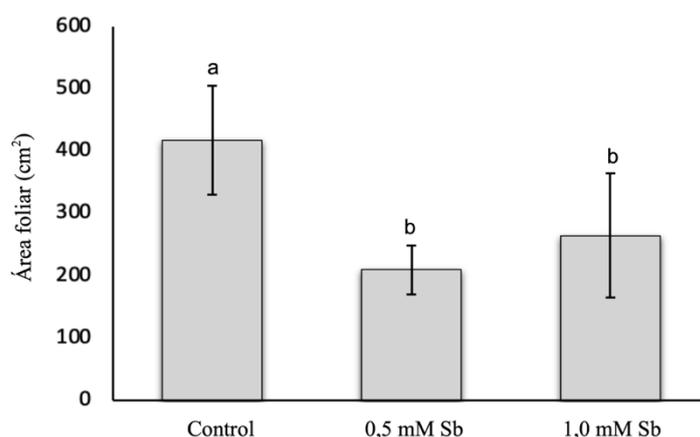


Figura 42. Índice de área foliar en plantas control y tratadas con 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb. Los datos son medias de, al menos cuatro experimentos independientes \pm SD. Letras diferentes indican diferencias significativas.

El área foliar disminuye en respuesta a la toxicidad de Sb, con valores similares para las dos concentraciones utilizadas. El área foliar total de las plantas control es de $417,5 \pm 75,9 \text{ cm}^2$, reduciéndose este valor hasta $209,4 \pm 34,6 \text{ cm}^2$ y $264,6 \pm 85,8 \text{ cm}^2$ para los tratamientos con 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente (Figura 42). Se produce una disminución de la longitud (Tabla 9) del 28% y del 36% de las raíces sometidas a 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente. Las disminuciones porcentuales de las longitudes de la parte aérea son menores que las de las raíces, siendo similares (en torno al 20%) para ambas concentraciones. En las raíces, se observa una reducción del PF y del PS, del 25% y 35%, y del 33% y 45%, para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente, respecto de los controles. Lo mismo ocurre en los tallos, con descensos del PF y PS del 35% y 60%, y del 17% y 39% para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente. En cuanto a la biomasa total producida, se observa una disminución respecto de los controles del 25% y 50%, para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente.

Tabla 9. Efecto del Sb sobre la longitud, peso fresco y peso seco de raíces y tallos, y producción total de biomasa en plantas de *D. viscosa*. Los datos proceden de 10 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado (letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0,05$, prueba U de Mann-Whitney).

Tratamiento	Longitud (cm)		PF (mg)		PS (mg)		Producción Biomasa (%)
	Raíces	Parte aérea	Raíces	Parte aérea	Raíces	Parte aérea	
Control	47,11 ± 1,95 ^a	29,41 ± 1,05 ^a	3460 ± 210 ^a	5930 ± 243 ^a	232 ± 18 ^a	817 ± 51 ^a	100 ^a
0,5 mM Sb	34,32 ± 1,11 ^b	23,43 ± 1,15 ^b	2620 ± 200 ^b	3853 ± 240 ^b	167 ± 13 ^b	687 ± 39 ^b	75,5 ± 3,1 ^b
1,0 mM Sb	29,68 ± 1,50 ^c	24,13 ± 0,66 ^b	2250 ± 200 ^c	2404 ± 87 ^c	126 ± 14 ^c	506 ± 25 ^c	47,0 ± 2,8 ^c

Efecto del Sb en la acumulación de Sb y otros elementos minerales

El incremento en la cantidad de Sb en el medio de cultivo provoca un significativo y fuerte aumento en la absorción y acumulación de este elemento, tanto en la parte radicular como en la aérea (Tabla 10). El aumento en la cantidad de Sb en el medio provoca un incremento en el contenido de este elemento, siendo la capacidad de acumulación mayor en la parte radicular que en la aérea. Así, en presencia de 0,5 mM Sb se observa una acumulación de este elemento en las raíces de 13503 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, mientras que si la concentración del medio es de 1,0 mM Sb se alcanzan los 24450 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF. La cantidad de Sb que se acumula en la parte aérea es mucho menor, con valores de 810 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF y 1547 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente. En las raíces control se detecta 4,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, mientras que en la parte aérea no aparece. Los valores de FB obtenidos muestran claramente la gran capacidad de absorción y acumulación de Sb en raíces de *D. viscosa*. Los valores del FB calculados son similares para ambas concentraciones, aunque dependen del órgano. La absorción muestra una tendencia a la saturación, valores del FB muy similares. En cuanto a la capacidad de transporte dentro de la planta, los valores del FT obtenidos son similares en ambas concentraciones (0,06 y 0,063 respectivamente).

Tabla 10. Contenido de Sb en raíces y parte aérea, valores de factor de bioacumulación (FB) y factor de translocación (FT) en plantas de *D. viscosa*. Los datos proceden de 10 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado (letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0.05$, Mann-Whitney U-test).

Tratamiento	Sb ($\mu\text{g Sb g}^{-1}$ PF)		FB		FT
	Raíces	Parte aérea	Raíces	Parte aérea	
Control	4,1 \pm 1,1 ^c	--	--	--	--
0,5 mM Sb	13503 \pm 225 ^b	810 \pm 52,5 ^b	224 ^a	12,1 ^a	0,060 ^a
1,0 mM Sb	24450 \pm 356 ^a	1547 \pm 75,0 ^a	202 ^a	12,8 ^a	0,063 ^a

La presencia de Sb en el medio, y su absorción por los tejidos altera la absorción y acumulación de otros elementos minerales esenciales. En la Tabla 11 se muestran las concentraciones de Fe, Mn, Cu, Zn y B en parte radicular y aérea. Entre los macronutrientes, el contenido en N, S y K disminuye tanto en raíces como en parte aérea, hasta valores muy similares para ambas concentraciones de Sb. El contenido en Ca y Mg solo disminuye en las raíces, manteniéndose sin alteración en la parte aérea. La excepción

entre los macroelementos es el P que no muestra alteración de su contenido total ni en parte radicular ni aérea. En los micronutrientes, se observa cómo el contenido en Fe y Cu sufre un fuerte descenso, mayor en raíces que en parte aérea, siendo la alteración en el contenido en Fe de mayor magnitud que la del Cu. El Mn en la parte aérea se mantiene sin cambios, pero en la parte radicular disminuye su contenido un 12% bajo 1,0 mM Sb, pero no para 0,5 mM Sb. El Zn aumenta su contenido en raíces bajo 0,5 mM Sb, para descender en 1,0 mM Sb (13%), mientras que en la parte aérea desciende de forma similar para ambas concentraciones en relación a los valores control. El B sólo desciende en la parte radicular, y aumenta su contenido total en la parte aérea (20% para ambas concentraciones tóxicas de Sb).

Efecto del Sb sobre el contenido en pigmentos fotosintéticos y eficiencia fotosintética

En la Tabla 12 se muestra cómo la toxicidad de 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb produce un descenso en el contenido en clorofila a del 15% y 36%, y en clorofila b del 20% y 42%, respectivamente. En consecuencia, los niveles totales de clorofilas también descienden. La relación clorofila a/clorofila b se incrementa en respuesta al Sb (debido al mayor descenso de clorofila b), desde 2,11 del control hasta 2,35 para 1,0 mM Sb. Por el contrario, el contenido en carotenoides aumenta en respuesta al estrés de Sb, con un incremento similar para ambas concentraciones del metaloide, en torno al 7%. Como consecuencia de este aumento en carotenoides y de la disminución en el contenido en clorofilas, la relación carotenoides/clorofilas se incrementa, pasando de 0,056 para el control a 0,072 y 0,094, para los tratamientos con Sb. La eficiencia fotosintética no se ve alterada por el tratamiento con 0,5 mM Sb, observándose un ligero descenso (aproximadamente del 10%) en la eficiencia fotosintética en el caso de plantas crecidas con 1,0 mM Sb. Estos resultados evidencian una alteración en el contenido en clorofilas y carotenoides en respuesta al estrés inducido por la toxicidad de Sb, pero la eficiencia fotosintética sólo se ve afectada y de forma muy ligera por la concentración más alta, lo que indica la capacidad de *D. viscosa* para mantener sus niveles normales de fotosíntesis bajo estas condiciones de estrés.

Tabla 11. Efecto del Sb sobre el contenido en Fe, Mn, Cu, Zn y B en raíces y parte aérea de plantas de *Dittrichia viscosa*. Los datos proceden de 10 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado (letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0,05$, prueba U de Mann-Whitney).

Tratamiento	N (mg g ⁻¹ PS)		P (mg g ⁻¹ PS)		S (mg g ⁻¹ PS)	
	Raíces	Parte aérea	Raíces	Parte aérea	Raíces	Parte aérea
Control	38,0 ± 0,45 ^a	39,2 ± 5,1 ^a	37,6 ± 4,0 ^a	32,3 ± 3,8 ^a	7,5 ± 1,0 ^a	4,4 ± 0,9 ^a
0,5 mM Sb	27,4 ± 0,38 ^b	28,8 ± 4,0 ^b	38,6 ± 4,1 ^a	32,4 ± 4,2 ^a	4,9 ± 1,2 ^b	3,7 ± 0,7 ^a
1,0 mM Sb	26,9 ± 0,30 ^b	23,4 ± 3,3 ^b	37,2 ± 4,7 ^a	30,8 ± 5,0 ^a	5,2 ± 1,1 ^b	3,2 ± 0,9 ^b

Tratamiento	K (mg g ⁻¹ PS)		Ca (mg g ⁻¹ PS)		Mg (mg g ⁻¹ PS)	
	Raíces	Parte aérea	Raíces	Parte aérea	Raíces	Parte aérea
Control	43,2 ± 5,0 ^a	39,0 ± 5,8 ^a	20,5 ± 3,0 ^a	17,4 ± 2,5 ^a	9,7 ± 1,5 ^a	7,2 ± 1,1 ^a
0,5 mM Sb	31,0 ± 4,5 ^b	28,9 ± 3,3 ^b	14,1 ± 2,2 ^b	17,0 ± 1,9 ^a	4,7 ± 0,8 ^b	6,0 ± 1,5 ^a
1,0 mM Sb	31,5 ± 4,1 ^b	27,4 ± 3,5 ^b	13,9 ± 2,7 ^b	16,3 ± 2,7 ^a	4,6 ± 1,0 ^b	6,1 ± 1,3 ^a

Tratamiento	Fe (µg g ⁻¹ PS)		Mn (µg g ⁻¹ PS)		Cu (µg g ⁻¹ PS)	
	Raíces	Parte aérea	Raíces	Parte aérea	Raíces	Parte aérea
Control	2298,3 ± 176,4 ^a	631,4 ± 81,4 ^a	753,3 ± 60,5 ^a	245,5 ± 31,3 ^a	94,8 ± 10,1 ^a	63,9 ± 6,1 ^a
0,5 mM Sb	878,6 ± 22,6 ^b	526,7 ± 64,5 ^b	769,2 ± 91,5 ^b	260,6 ± 33,5 ^a	39,6 ± 4,2 ^c	55,8 ± 6,2 ^b
1,0 mM Sb	620,9 ± 68,5 ^c	469,0 ± 55,3 ^b	440,6 ± 52,8 ^c	208,8 ± 34,0 ^b	49,1 ± 5,3 ^b	44,5 ± 5,6 ^c

Tratamiento	Zn (µg g ⁻¹ PS)		B (µg g ⁻¹ PS)	
	Raíces	Parte aérea	Raíces	Parte aérea
Control	55,4 ± 6,2 ^b	78,0 ± 8,5 ^a	165,2 ± 19,8 ^a	239,2 ± 18,5 ^b
0,5 mM Sb	80,2 ± 7,4 ^a	64,4 ± 5,7 ^b	123,6 ± 13,4 ^b	288,0 ± 25,5 ^a
1,0 mM Sb	48,5 ± 5,8 ^b	63,5 ± 5,1 ^b	56,9 ± 5,8 ^c	285,4 ± 25,9 ^a

Tabla 12. Efecto de Sb en los contenidos de clorofila a y b y clorofila total ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF), ratio clorofila a/b, carotenoides totales (Car) ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF), ratio carotenoides/clorofila, y eficiencia fotosintética (F_v/F_m) en hojas de *Dittrichia viscosa*. Los datos proceden de 10 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado (letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$, prueba U de Mann-Whitney).

Tratamiento	Clorofila a ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF)	Clorofila b ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF)	Clorofila a+b ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF)	Clorofila a/b	Carotenoides ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF)	Carotenoides /clorofilas totales
Control	1773,5 \pm 42,6 ^a	838,7 \pm 46,4 ^a	2617,8 ^a	2,11 ^c	145,9 \pm 7,1 ^b	0,056 ^c
0,5 mM Sb	1512,8 \pm 57,2 ^b	672,1 \pm 34,5 ^b	2188,3 ^b	2,26 ^b	157,5 \pm 6,3 ^a	0,072 ^b
1,0 mM Sb	1144,0 \pm 34,1 ^c	488,2 \pm 28,6 ^c	1630,8 ^c	2,35 ^a	155,1 \pm 7,4 ^a	0,094 ^a

Tratamiento	F ₀	F _M	F _v /F ₀	F _v /F _M
Control	336,8 \pm 15,8 ^a	1466,5 \pm 207,4 ^a	3,42 ^a	0,789 \pm 0,018 ^a
0,5 mM Sb	321,5 \pm 27,2 ^b	1515,2 \pm 215,5 ^a	3,51 ^a	0,783 \pm 0,026 ^a
1,0 mM Sb	350,9 \pm 25,4 ^c	1585,8 \pm 310,6 ^a	3,34 ^a	0,713 \pm 0,031 ^b

Peroxidación lipídica y contenido de ROS

El daño oxidativo es determinado por la medida de la peroxidación lipídica tanto en raíces como en hojas. En raíces, la toxicidad de Sb produce un fuerte incremento de la peroxidación de los lípidos de membrana, con incrementos del 21% y 43% para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente, en comparación con los valores control (Figura 43A). Sin embargo, sorprendentemente en las hojas no se observa incremento en los niveles de peroxidación lipídica, con valores incluso inferiores a las plantas control.

Con respecto a la producción de $O_2^{\cdot-}$ (Figura 43B), se observa un incremento en raíces que fueron similares en valor ($\approx 14\%$) para las dos concentraciones de Sb utilizadas. Estos resultados coinciden con la observación de la producción y acumulación de $O_2^{\cdot-}$ en raíces mediante sondas de fluorescencia específicas (Figura 44A,D) en las que se ve que la fluorescencia es muy similar en las raíces tratadas con Sb, independientemente de la concentración utilizada. En las hojas (Figura 43A,B) se produce un aumento del 18% con 1,0 mM Sb, pero no se observa alteración alguna con 0,5 mM Sb.

En cuanto al contenido en H_2O_2 , se observa cómo la toxicidad del Sb provoca un aumento significativo en el contenido de H_2O_2 en raíces, en un 82% y 346%. Este aumento es mayor en las hojas, con aumentos del 100% y 153%, para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente (Figura 43C). Con respecto a la cantidad de H_2O_2 acumulada determinada por microscopía de fluorescencia (Figura 44B,E), se observan fuertes aumentos en respuesta a la toxicidad de Sb ($\times 2,5$ y $\times 3,1$ para las dos concentraciones de Sb).

También se observa cómo el contenido de $\cdot NO$ bajo condiciones de estrés por Sb aumenta en ambos órganos (Figura 43D), en un 63,2% y 47,0% para 0,5 mM Sb y en un 72,3% y 38,0% para 1,0 mM Sb, en raíces y hojas respectivamente. Las imágenes de fluorescencia muestran este claro aumento en el contenido de $\cdot NO$ de las raíces (Figura 44C,F), con aumentos en los niveles de fluorescencia muy similares a los observados en el contenido de $\cdot NO$ determinados espectrofotométricamente.

La Figura 43E muestra el contenido de H_2S de raíces y hojas de plantas expuestas a la toxicidad del Sb. Como puede observarse, se produce un fuerte aumento en las raíces

(52%, o $\times 1,5$), siendo similar para las dos concentraciones de Sb utilizadas. El comportamiento es similar en las hojas, siendo un incremento más moderado (18%, $\times 1,2$). Nuevamente, las imágenes de fluorescencia permiten visualizar este aumento en la cantidad de H₂S acumulado en las raíces (Figura 44G,J) ($\times 2,2$ y $\times 2,4$ para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente).

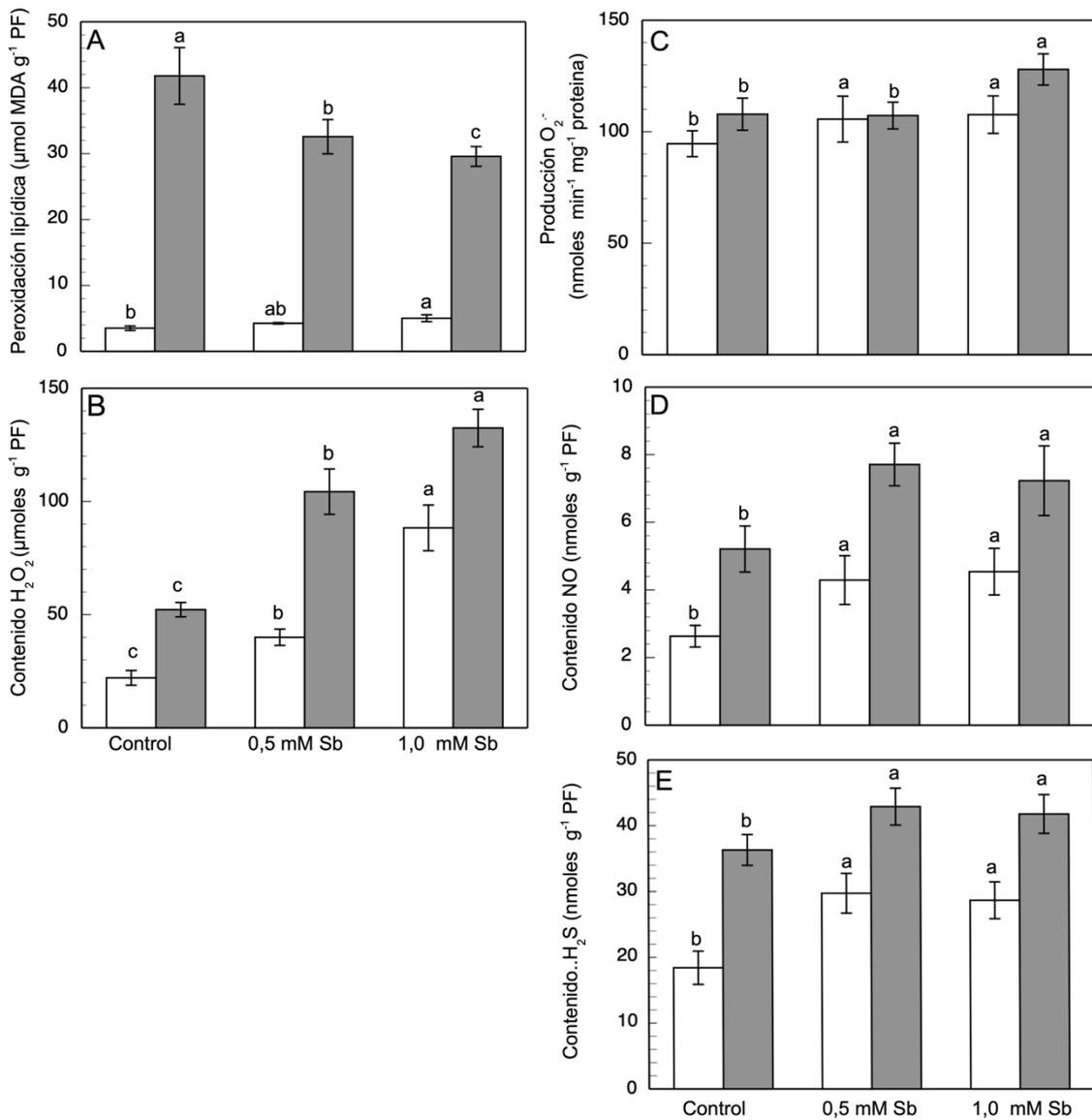
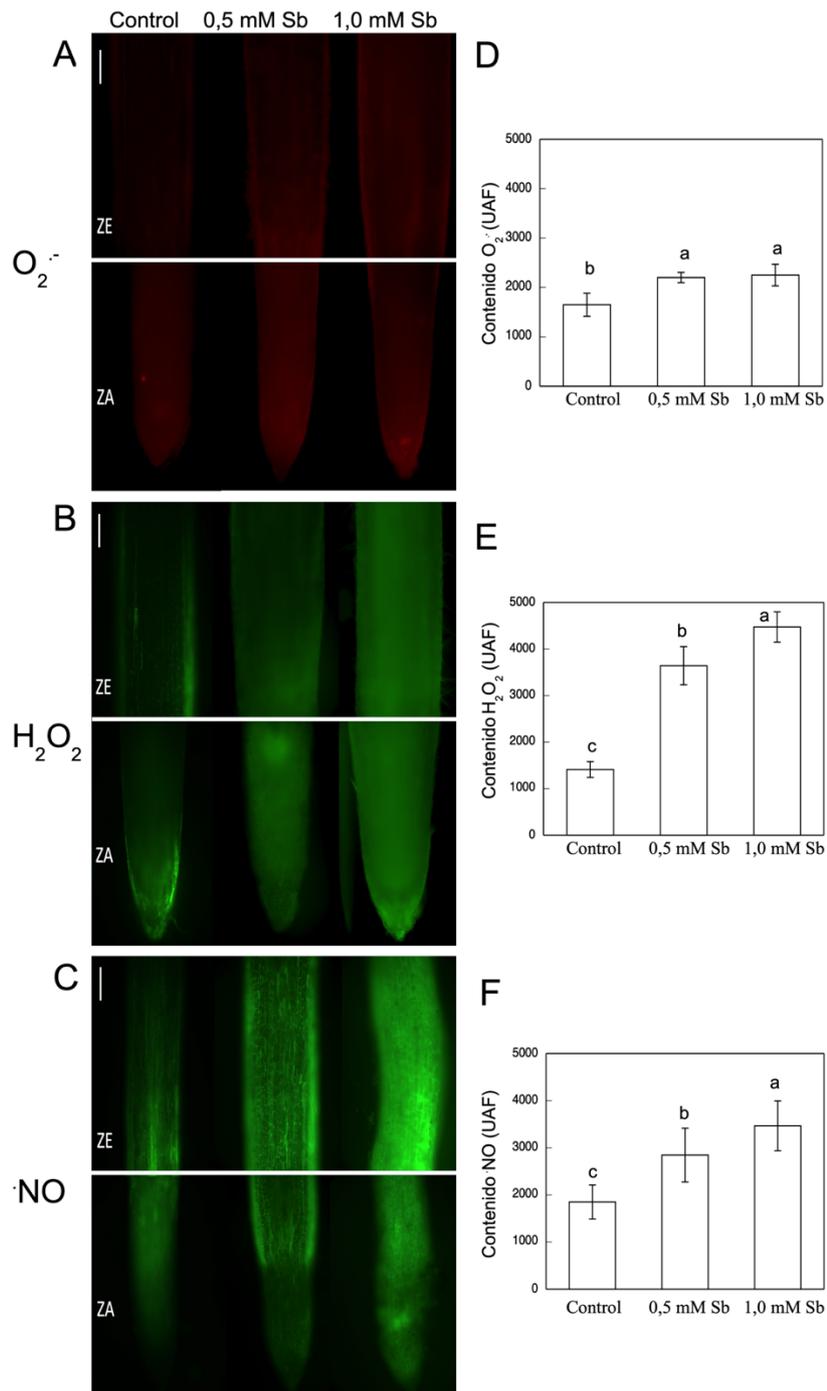


Figura 43. Efecto del Sb sobre la peroxidación lipídica (A), la producción de O₂⁻ (B) y el contenido de H₂O₂ (C), *NO (D) y H₂S (E) en raíces (blanco) y hojas (gris) de *D. viscosa*. Los datos proceden de 10 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado (letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0,05$, prueba U de Mann-Whitney).

En cuanto al contenido de ONOO^- en raíces también se observa un fuerte aumento, como se puede ver en las imágenes de microscopía de fluorescencia (Figura 44H,K) ($\times 2,2$ y $\times 2,6$, para Sb 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb). El tratamiento con Sb también altera el contenido en RSNOs (Figura 44I,L). Así, mediante fluorescencia se observa cómo en las raíces hay un fuerte aumento en la producción y acumulación de estos compuestos para ambas concentraciones de Sb utilizadas. Así, los RSNOs aumentan un 52,9% cuando las raíces se tratan con 0,5 mM Sb y un 70% cuando es con Sb 1,0 mM Sb.



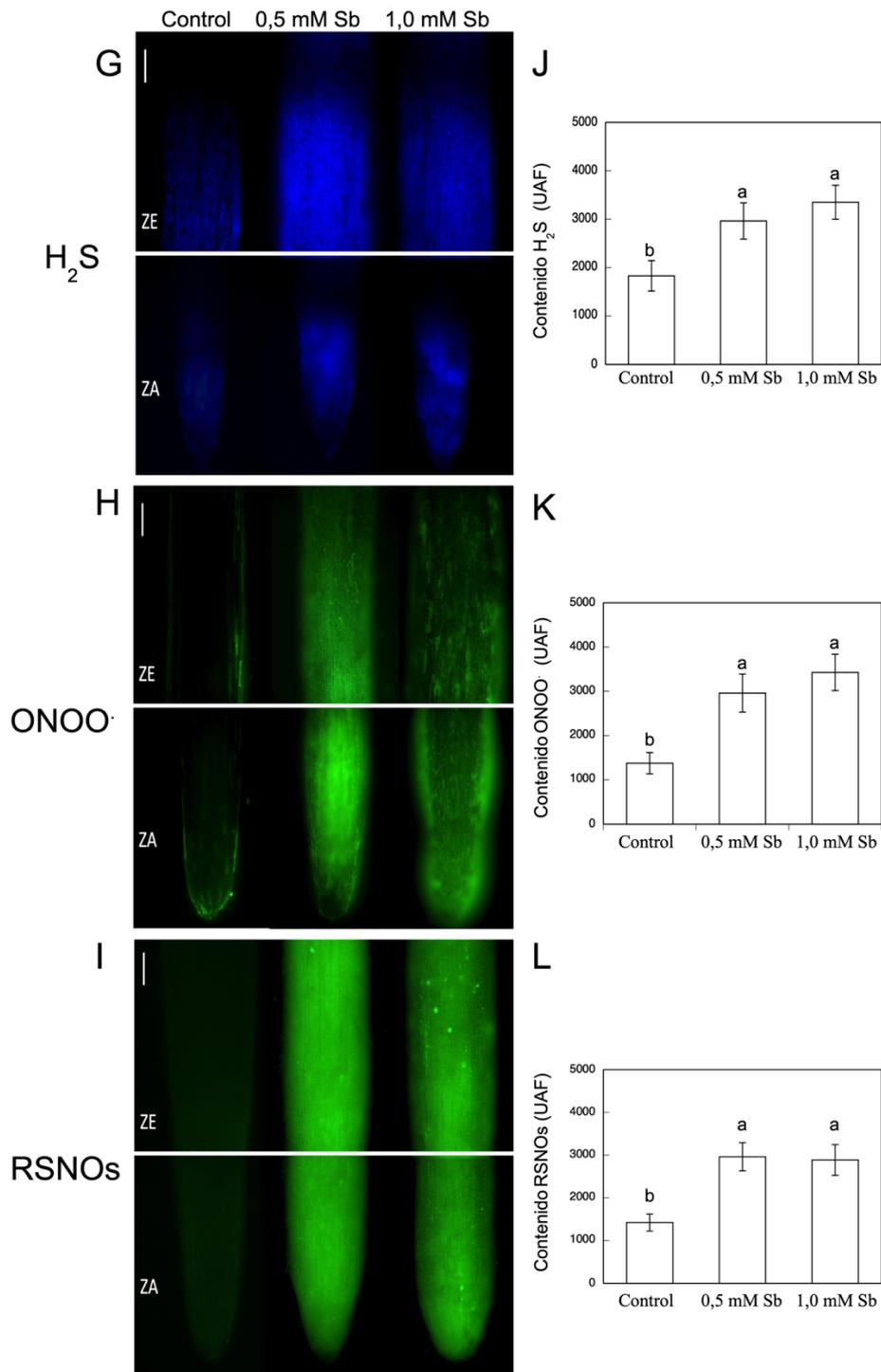


Figura 44. Detección de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot NO$, H_2S , $ONOO^-$, y RSNOs en las raíces (A-C, G-I), y niveles medios de intensidad de fluorescencia cuantificados en unidades arbitrarias (D-F, J-L), respectivamente. Se analizaron al menos cinco raíces para cada condición experimental y cinco repeticiones independientes (letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0,05$, prueba U de Mann-Whitney). Barra: 200 μm .

Efecto del Sb sobre las actividades antioxidantes enzimáticas

La actividad SOD disminuye en raíces, mientras que aumenta en hojas por el tratamiento con Sb (Figura 45A). Las plantas cultivadas con 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb presentan un descenso de esta actividad del 8% y 22%, respectivamente, para la actividad SOD en las raíces, mientras que en hojas se producen aumentos del 13% y 22,4%, respectivamente, en relación a los valores que se observan en hojas control. La actividad POX (Figura 45B) no muestra alteración alguna inducida por Sb en raíces, pero sí un leve incremento, aunque significativo en las hojas.

Respecto a las enzimas implicadas en el ciclo AsA-GSH, la actividad APX (Figura 45C) en raíces disminuye bajo toxicidad de 1,0 mM Sb un 11,5%. En hojas este descenso no es significativo, con valores de 10,5% y 8,4%, para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente. Sin embargo, la actividad DHAR (Figura 45D) en raíces aumenta para ambas concentraciones de Sb (15% para 1,0 mM Sb), mientras que en hojas aumenta para 0,5 mM Sb (12,5%) pero no para 1,0 mM Sb. La actividad MDHAR (Figura 45E) experimenta descensos del 22% y 47% con 0,5 mM Sb, y del 56% y 44%, con 1,0 mM Sb en raíces y hojas respectivamente. En cuanto a la actividad GR (Figura 45F) no se observan cambios en raíces por el tratamiento con Sb, y en hojas el comportamiento fluctúa en ambas concentraciones, aumentando un 19,7% para 0,5 mM Sb y disminuyendo un 36,5% para 1,0 mM Sb.

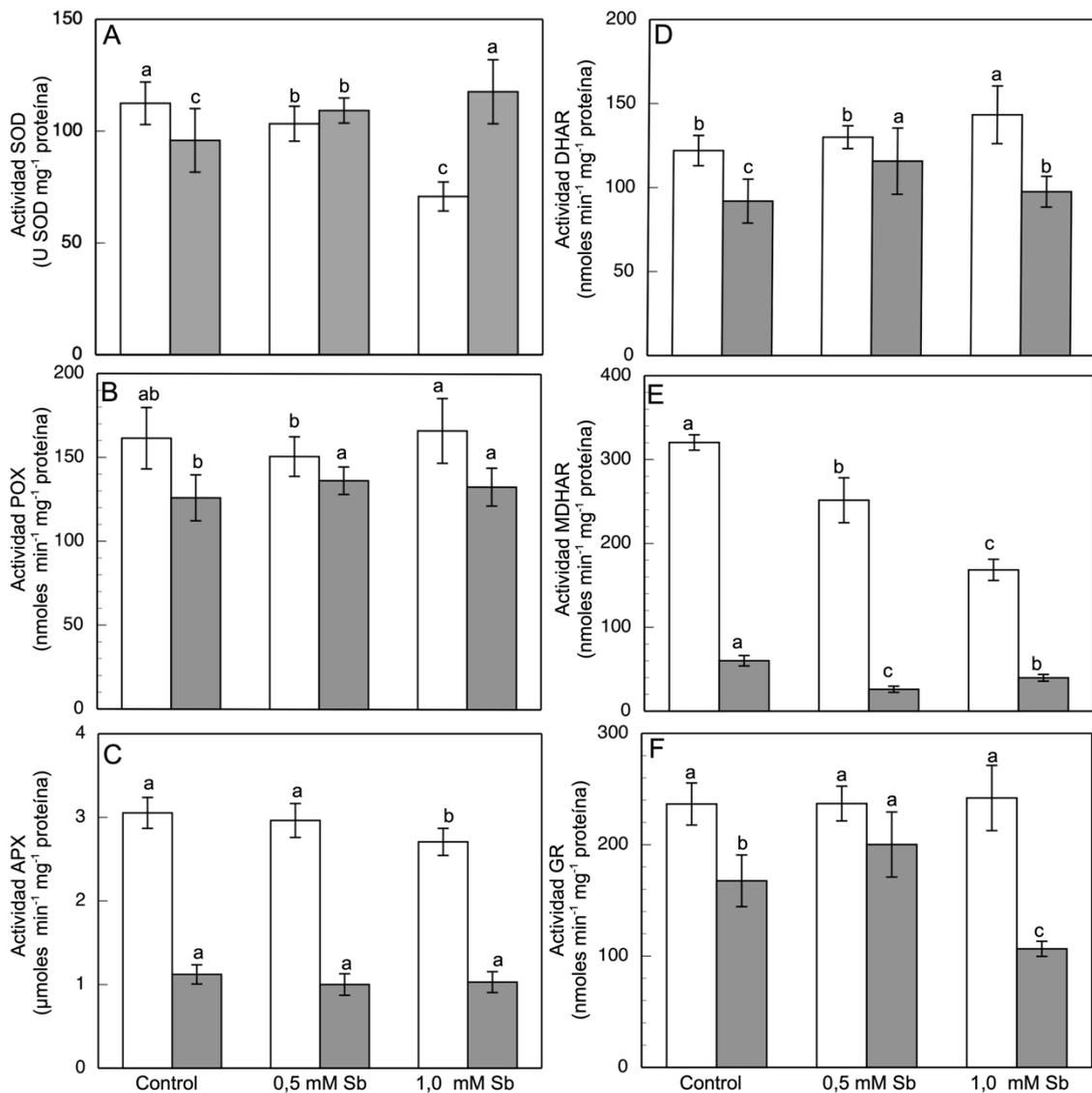


Figura 45. Efecto de Sb sobre las actividades SOD (A), POX (B), APX (C), DHAR (D), MDHAR (E) y GR (F), en raíces (blanco) y hojas (gris) de *D. viscosa*. Los datos proceden de 10 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado (letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0,05$, prueba U de Mann-Whitney).

En cuanto a la GSNOR se producen fuertes aumentos en la actividad, del 44,4% y 83,8% en raíces y 15,8% y 35,2% en hojas, para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente (Figura 46A).

Respecto a la actividad de L-DES (Figura 46B), se observa que aumenta tanto en raíces como en hojas, aunque este aumento es significativo solamente con 1,0 mM Sb (24 y 25% en raíces y hojas respectivamente).

La actividad de GST (Figura 46C) en raíces no se ve afectada con 0,5 mM Sb, pero bajo toxicidad de 1,0 mM Sb se observa un aumento del 21%. En hojas, por el contrario, muestra descensos del 9% y 12% para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente.

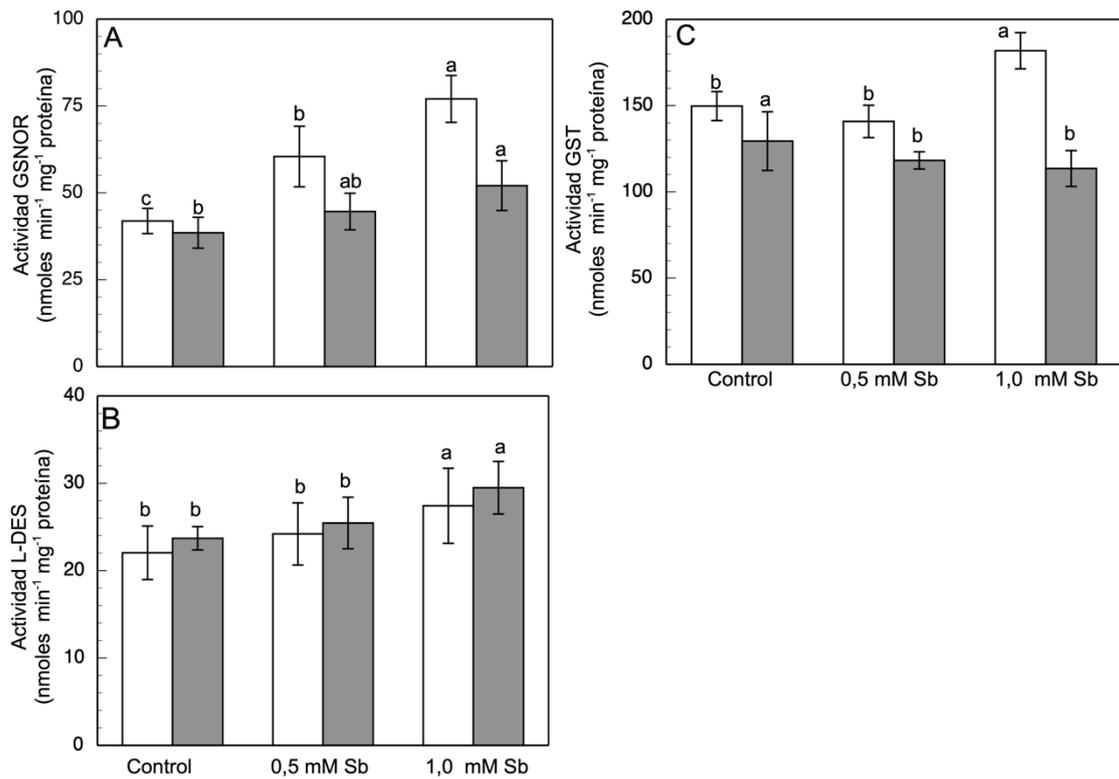


Figura 46. Efecto de Sb sobre las actividades GSNOR (A), L-DES (B) y GST (C) en raíces (blanco) y hojas (gris) de *D. viscosa*. Los datos proceden de 10 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado (letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0,05$, prueba U de Mann-Whitney).

Efecto del Sb sobre los compuestos fenólicos

Previa a la determinación del contenido en compuestos fenólicos, se realizan medidas relacionadas con el metabolismo de estos fenoles, así se miden las actividades CA-POX y PPO, enzimas implicadas en su oxidación.

Con respecto a la actividad CA-POX (Figura 47A) los resultados obtenidos muestran un aumento de esta actividad por la toxicidad del Sb, aunque de forma independiente a la dosis, tanto en raíces con un incremento del 83,1% y 71,2% como en hojas donde el incremento es 122,5% y 109,0%, para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente.

La actividad PPO (Figura 47B), en raíces disminuye dependiendo de la concentración de Sb utilizada (14,3% y 35,4%, respectivamente). En hojas, la actividad PPO muestra un comportamiento similar bajo toxicidad de 1,0 mM Sb, pero en el caso de 0,5 mM Sb se produce un aumento (15,4%).

El contenido total de compuestos fenólicos (Figura 47C) muestra cómo en las raíces se incrementan leve, pero significativamente, en respuesta al tratamiento con 0,5 mM Sb, y sin alteración respecto del control para 1,0 mM Sb. Por el contrario, en las hojas se observa una disminución para ambas concentraciones de Sb (en un 11,5% y un 21,8%, para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb). El contenido en flavonoides totales muestra una respuesta similar a la obtenida para los fenoles totales (Figura 47D). El contenido total de estos compuestos es superior en hojas. Sin embargo, la oxidación por la PPO de estos compuestos es superior en raíces.

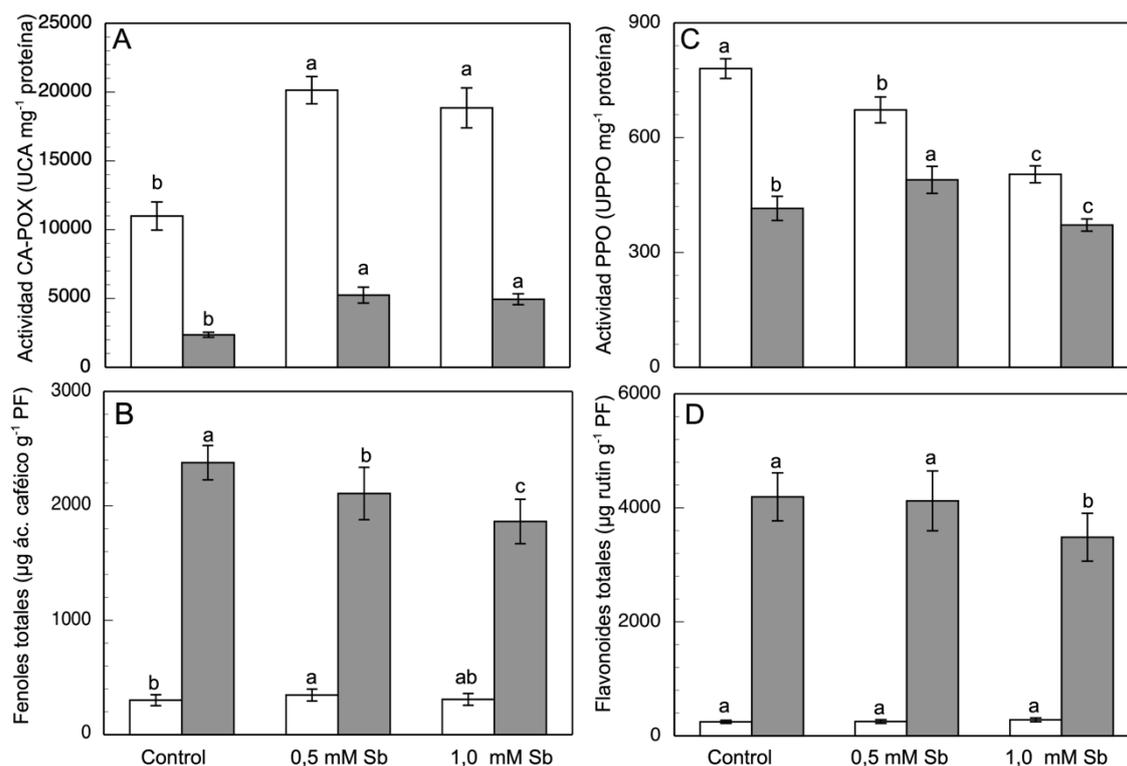


Figura 47. Efecto de Sb sobre CA-POX (A) y PPO (B) y actividades, y el contenido total de fenoles (C) y flavonoides (D), en raíces (blanco) y hojas (gris) de *D. viscosa*. Los datos proceden de 10 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado (letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$, prueba U de Mann-Whitney).

Efecto del Sb sobre los componentes del ciclo AsA-GSH

Se observa que en raíces el contenido de AsA muestra una reducción de entre 8,5% (0,5 mM Sb) y 16,1% (1,0 mM Sb) (Tabla 13). Por el contrario, en hojas los dos tratamientos de Sb producen un incremento similar en este contenido. Con respecto al contenido de DHA, en las raíces se produce un aumento para 0,5 mM Sb, aunque no significativo, y descenso para 1,0 mM Sb. Por el contrario, el contenido de DHA en hojas disminuye para ambas concentraciones (30,1% y 54,5%, respectivamente). Estas alteraciones provocan que el contenido total de AsA + DHA disminuya tanto en raíces como en hojas, excepto en 0,5 mM Sb en raíces cuando no se producen alteraciones. Finalmente, la relación AsA/DHA muestra una disminución no significativa en raíces para 1,0 mM Sb, pero no para 0,5 mM Sb, y mostrando un aumento en hojas (x1,6 y x2,2 para 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb, respectivamente).

En cuanto al contenido en GSH y GSSG (Tabla 13), se observa cómo el contenido en GSH sufre un fuerte descenso, sobre todo en raíces, en una respuesta tanto mayor cuanto mayor es la concentración de Sb utilizada. El contenido en GSSG también desciende, sobre todo en raíces y para 1,0 mM Sb. Como consecuencia de estas alteraciones el contenido total (GSH+GSSG) desciende, siendo este efecto nuevamente mucho más fuerte en raíces que en hojas. Finalmente, la relación GSH/GSSG también desciende en respuesta a la toxicidad de Sb, de forma similar para ambas concentraciones de Sb.

Tabla 13. Efecto de la Sb sobre los contenidos de AsA, DHA y ascorbato (AsA+DHA) y la relación AsA/DHA, los contenidos de GSH, GSSG y glutatión (GSH+GSSG) y la relación GSH/GSSG, en *D. viscosa*. Los datos proceden de 10 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado (letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$, prueba U de Mann-Whitney).

Tratamiento	AsA (nmol g ⁻¹ PF)		DHA (nmol g ⁻¹ PF)	
	Raíces	Hojas	Raíces	Hojas
Control	76,86 ± 7,63 ^a	185,30 ± 15,61 ^b	308,23 ± 18,57 ^a	1827,49 ± 129,10 ^a
0,5 mM Sb	70,30 ± 8,53 ^a	210,21 ± 10,17 ^a	339,24 ± 28,13 ^a	1288,89 ± 52,30 ^b
1,0 mM Sb	64,55 ± 8,05 ^a	213,97 ± 22,80 ^a	243,41 ± 13,10 ^b	1021,50 ± 100,13 ^c

Tratamiento	AsA + DHA (nmol g ⁻¹ PF)		AsA / DHA (nmol g ⁻¹ PF)	
	Raíces	Hojas	Raíces	Hojas
Control	385,06 ± 21,14 ^a	2012,72 ± 92,75 ^a	0,249 ± 0,030 ^a	0,101 ± 0,009 ^c
0,5 mM Sb	409,54 ± 32,17 ^a	1499,10 ± 105,11 ^b	0,210 ± 0,024 ^a	0,164 ± 0,009 ^b
1,0 mM Sb	307,92 ± 18,50 ^b	1237,47 ± 107,98 ^c	0,264 ± 0,027 ^a	0,224 ± 0,044 ^a

Tratamiento	GSH (nmol g ⁻¹ PF)		GSSG (nmol g ⁻¹ PF)	
	Raíces	Hojas	Raíces	Hojas
Control	2,81 ± 0,32 ^a	5,01 ± 0,72 ^a	0,34 ± 0,04 ^a	10,10 ± 1,82 ^a
0,5 mM Sb	0,90 ± 0,12 ^b	3,48 ± 0,16 ^b	0,23 ± 0,11 ^b	10,25 ± 0,86 ^a
1,0 mM Sb	0,54 ± 0,23 ^c	2,60 ± 0,29 ^c	0,14 ± 0,08 ^c	8,31 ± 0,49 ^b

Tratamiento	GSH + GSSG (nmol g ⁻¹ PF)		GSH / GSSG (nmol g ⁻¹ PF)	
	Raíces	Hojas	Raíces	Hojas
Control	3,15 ± 0,30 ^a	15,11 ± 1,53 ^a	8,36 ± 1,3 ^a	0,492 ± 0,035 ^a
0,5 mM Sb	1,13 ± 0,21 ^b	13,73 ± 1,10 ^{ab}	3,91 ± 0,8 ^b	0,342 ± 0,014 ^b
1,0 mM Sb	0,68 ± 0,24 ^c	10,91 ± 0,57 ^b	3,85 ± 0,9 ^b	0,316 ± 0,044 ^b

4.3.2. Discusión

La exposición de *D. viscosa* a elevadas concentraciones de Sb provoca reducción del crecimiento y de la producción de biomasa, siendo estos efectos similares a los provocados por la toxicidad de metales pesados y metaloides, como el Cd, el Pb o el Ni (Alyemeni et al., 2018; Mostofa et al., 2015; Sandalio et al., 2009; Verma & Dubey, 2003). En presencia de 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb durante 17 días, se ve reducida la longitud, el PF, y el PS tanto de la parte radicular como de la parte aérea, así como de la producción total de biomasa. La reducción del crecimiento es más pronunciada en las raíces que en la parte aérea, siendo estos resultados similares a los descritos en otras especies expuestas a este metaloide. Este efecto muestra una clara dependencia de la concentración de Sb. (Chai et al., 2016; Ortega et al., 2017; Tschan et al., 2009b; Zhou et al., 2018).

El Sb se acumula mayoritariamente en raíces, siendo esta acumulación dependiente de la cantidad de Sb presente en el medio (Feng et al., 2020; Ji et al., 2018; Ma et al., 2019; Ren et al., 2014). Los valores que muestra el FB en raíces son muy superiores a los que se observan en la parte aérea. El bajo valor del FT en *D. viscosa* es de 0,06, lo cual contrasta con los valores obtenidos por Benhamdi et al. (2014) de 1,21 y 0,34 en las plantas *Hedysarum pallidum* y *Lygeum spartum*, respectivamente. No obstante, estos bajos valores de FT coinciden con los observados por Pérez-Sirvent et al. (2012), que realizaron mediciones en *D. viscosa* y en diferentes localizaciones de un suelo minero de Sb. Aunque en su caso se observan menores niveles de acumulación, posiblemente debido a la menor biodisponibilidad de Sb en los suelos que estudiaron en comparación con los niveles aportados en este trabajo, donde las plantas crecen en cultivo hidropónico.

La absorción y el transporte de otros elementos minerales también se ven afectados por la toxicidad de Sb. Altas concentraciones de Sb en el medio provocan que el contenido de N, S, K y Ca disminuya tanto en raíces como en la parte aérea. Sin embargo, el contenido de P se mantiene inalterado. Shtangeeva et al. (2012) describen una disminución en el contenido de Ca y K bajo toxicidad de Sb, mientras que (Zhu et al., 2020b) describen la disminución en el contenido de K pero un aumento en el contenido de Ca. El contenido de Mg disminuye en raíces (Zhu et al., 2020b), pero esta disminución es mucho menor en la parte aérea, observándose un FT para este elemento mucho mayor

que el observado en las plantas control. Es posible que este factor esté relacionado con el mantenimiento de niveles de pigmentos fotosintéticos, lo que puede favorecer que se mantenga la eficiencia fotosintética en estas condiciones de estrés por Sb, especialmente en el caso de 0,5 mM Sb. El contenido en Fe y Cu desciende, siendo el descenso más acusado en raíces, coincidiendo con los descensos observados previamente (Feng et al., 2013c; Shtangeeva et al., 2011; Zhu et al., 2020b). Sin embargo, contrastan con los resultados obtenidos previamente en tomate, donde el Sb induce una disminución del contenido de Fe y Zn, con aumentos de Mg y Cu. El comportamiento de Mn es diferente, disminuyendo en las raíces, como también observan Zhu et al (2020b) en *O. sativa* y previamente en este trabajo en *S. lycopersicum*. Sin embargo, en la parte aérea se mantiene prácticamente sin cambios, con ligeras fluctuaciones que, junto con la menor disminución del contenido de Mg, podría contribuir a mantener la eficiencia fotosintética. Este resultado es similar al descrito por Rodríguez-Ruiz et al. (2019) quienes observan descensos del contenido de Mg y Mn en las raíces, pero no en las hojas de plantas de guisantes sometidas a toxicidad por As.

El contenido de clorofila disminuye en respuesta a la toxicidad de Sb, ya sea por una disminución en su biosíntesis (Pan et al., 2011; Xue et al., 2015; Zhang et al., 2010) o por un aumento en su degradación (Jain et al., 2010; Jaleel et al., 2009). La relación clorofila a/b aumenta en respuesta al tratamiento con Sb, lo que indica una respuesta a la toxicidad inducida por metaloides como se ha descrito previamente (Zhou et al., 2018). Este aumento se debe a la mayor disminución del contenido de clorofila b que la observada para la clorofila a, posiblemente debido a una mayor degradación de la clorofila b (Jain et al., 2010; Jaleel et al., 2009). Sin embargo, el contenido de carotenoides aumenta, lo que refleja su capacidad antioxidante y fotoprotectora (Chai et al., 2017), mientras que en *Acorus calamus* bajo toxicidad por Sb se ha observado tanto una disminución en el contenido de carotenoides como en la relación carotenoides/clorofilas (Zhou et al., 2018). Este aumento en el contenido de carotenoides, sumado a la disminución del contenido total de clorofilas, hace que la relación carotenoides/clorofilas también aumente. La toxicidad de Sb induce un aumento en la producción de ROS que afecta negativamente al contenido de clorofilas. La relación clorofila a/b está relacionada con el grado de apesamiento y fluidez de las membranas tilacoidales (Anderson & Aro, 1994; Chow, 1999). El aumento de la relación clorofila a/ b es interesante ya que refleja los cambios que se producen en la funcionalidad de las membranas tilacoidales, modificando su estado

de apresamiento y con ello el funcionamiento del PSII (Anderson & Aro, 1994). La relación clorofila a/b es inversamente proporcional al grado de apresamiento tilacoidal siendo, por tanto, un correcto apresamiento el factor clave para la capacidad de transferencia de electrones al PSII. Así, cambios en el grado de apresamiento tilacoidal alteran la fluidez de sus membranas, reduciendo con ello la transferencia de electrones (Chow, 1999), llegando a provocar fotoinhibición (Ortega et al., 2017; Pan et al., 2011; Zhou et al., 2018). De acuerdo con Ortega et al., (2017), y con lo descrito en el capítulo 4.1 de este trabajo, se observa, en girasol y en tomate, cómo la toxicidad de Sb induce un aumento en la relación clorofila a/b, lo que conduce a disminuciones en la eficiencia fotosintética en estas especies. Sin embargo, sorprendentemente, *D. viscosa* mantiene niveles de eficiencia fotosintética similares a los valores control bajo toxicidad de Sb. Sólo se observa una ligera disminución, no significativa, con 1,0 mM Sb. El aumento de la relación clorofila a/b en *D. viscosa* es porcentualmente menor que el observado en *H. annuus* (Ortega et al., 2017) y *S. lycopersicum* (capítulo 4.1.). Estos datos reflejan un funcionamiento eficiente del PSII, incluso en estas condiciones de alta toxicidad de Sb. Este resultado contrasta con los descritos en otros trabajos (Pan et al., 2011; Zhang et al., 2010) que observan cómo junto con la disminución de clorofilas, se produce un aumento en el flujo de disipación de energía, lo que conduce a una disminución de la eficiencia fotosintética en respuesta a esta toxicidad. En *D. viscosa* los valores de F_0 y F_m se mantienen constantes, lo que hace que la eficiencia fotosintética también lo haga. El mantenimiento estable de los valores de F_0 puede indicar que el centro de reacción del PSII no está afectado, sin reducción del flujo de energía desde las clorofilas antena hasta el PSII. Este efecto puede deberse al control en la producción de ROS. Además, la F_M sin cambios parece indicar que tampoco existen alteraciones significativas en la ultraestructura de las membranas tilacoidales, a pesar de un mayor apresamiento que podría afectar negativamente al flujo de electrones. Es posible que el aumento del contenido de carotenoides pueda ayudar a mantener la eficiencia fotosintética, eliminando ROS y protegiendo así la funcionalidad del PSII del daño oxidativo (Chai et al., 2017; Palm et al., 2017; Sanità di Toppi et al., 2009; Simkin et al., 2008).

En raíces, las concentraciones utilizadas de Sb producen un aumento en el contenido de H_2O_2 y, en menor grado, de $O_2^{\cdot-}$. Una consecuencia del aumento de ROS es el aumento de la peroxidación lipídica que se observa. Sin embargo, en hojas no hay aumento en la peroxidación lipídica a pesar del aumento en la producción de estas ROS. El aumento en

la producción de ROS inducido por Sb en *D. viscosa* es similar al descrito para otras plantas en respuesta a la toxicidad tanto de Sb como de otros metales pesados (Ahmad et al., 2020; Alyemeni et al., 2018; Feigl et al., 2015; Garrido et al., 2021; Hussain et al., 2018; Kaya et al., 2020a; Ortega et al., 2017; Srivastava et al., 2014). No obstante, el aumento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ fue mucho menor que el observado previamente en *H. annuus* (Ortega et al., 2017), y *S. lycopersicum* (capítulo 4.1.), lo que refleja la mayor tolerancia de *D. viscosa* al estrés por Sb. En plantas sometidas a toxicidad por Cd, se observan aumentos tanto en la peroxidación lipídica como en el contenido de H_2O_2 (Alyemeni et al., 2018; Kaya et al., 2020a). Este aumento de la peroxidación lipídica en respuesta al estrés causado por Sb y metales pesados también se observa en diferentes plantas (Chai et al., 2016; Ortega et al., 2017; Xue et al., 2015). La no alteración de los niveles de peroxidación lipídica en hojas puede estar relacionada con el desempeño eficaz del sistema antioxidante y con la capacidad de esta planta para compartimentalizar en las raíces la mayor parte del Sb, como indica su bajo FT (0,06), y coincide con resultados descritos por otros autores en otras especies (Corrales et al., 2014; Feng et al., 2011) en los que se evidencia que el Sb muestra un bajo impacto sobre la peroxidación lipídica.

El ligero aumento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ está en consonancia con la disminución de actividad SOD que se observa en raíces y el pequeño aumento en hojas. El sistema antioxidante enzimático se ve alterado por la toxicidad del Sb. Las actividades POX y APX se comportan de forma similar en raíces y hojas, no aumentan su actividad y muestran valores similares a los controles, incluso inferiores. La disminución de estas actividades provoca la acumulación de H_2O_2 , a pesar de la disminución de la actividad de SOD en raíces, pero no en hojas. Por el contrario, numerosos estudios observan un aumento de estas actividades en respuesta al Sb (Benhamdi et al., 2014; Feng et al., 2009; Ortega et al., 2017; Vaculíková et al., 2014). Sin embargo, en *D. viscosa*, una posible planta tolerante a Sb (Garrido et al., 2021; Murciego et al., 2007; Shtangeeva et al., 2012), las actividades de SOD y APX disminuyen en raíces. La diferente respuesta de estas enzimas antioxidantes según el órgano también es descrita por Rodríguez-Ruiz et al. (2019) en plantas de guisantes sometidas a estrés por As, en las que la expresión de la SOD disminuye fuertemente en las raíces, pero no en las hojas, mientras que la actividad de APX aumenta en las raíces y disminuye en las hojas. El aumento en el contenido de H_2O_2 puede estar siendo aprovechado para realizar procesos de lignificación, que pueden constituir una primera barrera de defensa para reducir la entrada de Sb a las raíces. Esta

posibilidad está respaldada por el fuerte aumento, en respuesta a la toxicidad de Sb, mostrado por la actividad CA-POX, peroxidasa apoplástica de clase III, implicada en la producción de lignina. Además, aunque el contenido total de compuestos fenólicos se mantiene sin cambios, se produce un descenso de la actividad PPO, pudiendo este descenso ayudar a mantener el contenido total de polifenoles, flavonoides y otros compuestos fenólicos con fuertes actividades antioxidantes. Además, al oxidar los fenoles, la CA-POX puede dar lugar al desarrollo de una barrera en las paredes celulares que reduce la entrada e inmoviliza a este nivel el Sb (Le Gall et al., 2015; Vaculíková et al., 2014; Zhu et al., 2020a).

En cuanto al resto de enzimas del ciclo AsA-GSH, la actividad DHAR aumenta en las raíces, mientras que en hojas aumenta con 0,5 mM Sb, pero permanece sin cambios con 1,0 mM Sb. La actividad MDHAR disminuye en ambos órganos, mientras la actividad GR no muestra cambios significativos en las raíces, pero sí en las hojas donde aumenta para el tratamiento con 0,5 mM Sb y disminuye en 1,0 mM Sb. Estas actividades muestran cambios en su actividad, dependiendo del órgano estudiado y de la concentración de Sb en el mismo. Singh et al. (2015), en hojas de *Luffa* sometidas a toxicidad de As, describen un aumento en la actividad GR y una disminución en las actividades de DHAR y MDHAR. Por su parte, Rodríguez-Ruiz et al. (2019) describen aumentos o disminuciones en las actividades GR, MDHAR y DHAR dependiendo del órgano, en respuesta a la toxicidad de As, coincidiendo con los resultados aquí descritos. Por el contrario, Feng et al. (2009) describen una disminución en la actividad de GR inducida por la toxicidad de Sb. La disminución de la actividad de GST en las hojas observada en el presente estudio puede estar relacionada con el menor descenso en el contenido de GSH que se produce en las hojas, en comparación con las raíces. Además, la relación GSH/GSSG disminuye menos en las hojas que en las raíces. Este comportamiento dependiente del órgano estudiado es también observado Zhang et al. (2008) en *O. sativa* sometido a toxicidad por Cd, que describen un comportamiento órgano-dependiente de la actividad GST, con aumentos en hojas y disminuciones en raíces, sugiriendo la posible existencia de diferentes isoenzimas y diferentes niveles de expresión. Mostofa et al. (2015) observan una disminución de la actividad GST en hojas de *O. sativa* sometidas a toxicidad por Cd, con aumentos en el resto de actividades enzimáticas antioxidantes. El aumento de esta actividad observado en las raíces bajo la toxicidad de Sb coincide con los resultados de Benhamdi et al. (2014) quienes describen aumentos en la actividad de GST bajo la

toxicidad de Sb y As, en su caso tanto en raíces como en hojas. Por otro lado, Hou et al. (2019) observan en *A. thaliana* cómo la toxicidad de Cd altera la estructura proteica de la GST, lo que reduce su actividad y afecta al sistema antioxidante. En hojas, y sobre todo en raíces de *D. viscosa*, el Sb produce un aumento de la actividad GST, que detoxifica este metaloide uniéndolo al grupo tiol del GSH, protegiendo así del daño oxidativo.

La presencia de Sb induce un aumento tanto del contenido de $\bullet\text{NO}$, ONOO^- y de la actividad de la GSNOR. El aumento de estos compuestos y de esta actividad GSNOR es mayor en raíces que en hojas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Leterrier et al. (2011) en *A. thaliana* sometidas a estrés de As, con aumento de $\bullet\text{NO}$ y actividad GSNOR, a la vez que observan un descenso en el contenido de GSH. Además, en *H. annuus* y *S. lycopersicum* (Ortega et al., 2017; Ma et al., 2019) el Sb también induce aumentos en el contenido de $\bullet\text{NO}$ y ONOO^- y de la actividad GSNOR, aunque estos efectos activadores varían según el órgano. Por el contrario, Rodríguez-Ruiz et al. (2019) describen cómo la toxicidad de As en guisantes inhibe tanto de la actividad GSNOR como de la formación de $\bullet\text{NO}$ y ONOO^- .

Con respecto al efecto que la toxicidad de Sb presenta sobre la producción de H_2S , estudios previos han descrito como la aplicación exógena H_2S actúa potenciando el sistema antioxidante y, por tanto, mejorando la defensa contra la toxicidad inducida por metales y metaloides pesados (Ahmad et al., 2020; Luo et al., 2020; Mostofa et al., 2015; Singh et al., 2015; Zhu et al., 2018). La interconexión entre H_2S y $\bullet\text{NO}$ es evidente en una gran cantidad de estudios (Kaya et al., 2020b; Shivaraj et al., 2020; Singh et al., 2020). En *D. viscosa*, la toxicidad de Sb induce un aumento en la actividad de L-DES, lo que supone un aumento en el contenido de H_2S , más marcado en raíces que en hojas. Este aumento en la actividad puede estar relacionado con el aumento observado en el contenido de $\bullet\text{NO}$ (Huang et al., 2021a) en respuesta a la toxicidad de Sb. No hay referencias en la literatura sobre el efecto de la toxicidad del Sb sobre el contenido y la función del H_2S endógeno. Kaya et al. (2020a) han descrito aumentos en el contenido de H_2S y $\bullet\text{NO}$ en condiciones de toxicidad de Cd en el trigo, con un aumento notable en el contenido de H_2O_2 y en las actividades de SOD y POX. En *Isatis indigotica*, bajo condiciones de toxicidad de Cd Jia et al. (2020) detectan un aumento en H_2S endógeno, lo que induce la formación de compuestos quelantes de Cd además de actuar

disminuyendo el flujo de Cd a través de las membranas. Por el contrario Kushwaha & Singh (2020b) muestran cómo la toxicidad de Cr provoca un descenso en los niveles de H₂S endógeno, aunque la aplicación de H₂S exógeno actúa mitigando los efectos del estrés oxidativo inducido y potenciando la respuesta antioxidante.

En este trabajo, en *D. viscosa*, los aumentos que se observan en el contenido de •NO y H₂S pueden actuar mejorando la respuesta de la planta a la toxicidad de este metaloide (Alamri et al., 2020; Hu et al., 2019; Sharma et al., 2020). Así, el aumento del contenido de •NO puede contribuir a reducir tanto la formación de O₂^{•-}, a través de su efecto inhibitor sobre la RBOH, como su acumulación, a través de la formación de ONOO⁻. El aumento de la actividad GSNOR puede actuar para mantener los niveles de •NO, regulando así sus efectos.

Los resultados de este trabajo muestran cómo el Sb induce una respuesta diferente dependiendo del órgano estudiado. Así se observa una disminución en el contenido de AsA en las raíces, pero no en las hojas, mientras que el contenido de DHA sí disminuye en ambos órganos. Esta alteración puede estar relacionada con las alteraciones observadas en las actividades APX, DHAR, MDHAR y GR. Los cambios que se producen en el contenido en AsA y DHA provocan que la relación AsA/DHA disminuya ligeramente en las raíces, pero aumente en las hojas. En raíces de tomate expuestas a toxicidad de Cr (Kushwaha et al., 2020a), se ha observado cómo el contenido de AsA disminuye, sin que se observen cambios significativos en la cantidad de DHA, lo que provoca también una disminución de AsA/DHA, siendo esta respuesta inducida por este metal pesado similar a la que induce el Sb.

En cuanto a la respuesta del GSH, que desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis redox celular (Foyer & Noctor, 2011; Hasanuzzaman et al., 2017), se observa cómo el Sb altera su contenido. Se producen descensos de los contenidos tanto de GSH como de GSSG, y de la relación GSH/GSSG, especialmente en las raíces. Esta disminución puede ser debida por la alta capacidad del Sb para unirse a grupos tiol (Sun et al., 2000), siendo este efecto es más fuerte en raíces, donde se encuentra la mayor acumulación de Sb. Estas alteraciones son evidenciadas por otros investigadores en diferentes plantas expuestas a metales pesados, obteniendo resultados similares a los obtenidos en *D. viscosa*. Estos estudios se realizan en condiciones tóxicas

de Cr en raíces de plantas de tomate (Kushwaha et al., 2020a), en condiciones tóxicas de Cd en raíces y hojas de alfalfa (Cui et al., 2014), y de arroz (Mostofa et al., 2015). Además, en guisantes sometidos a toxicidad de As, Rodríguez-Ruiz et al. (2019) describen disminuciones en el contenido de GSH y GSSG tanto en raíces como en hojas. La disminución en el contenido de GSH puede deberse a que actúa como sustrato para la síntesis de fitoquelatinas que, posteriormente, pueden actuar para formar quelatos con Sb (Rodríguez-Ruiz et al., 2019; Wojas et al., 2010). El Sb puede también unirse directamente al GSH o ser detoxificado mediante la actividad GST (Aslam et al., 2021), que en este trabajo aumenta. La mayor disminución del contenido de GSH junto con el aumento de la actividad de GST observado en las raíces pueden, junto con el fuerte aumento de la actividad de la CA-POX, pueden ser la causa de la gran acumulación de Sb que se produce en este órgano.

La toxicidad de Sb provoca un aumento en la formación de complejos Sb-tioles, favoreciendo así su inmovilización, y reduciendo su absorción y transporte (Huang et al., 2021a), como muestra el bajo FT de este metaloide en *D. viscosa*. Shi et al. (2014) muestran cómo la interacción de H₂S y •NO es necesaria para inducir la respuesta de defensa frente al estrés por metales pesado. El aumento del contenido de H₂S y •NO en respuesta al estrés inducido por Sb provoca un aumento del contenido de nitrosotioles, compuestos que ayudan a estimular el sistema de defensa (Per et al., 2017). Los niveles de H₂S y •NO endógenos aumentan en respuesta al tratamiento con Cd (Shivaraj et al., 2020). El •NO puede prevenir los aumentos de O₂^{•-} y la peroxidación lipídica (Shi et al., 2014; Whiteman et al., 2006), y manteniendo la estabilidad de los sistemas de transporte de electrones y, en consecuencia, la actividad del PSII (Sharma et al., 2020). El aumento de H₂S, además de su interacción con •NO y H₂O₂, puede también intervenir en el mantenimiento de la eficiencia fotosintética (Fu et al., 2018) y afectar tanto a las enzimas antioxidantes como al contenido de AsA y GSH, claves para mantener bajos los niveles de ROS (Luo et al., 2020).

En resumen, en *D. viscosa*, el tratamiento con 0,5 mM Sb y 1,0 mM Sb induce el desarrollo de estrés nitrooxidativo tanto en raíces como en hojas (Figura 48). La gran capacidad de las raíces de *Dittrichia* para acumular Sb es la razón del diferente comportamiento observado en los sistemas enzimáticos antioxidantes de los dos órganos. En raíces, el aumento en los niveles de ROS inducido por Sb se correlaciona con un

aumento en los niveles de peroxidación lipídica, reflejando el desarrollo de daño oxidativo a nivel de este órgano. Es en las raíces donde se detecta la mayor cantidad de Sb en la planta, con poca capacidad de translocación a la parte aérea. La toxicidad de Sb causa alteraciones en las actividades de SOD, APX, DHAR, MDHAR y GR en raíces, pero poca alteración en hojas. Se produce la disminución de los componentes del ciclo AsA-GSH, lo que unido al aumento de la actividad de GST en raíces, muestra la capacidad del GSH para interactuar con Sb, uniéndose y siendo posiblemente esta la principal forma de acumulación y desintoxicación que presenta *D. viscosa* como respuesta a este metaloide. El Sb altera el equilibrio de ROS, especialmente con respecto al H₂O₂, lo que provoca un aumento de •NO y H₂S, que actúan sobre el sistema antioxidante para limitar el desequilibrio redox inducido por Sb. Además, los aumentos en el contenido de •NO, ONOO⁻ y RSNOs, y la actividad de GSNOR son evidencias de la participación de RNS en esta respuesta. Posiblemente, la mayor parte del exceso de H₂O₂ puede utilizarse en el proceso de síntesis de lignina, tanto en las paredes celulares de las raíces como de las hojas como sistema de inmovilización de Sb.

Comparando la respuesta de las plantas de *Solanum lycopersicum* y de *Dittrichia viscosa* a la toxicidad por Sb se pone de manifiesto la mayor acumulación de Sb en *Dittrichia* (x3.2 veces la cantidad de Sb total por planta). El crecimiento se reduce en ambas plantas, pero en *Dittrichia* no se observa clorosis ni daños necróticos. *Dittrichia* presenta valores de bioacumulación de Sb, sobre todo en sus raíces, muy superiores a las de tomate, lo que unido al mayor desarrollo radicular hace que el contenido de Sb acumula sea muy alto. A falta de la caracterización molecular parece que *Dittrichia* puede ser una planta bioacumuladora de Sb, susceptible de ser utilizada en procesos de descontaminación de suelos con presencia de Sb. En esta capacidad de respuesta el GSH parece ser un factor clave, así como la interacción H₂O₂, •NO y H₂S.

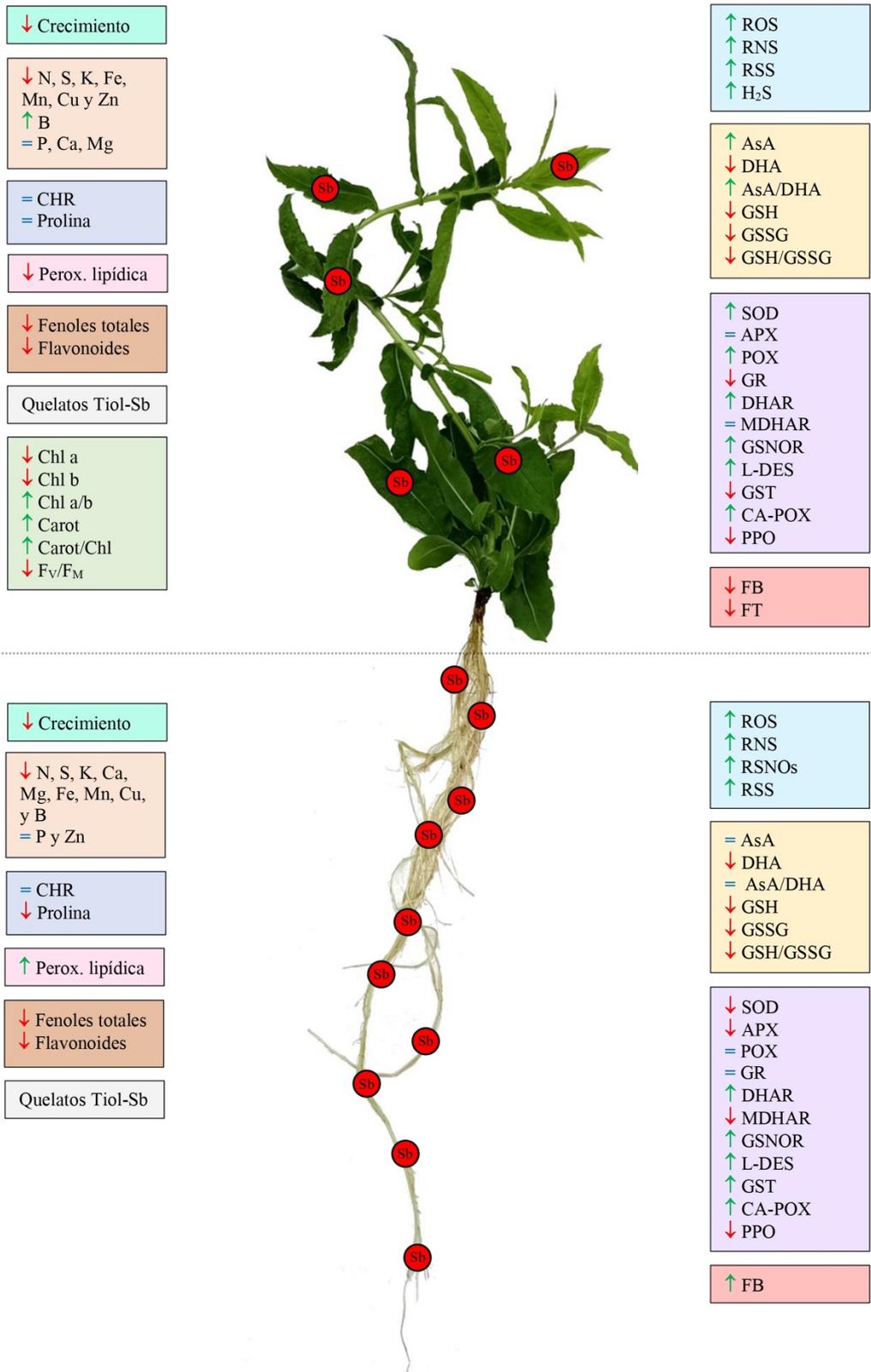


Figura 48. Esquema general de los efectos de la toxicidad de Sb sobre los parámetros de crecimiento, pigmentos y eficiencia fotosintética, acumulación de elementos minerales y Sb, producción de ROS, RNS y H₂S, actividades antioxidantes, compuestos fenólicos, y componentes del ciclo AsA-GSH en plantas de *D. viscosa*.

5. Conclusiones

1. En plantas de *Solanum lycopersicum* la toxicidad por Sb induce alteraciones en el crecimiento, tanto de la parte radicular como de la aérea. El Sb absorbido se acumula preferentemente en raíces, con bajo factor de translocación. El Sb induce un descenso en el contenido de Fe, Mg y Mn, mientras que Cu y Zn aumentan. El aparato fotosintético se ve alterado, con menor contenido en clorofilas y una menor eficiencia fotosintética.
2. La toxicidad de Sb induce en *Solanum lycopersicum* un estrés oxidativo con aumento en ROS y RNS. Se produce un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes como SOD, POX, APX y GR en raíces, pero en hojas sólo SOD y APX aumentan su actividad. La homeostasis redox se ve alterada y el contenido en GSH en raíces desciende. Este descenso de GSH en raíces podría afectar al desarrollo radicular al alterar la distribución de auxinas.
3. En plantas de *Solanum lycopersicum* bajo toxicidad de Sb se produce cambios en la expresión de *SOD*, *APX*, *DHAR*, *GR_{chl}* y *GST_{TCHQD}*, pero no la de *GR_{cyt}*, *GST* y *GSNOR*, que sólo lo hacen significativamente en un órgano determinado, para una determinada concentración y en un determinado tiempo de tratamiento. La expresión depende del órgano, raíz/hoja, de la concentración de Sb y del tiempo de exposición a la toxicidad.
4. El análisis de interacciones protéicas muestra una estrecha relación entre las enzimas SOD, APX, DHAR, *GR_{chl}*, *GR_{cyt}* y GST. Las que mayor interacción muestran son APX y GR, mientras que GSNOR y GST_{TCHQD} son las que tienen menor interacción. DHAR, GST y *GR_{chl}* muestran una alta interacción entre sí. El análisis filogenético revela una alta conservación de los dominios funcionales y residuos en las isoformas de GR y GST. Las divergencias pueden deberse a duplicaciones génicas.
5. En plantas de *Dittrichia viscosa* la toxicidad por Sb provoca un menor desarrollo y una fuerte acumulación de este metaloide en sus tejidos, sobre todo en raíces, mostrando baja capacidad de traslocación. El contenido en Fe, Mn y Cu desciende, mientras que en Mg sólo desciende en raíces. Aunque el contenido en pigmentos fotosintéticos desciende, la eficiencia fotosintética permanece en niveles normales, excepto bajo 1,0 mM Sb que muestra un ligero descenso.

6. El estrés inducido por Sb en *Dittrichia viscosa* provoca aumento de ROS, RNS y H₂S, sin aumento en los niveles de peroxidación lipídica. Las actividades SOD, APX, DHAR, MDHAR, GR y GST se ven alteradas, aunque no de igual manera en hojas y raíces. Por el contrario, las actividades CA-POX, GSNOR y L-DES aumentan en ambos órganos dependiendo de la dosis de Sb. Ésto indica la implicación de las peroxidasas, el •NO y el H₂S en la respuesta al Sb. Se produce una alteración del contenido de GSH, sobre todo en raíces, afectando la homeostasis redox. El descenso del GSH indica el papel clave que desempeña en el proceso de detoxificación de Sb, mediante la formación de complejos GSH-Sb.

7. La respuesta fisiológica de *Dittrichia viscosa* a altas concentraciones de antimonio evidencia que, a falta de la caracterización molecular, puede ser una planta bioacumuladora de Sb, susceptible de ser utilizada en procesos de descontaminación de suelos con presencia de Sb. En esta capacidad de respuesta el GSH parece ser un factor clave, así como la interacción H₂O₂, •NO y H₂S.

6. Bibliografía

- Agrawal, G. K., Jwa, N. S., Iwahashi, H., & Rakwal, R. (2003). Importance of ascorbate peroxidases OsAPX1 and OsAPX2 in the rice pathogen response pathways and growth and reproduction revealed by their transcriptional profiling. *Gene*, 322(1–2), 93–103. doi:10.1016/j.gene.2003.08.017
- Ahmad, M., Lee, S. S., Lim, J. E., Lee, S. E., Cho, J. S., Moon, D. H., Hashimoto, Y., & Ok, Y. S. (2014). Speciation and phytoavailability of lead and antimony in a small arms range soil amended with mussel shell, cow bone and biochar: EXAFS spectroscopy & chemical extractions. *Chemosphere*, 95, 433–441. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.09.077
- Ahmad, R., Ali, S., Rizwan, M., Dawood, M., Farid, M., Hussain, A., Wijaya, L., Alyemeni, M. N., & Ahmad, P. (2020). Hydrogen sulfide alleviates chromium stress on cauliflower by restricting its uptake and enhancing antioxidative system. *Physiologia Plantarum*, 168(2), 289–300. doi:10.1111/ppl.13001
- Ahsan, N., Renaut, J., & Komatsu, S. (2009). Recent developments in the application of proteomic to the analysis of plant responses to heavy metals. *Proteomics*, 9(10), 2602–2621. doi:10.1002/pmic.200800935
- Ainsworth, N., Cooke, J. A., & Johnson, M. S. (1990a). Distribution of antimony in contaminated grassland: 2-small mammals and invertebrates. *Environmental pollution*, 65, 79–87. doi:10.1016/0269-7491(90)90166-A
- Ainsworth, N., Cooke, J. A., & Johnson, M. S. (1990b). Distribution of antimony in contaminated grassland: 1-vegetation and soils. *Environmental pollution*, 65, 65–77. doi:10.1016/0269-7491(90)90165-9
- Ainsworth, N., Cooke, J. A., & Johnson, M. S. (1991). Biological significance of antimony in contaminated grassland. *Water, Air, and Soil Pollution*, 57–58(1), 193–199. doi:10.1007/BF00282882
- Airaki, M., Leterrier, M., Mateos, R. M., Valderrama, R., Chaki, M., Barroso, J. B., Del Río, L. A., Palma, J. M., & Corpas, F. J. (2012). Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant, Cell & Environment*, 35(2), 281–295. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02310.x
- Airaki, M., Leterrier, M., Valderrama, R., Chaki, M., Begara–Morales, J. C., Barroso, J. B., del Río, L. A., Palma, J. M., & Corpas, F. J. (2015). Spatial and temporal regulation of the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species during the early development of pepper (*Capsicum annuum*) seedlings. *Annals of Botany*, 116(4), 679–693. doi:10.1093/aob/mcv023
- Alamri, S., Ali, H. M., Khan, M. I. R., Singh, V. P., & Siddiqui, M. H. (2020). Exogenous nitric oxide requires endogenous hydrogen sulfide to induce the resilience through sulfur assimilation in tomato seedlings under hexavalent chromium toxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 20–34. doi:10.1016/j.plaphy.2020.07.003

- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*, 24(12), 1337–1344. doi:10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x
- Ali, W., Isayenkov, S. V., Zhao, F. J., & Maathuis, F. J. M. (2009). Arsenite transport in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(14), 2329–2339. doi:10.1007/s00018-009-0021-7
- Alloway, B. J. (1995). *Heavy Metals in Soils*. B. J. Alloway, Ed. Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-011-1344-1
- Álvarez, C., Bermúdez, M. Á., Romero, L. C., Gotor, C., & García, I. (2012a). Cysteine homeostasis plays an essential role in plant immunity. *New Phytologist*, 193(1), 165–177. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03889.x
- Álvarez, C., Calo, L., Romero, L. C., García, I., & Gotor, C. (2010). An O-acetylserine(thiol)lyase homolog with L-cysteine desulfhydrase activity regulates cysteine homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 152(2), 656–669. doi:10.1104/pp.109.147975
- Álvarez, C., García, I., Moreno, I., Pérez-Pérez, M. E., Crespo, J. L., Romero, L. C., & Gotor, C. (2012b). Cysteine-generated sulfide in the cytosol negatively regulates autophagy and modulates the transcriptional profile in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24(11), 4621–4634. doi:10.1105/tpc.112.105403
- Álvarez, C., García, I., Romero, L. C., & Gotor, C. (2012c). Mitochondrial sulfide detoxification requires a functional isoform O-acetylserine(thiol)lyase C in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, 5(6), 1217–1226. doi:10.1093/mp/sss043
- Alyemeni, M. N., Ahanger, M. A., Wijaya, L., Alam, P., Bhardwaj, R., & Ahmad, P. (2018). Selenium mitigates cadmium-induced oxidative stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants by modulating chlorophyll fluorescence, osmolyte accumulation, and antioxidant system. *Protoplasma*, 255(2), 459–469. doi:10.1007/s00709-017-1162-4
- Anderson, C. G. (2012). The metallurgy of antimony. *Chemie Der Erde*, 72(4), 3–8. doi:10.1016/j.chemer.2012.04.001
- Anderson, J. M., & Aro, E.-M. (1994). Grana stacking and protection of Photosystem II in thylakoid membranes of higher plant leaves under sustained high irradiance: An hypothesis. *Photosynthesis Research*, 41(2), 315–326. doi:10.1007/BF00019409
- Anjum, N. A., Gill, S. S., Gill, R., Hasanuzzaman, M., Duarte, A. C., Pereira, E., Ahmad, I., Tuteja, R., & Tuteja, N. (2014). Metal/metalloid stress tolerance in plants: role of ascorbate, its redox couple, and associated enzymes. *Protoplasma*, 251(6), 1265–1283. doi:10.1007/s00709-014-0636-x
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373–399. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701

- Arasimowicz-Jelonek, M., & Floryszak-Wieczorek, J. (2014). Nitric oxide: an effective weapon of the plant or the pathogen? *Molecular Plant Pathology*, 15(4), 406–416. doi:10.1111/mpp.12095
- Arditsoglou, A., & Samara, C. (2005). Levels of total suspended particulate matter and major trace elements in Kosovo: A source identification and apportionment study. *Chemosphere*, 59(5), 669–678. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.10.056
- Arif, Y., Hayat, S., Yusuf, M., & Bajguz, A. (2021). Hydrogen sulfide: A versatile gaseous molecule in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 158, 372–384. doi:10.1016/j.plaphy.2020.11.045
- Arora, A., Byrem, T. M., Nair, M. G., & Strasburg, G. M. (2000). Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373(1), 102–109. doi:10.1006/abbi.1999.1525
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141(2), 391–396. doi: 10.1104/pp.106.082040
- Ashley, P. M., Craw, D., Graham, B. P., & Chappell, D. A. (2003). Environmental mobility of antimony around mesothermal stibnite deposits, New South Wales, Australia and Southern New Zealand. *Journal of Geochemical Exploration*, 77(1), 1–14. doi:10.1016/S0375-6742(02)00251-0
- Aslam, S., Gul, N., Mir, M. A., Asgher, Mohd., Al-Sulami, N., Abulfaraj, A. A., & Qari, S. (2021). Role of jasmonates, calcium, and glutathione in plants to combat abiotic stresses through precise signaling cascade. *Frontiers in Plant Science*, 12, 668029. doi:10.3389/fpls.2021.668029
- Assche Van, F., & Clijsters, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell & Environment*, 13, 195–206. doi: 10.1111/j.1365-3040.1990.tb01304.x
- Astier, J., Gross, I., & Durner, J. (2018). Nitric oxide production in plants: An update. *Journal of Experimental Botany*, 69(14), 3401–3411. doi:10.1093/jxb/erx420
- Atsdr. (2019). Toxicological Profile for Antimony and Compounds. Agency for toxic substances and disease registry.
- Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. C. X., & De Menezes, S. L. (2002). Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: Two emerging radicals in Biology. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(9), 841–859 doi:10.1016/s0891-5849(02)00786-4
- Azad, A. K., Ahmed, J., Alum, M. A., Hasan, M. M., Ishikawa, T., & Sawa, Y. (2018). Prediction of arsenic and antimony transporter major intrinsic proteins from the genomes of crop plants. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 2630–2642. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.10.153

- Bagherifam, S., Brown, T. C., Fellows, C. M., & Naidu, R. (2019). Derivation methods of soils, water and sediments toxicity guidelines: A brief review with a focus on antimony. *Journal of Geochemical Exploration*, 205, 106348. doi:10.1016/j.gexplo.2019.106348
- Bai, Y., & Lindhout, P. (2007). Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany*, 100(5), 1085–1094. doi:10.1093/aob/mcm150
- Baker, A. J. M. (1981). Accumulators and Excluders - Strategies in the Response of Plants to Heavy Metals. *Journal of Plant Nutrition*, 3(1–4), 643–654. doi:10.1080/01904168109362867
- Baker, C. J., & Orlandi, E. W. (1995). Active oxygen in plant pathogenesis I. *Annual Review Phytopathology*, 33, 299–321. doi:10.1146/annurev.py.33.090195.001503
- Barbafieri, M., Dadea, C., Tassi, E., Bretzel, F., & Fanfani, L. (2011). Uptake of heavy metals by native species growing in a mining area in Sardinia, Italy: discovering native flora for phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*, 13(10), 985–997. doi:10.1080/15226514.2010.549858
- Baroni, F., Boscagli, A., Protano, G., & Riccobono, F. (2000). Antimony accumulation in *Achillea ageratum*, *Plantago lanceolata* and *Silene vulgaris* growing in an old Sb-mining area. *Environmental pollution*, 109, 347–352. doi:10.1016/S0269-7491(99)00240-7
- Barroso, J. B., Corpas, F. J., Carreras, A., Rodríguez-Serrano, M., Esteban, F. J., Fernández-Ocaña, A., Chaki, M., Romero-Puertas, M. C., Valderrama, R., Sandalio, L. M., & Del Río, L. A. (2006). Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *Journal of Experimental Botany*, 57(8), 1785–1793. doi:10.1093/jxb/erj175
- Barroso, J. B., Corpas, F. J., Carreras, A., Sandalio, L. M., Valderrama, R., Palma, J. M., Lupiáñez, J. A., & Del Río, L. A. (1999). Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes, 274(51), 36729–36733. *The Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.274.51.36729
- Bashir, S., & John, R. (2023). Alleviation of chilling stress by supplementation of brassinosteroid and silicon in *Solanum lycopersicum* L. *Plant and Soil*, 486(1–2), 165–181. doi:10.1007/s11104-022-05866-8
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205–207. doi:10.1007/BF00018060
- Baxter, A., Mittler, R., & Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1229–1240. doi:10.1093/jxb/ert375
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276–287. doi:10.1016/0003-2697(71)90370-8

- Bech, J., Corrales, I., Tume, P., Barceló, J., Duran, P., Roca, N., & Poschenrieder, C. (2012). Accumulation of antimony and other potentially toxic elements in plants around a former antimony mine located in the Ribes Valley (Eastern Pyrenees). *Journal Geochemical Exploration*, 113, 100–105. doi:10.1016/j.gexplo.2011.06.006
- Begara-Morales, J. C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Mata-Pérez, C., Valderrama, R., Padilla, M. N., López-Jaramillo, J., Luque, F., Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2015). Differential molecular response of monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase by nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany*, 66(19), 5983–5996. doi:10.1093/jxb/erv306
- Begara-Morales, J. C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Valderrama, R., Mata-Pérez, C., López-Jaramillo, J., Padilla, M. N., Carreras, A., Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2014). Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany*, 65(2), 527–538. doi:10.1093/jxb/ert396
- Beigi, F., Gonzalez, D. R., Minhas, K. M., Sun, Q.-A., Foster, M. W., Khan, S. A., Treuer, A. V., Dulce, R. A., Harrison, R. W., Saraiva, R. M., Premer, C., Schulman, I. H., Stamler, J. S., & Hare, J. M. (2012). Dynamic denitrosylation via S-nitrosoglutathione reductase regulates cardiovascular function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(11), 4314–4319. doi:10.1073/pnas.1113319109
- Belford, E. J. D., Dörfler, U., Stampfl, A., & Schröder, P. (2004). Microsomal detoxification enzymes in yam bean [*Pachyrhizus erosus* (L.) Urban]. *Z. Naturforsch*, 59, 693–700. doi:10.1515/znc-2004-9-1014
- Belzile, N., Chen, Y. W., & Filella, M. (2011). Human exposure to antimony: I. sources and intake. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41(14), 1309–1373. doi:10.1080/10643381003608227
- Benhamdi, A., Bentellis, A., Rached, O., Du Laing, G., & Mechakra, A. (2014). Effects of antimony and arsenic on antioxidant enzyme activities of two steppic plant species in an old antimony mining area. *Biological Trace Element Research*, 158(1), 96–104. doi:10.1007/s12011-014-9917-7
- Bermúdez, M. Á. (2011). Identificación de una nueva enzima cloroplástica con actividad S-sulfocisteína sintasa esencial para la función del cloroplasto en *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. CSIC - Universidad de Sevilla.
- Berna, A., & Bernier, F. (1999). Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme. *Plant Molecular Biology*, 39(3), 539–549. doi:10.1023/A:1006123432157
- Berndt, D., & Nijhawan, S. C. (1976). Lead-acid batteries with low antimony alloys. *Journal of Power Sources*, 1(1), 3–15. doi:10.1016/0378-7753(76)80002-X

- Besson-Bard, A., Pugin, A., & Wendehenne, D. (2008). New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 21–39. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092830
- Bhattacharjee, H., Mukhopadhyay, R., Thiyagarajan, S., & Rosen, B. P. (2008). Aquaglyceroporins: Ancient channels for metalloids. *Journal of Biology*, 7, 33. doi:10.1186/jbiol91
- Bielski, B. H. J., Richter, H. W., & Chan, P. C. (1975). Some properties of the ascorbate free radical. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 258(1), 231–237. doi:10.1111/j.1749-6632.1975.tb29283.x
- Bienert, G. P., Schüssler, M. D., & Jahn, T. P. (2008). Metalloids: essential, beneficial or toxic? Major intrinsic proteins sort it out. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(1), 20–26. doi:10.1016/j.tibs.2007.10.004
- Bloem, E., Rubekin, K., Haneklaus, S., Banfalvi, Z., Hesse, H., & Schnug, E. (2011). H₂S and COS gas exchange of transgenic potato lines with modified expression levels of enzymes involved in sulphur metabolism. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 197(4), 311–321. doi:10.1111/j.1439-037X.2010.00461.x
- Blokhina, O., & Fagerstedt, K. V. (2010). Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(5), 359–373. doi:10.1016/j.plaphy.2010.01.007
- Bolan, N., Kumar, M., Singh, E., Kumar, A., Singh, L., Kumar, S., Keerthanan, S., Hoang, S. A., El-Naggar, A., Vithanage, M., Sarkar, B., Wijesekara, H., Diyabalanage, S., Sooriyakumar, P., Vinu, A., Wang, H., Kirkham, M. B., Shaheen, S. M., Rinklebe, J., & Siddique, K. H. M. (2022). Antimony contamination and its risk management in complex environmental settings: A review. *Environment International*, 158, 106908. doi:10.1016/j.envint.2021.106908
- Bolchi, A., Petrucco, S., Tenca, P. L., Foroni, C., & Ottonello, S. (1999). Coordinate modulation of maize sulfate permease and ATP sulfurylase mRNAs in response to variations in sulfur nutritional status: stereospecific down-regulation by L-cysteine. *Plant Molecular Biology*, 39, 527–537. doi:10.1023/a:1006148815106
- Bölükbaşı, E. (2021). Expression analysis of some stress-related genes induced by cadmium on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Hittite Journal of Science and Engineering*, 8(4), 339–345. doi:10.17350/HJSE19030000247
- Bolwell, G. P. (1999). Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(4), 287–294. doi:10.1016/S1369-5266(99)80051-X
- Bonner, E. R., Cahoon, R. E., Knapke, S. M., & Jez, J. M. (2005). Molecular basis of cysteine biosynthesis in plants: Structural and functional analysis of O-acetylserine sulfhydrylase from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38803–38813. doi:10.1074/jbc.M505313200

- Bork, C., Schwenn, J. D., & Jäger Hell, R. (1998). Isolation and characterization of a gene for assimilatory sulfite reductase from *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 212(1), 147–153. doi:10.1016/S0378-1119(98)00155-3
- Bose, J., Rodrigo-Moreno, A., & Shabala, S. (2014). ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. In *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1241–1257. doi:10.1093/jxb/ert430
- Bowditch, M. I., & Donaldson, R. P. (1990). Ascorbate free-radical reduction by glyoxysomal membranes. *Plant Physiology*, 94(2), 531–537. doi:10.1104/pp.94.2.531
- Bowler, C., Montagu, M. V., & Inze, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43(1), 83–116. doi:10.1146/annurev.pp.43.060192.000503
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D., & Asada, K. (1994). Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(3), 199–218. doi:10.1080/07352689409701914
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brochu, C., Jingyu Wang, Roy, G., Messier, N., Wang, X. Y., Saravia, N. G., & Ouellette, M. (2003). Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10), 3073–3079. doi:10.1128/AAC.47.10.3073-3079.2003
- Broniowska, K. A., & Hogg, N. (2012). The chemical biology of S-nitrosothiols. In *Antioxidants and Redox Signaling*, 17(7), 969–980. doi:10.1089/ars.2012.4590
- Brun, C. B., Åström, M. E., Peltola, P., & Johansson, M. B. (2008). Trends in major and trace elements in decomposing needle litters during a long-term experiment in Swedish forests. *Plant & Soil*, 306(1–2), 199–210. doi:10.1007/s11104-008-9572-x
- Brüne, B., & Zhou, J. (2007). Nitric oxide and superoxide: Interference with hypoxic signaling. *Cardiovascular Research*, 75(2), 275–282. doi:10.1016/j.cardiores.2007.03.005
- Cai, F., Ren, J., Tao, S., & Wang, X. (2016). Uptake, translocation and transformation of antimony in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Environmental Pollution*, 209, 169–176. doi:10.1016/j.envpol.2015.11.033
- Calderwood, A., & Kopriva, S. (2014). Hydrogen sulfide in plants: From dissipation of excess sulfur to signaling molecule. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 41, 72–78. doi:10.1016/j.niox.2014.02.005
- Campbell, W. H. (1999). Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 277–303. doi:10.1146/annurev.arplant.50.1.277

- Campos, T., Chaer, G., dos Santos Leles, P., Silva, M., & Santos, F. (2019). Leaching of heavy metals in soils conditioned with biosolids from sewage sludge. *Floresta e Ambiente*, 26(1), e20180399. doi:10.1590/2179-8087.039918
- Cao, X., Ma, L. Q., & Tu, C. (2004). Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). *Environmental Pollution*, 128(3), 317–325. doi:10.1016/j.envpol.2003.09.018
- Carballal, S., Trujillo, M., Cuevasanta, E., Bartesaghi, S., Möller, M. N., Folkes, L. K., García-Bereguiaín, M. A., Gutiérrez-Merino, C., Wardman, P., Denicola, A., Radi, R., & Alvarez, B. (2011). Reactivity of hydrogen sulfide with peroxyxynitrite and other oxidants of biological interest. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(1), 196–205. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.705
- Carlioz, A., & Touati, D. (1986). Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *The EMBO Journal*, 5(3), 623–630. doi:10.1002/j.1460-2075.1986.tb04256.x
- Celep, O., Alp, I., & Deveci, H. (2011). Improved gold and silver extraction from a refractory antimony ore by pretreatment with alkaline sulphide leach. *Hydrometallurgy*, 105(3–4), 234–239. doi:10.1016/j.hydromet.2010.10.005
- Cen, R., Li, B., Wei, S., Mo, X., & Zhang, L. (2007). Investigation on correlation between chronic antimony poisoning and liver fibrosis. *Labeled Immunoassays and Clinical Medicine*, 14(2), 106–107.
- Chai, L., Wang, Y., Yang, Z., Mubarak, H., & Mirza, N. (2017). Physiological characteristics of *Ficus tikoua* under antimony stress. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 27(4), 939–945. doi:10.1016/S1003-6326(17)60106-7
- Chai, L. Y., Mubarak, H., Yang, Z. H., Yong, W., Tang, C. J., & Mirza, N. (2016). Growth, photosynthesis, and defense mechanism of antimony (Sb)-contaminated *Boehmeria nivea* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(8), 7470–7481. doi:10.1007/s11356-015-5987-0
- Chaki, M. (2007). Función de las especies de nitrógeno reactivo en la modulación de la respuesta de plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.) frente a procesos de estrés biótico y abiótico. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén.
- Chaki, M., Fernández-Ocaña, A. M., Valderrama, R., Carreras, A., Esteban, F. J., Luque, F., Gómez-Rodríguez, M. V., Begara-Morales, J. C., Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2009). Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower–mildew interaction. *Plant and Cell Physiology*, 50(2), 265–279. doi:10.1093/pcp/pcn196

- Chaki, M., Valderrama, R., Fernández-Ocaña, A. M., Carreras, A., Gómez-Rodríguez, M. V., Pedrajas, J. R., Begara-Morales, J. C., Sánchez-Calvo, B., Luque, F., Leterrier, M., Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2011). Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 62(6), 1803–1813. doi:10.1093/jxb/erq358
- Chamizo-Ampudia, A., Sanz-Luque, E., Llamas, A., Galvan, A., & Fernandez, E. (2017). Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis. *Trends in Plant Science*, 22(2), 163–174. doi:10.1016/j.tplants.2016.12.001
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59(3), 527–605. doi:10.1152/physrev.1979.59.3.527
- Chaney, R. L., Malikz, M., Li, Y. M., Brown, S. L., Brewer, E. P., Scott Angle, J., & Bake, A. J. (1997). Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 8, 279–284. doi:10.1016/s0958-1669(97)80004-3
- Chapman, J. M., Muhlemann, J. K., Gayomba, S. R., & Muday, G. K. (2019). RBOH-Dependent ROS synthesis and ROS scavenging by plant specialized metabolites to modulate plant development and stress responses. *Chemical Research in Toxicology*, 32(3) 370–396. doi:10.1021/acs.chemrestox.9b00028
- Chatterjee, S., Noack, H., Possel, H., & Wolf, G. (2000). Induction of nitric oxide synthesis lowers intracellular glutathione in microglia of primary glial cultures. *GLIA*, 29, 98–101. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(20000101)29:1<98::AID-GLIA10>3.0.CO;2-B
- Chaudière, J., & Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9–10), 949–962. doi:10.1016/S0278-6915(99)00090-3
- Chiang, C. M., Kuo, W. S., & Lin, K. H. (2014). Cloning and gene expression analysis of sponge gourd ascorbate peroxidase gene and winter squash superoxide dismutase gene under respective flooding and chilling stresses. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 55(2), 129–137. doi:10.1007/s13580-014-0116-4
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant Journal*, 90(5), 856–867. doi:10.1111/tpj.13299
- Chow, W. S. (1999). Grana formation: entropy-assisted local order in chloroplasts? *Functional Plant Biology*, 26(7), 641. doi:10.1071/PP99024
- Chu, J., Hu, X., Kong, L., Wang, N., Zhang, S., He, M., Ouyang, W., Liu, X., & Lin, C. (2021). Dynamic flow and pollution of antimony from polyethylene terephthalate (PET) fibers in China. *Science of the Total Environment*, 771. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.144643

- Conesa, H. M., María-Cervantes, A., Álvarez-Rogel, J., & González-Alcaraz, M. N. (2011). Influence of soil properties on trace element availability and plant accumulation in a Mediterranean salt marsh polluted by mining wastes: Implications for phytomanagement. *Science of The Total Environment*, 409(20), 4470–4479. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.07.049
- Consortium tomato. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635–641. doi:10.1038/nature11119
- Cooper, R., & Harrison, A. (2009). The exposure to and health effects of antimony. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 13(1), 3–10. doi:10.4103/0019-5278.50716
- Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2013). Nitro-oxidative stress vs oxidative or nitrosative stress in higher plants. *New Phytologist*, 199, 633–635. doi:10.1111/nph.12380
- Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2014a). Peroxisomal plant nitric oxide synthase (NOS) protein is imported by peroxisomal targeting signal type 2 (PTS2) in a process that depends on the cytosolic receptor PEX7 and calmodulin. *FEBS Letters*, 588(12), 2049–2054. doi:10.1016/j.febslet.2014.04.034
- Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2014b). Peroxynitrite (ONOO⁻) is endogenously produced in arabidopsis peroxisomes and is overproduced under cadmium stress. *Annals of Botany*, 113(1), 87–96. doi:10.1093/aob/mct260
- Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2015). Reactive sulfur species (RSS): Possible new players in the oxidative metabolism of plant peroxisomes. *Frontiers in Plant Science*, 6, 116. doi:10.3389/fpls.2015.00116
- Corpas, F. J., Barroso, J. B., González-Gordo, S., Muñoz-Vargas, M. A., & Palma, J. M. (2019a). Hydrogen sulfide: A novel component in Arabidopsis peroxisomes which triggers catalase inhibition. *Journal of Integrative Plant Biology*, 61(7), 871–883. doi:10.1111/jipb.12779
- Corpas, F. J., Carreras, A., Esteban, F. J., Chaki, M., Valderrama, R., del Río, L. A., & Barroso, J. B. (2008a). Localization of S-nitrosothiols and assay of nitric oxide synthase and S-nitrosoglutathione reductase activity in plants. *Methods in Enzymology*, 561–574. doi:10.1016/S0076-6879(07)37028-6
- Corpas, F. J., Chaki, M., Fernández-Ocaña, A., Valderrama, R., Palma, J. M., Carreras, A., Begara-Morales, J. C., Airaki, M., Del Río, L. A., & Barroso, J. B. (2008b). Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant and Cell Physiology*, 49(11), 1711–1722. doi:10.1093/pcp/pcn144
- Corpas, F. J., del Río, L. A., & Barroso, J. B. (2007). Need of biomarkers of nitrosative stress in plants. *Trends in Plant Science*, 12(10), 436–438. doi:10.1016/j.tplants.2007.08.013

- Corpas, F. J., Fernández-Ocaña, A., Carreras, A., Valderrama, R., Luque, F., Esteban, F. J., Rodríguez-Serrano, M., Chaki, M., Pedrajas, J. R., Sandalio, L. M., del Río, L. A., & Barroso, J. B. (2006). The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant and Cell Physiology*, 47(7), 984–994. doi:10.1093/pcp/pcj071
- Corpas, F. J., González-Gordo, S., Cañas, A., & Palma, J. M. (2019b). Nitric oxide and hydrogen sulfide in plants: which comes first? *Journal of Experimental Botany*, 70(17), 4391–4404. doi:10.1093/jxb/erz031
- Corpas, F. J., González-Gordo, S., & Palma, J. M. (2021). Protein nitration: A connecting bridge between nitric oxide (NO) and plant stress. *Plant Stress*, 2, 100026. doi:10.1016/j.stress.2021.100026
- Corpas, F. J., Leterrier, M., Valderrama, R., Airaki, M., Chaki, M., Palma, J. M., & Barroso, J. B. (2011). Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Science*, 181(5), 604–611. doi:10.1016/j.plantsci.2011.04.005
- Corpas, F. J., Muñoz-Vargas, M. A., González-Gordo, S., Rodríguez-Ruiz, M., & Palma, J. M. (2023). Nitric Oxide (NO) and Hydrogen Sulfide (H₂S): New potential biotechnological tools for postharvest storage of horticultural crops. In *Journal of Plant Growth Regulation*. doi:10.1007/s00344-023-11150-5
- Corpas, F. J., Palma, J. M., Del Río, L. A., & Barroso, J. B. (2009). Evidence supporting the existence of l-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytologist*, 184(1), 9–14. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02989.x
- Corpas, F. J., Palma, J. M., Sandalio, L. M., López-Huertas, E., Romero-Puertas, M. C., Barroso, J. B., & Del Río, L. A. (1999). Purification of catalase from pea leaf peroxisomes: identification of five different isoforms. *Free Radical Research*, 31(1), 235–241. doi:10.1080/10715769900301561
- Corrales, I., Barceló, J., Bech, J., & Poschenrieder, C. (2014). Antimony accumulation and toxicity tolerance mechanisms in *Trifolium* species. *Journal of Geochemical Exploration*, 147, 167–172. doi:10.1016/j.gexplo.2014.07.002
- Correa-Aragunde, N., Foresi, N., & Lamattina, L. (2015). Nitric oxide is a ubiquitous signal for maintaining redox balance in plant cells: Regulation of ascorbate peroxidase as a case study. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2913–2921. doi:10.1093/jxb/erv073
- Cortina, C., & Culiáñez-Macià, F. A. (2005). Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science*, 169(1), 75–82. doi:10.1016/j.plantsci.2005.02.026

- Crommentuijn, T., Sijm, D., De Bruijn, J., Van den Hoop, M., Van Leeuwen, K., & Van de Plassche, E. (2000). Maximum permissible and negligible concentrations for metals and metalloids in the Netherlands, taking into account background concentrations. *Journal of Environmental Management*, 60(2), 121–143. doi:10.1006/jema.2000.0354
- Cui, W., Chen, H., Zhu, K., Jin, Q., Xie, Y., Cui, J., Xia, Y., Zhang, J., & Shen, W. (2014). Cadmium-induced hydrogen sulfide synthesis is involved in cadmium tolerance in *Medicago sativa* by reestablishment of reduced (Homo)glutathione and Reactive oxygen species homeostases. *PLoS ONE*, 9(10), e109669. doi:10.1371/journal.pone.0109669
- Czarnocka, W., & Karpiński, S. (2018). Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 4–20. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.011
- Da Silva, C. J., Batista Fontes, E. P., & Modolo, L. V. (2017). Salinity-induced accumulation of endogenous H₂S and NO is associated with modulation of the antioxidant and redox defense systems in *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana. *Plant Science*, 256, 148–159. doi:10.1016/j.plantsci.2016.12.011
- Da Silva, C. J., Mollica, D. C. F., Vicente, M. H., Peres, L. E. P., & Modolo, L. V. (2018). NO, hydrogen sulfide does not come first during tomato response to high salinity. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 76, 164–173. doi:10.1016/j.niox.2017.09.008
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Colombo, R., & Milzani, A. (2007). S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(6), 883–898. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.014
- Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 53. doi:10.3389/fenvs.2014.00053
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(5), 779–795. doi:10.1007/s000180050041
- De Gara, L., de Pinto, M. C., & Arrigoni, O. (1997). Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiologia Plantarum*, 100(4), 894–900. doi:10.1111/j.1399-3054.1997.tb00015.x
- De Gara, L., de Pinto, M. C., Moliterni, V. M. C., & D'Egidio, M. G. (2003). Redox regulation and storage processes during maturation in kernels of *Triticum durum*. *Journal of Experimental Botany*, 54(381), 249–258. doi:10.1093/jxb/erg021

- De Gara, L., Paciolla, C., De Tullio, M. C., Motto, M., & Arrigoni, O. (2000). Ascorbate-dependent hydrogen peroxide detoxification and ascorbate regeneration during germination of a highly productive maize hybrid: Evidence of an improved detoxification mechanism against reactive oxygen species. doi:10.1034/j.1399-3054.2000.100102.x
- De Gregori, I., Fuentes, E., Rojas, M., Pinochet, H., & Potin-Gautier, M. (2003). Monitoring of copper, arsenic and antimony levels in agricultural soils impacted and non-impacted by mining activities, from three regions in Chile. *Journal of Environmental Monitoring*, 5(2), 287–295. doi:10.1039/b211469k
- De Kok, L. J., Bosma, W., Maas, F. M., & Kuiper, P. J. C. (1985). The effect of short-term H₂S fumigation on water-soluble sulphhydryl and glutathione levels in spinach. *Plant, Cell & Environment*, 8(3), 189–194. doi:10.1111/1365-3040.ep11604605
- De Pinto, M. C., Francis, D., & De Gara, L. (1999). The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma*, 209, 90–97. doi:10.1007/BF01415704
- De Pinto, M. C., Tommasi, F., & De Gara, L. (2000). Enzymes of the ascorbate biosynthesis and ascorbate-glutathione cycle in cultured cells of tobacco Bright Yellow 2. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(7–8), 541–550. doi:10.1016/S0981-9428(00)00773-7
- Degousee, N., Triantaphylidès, C., & Montillet, J.-L. (1994). Involvement of oxidative processes in the signaling mechanisms leading to the activation of glyceollin synthesis in soybean (*Glycine max*). *Plant Physiology*, 104(3), 945–952. doi:10.1104/pp.104.3.945
- Del Río, L. A. (2015). ROS and RNS in plant physiology: An overview. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2827–2837. doi:10.1093/jxb/erv099
- Del Río, L. A., Palma, J. M., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Pastori, G. M., & Bueno, P. (1996). Peroxisomes as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants. Superoxide dismutases (SODs) and superoxide radicals in peroxisomes. *Biochemical Society Transactions*, 24, 434–438. doi:10.1042/bst0240434
- Del Río, L. A., Sandalio, L. M., Altomare, D. A., & Zilinskas, B. A. (2003). Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: Differential expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, 54(384), 923–933. doi:10.1093/jxb/erg091
- Del Río, L. S. A., Sandalio, L. M., Palma, M., Bueno, P., & Corpas, F. J. (1992). Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radical Biology & Medicine*, 13(5), 557–580. Doi:10.1016/0891-5849(92)90150-f
- Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 212–228. doi:10.1016/j.envexpbot.2014.06.021

- Desikan, R., Neill, S. J., & Hancock, J. T. (2000). Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(5), 773–778. doi:10.1016/S0891-5849(00)00157-X
- Dixon, D. P., Skipsey, M., Grundy, N. M., & Edwards, R. (2005). Stress-induced protein S-glutathionylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 138(4), 2233–2244. doi:10.1104/pp.104.058917
- Domingos, P., Prado, A. M., Wong, A., Gehring, C., & Feijo, J. A. (2015). Nitric oxide: A multitasked signaling gas in plants. *Molecular Plant*, 8(4), 506–520. doi:10.1016/j.molp.2014.12.010
- Droillard, M.-J., & Paulin, A. (1990). Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Plant Physiology*, 94(3), 1187–1192. doi:10.1104/pp.94.3.1187
- Dupont, D., Arnout, S., Jones, P. T., & Binnemans, K. (2016). Antimony recovery from end-of-life products and industrial process residues: a critical review. *Journal of Sustainable Metallurgy*, 2(1), 79–103. doi:10.1007/s40831-016-0043-y
- Eising, R., Trelease, R. N., & Ni, W. (1990). Biogenesis of catalase in glyoxysomes and leaf-type peroxisomes of sunflower cotyledons. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 278(1), 258–264. doi:10.1016/0003-9861(90)90256-X
- Espinosa, F., Garrido, I., Ortega, A., Casimiro, I., & Álvarez-Tinaut, M. C. (2014). Redox activities and ROS, NO and phenylpropanoids production by axenically cultured intact olive seedling roots after interaction with a mycorrhizal or a pathogenic fungus. *PLoS ONE*, 9(6), e100132. doi:10.1371/journal.pone.0100132
- Espinosa-Vellarino, F. L., Garrido, I., Ortega, A., Casimiro, I., & Espinosa, F. (2021). Response to antimony toxicity in *Dittrichia viscosa* plants: ROS, NO, H₂S, and the antioxidant system. *Antioxidants*, 10(11), 1698. doi:10.3390/antiox10111698
- Esquinas Alcázar, J. T., & Nuez Viñals, F. (1995). Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate, 13–42. Mundi Prensa Libros (Ed). España
- Etim, E. U. (2017). Occurrence and distribution of arsenic, antimony and selenium in shallow groundwater systems of Ibadan metropolis southwestern Nigerian. *J. Health Pollut*, 7, 32–41. doi:10.5696/2156-9614-7-13.32
- Evangelou, M. W. H., Hockmann, K., Pokharel, R., Jakob, A., & Schulin, R. (2012). Accumulation of Sb, Pb, Cu, Zn and Cd by various plants species on two different relocated military shooting range soils. *Journal of Environmental Management*, 108, 102–107. doi:10.1016/j.jenvman.2012.04.044
- Fang, M., Jaffrey, S. R., Sawa, A., Ye, K., Luo, X., & Snyder, S. H. (2000). Dexas1: a G protein specifically coupled to neuronal nitric oxide synthase via CAPON. *Neuron*, 28(1), 183–193. doi:10.1016/S0896-6273(00)00095-7

- Fatma, M., Masood, A., Per, T. S., Rasheed, F., & Khan, N. A. (2016). Interplay between nitric oxide and sulfur assimilation in salt tolerance in plants. *The Crop Journal*, 4(3), 153–161. doi:10.1016/j.cj.2016.01.009
- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B.-W., Wang, Y., Pallas, J. A., & Loake, G. J. (2005). A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(22), 8054–8059. doi:10.1073/pnas.0501456102
- Feigl, G., Lehotai, N., Molnár, Á., Ördög, A., Rodríguez-Ruiz, M., Palma, J. M., Corpas, F. J., Erdei, L., & Kolbert, Z. (2015). Zinc induces distinct changes in the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) in the roots of two *Brassica* species with different sensitivity to zinc stress. *Annals of Botany*, 116(4), 613–625. doi:10.1093/aob/mcu246
- Feng, R. W., Lei, L., Su, J. M., Zhang, R. R., Zhu, Y. M., Chen, W. X., Wang, L. Z., Wang, R. J., Dai, J. X., Lin, Z. T., Li, Y. P., Liu, B. X., Fan, Z. L., Liu, H., & Rensing, C. (2020). Toxicity of different forms of antimony to rice plant: Effects on root exudates, cell wall components, endogenous hormones and antioxidant system. *Science of the Total Environment*, 711. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134589
- Feng, R., Wang, X., Wei, C., & Tu, S. (2013a). The accumulation and subcellular distribution of arsenic and antimony in four fern plants. *International Journal of Phytoremediation*, 17(4), 348–354. doi:10.1080/15226514.2013.773281
- Feng, R., Wei, C., & Tu, S. (2013b). The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany*, 87, 58–68. doi:10.1016/j.envexpbot.2012.09.002
- Feng, R., Wei, C., Tu, S., Ding, Y., Wang, R., & Guo, J. (2013c). The uptake and detoxification of antimony by plants: A review. In *Environmental and Experimental Botany*, 96, 28–34. doi:10.1016/j.envexpbot.2013.08.006
- Feng, R., Wei, C., Tu, S., Tang, S., & Wu, F. (2011). Simultaneous hyperaccumulation of arsenic and antimony in *Cretan brake* fern: Evidence of plant uptake and subcellular distributions. *Microchemical Journal*, 97(1), 38–43. doi:10.1016/j.microc.2010.05.010
- Feng, R., Wei, C., Tu, S., Wu, F., & Yang, L. (2009). Antimony accumulation and antioxidative responses in four fern plants. *Plant and Soil*, 317(1–2), 93–101. doi:10.1007/s11104-008-9790-2
- Fernandez-Pozo, N., Menda, N., Edwards, J. D., Saha, S., Teclé, I. Y., Strickler, S. R., Bombarely, A., Fisher-York, T., Pujar, A., Foerster, H., Yan, A., & Mueller, L. A. (2015). The sol genomics network (SGN)—from genotype to phenotype to breeding. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D1036–D1041. doi:10.1093/nar/gku1195

- Filella, M., Belzile, N., & Chen, Y. W. (2012). Human exposure to antimony. II. Contents in some human tissues often used in biomonitoring (hair, nails, teeth). *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42(10), 1058–1115. doi:10.1080/10643389.2011.556540
- Filella, M., Belzile, N., & Chen, Y. W. (2013a). Human exposure to antimony. III. Contents in some human excreted biofluids (Urine, Milk, Saliva). *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(2), 162–214. doi:10.1080/10643389.2011.604257
- Filella, M., Belzile, N., & Chen, Y. W. (2013b). Human exposure to antimony. IV. Contents in human blood. In *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(19), 2071–2105. doi:10.1080/10643389.2013.790741
- Filella, M., Belzile, N., & Chen, Y.-W. (2002). Antimony in the environment: a review focused on natural waters II. Relevant solution chemistry. *Earth Science Reviews*, 59, 265–285. doi:10.1016/S0012-8252(02)00089-2
- Flynn, H. C., Meharg, A. A., Bowyer, P. K., & Paton, G. I. (2003). Antimony bioavailability in mine soils. *Environmental Pollution*, 124, 93–100. doi:10.1016/s0269-7491(02)00411-6
- Foresi, N., Correa-Aragunde, N., Parisi, G., Caló, G., Salerno, G., & Lamattina, L. (2010). Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell*, 22(11), 3816–3830. doi:10.1105/tpc.109.073510
- Foyer, C. H. (2001). Prospects for enhancement of the soluble antioxidants, ascorbate and glutathione. *BioFactors*, 15, 75–78. doi:10.1002/biof.5520150204
- Foyer, C. H., & Harbinson, J. (2019). Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants* 1, 1–42. CRC Press. doi:10.1201/9781351070454-1
- Foyer, C. H., Lopez-Delgado, H., Dat, J. F., & Scott, I. M. (1997). Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum*, 100(2), 241–254. doi:10.1111/j.1399-3054.1997.tb04780.x
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2000). Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytology*, 146, 359–388. doi:10.1046/j.1469-8137.2000.00667.x
- Foyer, C. H., & 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. doi:10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiology*, 155(1), 2–18. doi:10.1104/pp.110.167569

- Fratelli, M., Gianazza, E., & Ghezzi, P. (2004). Redox proteomics: identification and functional role of glutathionylated proteins. *Expert Review of Proteomics*, 1(3), 365–376. doi:10.1586/14789450.1.3.365
- Fridovich, I. (1986). Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 247(1), 1–11. doi:10.1016/0003-9861(86)90526-6
- Frungillo, L., Skelly, M. J., Loake, G. J., Spoel, S. H., & Salgado, I. (2014). S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nature Communications*, 5(1). doi:10.1038/ncomms6401
- Fu, J., & Huang, B. (2001). Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 45(2), 105–114. doi:10.1016/S0098-8472(00)00084-8
- Fu, Y. F., Zhang, Z. W., & Yuan, S. (2018). Putative connections between nitrate reductase S-nitrosylation and NO synthesis under pathogen attacks and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 9, 474. doi:10.3389/fpls.2018.00474
- Gálvez, M., Martín-Cordero, C., Houghton, P. J., & Ayuso, M. J. (2005). Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1927–1933. doi:10.1021/jf048076s
- García-Lorenzo, M. L., Martínez-Sánchez, M. J., Pérez-Sirvent, C., López-Sánchez, J., Molina-Ruiz, J., & Tudela, M. L. (2015). Geogenic distribution of arsenic (As) and antimony (Sb) in soils of the Murcia region in Spain. *Environmental Forensics*, 16(1), 88–95. doi:10.1080/15275922.2014.991435
- Garrido, I., García-Sánchez, M., Casimiro, I., Casero, P. J., García-Romera, I., Ocampo, J. A., & Espinosa, F. (2012). Oxidative stress induced in sunflower seedling roots by aqueous dry olive-mill residues. *PLoS ONE*, 7(9), e46137. doi:10.1371/journal.pone.0046137
- Garrido, I., Ortega, A., Hernández, M., Fernández-Pozo, L., Cabezas, J., & Espinosa, F. (2021). Effect of antimony in soils of an Sb mine on the photosynthetic pigments and antioxidant system of *Dittrichia viscosa* leaves. *Environmental Geochemistry and Health*, 43(4), 1367–1383. doi:10.1007/s10653-020-00616-0
- Gaupels, F., Spiazzi-Vandelle, E., Yang, D., & Delledonne, M. (2011). Detection of peroxynitrite accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive defense response. *Nitric Oxide*, 25(2), 222–228. doi:10.1016/j.niox.2011.01.009
- Gebel, T. (1997). Short review Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. *Chemico-Biological Interactions*, 107, 131–144. doi:10.1016/S0009-2797(97)00087-2
- Giles, G. I., & Jacob, C. (2002). Reactive Sulfur Species: An emerging concept in oxidative stress. *Biological Chemistry*, 383(3–4), 375–388. doi:10.1515/BC.2002.042

- Giles, G. I., Nasim, M. J., Ali, W., & Jacob, C. (2017). The reactive sulfur species concept: 15 years on. *Antioxidants*, 6(2), 38. doi:10.3390/antiox6020038
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930. doi:10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Gow, A. J., Farkouh, C. R., Munson, D. A., Posencheg, M. A., & Ischiropoulos, H. (2004). Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular*, 287(2), L262-L268. doi:10.1152/ajplung.00295.2003
- Groß, F., Durner, J., & Gaupels, F. (2013). Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Frontiers in Plant Science*, 4. doi:10.3389/fpls.2013.00419
- Gruhlke, M. C. (2019). Reactive sulfur species. In reactive oxygen, nitrogen and sulfur species in plants, Hasanuzzaman, M., Fotopoulos, V., Nahar, K., Fujita, M., (Eds.) Wiley & Sons Ltd, 715–728, UK. doi:10.1002/9781119468677.ch31
- Guan, L. M., Zhao, J., & Scandalios, J. G. (2000). Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize *Cat1* antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response. *Plant Journal*, 22(2), 87–95. doi:10.1046/j.1365-313X.2000.00723.x
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141(2), 312–322. doi:10.1104/pp.106.077073
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in biology and medicine* (5th ed.). Oxford University Press, New York. doi:10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001
- Hammel, W., Debus, R., & Steubing, L. (2000). Mobility of antimony in soil and its availability to plants. *Chemosphere*, 41, 1791–1798. doi:10.1016/S0045-6535(00)00037-0
- Hancock, J. T. (2019). Hydrogen sulfide and environmental stresses. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 50–56. doi:10.1016/j.envexpbot.2018.08.034
- Hancock, J. T., & Whiteman, M. (2016). Hydrogen sulfide signaling: Interactions with nitric oxide and reactive oxygen species. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1365(1), 5–14. doi:10.1111/nyas.12733
- Hara, M. R., Agrawal, N., Kim, S. F., Cascio, M. B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J. H., Tankou, S. K., Hester, L. D., Ferris, C. D., Hayward, S. D., Snyder, S. H., & Sawa, A. (2005). S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nature Cell Biology*, 7(7), 665–674. doi:10.1038/ncb1268

- Hasanuzzaman, M., Fotopoulos, V., Nahar, K., & Fujita, M. (2019). Reactive oxygen, nitrogen and sulfur species in plants production, metabolism, signaling and defense mechanisms. Hasanuzzaman, M., Fotopoulos, V., Nahar, K., & Fujita, M. (Eds.). Wiley & Sons Ltd, 1, UK. doi:10.1002/9781119468677
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Anee, T. I., & Fujita, M. (2017). Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(2), 249–268. doi:10.1007/s12298-017-0422-2
- Hasanuzzaman, M., Raihan, Md. R. H., Siddika, A., Rahman, K., & Nahar, K. (2023). Supplementation with *Ascophyllum nodosum* extracts mitigates arsenic toxicity by modulating reactive oxygen species metabolism and reducing oxidative stress in rice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 255, 114819. doi:10.1016/j.ecoenv.2023.114819
- Hashimoto, Y., Matsufuru, H., & Sato, T. (2008). Attenuation of lead leachability in shooting range soils using poultry waste amendments in combination with indigenous plant species. *Chemosphere*, 73(5), 643–649. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.07.033
- Hassan, H. M. (1989). Microbial Superoxide Dismutases. *Advances in genetics*, 26, 65–97. doi:10.1016/S0065-2660(08)60223-0
- Hatzfeld, Y., Lee, S., Lee, M., Leustek, T., & Saito, K. (2000). Functional characterization of a gene encoding a fourth ATP sulfurylase isoform from *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 248, 51–58. doi:10.1016/s0378-1119(00)00132-3
- Hausladen, A., Privalle, C. T., Keng, T., DeAngelo, J., & Stamler, J. S. (1996). Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell*, 86(5), 719–729. doi:10.1016/S0092-8674(00)80147-6
- Havir, E. A., Brisson, L. F., & Zelitch, I. (1996). Distribution of catalase isoforms in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*, 41(3), 699–702. doi:10.1016/0031-9422(95)00674-5
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments. *Plant Signaling & Behavior*, 7(11), 1456–1466. doi:10.4161/psb.21949
- He, M. (2007). Distribution and phytoavailability of antimony at an antimony mining and smelting area, Hunan, China. *Environmental Geochemistry and Health*, 29(3), 209–219. doi:10.1007/s10653-006-9066-9
- He, M., Wang, N., Long, X., Zhang, C., Ma, C., Zhong, Q., Wang, A., Wang, Y., Pervaiz, A., & Shan, J. (2019). Antimony speciation in the environment: Recent advances in understanding the biogeochemical processes and ecological effects. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 75, 14–39. doi:10.1016/j.jes.2018.05.023
- He, M., Wang, X., Wu, F., & Fu, Z. (2012). Antimony pollution in China. *Science of the Total Environment*, 421–422, 41–50. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.06.009

- He, M., & Yang, J. (1999). Total Environment Effects of different forms of antimony on rice during the period of germination and growth and antimony concentration in rice tissue. *The Science of the Total Environment*, 243–244, 149–155. doi:10.1016/S0048-9697(99)00370-8
- Heidenreich, T., Wollers, S., Mendel, R. R., & Bittner, F. (2005). Characterization of the NifS-like domain of ABA3 from *Arabidopsis thaliana* provides insight into the mechanism of molybdenum cofactor sulfuration. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4213–4218. doi:10.1074/jbc.M411195200
- Herath, I., Vithanage, M., & Bundschuh, J. (2017). Antimony as a global dilemma: Geochemistry, mobility, fate and transport. In *Environmental Pollution*, 223, 545–559. doi:10.1016/j.envpol.2017.01.057
- Hippeli, S., Heiser, I., & Elstner, E. F. (1999). Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: New insights and analogies between animals and plants. *Plant Physiology Biochemistry*, 37(3), 167–178. doi:10.1016/S0981-9428(99)80031-X
- Horst, W. J., Wang, Y., & Eticha, D. (2010). The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: a review. *Annals of Botany*, 106(1), 185–197. doi:10.1093/aob/mcq053
- Hossain, M. A., & Asada, K. (1984a). Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: its protection by ascorbate. *Plant & Cell Physiology*, 25(7), 1285–1295. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a076837
- Hossain, M. A., & Asada, K. (1984b). Purification of Dehydroascorbate Reductase from Spinach and Its Characterization as a Thiol Enzyme. *Plant and Cell Physiology*, 25(1), 85–92. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a076700
- Hossain, M. A., Hossain, M. Z., & Fujita, M. (2009). Stress-induced changes of methylglyoxal level and glyoxalase I activity in pumpkin seedlings and cDNA cloning of glyoxalase I gene. *Australian Journal of Crop Science Southern Cross Journals*, 3(2), 53–64.
- Hossain, M. A., Nakano, Y., & Asada, K. (1984). Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant & CellPhysiol*, 25(3), 385–395. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a076726
- Hossain, M. A., Piyatida, P., da Silva, J. A. T., & Fujita, M. (2012). Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany*, 2012, 1–37. doi:10.1155/2012/872875
- Hou, X., Tan, L., & Tang, S.-F. (2019). Molecular mechanism study on the interactions of cadmium (II) ions with *Arabidopsis thaliana* glutathione transferase Phi8. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 216, 411–417. doi:10.1016/j.saa.2019.03.048

- Hu, L., Fu, J., Wang, S., Xiang, Y., & Pan, X. (2021). Microplastics generated under simulated fire scenarios: Characteristics, antimony leaching, and toxicity. *Environmental Pollution*, 269. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115905>
- Hu, Y., Lu, L., Tian, S., Li, S., Liu, X., Gao, X., Zhou, W., & Lin, X. (2019). Cadmium-induced nitric oxide burst enhances Cd tolerance at early stage in roots of a hyperaccumulator *Sedum alfredii* partially by altering glutathione metabolism. *Science of The Total Environment*, 650, 2761–2770. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.09.269
- Huang, D., Huo, J., & Liao, W. (2021a). Hydrogen sulfide: Roles in plant abiotic stress response and crosstalk with other signals. *Plant Science*, 302, 110733. doi:10.1016/j.plantsci.2020.110733
- Huang, D., Jing, G., Zhang, L., Chen, C., & Zhu, S. (2021b). Interplay among hydrogen sulfide, nitric oxide, reactive oxygen species, and mitochondrial DNA oxidative damage. *Frontiers in Plant Science*, 12. doi:10.3389/fpls.2021.701681
- Huang, Y., Zhang, L., Zhang, K., Chen, S., Hu, J., & Cheng, F. (2022). The impact of tandem duplication on gene evolution in *Solanaceae* species. *Journal of Integrative Agriculture*, 21(4), 1004–1014. doi:10.1016/S2095-3119(21)63698-5
- Hussain, A., Ali, S., Rizwan, M., Zia ur Rehman, M., Javed, M. R., Imran, M., Chatha, S. A. S., & Nazir, R. (2018). Zinc oxide nanoparticles alter the wheat physiological response and reduce the cadmium uptake by plants. *Environmental Pollution*, 242, 1518–1526. doi:10.1016/j.envpol.2018.08.036
- Intrakamhaeng, V., Clavier, K. A., Liu, Y., & Townsend, T. G. (2020). Antimony mobility from E-waste plastic in simulated municipal solid waste landfills. *Chemosphere*, 241. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125042
- Ishikawa, T., Takeda, T., & Shigeoka, S. (1996). Purification and characterization of cytosolic ascorbate peroxidase from komatsuna (*Brassica rapa*). *Plant Science*, 120(1), 11–18. doi:10.1016/S0168-9452(96)04472-X
- Iyer, A. K. V., Rojanasakul, Y., & Azad, N. (2014). Nitrosothiol signaling and protein nitrosation in cell death. *Nitric Oxide*, 42, 9–18. doi:10.1016/j.niox.2014.07.002
- Jahnová, J., Luhová, L., & Petřivalský, M. (2019). S-Nitrosogluthathione reductase - the master regulator of protein S-nitrosation in plant NO signaling. *Plants*, 8(2), 48. doi:10.3390/plants8020048
- Jain, M., Tiwary, S., & Gadre, R. (2010). Sorbitol-induced changes in various growth and biochemical parameters in maize. *Plant, Soil and Environment*, 56(6), 263–267. doi:10.17221/233/2009-PSE
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Somasundaram, R., & Panneerselvam, R. (2009). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture & Biology*, 11, 100–105.

- Jander, G., & Barth, C. (2007). Tandem gene arrays: a challenge for functional genomics. *Trends in Plant Science*, 12(5), 203–210. doi:10.1016/j.tplants.2007.03.008
- Jasid, S., Simontacchi, M., Bartoli, C. G., & Puntarulo, S. (2006). Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiology*, 142(3), 1246–1255. doi:10.1104/pp.106.086918
- Jeandroz, S., Wipf, D., Stuehr, D. J., Lamattina, L., Melkonian, M., Tian, Z., Zhu, Y., Carpenter, E. J., Ka-Shu Wong, G., & Wendehenne, D. (2016). Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Plant Biology*. doi:10.1126/scisignal.aad4403
- Ji, Y., Mestrot, A., Schulin, R., & Tandy, S. (2018). Uptake and transformation of methylated and inorganic antimony in plants. *Frontiers in Plant Science*, 9. doi:10.3389/fpls.2018.00140
- Jia, H., Wang, X., Shi, C., Guo, J., Ma, P., Ren, X., Wei, T., Liu, H., & Li, J. (2020). Hydrogen sulfide decreases Cd translocation from root to shoot through increasing Cd accumulation in cell wall and decreasing Cd²⁺ influx in *Isatis indigotica*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 605–612. doi:10.1016/j.plaphy.2020.08.033
- Jian, F. M., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y., & Yano, M. (2006). A silicon transporter in rice. *Nature*, 440(7084), 688–691. doi:10.1038/nature04590
- Jimenez, A., Hernandez, J. A., del Rio, L. A., & Sevilla, F. (1997). Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology*, 114(1), 275–284. doi:10.1104/pp.114.1.275
- Jiménez, M. N., Bacchetta, G., Casti, M., Navarro, F. B., Lallena, A. M., & Fernández-Ondoño, E. (2011). Potential use in phytoremediation of three plant species growing on contaminated mine-tailing soils in Sardinia. *Ecological Engineering*, 37(2), 392–398. doi:10.1016/j.ecoleng.2010.11.030
- Jourd'heuil, D., Jourd'heuil, F. L., Lowery, A. M., Hughes, J., & Grisham, M. B. (2005). Detection of nitrosothiols and other nitroso species *in vitro* and in cells. *Methods in Enzymology*, 396, 118–131. doi:10.1016/S0076-6879(05)96012-6
- Jung, C., Maeder, V., Funk, F., Sticher, H., & Frossard, E. (2003). Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. *Plant and Soil*, 252. doi:10.1023/A:1024775803759
- Kabata-Pendias, Alina., & Pendias, Henryk. (2010). Trace elements in soils and plants. CRC Press, 403, Boca Raton. doi:10.1201/b10158
- Kamiya, T., & Fujiwara, T. (2009). Arabidopsis NIP1;1 transports antimonite and determines antimonite sensitivity. *Plant and Cell Physiology*, 50(11), 1977–1981. doi:10.1093/pcp/pcp130

- Kaya, C., Ashraf, M., Alyemini, M. N., & Ahmad, P. (2020a). Responses of nitric oxide and hydrogen sulfide in regulating oxidative defence system in wheat plants grown under cadmium stress. *Physiologia Plantarum*, 168(2), 345–360. doi:10.1111/ppl.13012
- Kaya, C., Higgs, D., Ashraf, M., Alyemini, M. N., & Ahmad, P. (2020b). Integrative roles of nitric oxide and hydrogen sulfide in melatonin-induced tolerance of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants to iron deficiency and salt stress alone or in combination. *Physiologia Plantarum*, 168(2), 256–277. doi:10.1111/ppl.12976
- Keyster, M., Niekerk, L. A., Basson, G., Carelse, M., Bakare, O., Ludidi, N., Klein, A., Mekuto, L., & Gokul, A. (2020). Decoding heavy metal stress signalling in plants: Towards improved food security and safety. *Plants*, 9(12), 1–26. doi:10.3390/plants9121781
- Khan, M., Ali, S., Al Azzawi, T. N. I., Saqib, S., Ullah, F., Ayaz, A., & Zaman, W. (2023). The key roles of ROS and RNS as a signaling molecule in plant–microbe interactions. *Antioxidants*, 12(2), 268. doi:10.3390/antiox12020268
- Khan, M. I. R., Chopra, P., Chhillar, H., Ahanger, M. A., Hussain, S. J., & Maheshwari, C. (2021). Regulatory hubs and strategies for improving heavy metal tolerance in plants: Chemical messengers, omics and genetic engineering. *Plant Physiology and Biochemistry*, 164, 260–278. doi:10.1016/j.plaphy.2021.05.006
- Khan, M. I. R., Iqbal, N., Masood, A., Mobin, M., Anjum, N. A., & Khan, N. A. (2016). Modulation and significance of nitrogen and sulfur metabolism in cadmium challenged plants. *Plant Growth Regulation*, 78(1), 1–11. doi:10.1007/s10725-015-0071-9
- Khan, M. S., Haas, F. H., Samami, A. A., Gholami, A. M., Bauer, A., Fellenberg, K., Reichelt, M., Hänsch, R., Mendel, R. R., Meyer, A. J., Wirtz, M., & Hell, R. (2010). Sulfite reductase defines a newly discovered bottleneck for assimilatory sulfate reduction and is essential for growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 22(4), 1216–1231. doi:10.1105/tpc.110.074088
- Kim, D. O., Jeong, S. W., & Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81(3), 321–326. doi:10.1016/S0308-8146(02)00423-5
- Kim, J. S., Jeon, B. W., & Kim, J. (2021). Signaling peptides regulating abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Plant Science*, 12. doi:10.3389/fpls.2021.704490
- Kim, J. E., & Tannenbaum, S. R. (2004). S-nitrosation regulates the activation of endogenous procaspase-9 in HT-29 human colon carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(11), 9758–9764. doi:10.1074/jbc.M312722200

- Kim, Y. S., Kim, I. S., Shin, S. Y., Park, T. H., Park, H. M., Kim, Y. H., Lee, G. S., Kang, H. G., Lee, S. H., & Yoon, H. S. (2014). Overexpression of dehydroascorbate reductase confers enhanced tolerance to salt stress in rice plants (*Oryza sativa* L. japonica). *Journal of Agronomy and Crop Science*, 200(6), 444–456. doi:10.1111/jac.12078
- Klomsiri, C., Karplus, P. A., & Poole, L. B. (2011). Cysteine-based redox switches in enzymes. *Antioxidants & Redox Signal*, 14(6), 1065–1077. doi:10.1089/ars.2010.3376
- Kohli, S. K., Khanna, K., Bhardwaj, R., Abd Allah, E. F., Ahmad, P., & Corpas, F. J. (2019). Assessment of subcellular ROS and NO metabolism in higher plants: Multifunctional signaling molecules. *Antioxidants*, 8(12). doi:10.3390/antiox8120641
- Koprivova, A., Mugford, S. T., & Kopriva, S. (2010). Arabidopsis root growth dependence on glutathione is linked to auxin transport. *Plant Cell Reports*, 29(10), 1157–1167. doi:10.1007/s00299-010-0902-0
- Kotaniemi, S., Toikka, M. M., Kärkönen, A., Mustonen, M., Lundell, T., Simola, L. K., Kilpeläinen, I. A., Teeri, T. H. (2005). Characterization of basic *p*-coumaryl and coniferyl alcohol oxidizing peroxidases from a lignin-forming *Picea abies* suspension culture. *Plant Molecular Biology*, 58(2), 147–157. doi: 10.1007/S11103-005-5345-6
- Kovtun, Y., Chiu, W. L., Tena, G., & Sheen, J. (1999). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(6), 2940–2945. doi:10.1073/pnas.97.6.2940
- Krishna, R., Ansari, W. A., Jaiswal, D. K., Singh, A. K., Prasad, R., Verma, J. P., & Singh, M. (2021). Overexpression of AtDREB1 and BcZAT12 genes confers drought tolerance by reducing oxidative stress in double transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Cell Reports*, 40(11), 2173–2190. doi:10.1007/s00299-021-02725-1
- Krueger, R. J., & Siegel, L. M. (1982). Evidence for siroheme-Fe₄S₄ interaction reductase. *Biochemistry*, 21, 2905–2909. doi:10.1021/bi00541a015
- Krzesłowska, M. (2011). The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(1), 35–51. doi:10.1007/s11738-010-0581-z
- Kubienová, L., Kopečný, D., Tylichová, M., Briozzo, P., Skopalová, J., Šebela, M., Navrátil, M., Tâche, R., Luhová, L., Barroso, J. B., & Petřivalský, M. (2013). Structural and functional characterization of a plant S-nitrosoglutathione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie*, 95(4), 889–902. doi:10.1016/j.biochi.2012.12.009

- Kubienová, L., Tichá, T., Jahnová, J., Luhová, L., Mieslerová, B., & Petřivalský, M. (2014). Effect of abiotic stress stimuli on S-nitrosoglutathione reductase in plants. *Planta*, 239(1), 139–146. doi:10.1007/s00425-013-1970-5
- Kumar, S., & Trivedi, P. K. (2018). Glutathione S-transferases: role in combating abiotic stresses including arsenic detoxification in plants. *Frontiers in Plant Science*, 9, 751. doi:10.3389/fpls.2018.00751
- Kushnir, S., Babiychuk, E., Storozhenko, S., Davey, M. W., Papenbrock, J., De Rycke, R., Engler, G., Stephan, U. W., Lange, H., Kispal, G., Lill, R., & Van Montagu, M. (2001). A mutation of the mitochondrial ABC transporter *Sta1* leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant *starik*. *The Plant Cell*, 13, 89–100. doi:10.1105/tpc.13.1.89
- Kushwaha, B. K., Ali, H. M., Siddiqui, M. H., & Singh, V. P. (2020a). Nitric oxide-mediated regulation of sub-cellular chromium distribution, ascorbate–glutathione cycle and glutathione biosynthesis in tomato roots under chromium (VI) toxicity. *Journal of Biotechnology*, 318, 68–77. doi:10.1016/j.jbiotec.2020.05.006
- Kushwaha, B. K., & Singh, V. P. (2020b). Glutathione and hydrogen sulfide are required for sulfur-mediated mitigation of Cr(VI) toxicity in tomato, pea and brinjal seedlings. *Physiologia Plantarum*, 168(2), 406–421. doi:10.1111/ppl.13024
- Lamattina, L., García-Mata, C., Graziano, M., & Pagnussat, G. (2003). Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 109–136. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.134752
- Lau, N., & Pluth, M. D. (2019). Reactive sulfur species (RSS): persulfides, polysulfides, potential, and problems. *Current Opinion in Chemical Biology*, 49, 1–8. doi:10.1016/j.cbpa.2018.08.012
- Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J.-M., Gillet, F., Pelloux, J., & Rayon, C. (2015). Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants*, 4(1), 112–166. doi:10.3390/plants4010112
- Lee, S. H., Ahsan, N., Lee, K.-W., Kim, D. H., Lee, D.-G., Kwak, S.-S., Kwon, S. Y., Kim, T. H., & Lee, B. H. (2007). Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology*, 164(12), 1626–1638. doi:10.1016/j.jplph.2007.01.003
- Lee, U., Wie, C., Fernandez, B. O., Feelisch, M., & Vierling, E. (2008). Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20(3), 786–802. doi:10.1105/tpc.107.052647
- Lehotai, N., Kolbert, Z., Peto, A., Feigl, G., Ordog, A., Kumar, D., Tari, I., & Erdei, L. (2012). Selenite-induced hormonal and signalling mechanisms during root growth of *Arabidopsis thaliana* L. *Journal of Experimental Botany*, 63(15), 5677–5687. doi:10.1093/jxb/ers222

- Lei, M., Wan, X. M., Huang, Z. C., Chen, T. Bin, Li, X. W., & Liu, Y. R. (2012). First evidence on different transportation modes of arsenic and phosphorus in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Environmental Pollution*, 161, 1–7. doi:10.1016/j.envpol.2011.09.017
- León, S., Touraine, B., Briat, J.-F., & Lobréaux, S. (2002). The AtNFS2 gene from *Arabidopsis thaliana* encodes a NifS-like plastidial cysteine desulphurase. *Biochemical Journal*, 366(2), 557–564. doi:10.1042/bj20020322
- Leterrier, M., Airaki, M., Palma, J. M., Chaki, M., Barroso, J. B., & Corpas, F. J. (2012). Arsenic triggers the nitric oxide (NO) and S-nitrosoglutathione (GSNO) metabolism in *Arabidopsis*. *Environmental Pollution*, 166, 136–143. doi:10.1016/j.envpol.2012.03.012
- Leterrier, M., Chaki, M., Airaki, M., Valderrama, R., Palma, J. M., Barroso, J. B., & Corpas, F. J. (2011). Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior*, 6(6), 789–793. doi:10.4161/psb.6.6.15161
- Leterrier, M., Corpas, F. J., Barroso, J. B., Sandalio, L. M., & del Río, L. A. (2005). Peroxisomal monodehydroascorbate reductase. Genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions. *Plant Physiology*, 138(4), 2111–2123. doi:10.1104/pp.105.066225
- Leustek, T., Martin, M. N., Bick, J. A., & Davies, J. P. (2000). Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51. doi:10.1146/annurev.arplant.51.1.141
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., & Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79(4), 583–593. doi:10.1016/0092-8674(94)90544-4
- Li, L., Wang, Y., & Shen, W. (2012). Roles of hydrogen sulfide and nitric oxide in the alleviation of cadmium-induced oxidative damage in alfalfa seedling roots. *BioMetals*, 25(3), 617–631. doi:10.1007/s10534-012-9551-9
- Li, Q., & Lancaster, J. R. (2013b). Chemical foundations of hydrogen sulfide biology. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 35, 21–34. doi:10.1016/j.niox.2013.07.001
- Li, X., Yang, H., Zhang, C., Zeng, G., Liu, Y., Xu, W., Wu, Y., & Lan, S. (2017). Spatial distribution and transport characteristics of heavy metals around an antimony mine area in central China. *Chemosphere*, 170, 17–24. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.12.011
- Li, Z. G. (2013). Hydrogen sulfide: A multifunctional gaseous molecule in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 60(6), 733–740. doi:10.1134/S1021443713060058
- Li, Z.-G., Fang, J. R., & Bai, S. J. (2024). Hydrogen sulfide signaling in plant response to temperature stress. *Frontiers in Plant Science*, 15. doi:10.3389/fpls.2024.1337250

- Lindermayr, C. (2018). Crosstalk between reactive oxygen species and nitric oxide in plants: Key role of S-nitrosoglutathione reductase. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 110–115. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.027
- Lindermayr, C., & Durner, J. (2009). S-nitrosylation in plants: pattern and function. *Journal of Proteomics*, 73(1), 1–9. doi:10.1016/j.jprot.2009.07.002
- Liu, D., Xu, S., Hu, H., Pan, J., Li, P., & Shen, W. (2017). Endogenous hydrogen sulfide homeostasis is responsible for the alleviation of senescence of postharvest daylily flower via increasing antioxidant capacity and maintained energy status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(4), 718–726. doi:10.1021/acs.jafc.6b04389
- Liu, H., Wang, J., Liu, J., Liu, T., & Xue, S. (2021). Hydrogen sulfide (H₂S) signaling in plant development and stress responses. *aBIOTECH*, 2(1), 32–63. doi:10.1007/s42994-021-00035-4
- Liu, K., Zhang, L., Lin, X., Chen, L., Shi, H., Magaye, R., Zou, B., & Zhao, J. (2013). Association of GST genetic polymorphisms with the susceptibility to hepatocellular carcinoma (HCC) in chinese population evaluated by an updated systematic meta-analysis. *PLoS ONE*, 8(2), e57043. doi:10.1371/journal.pone.0057043
- Liu, Z., Liu, Y., & Liao, W. (2024). Hydrogen sulfide in the oxidative stress response of plants: crosstalk with reactive oxygen species. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(3), 1935. doi:10.3390/ijms25031935
- López-Huertas, E., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., & Del Río, L. A. (1999). Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *Biochemical Journal J*, 337(3), 531–536. doi:10.1042/bj3370531
- López-Huertas, E., Sandalio, L. M., Gómez, M., & Del Río, L. A. (1996). Superoxide radical generation in peroxisomal membranes: evidence for the participation of the 18-kDa integral membrane polypeptide. *Free Radical Research*, 26, 497–506. doi:10.3109/10715769709097820
- Løvdaal, T., & Lillo, C. (2009). Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Analytical Biochemistry*, 387(2), 238–242. doi:10.1016/j.ab.2009.01.024
- Luo, S., Calderón-Urrea, A., YU, J., Liao, W., Xie, J., Lv, J., Feng, Z., & Tang, Z. (2020). The role of hydrogen sulfide in plant alleviates heavy metal stress. *Plant and Soil*, 449(1–2), 1–10. doi:10.1007/s11104-020-04471-x
- Ma, C., He, M., Zhong, Q., Ouyang, W., Lin, C., & Liu, X. (2019). Uptake, translocation and phytotoxicity of antimonite in wheat (*Triticum aestivum*). *Science of the Total Environment*, 669, 421–430. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.03.145
- Ma, J. F., & Yamaji, N. (2006). Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends in Plant Science*, 11(8), 392–397. doi:10.1016/j.tplants.2006.06.007

- Macgregor, K., MacKinnon, G., Farmer, J. G., & Graham, M. C. (2015). Mobility of antimony, arsenic and lead at a former antimony mine, Glendinning, Scotland. *Science of the Total Environment*, 529, 213–222. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.04.039
- Mackerness, S., John, C. F., Jordan, B., & Thomas, B. (2001). Early signaling components in ultraviolet-B responses: Distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS*, 489(2–3), 237–242. doi:10.1016/S0014-5793(01)02103-2
- Maere, S., De Bodt, S., Raes, J., Casneuf, T., Van Montagu, M., Kuiper, M., & Van de Peer, Y. (2005). Modeling gene and genome duplications in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(15), 5454–5459. doi:10.1073/pnas.0501102102
- Magadum, S., Banerjee, U., Murugan, P., Gangapur, D., & Ravikesavan, R. (2013). Gene duplication as a major force in evolution. *Journal of Genetics*, 92(1), 155–161. doi:10.1007/s12041-013-0212-8
- Mariussen, E., Johnsen, I. V., & Strømseng, A. E. (2017). Distribution and mobility of lead (Pb), copper (Cu), zinc (Zn), and antimony (Sb) from ammunition residues on shooting ranges for small arms located on mires. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(11), 10182–10196. doi:10.1007/s11356-017-8647-8
- Martinez, C., Díaz, M., Achkor, H., & Espunya, M. C. (2006). Glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase from *Arabidopsis*. Expression pattern and functional implications in Phytoremediation and Pathogenesis. 253–259. doi:10.1186/1471-2229-5-s1-s22
- Matsumoto, T., Wu, J., Kanamori, H., Katayose, Y., Fujisawa, M., Namiki, N., Mizuno, H., Yamamoto, K., Antonio, B. A., Baba, T., Sakata, K., Nagamura, Y., Aoki, H., Arikawa, K., Arita, K., Bito, T., Chiden, Y., Fujitsuka, N., Fukunaka, R., ... Burr, B. (2005). The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, 436(7052), 793–800. doi:10.1038/nature03895
- Matthews, J. R., Botting, C. H., Panico, M., Morris, H. R., & Hay, R. T. (1996). Inhibition of NF- κ B DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Research*, 24(12), 2236–2242. doi:10.1093/nar/24.12.2236
- Maurel, C. (2007). Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *FEBS*, 581(12), 2227–2236. doi:10.1016/j.febslet.2007.03.021
- Mbadugha, L., Cowper, D., Dossanov, S., & Paton, G. I. (2020). Geogenic and anthropogenic interactions at a former Sb mine: environmental impacts of As and Sb. *Environmental Geochemistry and Health*, 42(11), 3911–3924. doi:10.1007/s10653-020-00652-w

- Medrano-Macías, J., Flores-Gallegos, A. C., Nava-Reyna, E., Morales, I., Tortella, G., Solís-Gaona, S., & Benavides-Mendoza, A. (2022). Reactive oxygen, nitrogen, and sulfur Species (RONSS) as a metabolic cluster for signaling and biostimulation of plants: an overview. *Plants*, 11(23). doi:10.3390/plants11233203
- Meharg, A. A., & Jardine, L. (2003). Arsenite transport into paddy rice (*Oryza sativa*) roots. *New Phytologist*, 157, 39–44. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00655.x
- Mendoza-Cózatl, D. G., Butko, E., Springer, F., Torpey, J. W., Komives, E. A., Kehr, J., & Schroeder, J. I. (2008). Identification of high levels of phytochelatin, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *The Plant Journal*, 54(2), 249–259. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03410.x
- Messing, J., Bharti, A. K., Karlowski, W. M., Gundlach, H., Kim, H. R., Yu, Y., Wei, F., Fuks, G., Soderlund, C. A., Mayer, K. F. X., & Wing, R. A. (2004). Sequence composition and genome organization of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(40), 14349–14354. doi:10.1073/pnas.0406163101
- Meyer, C., & Stöhr, C. (2002). Soluble and plasma membrane-bound enzymes involved in nitrate and nitrite metabolism. In photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon and respiratory metabolism. Foyer, C. H., Noctor, G. (Eds.). Kluwer Academics, 49–62, Holland. doi:10.1007/0-306-48138-3_4
- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4), 523–530.
- Miller, G., Shulaev, V., & Mittler, R. (2008). Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum*, 133(3), 481–489. doi:10.1111/j.1399-3054.2008.01090.x
- Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The Role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3170–3175. doi:10.1016/S0021-9258(19)45228-9
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7, 405–410. doi:10.1016/s1360-1385(02)02312-9
- Mittler, R., Feng, X., & Cohen, M. (1998). Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *The Plant Cell*, 10(3), 461–473. Doi:10.1105/tpc.10.3.461
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490–498. doi:10.1016/j.tplants.2004.08.009
- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M., & Guy, M. (2003). Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant, Cell & Environment*, 26(6), 845–856. doi:10.1046/j.1365-3040.2003.01016.x

- Miyake, C., Schreiber, U., Hormann, H., Sano, S., & Kozi, A. (1998). The FAD-enzyme monodehydroascorbate radical reductase mediates photoproduction of superoxide radicals in spinach thylakoid membranes. *Plant and Cell Physiology*, 39(8), 821–829. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a029440
- Moche, M., Stremlau, S., Hecht, L., Göbel, C., Feussner, I., & Stöhr, C. (2010). Effect of nitrate supply and mycorrhizal inoculation on characteristics of tobacco root plasma membrane vesicles. *Planta*, 231(2), 425–436. doi:10.1007/s00425-009-1057-5
- Molina y Vedia, L., McDonald, B., Reep, B., Brüne, B., Di Silvio, M., Billiar, T. R., & Lapetina, E. G. (1992). Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(35), 24929–24932. doi:10.1016/S0021-9258(19)73985-4
- Moreau, M., Lindermayr, C., Durner, J., & Klessig, D. F. (2010). NO synthesis and signaling in plants - where do we stand? In *Physiologia Plantarum*, 138(4), 372–383. doi:10.1111/j.1399-3054.2009.01308.x
- Mostofa, M. G., Rahman, A., Ansary, M. M. U., Watanabe, A., Fujita, M., & Tran, L. S. P. (2015). Hydrogen sulfide modulates cadmium-induced physiological and biochemical responses to alleviate cadmium toxicity in rice. *Scientific Reports*, 5, 14078. doi:10.1038/srep14078
- Müller, K., Daus, B., Mattusch, J., Vetterlein, D., Merbach, I., & Wennrich, R. (2013). Impact of arsenic on uptake and bio-accumulation of antimony by arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Environmental Pollution*, 174, 128–133. doi:10.1016/j.envpol.2012.10.024
- Mur, L. A. J., Prats, E., Pierre, S., Hall, M. A., & Hebelstrup, K. H. (2013). Integrating nitric oxide into salicylic acid and jasmonic acid/ ethylene plant defense pathways. *Frontiers in Plant Science*, 4, 215. doi:10.3389/fpls.2013.00215
- Murciego, A. M., Sánchez, A. G., Rodríguez, M. A. G., Pinilla, E. G., Toro, C.G., Cabezas, J. F., & Buyolo, T. T. (2007). Antimony distribution and mobility in topsoils and plants (*Cytisus striatus*, *Cistus ladanifer* and *Dittrichia viscosa*) from polluted Sb-mining areas in Extremadura (Spain). *Environmental Pollution*, 145(1), 15–21. doi:10.1016/j.envpol.2006.04.004
- Nabi, R. B. S., Tayade, R., Hussain, A., Kulkarni, K. P., Imran, Q. M., Mun, B. G., & Yun, B. W. (2019). Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 120–133. doi:10.1016/j.envexpbot.2019.02.003
- Nakamaru, Y., Tagami, K., & Uchida, S. (2006). Antimony mobility in Japanese agricultural soils and the factors affecting antimony sorption behavior. *Environmental Pollution*, 141(2), 321–326. doi:10.1016/j.envpol.2005.08.040

- Nakayama, M., Akashi, T., & Hase, T. (2000). Plant sulfite reductase: molecular structure, catalytic function and interaction with ferredoxin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 82, 27–32. doi:10.1016/s0162-0134(00)00138-0
- Natasha, Shahid, M., Khalid, S., Dumat, C., Pierart, A., & Niazi, N. K. (2019). Biogeochemistry of antimony in soil-plant system: Ecotoxicology and human health. *Applied Geochemistry*, 106, 45–59. doi:10.1016/j.apgeochem.2019.04.006
- Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Ribeiro, D., & Wilson, I. (2008). Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 59(2), 165–176. doi:10.1093/jxb/erm293
- Ngo, L. K., Pinch, B. M., Bennett, W. W., Teasdale, P. R., & Jolley, D. F. (2016). Assessing the uptake of arsenic and antimony from contaminated soil by radish (*Raphanus sativus*) using DGT and selective extractions. *Environmental Pollution*, 216, 104–114. doi:10.1016/j.envpol.2016.05.027
- Ngo, T. T., & Lenhoff, H. M. (1980). A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions. *Analytical Biochemistry*, 105(1), 389–397. doi:10.1016/0003-2697(80)90475-3
- Nishad, P. A., & Bhaskarapillai, A. (2021). Antimony, a pollutant of emerging concern: A review on industrial sources and remediation technologies. In *Chemosphere* (Vol. 277). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130252>
- Nishad, P. A., Bhaskarapillai, A., & Velmurugan, S. (2017). Towards finding an efficient sorbent for antimony: comparative investigations on antimony removal properties of potential antimony sorbents. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14(4), 777–784. doi:10.1007/s13762-016-1181-2
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249–279. doi:10.1146/annurev.arplant.49.1.249
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., & Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment*, 35(2), 454–484. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x
- Nogales, R., & Benítez, E. (2006). Absorption of zinc and lead by *Dittrichia viscosa* grown in a contaminated soil amended with olive-derived wastes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 76(3), 538–544. doi:10.1007/s00128-006-0953-7
- Nott, A., Watson, P. M., Robinson, J. D., Crepaldi, L., & Riccio, A. (2008). S-nitrosylation of histone deacetylase 2 induces chromatin remodelling in neurons. *Nature*, 455(7211), 411–415. doi:10.1038/nature07238
- Novaković, L., Guo, T., Bacic, A., Sampathkumar, A., & Johnson, K. (2018). Hitting the wall—sensing and signaling pathways involved in plant cell wall remodeling in response to abiotic stress. *Plants*, 7(4), 89. doi:10.3390/plants7040089

- Ogawa, K., Kanematsu, S., & Asada, K. (1996). Intra-and extra-cellular localization of “cytosolic” CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. *Plant CellPhysiol*, 37(6), 790–799. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a029014
- Ogawa, K., Kanematsu, S., Takabe, K., & Asada, K. (1995). Attachment of CuZn-superoxide dismutase to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PSI) in spinach chloroplasts: detection by immuno-gold labeling after rapid freezing and substitution method. *Plant and Cell Physiology*, 36(4), 565–573. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a078795
- Okkenhaug, G., Grasshorn Gebhardt, K. A., Amstaetter, K., Lassen Bue, H., Herzel, H., Mariussen, E., Rossebø Almås, Å., Cornelissen, G., Breedveld, G. D., Rasmussen, G., & Mulder, J. (2016). Antimony (Sb) and lead (Pb) in contaminated shooting range soils: Sb and Pb mobility and immobilization by iron based sorbents, a field study. *Journal of Hazardous Materials*, 307, 336–343. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.01.005
- Okkenhaug, G., Zhu, Y. G., He, J., Li, X., Luo, L., & Mulder, J. (2012). Antimony (Sb) and Arsenic (As) in Sb mining impacted paddy soil from Xikuangshan, China: Differences in mechanisms controlling soil sequestration and uptake in rice. *Environmental Science and Technology*, 46(6), 3155–3162. doi:10.1021/es2022472
- Okkenhaug, G., Zhu, Y. G., Luo, L., Lei, M., Li, X., & Mulder, J. (2011). Distribution, speciation and availability of antimony (Sb) in soils and terrestrial plants from an active Sb mining area. *Environmental Pollution*, 159(10), 2427–2434. doi:10.1016/j.envpol.2011.06.028
- Orozco-Cardenas, M., & Ryan, C. A. (1999). Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *In Plant Biology*, 96, 6553-6557. doi:10.1073/pnas.96.11.6553
- Ortega, A., de Marcos, A., Illescas-Miranda, J., Mena, M., & Fenoll, C. (2019). The tomato genome encodes SPCH, MUTE, and FAMA candidates that can replace the endogenous functions of their Arabidopsis Orthologs. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1300. doi:10.3389/fpls.2019.01300
- Ortega, A., Garrido, I., Casimiro, I., & Espinosa, F. (2017). Effects of antimony on redox activities and antioxidant defence systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. *PLoS ONE*, 12(9). doi:10.1371/journal.pone.0183991
- Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric oxide & peroxynitrite in health & disease. *Physiological reviews*, 87(1), 315–424. doi:10.1152/physrev.00029.2006
- Pacyna, J. M., & Pacyna, E. G. (2001). An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. *Environmental Reviews*, 9(4), 269–298. doi:10.1139/er-9-4-269

- Palm, E., Guidi Nissim, W., Giordano, C., Mancuso, S., & Azzarello, E. (2017). Root potassium and hydrogen flux rates as potential indicators of plant response to zinc, copper and nickel stress. *Environmental and Experimental Botany*, 143, 38–50. doi:10.1016/j.envexpbot.2017.08.009
- Pan, X., Zhang, D., Chen, X., Bao, A., & Li, L. (2011). Antimony accumulation, growth performance, antioxidant defense system and photosynthesis of *Zea mays* in response to antimony pollution in soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 215(1–4), 517–523. doi:10.1007/s11270-010-0496-8
- Pandey, A. K., & Gautam, A. (2020). Stress responsive gene regulation in relation to hydrogen sulfide in plants under abiotic stress. *Physiologia Plantarum*, 168(2), 511–525. doi:10.1111/ppl.13064
- Pandey, P., Singh, J., Achary, V. M. M., & Reddy, M. K. (2015). Redox homeostasis via gene families of ascorbate-glutathione pathway. *Frontiers in Environmental Science*, 3, 25. doi:10.3389/fenvs.2015.00025
- Paoli, L., Fiorini, E., Munzi, S., Sorbo, S., Basile, A., & Loppi, S. (2013). Antimony toxicity in the lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. *Chemosphere*, 93(10), 2269–2275. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.07.082
- Papenbrock, J., Riemenschneider, A., Kamp, A., Schulz-Vogt, H. N., & Schmidt, A. (2007). Characterization of cysteine-degrading and H₂S-releasing enzymes of higher plants - From the field to the test tube and back. *Plant Biology*, 9(5), 582–588. doi:10.1055/s-2007-965424
- Parolin, P., Ion Scotta, M., & Bresch, C. (2014). Biology of *Dittrichia viscosa*, a mediterranean ruderal plant: a review. *Phyton*, 83(1), 251–262. doi:10.32604/phyton.2014.83.251
- Pascaud, G., Leveque, T., Soubrand, M., Boussen, S., Joussein, E., & Dumat, C. (2014). Environmental and health risk assessment of Pb, Zn, As and Sb in soccer field soils and sediments from mine tailings: solid speciation and bioaccessibility. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(6), 4254–4264. doi:10.1007/s11356-013-2297-2
- Pasricha, S., Mathur, V., Garg, A., Lenka, S., Verma, K., & Agarwal, S. (2021). Molecular mechanisms underlying heavy metal uptake, translocation and tolerance in hyperaccumulators-an analysis. *Environmental Challenges*, 4, 100197. doi:10.1016/j.envc.2021.100197
- Passardi, F., Longet, D., Penel, C., & Dunand, C. (2004). The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry*, 65(13), 1879–1893. doi:10.1016/j.phytochem.2004.06.023

- Paterson, S., Vogwill, T., Buckling, A., Benmayor, R., Spiers, A. J., Thomson, N. R., Quail, M., Smith, F., Walker, D., Libberton, B., Fenton, A., Hall, N., & Brockhurst, M. A. (2010). Antagonistic coevolution accelerates molecular evolution. *Nature*, 464(7286), 275–278. doi:10.1038/nature08798
- Pauling, L. (1933). The formulas of antimononic acid and the antimonates. In contribution from gates chemical laboratory, 55(5), 1895–1900. doi:10.1021/ja01332a016
- Pei, Z.-M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G. J., Grill, E., & Schroeder, J. I. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 406(6797), 731–734. doi:10.1038/35021067
- Per, T. S., Masood, A., & Khan, N. A. (2017). Nitric oxide improves S-assimilation and GSH production to prevent inhibitory effects of cadmium stress on photosynthesis in mustard (*Brassica juncea* L.). *Nitric Oxide*, 68, 111–124. doi:10.1016/j.niox.2016.12.012
- Peralta, I. E., & Spooner, D. M. (2006). Genetic Improvement of Solanaceous Crops. In, History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae) Razdan, M. K & Mattoo, A. K. (Eds.), CRC Press, 2, 1–24. doi:10.1201/b10744
- Pereira, G. J. G., Molina, S. M. G., Lea, P. J., & Azevedo, R. A. (2002). Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. *Plant and Soil*, 239, 123–132. doi:10.1023/A:1014951524286
- Pérez-Sirvent, C., Martínez-Sánchez, M. J., Martínez-López, S., Bech, J., & Bolan, N. (2012). Distribution and bioaccumulation of arsenic and antimony in *Dittrichia viscosa* growing in mining-affected semiarid soils in southeast Spain. *Journal of Geochemical Exploration*, 123, 128–135. doi:10.1016/j.gexplo.2012.08.002
- Peško, M., Molnárová, M., & Fargašová, A. (2016). Response of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) to stress induced by Sb(III). *Acta Environmentalica Universitatis Comenianae*, 24(1), 42–47. doi:10.1515/aeuc-2016-0006
- Pető, A., Lehotai, N., Feigl, G., Tugyi, N., Ördög, A., Gémes, K., Tari, I., Erdei, L., & Kolbert, Z. (2013). Nitric oxide contributes to copper tolerance by influencing ROS metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, 32(12), 1913–1923. doi:10.1007/s00299-013-1503-5
- Pierart, A., Shahid, M., Séjalon-Delmas, N., & Dumat, C. (2015). Antimony bioavailability: knowledge and research perspectives for sustainable agricultures. *Journal of Hazardous Materials*, 289, 219–234. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.02.011
- Pilon-Smits, E. A. H., Garifullina, G. F., Abdel-Ghany, S., Kato, S.-I., Mihara, H., Hale, K. L., Burkhead, J. L., Esaki, N., Kurihara, T., & Pilon, M. (2002). Characterization of a NifS-Like chloroplast protein from *Arabidopsis*. Implications for Its role in sulfur and selenium metabolism. *Plant Physiology*, 130(3), 1309–1318. doi:10.1104/pp.102.010280

- Porquet, A., & Filella, M. (2007). Structural evidence of the similarity of Sb(OH)₃ and As(OH)₃ with glycerol: Implications for their uptake. *Chemical Research in Toxicology*, 20(9), 1269–1276. doi:10.1021/tx700110m
- Potters, G., De Gara, L., Asard, H., & Horemans, N. (2002). Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime?. *Plant Physiology & Biochemistry*, 40(6–8), 537–548, doi:10.1016/S0981-9428(02)01414-6
- Pourrut, B., Shahid, M., Douay, F., Dumat, C., & Pinelli, E. (2013). Molecular mechanisms involved in lead uptake, toxicity and detoxification in higher plants. In *heavy metal stress in plants*, Gupta, D. K. et al (Eds.). Springer–Verlag Berlin Heidelberg, 121–147, France. doi:10.1007/978-3-642-38469-1_7
- Prakash, V., Singh, V. P., Tripathi, D. K., Sharma, S., & Corpas, F. J. (2019). Crosstalk between nitric oxide (NO) and abscisic acid (ABA) signalling molecules in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 41–49. doi:10.1016/j.envexpbot.2018.10.033
- Prasad, T. K., Anderson, M. D., Martin, B. A., & Stewart, R. (1994). Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *The Plant Cell*, 6, 65–74. doi:10.1105/tpc.6.1.65
- Puppo, A., Groten, K., Bastian, F., Carzaniga, R., Soussi, M., Lucas, M. M., De Felipe, M. R., Harrison, J., Vanacker, H., & Foyer, C. H. (2005). Legume nodule senescence: Roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytologist*, 165(3), 683–701. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01285.x
- Qi, C., Liu, G., Chou, C. L., & Zheng, L. (2008). Environmental geochemistry of antimony in chinese coals. In *Science of the Total Environment*, 389(2–3), 225–234. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.09.007
- Qi, C., Wu, F., Deng, Q., Liu, G., Mo, C., Liu, B., & Zhu, J. (2011). Distribution and accumulation of antimony in plants in the super-large Sb deposit areas, China. *Microchemical Journal*, 97(1), 44–51. doi:10.1016/j.microc.2010.05.016
- Qiao, W., Li, C., & Fan, L. M. (2014). Cross-talk between nitric oxide and hydrogen peroxide in plant responses to abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany*, 100, 84–93. doi:10.1016/j.envexpbot.2013.12.014
- Qiu, D., Diretto, G., Tavarza, R., & Giuliano, G. (2007). Improved protocol for *Agrobacterium* mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD. *Scientia Horticulturae*, 112(2), 172–175. doi:10.1016/j.scienta.2006.12.015
- Ragaini, R., Ralston, H., & Roberts, N. (1977). Environmental trace metal contamination in Kellogg, Idaho, near a lead smelting complex. *Environmental Science & Technology*, 11(8), 773–781 doi:10.1021/es60131a004

- Rajabpoor, S., Ghaderian, S. M., & Schat, H. (2019). Effects of antimony on enzymatic and non-enzymatic antioxidants in a metallicolous and a non-metallicolous population of *Salvia spinosa* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 144, 386–394. doi:10.1016/j.plaphy.2019.10.011
- Rajapaksha, A. U., Ahmad, M., Vithanage, M., Kim, K. R., Chang, J. Y., Lee, S. S., & Ok, Y. S. (2015). The role of biochar, natural iron oxides, and nanomaterials as soil amendments for immobilizing metals in shooting range soil. *Environmental Geochemistry and Health*, 37(6), 931–942. doi:10.1007/s10653-015-9694-z
- Ramírez-Solís, A., Mukopadhyay, R., Rosen, B. P., & Stemmler, T. L. (2004). Experimental and theoretical characterization of arsenite in water: insights into the coordination environment of As-O. *Inorganic Chemistry*, 43(9), 2954–2959. doi:10.1021/ic0351592
- Rao, M. V., Paliyath, G., & Ormrod, D. P. (1996). Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 110(1), 125–136. doi:10.1104/pp.110.1.125
- Reeves, R., & Baker, A. (2000). Metal-accumulating plants. In *phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*, Raskin, I., Ensley, B. D. (Eds.), Wiley & Sons, 193–229, New York.
- Ren, J., Ma, L. Q., Sun, H., Cai, F., & Luo, J. (2014). Antimony uptake, translocation and speciation in rice plants exposed to antimonite and antimonate. *Science of The Total Environment*, 475, 83–89. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.12.103
- Riemenschneider, A., Nikiforova, V., Hoefgen, R., De Kok, L. J., & Papenbrock, J. (2005). Impact of elevated H₂S on metabolite levels, activity of enzymes and expression of genes involved in cysteine metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(5), 473–483. doi:10.1016/j.plaphy.2005.04.001
- Rivero, R. M., Ruiz, J. M., & Romero, L. (2003). Role of grafting in horticultural plants under stress conditions. *Food, Agriculture & Environment*, 1(1), 70–74. doi:10.1234/4.2003.318
- Rizwan, M., Mostofa, M. G., Ahmad, M. Z., Imtiaz, M., Mehmood, S., Adeel, M., Dai, Z., Li, Z., Aziz, O., Zhang, Y., & Tu, S. (2018). Nitric oxide induces rice tolerance to excessive nickel by regulating nickel uptake, reactive oxygen species detoxification and defense-related gene expression. *Chemosphere*, 191, 23–35. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.09.068
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., & Kaiser, W. M. (2002). Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 103–110. doi:10.1093/jexbot/53.366.103

- Rodríguez-Ruiz, M., Aparicio-Chacón, M. V., Palma, J. M., & Corpas, F. J. (2019). Arsenate disrupts ion balance, sulfur and nitric oxide metabolisms in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L.) plants. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 143–156. doi:10.1016/j.envexpbot.2018.06.028
- Romero, L. C., Aroca, M. Á., Laureano-Marín, A. M., Moreno, I., García, I., & Gotor, C. (2014). Cysteine and cysteine-related signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, 7(2), 264–276. doi:10.1093/mp/sst168
- Romero, L. C., García, I., & Gotor, C. (2013). L-cysteine desulfhydrase 1 modulates the generation of the signaling molecule sulfide in plant cytosol. *Plant Signaling & Behavior*, 8(5), e24007. doi:10.4161/psb.24007
- Rosa, S. B., Caverzan, A., Teixeira, F. K., Lazzarotto, F., Silveira, J. A. G., Ferreira-Silva, S. L., Abreu-Neto, J., Margis, R., & Margis-Pinheiro, M. (2010). Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice. *Phytochemistry*, 71(5–6), 548–558. doi:10.1016/j.phytochem.2010.01.003
- Rosales, M. A., Ruiz, J. M., Hernández, J., Soriano, T., Castilla, N., & Romero, L. (2006). Antioxidant content and ascorbate metabolism in cherry tomato exocarp in relation to temperature and solar radiation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(10), 1545–1551. doi:10.1002/jsfa.2546
- Ruiz, J. M., Blasco, B., Rivero, R. M., & Romero, L. (2005). Nicotine-free and salt-tolerant tobacco plants obtained by grafting to salinity-resistant rootstocks of tomato. *Physiologia Plantarum*, 124(4), 465–475. doi:10.1111/j.1399-3054.2005.00532.x
- Sagi, M., & Fluhr, R. (2001). Superoxide Production by Plant Homologues of the gp91 phox NADPH Oxidase. Modulation of Activity by Calcium and by Tobacco Mosaic Virus Infection. *Plant Physiology*, 126(3), 1281–1290. doi:10.1104/pp.126.3.1281
- Sahay, S., & Gupta, M. (2017). An update on nitric oxide and its benign role in plant responses under metal stress. In *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 67, 39–52. doi:10.1016/j.niox.2017.04.011
- Saito, K. (2004). Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiology*, 136(1), 2443–2450. doi:10.1104/pp.104.046755
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. In *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
- Sakamoto, A., Ueda, M., & Morikawa, H. (2002). Arabidopsis glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS*, 515(1–3), 20–24. doi:10.1016/S0014-5793(02)02414-6
- Sakihama, Y., Mano, J., Sano, S., Asada, K., & Yamasaki, H. (2000). Reduction of phenoxyl radicals mediated by monodehydroascorbate reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(3), 949–954. doi:10.1006/bbrc.2000.4053

- Sandalio, L. M., Palma, J. M., & Del Rio, L. A. (1987). Localization of manganese superoxide dismutase in peroxisomes isolated from *Pisum sativum* L. *Plant Science*, 51(1), 1–8. doi:10.1016/0168-9452(87)90213-5
- Sandalio, L. M., Rodríguez-Serrano, M., del Río, L. A., & Romero-Puertas, M. C. (2009). Reactive oxygen species and signaling in cadmium toxicity. In *Signaling and Communication in plants*, Del Río L. A., Puppó, A. (Eds.), Springer–Verlag Berlin Heidelberg, 175–189, Granada, Spain. doi:10.1007/978-3-642-00390-5_11
- Sanità di Toppi, L., Castagna, A., Andreozzi, E., Careri, M., Predieri, G., Vurro, E., & Ranieri, A. (2009). Occurrence of different inter-varietal and inter-organ defence strategies towards supra-optimal zinc concentrations in two cultivars of *Triticum aestivum* L. *Environmental and Experimental Botany*, 66(2), 220–229. doi:10.1016/j.envexpbot.2009.02.008
- Sano, S., Tao, S., Endo, Y., Inaba, T., Hossain, M. A., Miyake, C., Matsuo, M., Aoki, H., Asada, K., & Saito, K. (2005). Purification and cDNA Cloning of Chloroplastic Monodehydroascorbate Reductase from Spinach. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(4), 762–772. doi:10.1271/bbb.69.762
- Santisree, P., Adimulam, S. S., Sharma, K., Bhatnagar-Mathur, P., & Sharma, K. K. (2019). Insights into the nitric oxide mediated stress tolerance in plants. *Plant Signaling Molecules*, Ferrante, A Khan, M. I. R., Khan, N. A., Reddy, P. S., Elsevier, 25, 385–406. doi:10.1016/B978-0-12-816451-8.00024-1
- Santolini, J., André, F., Jeandroz, S., & Wendehenne, D. (2017). Nitric oxide synthase in plants: Where do we stand? *Nitric oxide - Biology and Chemistry*, 63, 30–38. doi:10.1016/j.niox.2016.09.005
- Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(7), 995–1014. doi:10.1590/s0100-879x2005000700003
- Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Review Article redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide glutathione disulfide/Glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(11), 1191–1212. doi:10.1016/s0891-5849(01)00480-4
- Sen, N., & Snyder, S. H. (2011). Neurotrophin-mediated degradation of histone methyltransferase by S-nitrosylation cascade regulates neuronal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(50), 20178–20183. doi:10.1073/pnas.1117820108
- Sengupta, R., Ryter, S. W., Zuckerbraun, B. S., Tzeng, E., Billiar, T. R., & Stoyanovsky, D. A. (2007). Thioredoxin catalyzes the denitrosation of low-molecular mass and protein S-nitrosothiols. *Biochemistry*, 46(28), 8472–8483. doi:10.1021/bi700449x

- Seregin, I. V., & Kozhevnikova, A. D. (2023). Phytochelatins: sulfur-containing metal(loid)-chelating ligands in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 24(3), 2430. doi:10.3390/ijms24032430
- Sgherri, C. L., Pinzino, C., & Navari-Izzo Sgheni, F. (1996). Sunflower seedlings subjected to increasing stress by water deficit: Changes in O₂⁻ production related to the composition of thylakoid membranes. *Physiologia Plantarum*, 96, 446–452. doi:10.1111/j.1399-3054.1996.tb00457.x
- Shan, C. Juan, Zhang, S. li, Li, D. fang, Zhao, Y. zeng, Tian, X. liang, Zhao, X. liang, Wu, Y. xia, Wei, X. ying, & Liu, R. qiang. (2011). Effects of exogenous hydrogen sulfide on the ascorbate and glutathione metabolism in wheat seedlings leaves under water stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(6), 2533–2540. doi:10.1007/s11738-011-0746-4
- Sharma, A., Soares, C., Sousa, B., Martins, M., Kumar, V., Shahzad, B., Sidhu, G. P. S., Bali, A. S., Asgher, M., Bhardwaj, R., Thukral, A. K., Fidalgo, F., & Zheng, B. (2020). Nitric oxide-mediated regulation of oxidative stress in plants under metal stress: a review on molecular and biochemical aspects. *Physiologia Plantarum*, 168(2), 318–344. doi:10.1111/ppl.13004
- Shi, H., Ye, T., & Chan, Z. (2014). Nitric oxide-activated hydrogen sulfide is essential for cadmium stress response in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L). Pers.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 74, 99–107. doi:10.1016/j.plaphy.2013.11.001
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., & Yoshimura, K. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal Experimental Botany*, 53(372), 1305–1319. doi:10.1093/jexbot/53.372.1305
- Shivaraj, S. M., Vats, S., Bhat, J. A., Dhakte, P., Goyal, V., Khatri, P., Kumawat, S., Singh, A., Prasad, M., Sonah, H., Sharma, T. R., & Deshmukh, R. (2020). Nitric oxide and hydrogen sulfide crosstalk during heavy metal stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 168(2), 437–455. doi:10.1111/ppl.13028
- Shotyk, W., Krachler, M., & Chen, B. (2005). Antimony: Global environmental contaminant. *Journal of Environmental Monitoring*, 7(12), 1135–1136. doi:10.1039/b515468p
- Shtangeeva, I., Bali, R., & Harris, A. (2011). Bioavailability and toxicity of antimony. *Journal Geochemical Exploration*, 110(1), 40–45. doi:10.1016/j.gexplo.2010.07.003
- Shtangeeva, I., Niemelä, M., & Perämäki, P. (2013). Effects of soil amendments on antimony uptake by wheat. *Journal of Soils and Sediments*, 14(4), 679–686. doi:10.1007/s11368-013-0761-8
- Shtangeeva, I., Singh, B., Bali, R., Ayrault, S., & Timofeev, S. (2014). Antimony accumulation in wheat seedlings grown in soil and water. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 45(7), 968–983. doi:10.1080/00103624.2013.867055

- Shtangeeva, I., Steinnes, E., & Lierhagen, S. (2012). Uptake of different forms of antimony by wheat and rye seedlings. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(2), 502–509. doi:10.1007/s11356-011-0589-y
- Sies, H., & Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(6), 1315S–1321S. doi:10.1093/ajcn/62.6.1315S
- Signorelli, S., Coitiño, E. L., Borsani, O., & Monza, J. (2014). Molecular mechanisms for the reaction between OH radicals and proline: insights on the role as reactive oxygen species scavenger in plant stress. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(1), 37–47. doi:10.1021/jp407773u
- Signorelli, S., Imparatta, C., Rodríguez-Ruiz, M., Borsani, O., Corpas, F. J., & Monza, J. (2016). *In vivo* and *in vitro* approaches demonstrate proline is not directly involved in the protection against superoxide, nitric oxide, nitrogen dioxide and peroxyxynitrite. *Functional Plant Biology*, 43(9), 870. doi:10.1071/FP16060
- Simkin, A. J., Moreau, H., Kuntz, M., Pagny, G., Lin, C., Tanksley, S., & McCarthy, J. (2008). An investigation of carotenoid biosynthesis in *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. *Journal of Plant Physiology*, 165(10), 1087–1106. doi:10.1016/j.jplph.2007.06.016
- Simplicio, P. Di, Cacace, M. G., Lusini, L., Giannerini, F., Giustarini, D., & Rossi, R. (1998). Role of protein -SH groups in redox homeostasis - the erythrocyte as a model system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 355(2), 145–152. doi:10.1006/abbi.1998.0694
- Singh, A., Agrawal, M., & Marshall, F. M. (2010). The role of organic vs. inorganic fertilizers in reducing phytoavailability of heavy metals in a wastewater-irrigated area. *Ecological Engineering*, 36(12), 1733–1740. doi:10.1016/j.ecoleng.2010.07.021
- Singh, S., Kumar, V., Kapoor, D., Kumar, S., Singh, S., Dhanjal, D. S., Datta, S., Samuel, J., Dey, P., Wang, S., Prasad, R., & Singh, J. (2020). Revealing on hydrogen sulfide and nitric oxide signals co-ordination for plant growth under stress conditions. *Physiologia Plantarum*, 168(2), 301–317. doi:10.1111/ppl.13002
- Singh, V. P., Singh, S., Kumar, J., & Prasad, S. M. (2015). Investigating the roles of ascorbate-glutathione cycle and thiol metabolism in arsenate tolerance in ridged *Luffa* seedlings. *Protoplasma*, 252(5), 1217–1229. doi:10.1007/s00709-014-0753-6
- Singleton, V. L., Salgues, M., Zaya, J., & Trousdale, E. (1985). Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36(1), 50–56. doi:10.5344/ajev.1985.36.1.50

- Smart, R. E., & Bingham, G. E. (1974). Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiology*, 53(2), 258–260. doi:10.1104/pp.53.2.258
- Smith, K., & Huyck, H. (1999). An overview of the abundance, relative mobility, bioavailability, and human toxicity of metals. In the environmental geochemistry of mineral deposits, 6, 29–70. doi:10.5382/Rev.06.02
- Soll, J., Schultz, G., Joyard, J., Douce, R., & Block, M. A. (1985). Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 238(1), 290–299. doi:10.1016/0003-9861(85)90167-5
- Song, J., Zhao, F. J., Luo, Y. M., McGrath, S. P., & Zhang, H. (2004). Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. *Environmental Pollution*, 128(3), 307–315. doi:10.1016/j.envpol.2003.09.019
- Song, W., Zhou, F., Shan, C., Zhang, Q., Ning, M., Liu, X., Zhao, X., Cai, W., Yang, X., Hao, G., & Tang, F. (2021). Identification of glutathione S-transferase genes in Hami Melon (*Cucumis melo* var. *saccharinus*) and their expression analysis under cold stress. *Frontiers in Plant Science*, 12, 672017. doi:10.3389/fpls.2021.672017
- Spadaro, D., Yun, B. W., Spoel, S. H., Chu, C., Wang, Y. Q., & Loake, G. J. (2010). The redox switch: Dynamic regulation of protein function by cysteine modifications. *Physiologia Plantarum*, 138(4), 360–371. doi:10.1111/j.1399-3054.2009.01307.x
- Spuller, C., Weigand, H., & Marb, C. (2007). Trace metal stabilisation in a shooting range soil: Mobility and phytotoxicity. *Journal of Hazardous Materials*, 141(2), 378–387. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.05.082
- Srivastava, M., Ma, L. Q., Singh, N., & Singh, S. (2005). Antioxidant responses of hyper-accumulator and sensitive fern species to arsenic. *Journal of Experimental Botany*, 56(415), 1335–1342. doi:10.1093/jxb/eri134
- Srivastava, R. K., Pandey, P., Rajpoot, R., Rani, A., & Dubey, R. S. (2014). Cadmium and lead interactive effects on oxidative stress and antioxidative responses in rice seedlings. *Protoplasma*, 251(5), 1047–1065. doi:10.1007/s00709-014-0614-3
- Srivastava, S., Agrawal, S. B., & Mondal, M. K. (2015). A review on progress of heavy metal removal using adsorbents of microbial and plant origin. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(20), 15386–15415. doi:10.1007/s11356-015-5278-9
- Stavrianakou, S., Liakopoulos, G., & Karabourniotis, G. (2006). Boron deficiency effects on growth, photosynthesis and relative concentrations of phenolics of *Dittrichia viscosa* (Asteraceae). *Environmental and Experimental Botany*, 56(3), 293–300. doi:10.1016/j.envexpbot.2005.03.007
- Stöhr, C., & Stremlau, S. (2006). Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany*, 57(3), 463–470. doi:10.1093/jxb/erj058

- Stöhr, C., & Ullrich, W. R. (2002). Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *Journal of Experimental Botany*, 53(379), 2293–2303. doi:10.1093/jxb/erf110
- Sun, C., Shi, Z. Z., Zhou, X., Chen, L., & Zhao, X. M. (2013). Prediction of S-glutathionylation sites based on protein sequences. *PLoS ONE*, 8(2). doi:10.1371/journal.pone.0055512
- Sun, C., Zhang, Y., Liu, L., Liu, X., Li, B., Jin, C., & Lin, X. (2021). Molecular functions of nitric oxide and its potential applications in horticultural crops. *Horticulture Research*, 8(1), 71. doi:10.1038/s41438-021-00500-7
- Sun, H., Yan, S. C., & Cheng, W. S. (2000). Interaction of antimony tartrate with the tripeptide glutathione. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5450–5457. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01605.x
- Sundar, S., & Chakravarty, J. (2010). Antimony toxicity. In *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(12), 4267–4277. doi:10.3390/ijerph7124267
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Mering, C. von. (2019). STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607–D613. doi:10.1093/nar/gky1131
- Takahama, U., Hirotsu, M., & Oniki, T. (1999). Age-dependent changes in levels of ascorbic acid and chlorogenic acid, and activities of peroxidase and superoxide dismutase in the apoplast of tobacco leaves: mechanism of the oxidation of chlorogenic acid in the apoplast. *Plant Cell Physiology*, 40(7), 716–724. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a029598
- Takano, J., Wada, M., Ludewig, U., Schaaf, G., Von Wirén, N., & Fujiwara, T. (2006). The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell*, 18(6), 1498–1509. doi:10.1105/tpc.106.041640
- Talukdar, D., & Talukdar, T. (2014). Retracted article: Coordinated response of sulfate transport, cysteine biosynthesis, and glutathione-mediated antioxidant defense in lentil (*Lens culinaris* Medik.) genotypes exposed to arsenic. *Protoplasma*, 251(4), 839–855. doi:10.1007/s00709-013-0586-8
- Tanaka, K., Takeuchi, E., Kubo, A., Sakaki, T., Haraguchi, K., & Kawamura, Y. (1991). Two immunologically different isozymes of ascorbate peroxidase from spinach leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 286(2), 371–375. doi:10.1016/0003-9861(91)90053-L

- Tang, H., Hassan, M. U., Nawaz, M., Yang, W., Liu, Y., & Yang, B. (2023). A review on sources of soil antimony pollution and recent progress on remediation of antimony polluted soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 266, 115583. doi:10.1016/j.ecoenv.2023.115583
- Tanou, G., Job, C., Rajjou, L., Arc, E., Belghazi, M., Diamantidis, G., Molassiotis, A., & Job, D. (2009). Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. *Plant Journal*, 60(5), 795–804. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04000.x
- Tavares, C. P., Vernal, J., Delena, R. A., Lamattina, L., Cassia, R., & Terenzi, H. (2014). S-nitrosylation influences the structure and DNA binding activity of AtMYB30 transcription factor from *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1844(4), 810–817. doi:10.1016/j.bbapap.2014.02.015
- Teixeira, F. K., Menezes-Benavente, L., Galvão, V. C., Margis, R., & Margis-Pinheiro, M. (2006). Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta*, 224(2), 300–314. doi:10.1007/s00425-005-0214-8
- Teixeira, F. K., Menezes-Benavente, L., Margis, R., & Margis-Pinheiro, M. (2004). Analysis of the Molecular Evolutionary History of the Ascorbate Peroxidase Gene Family: Inferences from the Rice Genome. *Journal of Molecular Evolution*, 59(6), 761–770. doi:10.1007/s00239-004-2666-z
- Telford, K., Maher, W., Krikowa, F., Foster, S., Ellwood, M. J., Ashley, P. M., Lockwood, P. V., & Wilson, S. C. (2009). Bioaccumulation of antimony and arsenic in a highly contaminated stream adjacent to the Hillgrove Mine, NSW, Australia. *Environmental Chemistry*, 6(2), 133–143. doi:10.1071/EN08097
- Thakur, M., Praveen, S., Divte, P. R., Mitra, R., Kumar, M., Gupta, C. K., Kalidindi, U., Bansal, R., Roy, S., Anand, A., & Singh, B. (2022). Metal tolerance in plants: Molecular and physicochemical interface determines the “not so heavy effect” of heavy metals. *Chemosphere*, 287, 131957. doi:10.1016/j.chemosphere.2021.131957
- Thatcher, L. F., Carrie, C., Andersson, C. R., Sivasithamparam, K., Whelan, J., & Singh, K. B. (2007). Differential gene expression and subcellular targeting of Arabidopsis glutathione S-transferase F8 is achieved through alternative transcription start sites. *Journal of Biological Chemistry*, 282(39), 28915–28928. doi:10.1074/jbc.M702207200
- Theologis, A., Ecker, J. R., Palm, C. J., Federspiel, N. A., Kaul, S., White, O., Alonso, J., Altafi, H., Araujo, R., Bowman, C. L., Brooks, S. Y., Buehler, E., Chan, A., Chao, Q., Chen, H., Cheuk, R. F., Chin, C. W., Chung, M. K., Conn, L., ... Davis, R. W. (2000). *Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 816–820. doi:10.1038/35048500

- Thipyapong, P., Hunt, M. D., & Steffens, J. C. (1995). Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 40(3), 673–676. doi:10.1016/0031-9422(95)00359-F
- Thomas, D. D., Liu, X., Kantrow, S. P., & Lancaster, J. R. (2001). The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *PNAS*, 98(1), 355–360. doi:10.1073/pnas.98.1.355
- Thompson, J. E., Legge, R. L., & Barber, R. F. (1987). The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytologist*, 105, 317–344. doi:10.1111/j.1469-8137.1987.tb00871.x
- Tichá, T., Činčalová, L., Kopečný, D., Sedlářová, M., Kopečná, M., Luhová, L., & Petřivalský, M. (2017). Characterization of S-nitrosogluthione reductase from *Brassica* and *Lactuca* spp. and its modulation during plant development. *Nitric Oxide*, 68, 68–76. doi:10.1016/j.niox.2016.12.002
- Tola, A. J., Jaballi, A., & Missihoun, T. D. (2021). Protein carbonylation: emerging roles in plant redox Biology and future prospects. *Plants*, 10(7), 1451. doi:10.3390/plants10071451
- Trümper, S., & Follmann, H. (1994). A novel dehydroascorbate reductase from spinach chloroplasts homologous to plant trypsin inhibitor. *FEBS*, 352, 159–162. doi:10.1016/0014-5793(94)00947-3
- Tschan, M., Robinson, B. H., Nodari, M., & Schulin, R. (2009a). Antimony uptake by different plant species from nutrient solution, agar and soil. *Environmental Chemistry*, 6(2), 144–152. doi:10.1071/EN08103
- Tschan, M., Robinson, B. H., & Schulin, R. (2009b). Antimony in the soil - plant system - A review. In *Environmental Chemistry*, 6(2), 106–115. doi:10.1071/EN08111
- Tschan, M., Robinson, B., & Schulin, R. (2008). Antimony uptake by *Zea mays* (L.) and *Helianthus annuus* (L.) from nutrient solution. *Environmental Geochemistry and Health*, 30(2), 187–191. doi:10.1007/s10653-008-9142-4
- Tun, N. N., Santa-Catarina, C., Begum, T., Silveira, V., Handro, W., Segal Floh, E. I., & Scherer, G. F. E. (2006). Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 47(3), 346–354. doi:10.1093/pcp/pci252
- UE. (1998). Council directive 98/83/EC of 3 November 1998, quality of water intended for human consumption. *Official Journal of the European Communities*, 330, 32–54.
- USEPA. (1979). Water related fate of the 129 priority pollutants Volume I: Introduction and Technical Rackground, Metals and Inorganics, Pesticides and PCBs.
- Vaculíková, M., Vaculík, M., Šimková, L., Fialová, I., Kochanová, Z., Sedlářová, B., & Luxová, M. (2014). Influence of silicon on maize roots exposed to antimony – Growth and antioxidative response. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 279–284. doi:10.1016/j.plaphy.2014.08.014

- Vaish, S., Gupta, D., Mehrotra, R., Mehrotra, S., & Basantani, M. K. (2020). Glutathione S-transferase: a versatile protein family. *3 Biotech*, 10(7), 321. doi:10.1007/s13205-020-02312-3
- Valderrama, R., Corpas, F. J., Carreras, A., Fernández-Ocaña, A., Chaki, M., Luque, F., Gómez-Rodríguez, M. V., Colmenero-Varea, P., del Río, L. A., & Barroso, J. B. (2007). Nitrosative stress in plants. *FEBS*, 581(3), 453–461. doi:10.1016/j.febslet.2007.01.006
- Valério, L., De Meyer, M., Penel, C., & Dunand, C. (2004). Expression analysis of the Arabidopsis peroxidase multigenic family. *Phytochemistry*, 65(10), 1331–1342. doi:10.1016/j.phytochem.2004.04.017
- Vandelle, E., & Delledonne, M. (2011). Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Science*, 181(5), 534–539. doi:10.1016/j.plantsci.2011.05.002
- Velmurugan, S., Rufus, A. L., Sathyaseelan, V. S., Mittal, V. S. V. K., & Narasimhan, S. V. (2011). Experience with dilute chemical decontamination in indian pressurized heavy water reactors. *Energy Procedia*, 7, 645–649. doi:10.1016/j.egypro.2011.06.086
- Verbruggen, N., & Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35(4), 753–759. doi:10.1007/s00726-008-0061-6
- Verma, S., & Dubey, R. S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164(4), 645–655. doi:10.1016/S0168-9452(03)00022-0
- Vernoux, T., Wilson, R. C., Seeley, K. A., Reichheld, J.-P., Muroy, S., Brown, S., Maughan, S. C., Cobbett, C. S., Van Montagu, M., Inzé, D., May, M. J., & Sung, Z. R. (2000). The ROOTMERISTEMLESS1 /CADMIUM SENSITIVE2 Gene Defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *The Plant Cell*, 12(1), 97–109. doi:10.1105/tpc.12.1.97
- Vidya, C. S. N., Shetty, R., Vaculíková, M., & Vaculík, M. (2022). Antimony toxicity in soils and plants, and mechanisms of its alleviation. In *Environmental and Experimental Botany*, 202, 104996. doi:10.1016/j.envexpbot.2022.104996
- Villalba, J. M., Córdoba, F., & Navas, P. (1996). Ascorbate and the plasma membrane a new view of cell growth control. In *Subcellular Biochemistry*, Harris, R. (Ed.), Plenum press, 25, 57–81, New York. doi:10.1007/978-1-4613-0325-1_4
- Wan, X. M., Tandy, S., Hockmann, K., & Schulin, R. (2013). Changes in Sb speciation with waterlogging of shooting range soils and impacts on plant uptake. *Environmental Pollution*, 172, 53–60. doi:10.1016/j.envpol.2012.08.010
- Wang, N., Wang, A., Kong, L., & He, M. (2018). Calculation and application of Sb toxicity coefficient for potential ecological risk assessment. *Science of the Total Environment*, 610–611, 167–174. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.07.268

- Wang, X., He, M., Xi, J., & Lu, X. (2011). Antimony distribution and mobility in rivers around the world's largest antimony mine of Xikuangshan, Hunan Province, China. *Microchemical Journal*, 97(1), 4–11. doi:10.1016/j.microc.2010.05.011
- Wang, Y., Loake, G. J., & Chu, C. (2013). Cross-talk of nitric oxide and reactive oxygen species in plant programmed cell death. *Frontiers in Plant Science*, 4, 314. doi:10.3389/fpls.2013.00314
- Wang, Y., Yun, B. W., Kwon, E. J., Hong, J. K., Yoon, J., & Loake, G. J. (2006). S-nitrosylation: An emerging redox-based post-translational modification in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57(8), 1777–1784. doi:10.1093/jxb/erj211
- Warner, J. R., Behlen, L. S., & Copley, S. D. (2008). A trade-off between catalytic power and substrate inhibition in TCHQ Dehalogenase. *Biochemistry*, 47(10), 3258–3265. doi:10.1021/bi702431n
- Waszczak, C., Carmody, M., & Kangasjärvi, J. (2018). Reactive oxygen species in plant signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 69, 209–236. doi:10.1146/annurev-arplant-042817
- Weckwerth, G. (2001). Verification of traffic emitted aerosol components in the ambient air of Cologne (Germany). *Atmospheric Environment*, 35, 5525–5536. doi:10.1016/S1352-2310(01)00234-5
- Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307–313. doi:10.1016/S0176-1617(11)81192-2
- Wen, B., Zhou, J., Zhou, A., Liu, C., & Li, L. (2018). A review of antimony (Sb) isotopes analytical methods and application in environmental systems. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 128, 109–116. Doi:10.1016/j.ibiod.2017.01.008
- Whiteman, M., Li, L., Kostetski, I., Chu, S. H., Siau, J. L., Bhatia, M., & Moore, P. K. (2006). Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 343(1), 303–310. doi:10.1016/j.bbrc.2006.02.154
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Van Montagu, M., & Inzé, D. (1997). Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO Journal*, 16(16), 4806–4816. doi:10.1093/emboj/16.16.4806
- Wilson, I. D., Neill, S. J., & Hancock, J. T. (2008). Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell and Environment*, 31(5), 622–631. doi:10.1111/j.1365-3040.2007.01761.x
- Wilson, N., Craw, D., & Hunter, K. (2004). Antimony distribution and environmental mobility at an historic antimony smelter site, New Zealand. *Environmental Pollution*, 129(2), 257–266. doi:10.1016/j.envpol.2003.10.014

- Wilson, S. C., Lockwood, P. V., Ashley, P. M., & Tighe, M. (2010). The chemistry and behaviour of antimony in the soil environment with comparisons to arsenic: A critical review. In *Environmental Pollution*, 158(5), 1169–1181. doi:10.1016/j.envpol.2009.10.045
- Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), 218–223. doi:10.1016/S1369-5266(02)00256-X
- Wojas, S., Clemens, S., SkŁodowska, A., & Maria Antosiewicz, D. (2010). Arsenic response of AtPCS1- and CePCS-expressing plants – Effects of external As(V) concentration on As-accumulation pattern and NPT metabolism. *Journal of Plant Physiology*, 167(3), 169–175. doi:10.1016/j.jplph.2009.07.017
- Wojtaszek, P. (2000). Nitric oxide in plants. *Phytochemistry*, 54(1), 1–4. doi:10.1016/S0031-9422(00)00056-X
- Wolhuter, K., & Eaton, P. (2017). How widespread is stable protein S-nitrosylation as an end-effector of protein regulation? *Free Radical Biology and Medicine*, 109, 156–166. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.013
- Wu, D., Chu, H., Jia, L., Chen, K., & Zhao, L. (2015). A feedback inhibition between nitric oxide & hydrogen peroxide in the heat shock pathway in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Growth Regulation*, 75(2), 503–509. doi:10.1007/s10725-014-0014-x
- Wu, F., Fu, Z., Liu, B., Mo, C., Chen, B., Corns, W., & Liao, H. (2011). Health risk associated with dietary co-exposure to high levels of antimony and arsenic in the world's largest antimony mine area. *Science of the Total Environment*, 409(18), 3344–3351. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.05.033
- Wynia-Smith, S. L., & Smith, B. C. (2017). Nitrosothiol formation and S-nitrosation signaling through nitric oxide synthases. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 63, 52–60. doi:10.1016/j.niox.2016.10.001
- Wysocki, R., & Tamás, M. J. (2010). How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 925–951. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00217.x
- Xi, J., He, M., & Lin, C. (2011). Adsorption of antimony(III) and antimony(V) on bentonite: Kinetics, thermodynamics and anion competition. *Microchemical Journal*, 97(1), 85–91. doi:10.1016/j.microc.2010.05.017
- Xu, S., Guerra, D., Lee, U., & Vierling, E. (2013). S-nitrosoglutathione reductases are low-copy number, cysteine-rich proteins in plants that control multiple developmental and defense responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 4, 430. doi:10.3389/fpls.2013.00430
- Xue, L., Ren, H., Li, S., Gao, M., Shi, S., Chang, E., Wei, Y., Yao, X., Jiang, Z., & Liu, J. (2015). Comparative proteomic analysis in *Miscanthus sinensis* exposed to antimony stress. *Environmental Pollution*, 201, 150–160. doi:10.1016/j.envpol.2015.03.004

- Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76(2), 167–179. doi:10.1016/j.sajb.2009.10.007
- Yamaguchi, Y., Nakamura, T., Kusano, T., & Sano, H. (2000). Three Arabidopsis genes encoding proteins with differential activities for cysteine synthase and β -cyanoalanine synthase. *Plant and Cell Physiology*, 41(4), 465–476. doi:10.1093/pcp/41.4.465
- Yamasaki, H. (2000). Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: Implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition *in vivo*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1402), 1477–1488. doi:10.1098/rstb.2000.0708
- Yamasaki, H., & Cohen, M. F. (2016). Biological consilience of hydrogen sulfide and nitric oxide in plants: gases of primordial earth linking plant, microbial and animal physiologies. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 55–56, 91–100. doi:10.1016/j.niox.2016.04.002
- Yang, H., Mu, J., Chen, L., Feng, J., Hu, J., Li, L., Zhou, J.-M., & Zuo, J. (2015). S-nitrosylation positively regulates ascorbate peroxidase activity during plant stress responses. *Plant Physiology*, 167(4), 1604–1615. doi:10.1104/pp.114.255216
- Yang, L., Tian, D., Todd, C. D., Luo, Y., & Hu, X. (2013). Comparative proteome analyses reveal that nitric oxide is an important signal molecule in the response of rice to aluminum toxicity. *Journal of Proteome Research*, 12(3), 1316–1330. doi:10.1021/pr300971n
- Yang, Z., Wang, X., Feng, J., & Zhu, S. (2022). Biological functions of hydrogen sulfide in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 15107. doi:10.3390/ijms232315107
- Yemm, E. W., Cocking, E. C., & Ricketts, R. E. (1955). The determination of amino-acids with ninhydrin. *The Analyst*, 80(948), 209. doi:10.1039/an9558000209
- Yoshimura, K., Yabuta, Y., Ishikawa, T., & Shigeoka, S. (2000). Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology*, 123(1), 223–234. doi:10.1104/pp.123.1.223
- Yu, M., Lamattina, L., Spoel, S. H., & Loake, G. J. (2014). Nitric oxide function in plant biology: A redox cue in deconvolution. *New Phytologist*, 202(4), 1142–1156. doi:10.1111/nph.12739
- Yu, M., Yun, B. W., Spoel, S. H., & Loake, G. J. (2012). A sleigh ride through the SNO: regulation of plant immune function by protein S-nitrosylation. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(4), 424–430. doi:10.1016/j.pbi.2012.03.005

- Yun, B. W., Feechan, A., Yin, M., Saidi, N. B. B., Le Bihan, T., Yu, M., Moore, J. W., Kang, J. G., Kwon, E., Spoel, S. H., Pallas, J. A., & Loake, G. J. (2011). S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature*, 478(7368), 264–268. doi:10.1038/nature10427
- Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Marchand, C. H., Morisse, S., Trost, P., & Lemaire, S. D. (2012). Redox regulation in photosynthetic organisms: Focus on glutathionylation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 16(6), 567–586. doi:10.1089/ars.2011.4255
- Zhang, D., Pan, X., Mu, G., & Wang, J. (2010). Toxic effects of antimony on photosystem II of *Synechocystis* sp. as probed by in vivo chlorophyll fluorescence. *Journal of Applied Phycology*, 22(4), 479–488. doi:10.1007/s10811-009-9482-1
- Zhang, F. Q., Wang, Y. S., Lou, Z. P., & Dong, J. De. (2007). Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). *Chemosphere*, 67(1), 44–50. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.10.007
- Zhang, H., Hu, L., Hu, K., He, Y., Wang, S., & Luo, J. (2008). Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(12), 1518–1529. doi:10.1111/j.1744-7909.2008.00769.x
- Zhang, L., Pei, Y., Wang, H., Jin, Z., Liu, Z., Qiao, Z., Fang, H., & Zhang, Y. (2015). Hydrogen sulfide alleviates cadmium-induced cell death through restraining ROS accumulation in Roots of *Brassica rapa* L. sp. *Pekinensis*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1–11. doi:10.1155/2015/804603
- Zhao, M., Liu, Q., Zhang, Y., Yang, N., Wu, G., Li, Q., & Wang, W. (2020). Alleviation of osmotic stress by H₂S is related to regulated PLD α 1 and suppressed ROS in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, 133(3), 393–407. doi:10.1007/s10265-020-01182-3
- Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., Jack, R. F., & Dean, D. R. (1993). Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(7), 2754–2758. doi:10.1073/pnas.90.7.2754
- Zhong, Q., Ma, C., Chu, J., Wang, X., Liu, X., Ouyang, W., Lin, C., & He, M. (2020). Toxicity and bioavailability of antimony in edible amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) cultivated in two agricultural soil types. *Environmental Pollution*, 257, 113642. doi:10.1016/j.envpol.2019.113642
- Zhou, B., Guo, Z., Xing, J., & Huang, B. (2005). Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*. *Journal of Experimental Botany*, 56(422), 3223–3228. doi:10.1093/jxb/eri319

- Zhou, X., Joshi, S., Patil, S., Khare, T., & Kumar, V. (2022). Reactive oxygen, nitrogen, carbonyl and sulfur species and their roles in plant abiotic stress responses and tolerance. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(1), 119–142. doi:10.1007/s00344-020-10294-y
- Zhou, X., Sun, C., Zhu, P., & Liu, F. (2018). Effects of antimony stress on photosynthesis and growth of *Acorus calamus*. *Frontiers in Plant Science*, 9, 579. doi:10.3389/fpls.2018.00579
- Zhu, C. Q., Zhang, J. H., Sun, L. M., Zhu, L. F., Abliz, B., Hu, W. J., Zhong, C., Bai, Z. G., Sajid, H., Cao, X. C., & Jin, Q. Y. (2018). Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity via decreasing apoplast and symplast Al contents in rice. *Frontiers in Plant Science*, 9, 294. doi:10.3389/fpls.2018.00294
- Zhu, Y. M., Wu, Q. H., Lv, H. Q., Chen, W. X., Wang, L. Z., Shi, S. ie, Yang, J. G., Zhao, P. P., Li, Y. P., Christopher, R., Liu, H., & Feng, R. (2020a). Toxicity of different forms of antimony to rice plants: Effects on reactive oxidative species production, antioxidative systems, and uptake of essential elements. *Environmental Pollution*, 263, 114544. doi:10.1016/j.envpol.2020.114544
- Zhu, Y. M., Yang, J. G., Wang, L. Z., Lin, Z. T., Dai, J. X., Wang, R. J., Yu, Y. S., Liu, H., Rensing, C., & Feng, R. W. (2020b). Factors influencing the uptake and speciation transformation of antimony in the soil-plant system, and the redistribution and toxicity of antimony in plants. *Science of the Total Environment*, 738, 140232. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140232

7. Abreviaturas

A. CoA	Acetil coenzima A
ADH3	Alcohol deshidrogenasa de clase III
Ala	Alanina
AOX	Oxidasa alternativa
APF	3'-(<i>p</i> -aminofenil) fluoresceína
APR	APS-reductasa
APS	Adenosina 5'-fosfato
APX	Ascorbato peroxidasa
Arg	Arginina
AsA	Ascorbato
ATPS	ATP-sulfurilasa
AzMC	7-azido-4-metilcumarina
BR	Brasinoesteroides
CA	Anhidrasa carbónica
CA-POX	Coniferil-alcohol peroxidasa
CaM	Calmodulina
cAPX	Ascorbato peroxidasa del citosol
CAS	β -cianoalanina sintasa
CAT	Catalasa
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
CHR %	Contenido hídrico relativo
COS	Sulfuro de carbonilo
CS	Cisteína sintasa
Cys	Cisteína
DAF-2DA	Diaminofluoresceína diacetato
DCF-DA	2',7'-diclorofluoresceína diacetato
DHAR	Dehidroascorbato reductasa
DHE	Dihidroetidío
DMAB	4-(Dimetilamino)benzaldehído
DTT	DL-ditiotreitól
ECS	Glutamilcisteína sintasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EF	Eficiencia fotosintética
F ₀	Fluorescencia mínima
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FAO	Organización de Naciones Unidas para Agricultura y Alimentación
FB	Factor de bioacumulación
Fd	Ferredoxina
F _M	Fluorescencia máxima

FMN	Flavín mononucleótido
FNR	Ferredoxina NADP reductasa
FT	Factor de translocación
F _v	Fluorescencia variable
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
GR	Glutación reductasa
GS	Glutación sintasa
GSH	Glutación reducido
GSNO	S-nitrosoglutación
GSNOR	S-nitrosoglutación reductasa
GSSG	Glutación oxidado
His	Histidina
HR%	Humedad relativa
ICP-MS	Espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente
L-DES	L-cisteína desulfhidrasa
Lys	Lisina
MBTH	Clorhidrato de 3-metil-2-benzotiazolinona-hidrazona
MDA	Malondialdehído
MDHAR	Monodehidroascorbato reductasa
MoCo	Pterina complejo de molibdeno
NBT	Nitroazul tetrazolio
NEM	N-etilmaleimida
NifS-like	Cluster de proteínas nitrogenasas
NiNOR	Nitrito-NO reductasa
NOS	NO sintasa
NOS	Óxido nítrico sintasa
NR	Nitrato reductasa
OAS	O-Acetil serina
OASTL	O-Acetiserin(tiol)liasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón fosfato sódico
PCD	Muerte celular programada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PET	Tereftalato de polietileno
PF	Peso fresco
Pi	Fosfato inorgánico
PLP	Piridoxal 5'-fosfato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

POX	Peroxidasa
PPGs	Fenilpropanoides glicósidos
PPO	Polifenoloxidasas
Pro	Prolina
PRX	Peroxirredoxina
PS	Peso seco
PSI/II	Fotosistema I/II
PTMs	Modificaciones postraduccionales
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
Pyr	Piruvato
RBOH-NOX	NADPH oxidasa de la membrana plasmática, homólogo de oxidasa de macrófagos
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RSNO	S-Nitrosotiol
RSS	Especies reactivas del azufre
RSU	Residuos sólidos urbanos
sAPX	Ascorbato peroxidasa del estroma
SAT	Serina acetil transferasa
Ser	Serina
SiR	Sulfito reductasa
SOD	Superóxido dismutasa
tAPX	Ascorbato peroxidasa de los tilacoides
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico
TBE	Tris borato y EDTA
TCA	Ácido tricloroacético
TCHQD	Tetraclorohidroquinona deshalogenasa
TF	Factor de transcripción
Thr	Treonina
TRX	Tiorredoxinas
Tyr	Tirosina
UAF	Unidades arbitrarias de fluorescencia
UE	Unión Europea
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
XO	Xantina oxidasa
ZE	Zona de elongación

8. Anexo



Effects of Antimony on Reactive Oxygen and Nitrogen Species (ROS and RNS) and Antioxidant Mechanisms in Tomato Plants

Francisco L. Espinosa-Vellarino, Inmaculada Garrido, Alfonso Ortega, Ilda Casimiro and Francisco Espinosa*

Research Group of Physiology, Cellular and Molecular Biology of Plants, University of Extremadura, Badajoz, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Jörg-Peter Schnitzler,
Helmholtz Zentrum München,
Germany

Reviewed by:

Francisco J. Corpas,
Estación Experimental del Zaidín
(EEZ), Spain
Vijay Pratap Singh,
Allahabad University, India

*Correspondence:

Francisco Espinosa
espinosa@unex.es

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 14 February 2020

Accepted: 29 April 2020

Published: 27 May 2020

Citation:

Espinosa-Vellarino FL, Garrido I,
Ortega A, Casimiro I and Espinosa F
(2020) Effects of Antimony on
Reactive Oxygen and Nitrogen
Species (ROS and RNS)
and Antioxidant Mechanisms
in Tomato Plants.
Front. Plant Sci. 11:674.
doi: 10.3389/fpls.2020.00674

This research studies the effects that Sb toxicity (0.0, 0.5, and 1.0 mM) has on the growth, reactive oxygen and nitrogen species, and antioxidant systems in tomato plants. Sb is accumulated preferentially in the roots, with little capacity for its translocation to the leaves where the concentration is much lower. The growth of the seedlings is reduced, with alteration in the content in other nutrients. There is a decrease in the content of Fe, Mg, and Mn, while Cu and Zn increase. The contents in chlorophyll a and b decrease, as does the photosynthetic efficiency. On the contrary the carotenoids increase, indicating a possible action as antioxidants and protectors against Sb. The phenolic compounds do not change, and seem not to be involved in the defense response of the tomato against the stress by Sb. The water content of the leaves decreases while that of proline increases in response to the Sb toxicity. Fluorescence microscopy images and spectrofluorometric detection showed increases in the production of $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , NO, and ONOO⁻, but not of nitrosothiols. The Sb toxicity induces changes in the SOD, POX, APX, and GR antioxidant activities, which show a clear activation in the roots. In leaves, only the SOD and APX increase. The DHAR activity is inhibited in roots but undergoes no changes in the leaves, as is also the case for the POX and GR activities. Ascorbate increases while GSH decreases in the roots. The total AsA + DHA content increases in the roots, but the total GSH + GSSG content decreases, while neither is altered in the leaves. Under Sb toxicity increases the expression of the SOD, APX, and GR genes, while the expression of GST decreases dramatically in roots but increases in leaves. In addition, an alteration is observed in the pattern of the growth of the cells in the elongation zone, with smaller and disorganized cells. All these effects appear to be related to the ability of the Sb to form complexes with thiol groups, including GSH, altering both redox homeostasis and the levels of auxin in the roots and the quiescent center.

Keywords: antimony, antioxidants, ascorbate, glutathione, reactive oxygen species, reactive nitrogen species, tomato

Article

Response to Antimony Toxicity in *Dittrichia viscosa* Plants: ROS, NO, H₂S, and the Antioxidant System

Francisco Luis Espinosa-Vellarino, Inmaculada Garrido , Alfonso Ortega, Ilda Casimiro and Francisco Espinosa * 

Research Group of Physiology, Cellular and Molecular Biology of Plants, University of Extremadura, 06006 Badajoz, Spain; flespinosav@unex.es (F.L.E.-V.); igarridoc@unex.es (I.G.); a.ortega@enzazaden.es (A.O.); casimiro@unex.es (I.C.)

* Correspondence: espinosa@unex.es



Citation: Espinosa-Vellarino, F.L.; Garrido, I.; Ortega, A.; Casimiro, I.; Espinosa, F. Response to Antimony Toxicity in *Dittrichia viscosa* Plants: ROS, NO, H₂S, and the Antioxidant System. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1698. <https://doi.org/10.3390/antiox10111698>

Academic Editors:
Francisco J. Corpas, José M. Palma and Marta Rodríguez-Ruiz

Received: 24 September 2021

Accepted: 23 October 2021

Published: 27 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Dittrichia viscosa* plants were grown hydroponically with different concentrations of Sb. There was preferential accumulation of Sb in roots. Fe and Cu decreased, while Mn decreased in roots but not in leaves. Chlorophyll content declined, but the carotenoid content increased, and photosynthetic efficiency was unaltered. O₂^{•−} generation increased slightly, while lipid peroxidation increased only in roots. H₂O₂, NO, ONOO[−], S-nitrosothiols, and H₂S showed significant increases, and the enzymatic antioxidant system was altered. In roots, superoxide dismutase (SOD) and monodehydroascorbate reductase (MDAR) activities declined, dehydroascorbate reductase (DHAR) rose, and ascorbate peroxidase (APX), peroxidase (POX), and glutathione reductase (GR) were unaffected. In leaves, SOD and POX increased, MDAR decreased, and APX was unaltered, while GR increased. S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) and L-cysteine desulfhydrilase (L-DES) increased in activity, while glutathione S-transferase (GST) decreased in leaves but was enhanced in roots. Components of the AsA/GSH cycle decreased. The great capacity of *Dittrichia* roots to accumulate Sb is the reason for the differing behaviour observed in the enzymatic antioxidant systems of the two organs. Sb appears to act by binding to thiol groups, which can alter free GSH content and SOD and GST activities. The coniferyl alcohol peroxidase activity increased, possibly to lignify the roots' cell walls. Sb altered the ROS balance, especially with respect to H₂O₂. This led to an increase in NO and H₂S acting on the antioxidant system to limit that Sb-induced redox imbalance. The interaction NO, H₂S and H₂O₂ appears key to the response to stress induced by Sb. The interaction between ROS, NO, and H₂S appears to be involved in the response to Sb.

Keywords: antimony; AsA/GSH; *Dittrichia*; hydrogen sulfide; nitric oxide; reactive oxygen species

1. Introduction

Antimony (Sb) is a metalloid that is toxic for both plants and animals, including humans [1–3]. It is found at low concentrations in soils [4]. Nonetheless, its presence and polluting effects have been increasing considerably due to the growth in its mining and in industrial processes which use it, such as the manufacture of batteries [5–8]. It has recently been listed as a priority pollutant by both the European Union and the United States [9,10].

Sb is not an essential element for plants, but they can absorb and transport it [11]. Plants' capacity to absorb this metalloid depends on which different species of Sb are in the soil and their bioavailability, as well as on the plant species itself [12–14]. If Sb absorption is high, toxicity problems result in reduced growth, impaired absorption of other mineral elements, slowed photosynthesis, development of oxidative stress, etc. [15–19].

As part of both normal physiological processes and processes under conditions of stress, different reactive species are produced in the various components of the plant's cells. They include reactive oxygen, nitrogen, and sulfur species (ROS, RNS, and RSS, respectively) [20–23]. Thus, ROS and RNS are produced in the apoplast, cytoplasm, chloroplasts,

Article

Effect of Thallium(I) on Growth, Nutrient Absorption, Photosynthetic Pigments, and Antioxidant Response of *Dittrichia* Plants

Francisco Espinosa ^{*}, Alfonso Ortega, Francisco L. Espinosa-Vellarino and Inmaculada Garrido 

Research Group FBCMP(BBB015), Faculty of Sciences, Campus Avenida de Elvas s/n, University of Extremadura, 06006 Badajoz, Spain

* Correspondence: espinosa@unex.es

Abstract: *Dittrichia* plants were exposed to thallium (Tl) stress (10, 50, and 100 μM) for 7 days. The Tl toxicity altered the absorption and accumulation of other nutrients. In both the roots and the leaves, there was a decline in K, Mg, and Fe content, but an increase in Ca, Mn, and Zn. Chlorophylls decreased, as did the photosynthetic efficiency, while carotenoids increased. Oxidative stress in the roots was reflected in increased lipid peroxidation. There was more production of superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and nitric oxide (NO) in the roots than in the leaves, with increases in both organs in response to Tl toxicity, except for $\text{O}_2^{\cdot-}$ production in the roots, which fluctuated. There was increased hydrogen sulfide (H_2S) production, especially in the leaves. Superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), dehydroascorbate reductase (DHAR), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), and glutathione reductase (GR) showed increased activities, except for APX and MDHAR in the roots and GR in the leaves. The components of the ascorbate–glutathione cycle were affected. Thus, ascorbate (AsA) increased, while dehydroascorbate (DHA), reduced glutathione (GSH), and oxidized glutathione (GSSG) decreased, except for in the roots at 100 μM Tl, which showed increased GSH. These Tl toxicity-induced alterations modify the AsA/DHA and GSH/GSSG redox status. The NO and H_2S interaction may act by activating the antioxidant system. The effects of Tl could be related to its strong affinity for binding with -SH groups, thus altering the functionality of proteins and the cellular redox state.

Keywords: antioxidant defense system; ascorbate; *Dittrichia*; glutathione; hydrogen sulfide; nitric oxide; photosynthesis; reactive oxygen species; thallium toxicity



Citation: Espinosa, F.; Ortega, A.; Espinosa-Vellarino, F.L.; Garrido, I. Effect of Thallium(I) on Growth, Nutrient Absorption, Photosynthetic Pigments, and Antioxidant Response of *Dittrichia* Plants. *Antioxidants* **2023**, *12*, 678. <https://doi.org/10.3390/antiox12030678>

Academic Editor: Stanley Omaye

Received: 30 January 2023

Revised: 2 March 2023

Accepted: 7 March 2023

Published: 9 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Plants' response to stress includes a sharp increase in reactive oxygen, nitrogen, and sulfur species (ROS, RNS, and RSS, respectively) production, which alters the cellular redox balance [1–4]. The damage that is induced by this alteration, and by the excess ROS, is dealt with by the enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems [5–7]. The former includes superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), peroxidases (POD, EC 1.11.1.7), catalases (CAT, EC 1.11.1.6), ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2), monodehydroascorbate reductase (MDHAR, EC 1.6.5.4), and dehydroascorbate reductase (DHAR, EC 1.6.4.2), and the latter includes ascorbate (AsA), reduced glutathione (GSH), phenolics, alkaloids, non-protein amino acids, α -tocopherols, and carotenoids [2,8]. The ascorbate–glutathione (AsA–GSH) cycle removes hydrogen peroxide (H_2O_2), maintaining redox homeostasis [2]. The production of nitric oxide (NO), the main RNS, is also related to plants' response to stress [9–11]. It acts at the level of the expression of the defense genes that are involved in eliminating ROS [12–14] and plays a key role in the defense mechanisms against different stressors [15], including heavy metals, such as Cd and As [9,16–19]. Heavy metals increase the synthesis of NO [9,16,20], which is involved in activating the antioxidant defense system and in eliminating the excess ROS that is

Article

Enzymes Involved in Antioxidant and Detoxification Processes Present Changes in the Expression Levels of Their Coding Genes under the Stress Caused by the Presence of Antimony in Tomato

Francisco Luis Espinosa-Vellarino ¹, Inmaculada Garrido ¹, Ilda Casimiro ¹, Ana Cláudia Silva ²,
Francisco Espinosa ^{1,*} and Alfonso Ortega ¹

- ¹ Grupo Investigación Fisiología y Biología Celular y Molecular de Plantas (BBB015), Facultad de Ciencias, Campus Avenida de Elvas s/n, Universidad de Extremadura, 06071 Badajoz, Spain; flespinosav@unex.es (F.L.E.-V.); igarridoc@unex.es (I.G.); casimiro@unex.es (I.C.); aortegagarrido@unex.es (A.O.)
- ² Centro Tecnológico Nacional Agroalimentario “Extremadura” (CTAEX), Ctra. Villafranco-Balboa 1.2, 06195 Badajoz, Spain; asilva@ctaex.es
- * Correspondence: espinosa@unex.es

Abstract: Currently, there is an increasing presence of heavy metals and metalloids in soils and water due to anthropogenic activities. However, the biggest problem caused by this increase is the difficulty in recycling these elements and their high permanence in soils. There are plants with great capacity to assimilate these elements or make them less accessible to other organisms. We analyzed the behavior of *Solanum lycopersicum* L., a crop with great agronomic interest, under the stress caused by antimony (Sb). We evaluated the antioxidant response throughout different exposure times to the metalloid. Our results showed that the enzymes involved in the AsA-GSH cycle show changes in their expression level under the stress caused by Sb but could not find a relationship between the *NITROSOGLUTATHIONE REDUCTASE* (*GSNOR*) expression data and nitric oxide (NO) content in tomato roots exposed to Sb. We hypothesize that a better understanding of how these enzymes work could be key to develop more tolerant varieties to this kind of abiotic stress and could explain a greater or lesser phytoremediation capacity. Moreover, we deepened our knowledge about Glutathione S-transferase (GST) and Glutathione Reductase (GR) due to their involvement in the elimination of the xenobiotic component.

Keywords: antimony; ascorbate; glutathione; glutathione reductase; glutathione-S-transferase; tomato



Citation: Espinosa-Vellarino, F.L.; Garrido, I.; Casimiro, I.; Silva, A.C.; Espinosa, F.; Ortega, A. Enzymes Involved in Antioxidant and Detoxification Processes Present Changes in the Expression Levels of Their Coding Genes under the Stress Caused by the Presence of Antimony in Tomato. *Plants* **2024**, *13*, 609. <https://doi.org/10.3390/plants13050609>

Academic Editor: Juan Barceló

Received: 24 November 2023

Revised: 9 February 2024

Accepted: 19 February 2024

Published: 23 February 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Plants are sessile organisms that can live in adverse conditions, where their growth and development are severely affected [1]. Due to this, plants have had to evolve and develop defense mechanisms that allowed them to survive and adapt to the changing environment [2,3]. Many of them, including crop species, are exposed to different stresses (biotic and abiotic or the combination of the two) in open fields [4]. Climate change is accelerating the appearance of symptoms caused by these severe conditions [5].

Heavy metals (HM) and metalloids are elements with an atomic mass and specific gravity higher than 20 and 5, respectively, and they are found in nature as subcomponents of the earth’s crust [6,7]. The contamination caused by these elements is a global problem for human health and the environment and, therefore, can cause abiotic stress to plants. Currently, the danger is greater due to their increased presence in fertile soils at high levels. These high levels can be mainly explained by anthropogenic activities, among others, becoming a potential risk for agricultural production, as they affect crop growth, development, and yield [7].

HM can be classified into essential and non-essential according to their biological importance and potential effect on plant growth and performance. Some examples of

