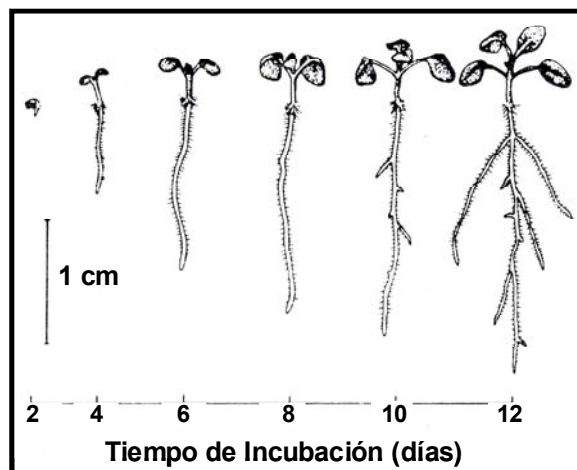


## 8. Detección de la FALDH en plántulas de *Arabidopsis* mediante tinción por actividad enzimática.

Los cambios fisiológicos y metabólicos que sufren las semillas después de la imbibición en agua culminan con el inicio de la división celular en el embrión y el desarrollo posterior de la plántula. Por lo general este proceso comienza por la radícula, que es el primer órgano que emerge a través de la cubierta de la semilla, produciendo la ruptura de la testa (Azcón-Bieto y Talón, 1993). La raíz temprana es conocida como radícula o raíz primaria. La semilla de *Arabidopsis* comienza a germinar entre las 24 y 48 horas después de la imbibición en agua. Las raíces laterales, comienzan a aparecer a partir del día 8 de crecimiento o, lo que es lo mismo del día 10 post-incubación (Figura 44). El desarrollo vegetativo se caracteriza por la producción de hojas de roseta con internodos muy cortos entre las hojas sucesivas. El número de hojas de roseta varía con las condiciones de crecimiento, en especial la temperatura y las horas de luz a las que está expuesta la planta (Bowman, 1994).



**Figura 44.** Representación esquemática del crecimiento y desarrollo de plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

Las plántulas de *Arabidopsis* fueron germinadas en placas de Petri con medio GM. Los ensayos de localización histoquímica de la actividad enzimática se realizaron en estadíos de desarrollo comprendidos entre las 24 horas y los 16 días después de la germinación. Las plántulas fueron teñidas por actividad enzimática FALDH adicionando formaldehído y glutatión como sustratos a una mezcla de reacción que contenía tampón fosfato de sodio, piruvato para inhibir la lactato deshidrogenasa, NBT como sustrato colorimétrico para deshidrogenasas y otras oxidasas,  $\text{NAD}^+$  como cofactor, y PMS como transportador de electrones que aceleraba la velocidad de la reacción. En el lugar de la planta donde existía actividad FALDH la oxidación del S-hidroximetilglutatión producía la reducción del coenzima  $\text{NAD}^+$  a NADH, el cual a su vez reducía el NBT que actuaba como aceptor final de electrones dando lugar a un precipitado azul oscuro.

Aunque la FALDH es la principal enzima responsable de metabolizar el formaldehído intracelular, existen otras enzimas que también pueden hacerlo, como la aldehído deshidrogenasa mitocondrial de levadura y de rata. Sin embargo, la aldehído deshidrogenasa tiene un valor de  $K_m$  para el formaldehído libre que es mayor de 400  $\mu\text{M}$  (Casanova-Schmitz et al., 1984), por lo que probablemente juega un papel menor en el metabolismo del formaldehído, aunque a las concentraciones utilizadas en el ensayo *in vitro*, podría contribuir a la aparición de background. Por otra parte, el glutatión reducido puede ser oxidado por la glutatión reductasa, generando también NADH. El S-hidroximetilglutatión presenta una constante de disociación ( $K_d$ ) de 1,5 mM, y por tanto, en el equilibrio coexisten formaldehído y glutatión libres con el S-hidroximetilglutatión. Para descartar los resultados inespecíficos por estos y otros posibles sistemas enzimáticos presentes en las plantas, se realizaron controles incubando las plantas solo con formaldehído ó solo con glutatión, utilizando dichas tinciones como controles negativos.

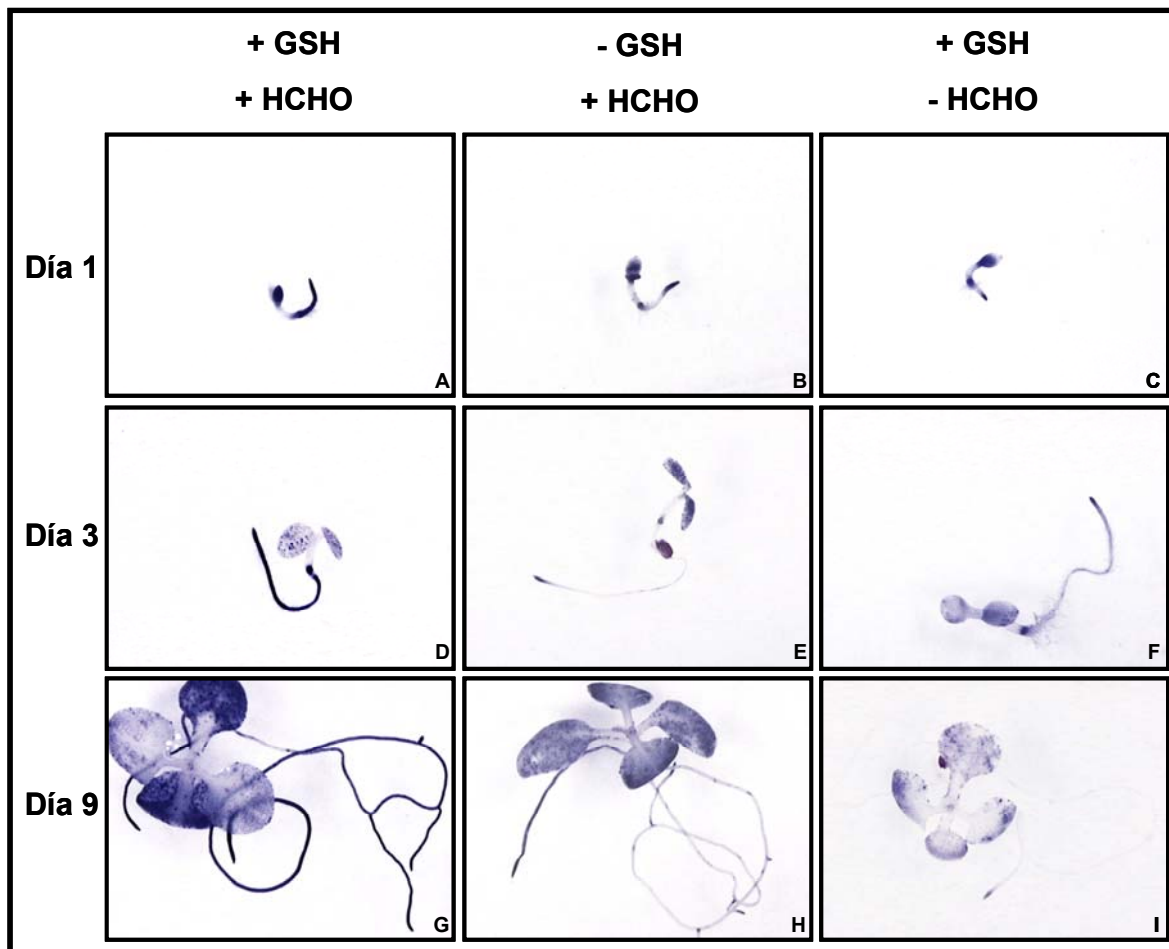
Todas las fotos que se muestran fueron capturadas con una CCD Cámara CV-950 Super color utilizando un objetivo Vivitar 28105 modelo N/AI-S y tubos de extensión Kenko de 36 mm y el Kenko de 20 mm, en el Departamento de Fisiología Vegetal de la

Universidad Autónoma de Barcelona. Cada serie de fotos se calibró mediante fotografías sobre un papel milimetrado que se usó como patrón.

En la Figura 45 se observa que las plántulas de 1 día presentan tinción en la radícula y en los cotiledones siendo más intensa en la radícula. En el hipocótilo no se detecta presencia de FALDH (Figura 45 A, B y C). La tinción en los cotiledones y en el meristemo apical de la raíz también se observa en los controles, por lo que no puede considerarse específica de la FALDH. Sí es específica en la zona de elongación de la raíz.

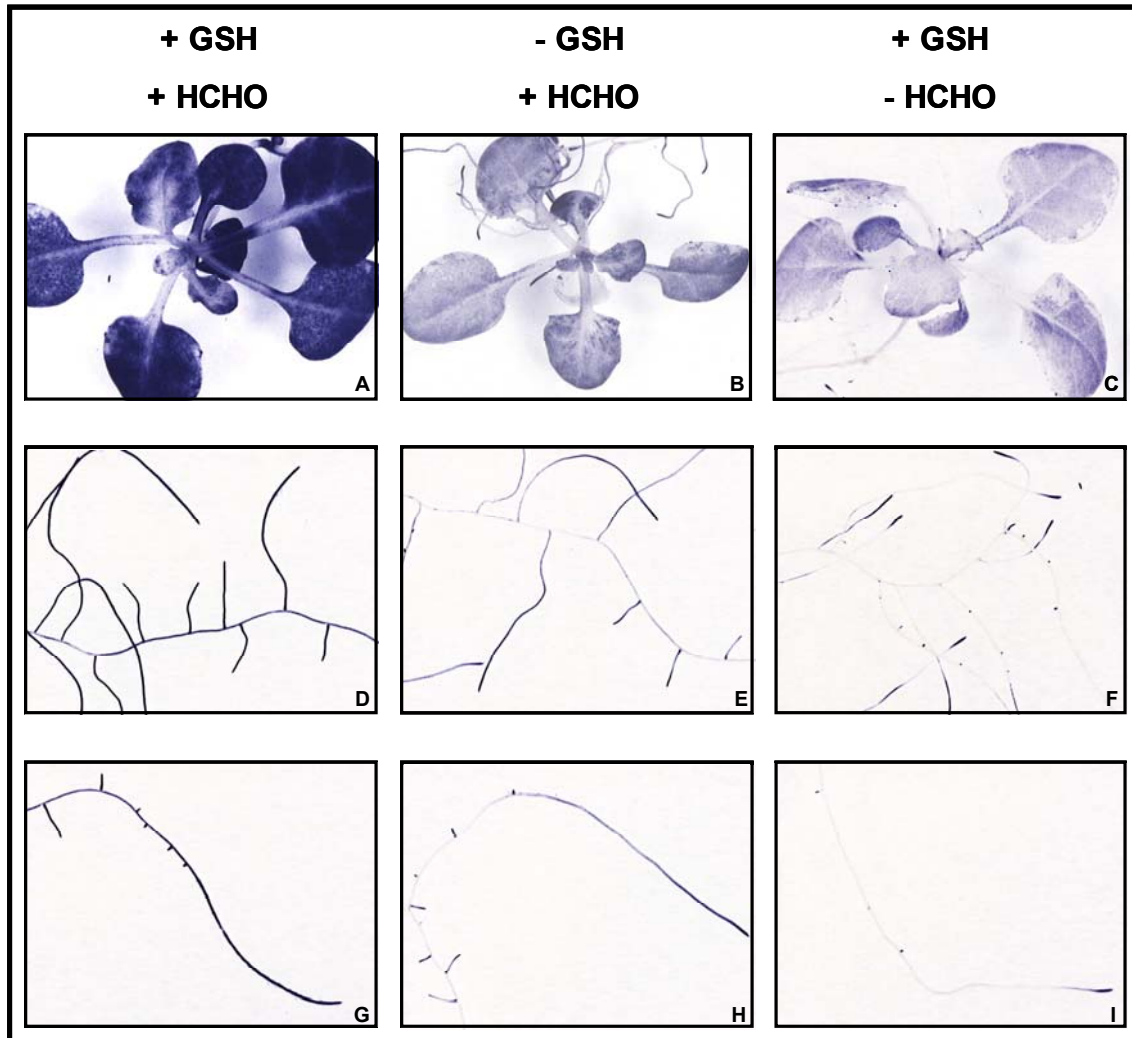
En plántulas de 3 días observamos que la tinción en la raíz es muy intensa y es específica tanto en la región meristemática como en la de elongación y en la de diferenciación (Figura 45 D).

A partir del día 9 de crecimiento, comenzamos a observar la aparición de raíces secundarias (Figura 45 J). La raíz secundaria al emerger presenta una elevada tinción lo que confirma la presencia de la FALDH en la zona meristemática (tanto de la raíz primaria como de la secundaria). Observamos también zonas azules intensas en las hojas como resultado de la actividad FALDH.



**Figura 45.** Actividad enzimática FALDH determinada por tinción histoquímica *in vivo*, en plántulas de *Arabidopsis thaliana* en diferentes estadios de desarrollo. La tinción con HCHO y GSH detecta la actividad FALDH (A, D y G). Como controles negativos se utilizó la tinción sólo con HCHO (B, E y H) o sólo con GSH (C, F y I). GSH, glutatión reducido.

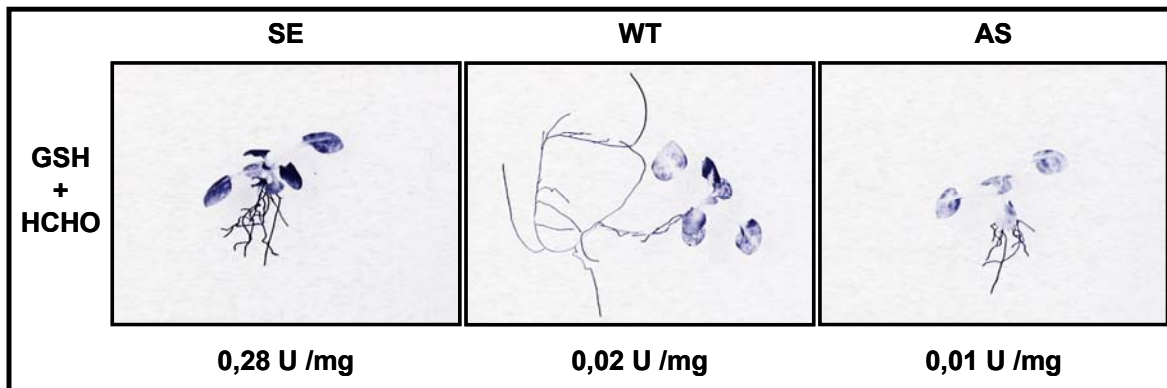
A los 16 días (Figura 46), observamos la planta completamente desarrollada con varias hojas de roseta. La señal continúa siendo intensa en hojas (Figura 46 A) y en raíz, tanto primaria como secundaria (Figura 46 D y G).



**Figura 46.** Actividad enzimática FALDH determinada por tinción histoquímica *in vivo*, en plántulas de *Arabidopsis* de 16 días. La tinción con HCHO y GSH detecta la actividad FALDH (A, D y G). Como controles negativos se utilizó la tinción sólo con HCHO (B, E y H) o sólo con GSH (C, F e I). GSH, glutatión reducido.

Con el fin de averiguar si este método podría ser utilizado para determinaciones cuantitativas, realizamos la tinción histoquímica con las plantas transgénicas de sobreexpresión de la FALDH (Achkor et al., 2003) y con plantas transgénicas antisentido. En la Figura 47 se muestran los resultados obtenidos con plántulas transgénicas y plántulas sin transformar, de 8 días. En el caso de las plántulas control (wt) vemos menos señal que en las Figuras 45 y 46 debido a que el tiempo de incubación con la solución de tinción fue la mitad para evitar la saturación de color en las plántulas transgénicas de sobreexpresión. Como se puede observar, la señal es

mucho más intensa en las plántulas transgénicas de sobreexpresión que en las plántulas antisentido y que en las plántulas control. Estos resultados demuestran que la intensidad de la tinción es proporcional a la cantidad de FALDH presente en la planta.



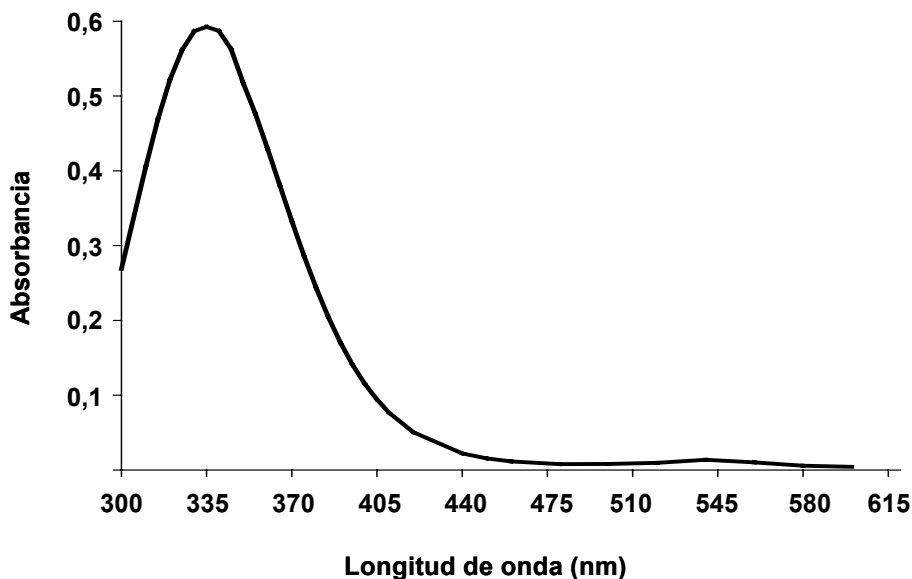
**Figura 47.** Actividad enzimática FALDH determinada por tinción histoquímica *in vivo*, en plántulas transgénicas y sin transformar de *Arabidopsis thaliana* de 8 días. La tinción con HCHO y GSH detecta la actividad FALDH. En la parte inferior de la figura se muestra los valores de actividad específica de la FALDH de cada una de las líneas en estudio, medidas a partir de extractos proteicos. Las abreviaturas utilizadas fueron las siguientes: AS, plántulas transgénicas antisentido; SE, plántulas transgénicas de sobreexpresión; wt, plántulas de *Arabidopsis* sin transformar.

## 9. Papel de la FALDH en las reacciones de defensa de las plantas.

Como se ha mencionado en la Introducción, recientemente se ha descubierto que la FALDH presenta una fuerte actividad GSNO reductasa (Sakamoto et al., 2002). El óxido nítrico (NO), y algunos metabolitos relacionados con él, tienen funciones importantes en la transducción de señales en las reacciones de defensa de las plantas (Wendehenne et al., 2001). Por esta razón nos interesaba estudiar el efecto de la modificación de los niveles intracelulares de FALDH / GSNO reductasa en las interacciones planta-patógeno. Para ello realizamos en primer lugar mediciones de la actividad enzimática GSNO reductasa en las diferentes líneas transgénicas y después infectamos las líneas seleccionadas con el oomiceto *Peronospora parasitica* y con la bacteria *Pseudomonas syringae*.

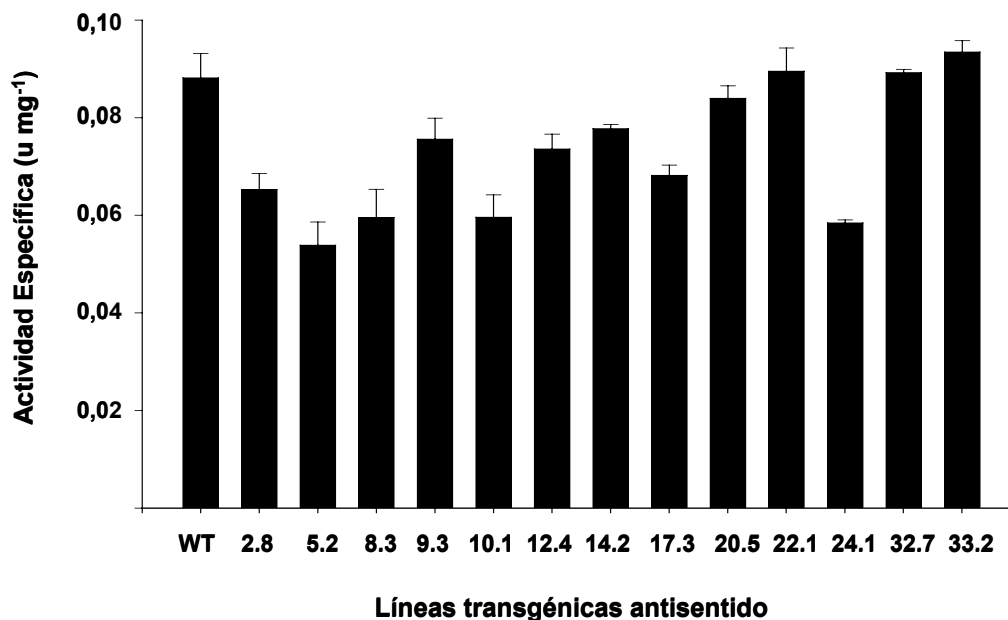
### 9.1 Actividad GSNO reductasa en las líneas transgénicas de *Arabidopsis*.

Para determinar la actividad GSNO reductasa es necesario preparar al momento el S-nitrosoglutatión (GSNO), ya que es un compuesto inestable (véase Materiales y Métodos). Una vez preparado, debe hacerse un espectro de absorción para calcular su concentración (Figura 48). El pico de mayor densidad óptica se observa a los 335 nm, y es el valor de absorbancia a esa longitud de onda el que se utiliza para calcular la concentración, utilizando un coeficiente de extinción molar para el GSNO de  $800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 48.** Espectro de GSNO a las longitudes de ondas comprendidas entre 300 y 600 nm. El pico de máxima absorbancia se observa a los 335 nm.

La actividad específica S-nitrosoglutatión reductasa de las plantas transgénicas antisentido se representa en la Figura 49. La actividad se midió con 0,5 mM de NADH y 1 mM de GSNO a 340 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar de  $7060 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

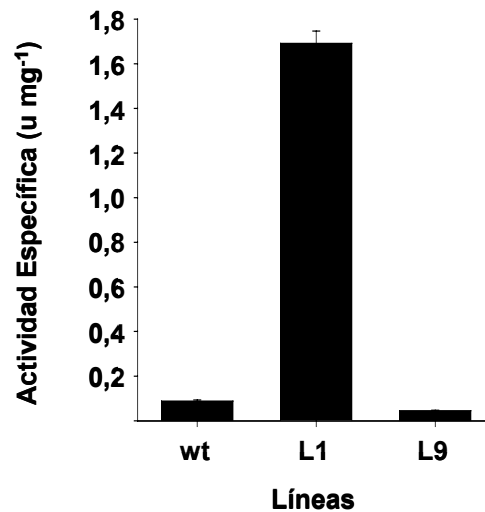


**Figura 49.** Actividad específica GSNO reductasa de las plantas transgénicas antisentido. En la gráfica se representan las actividades de 13 líneas transgénicas antisentido. La actividad específica se midió tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos muestran una disminución de la actividad GSNO reductasa de las plantas transgénicas con respecto al control. Observamos que en varias líneas la disminución de la actividad llega hasta un 36 % aproximadamente. En algunas líneas transgénicas existen discrepancias con la actividad obtenida frente al sustrato S-hidroximetilglutación.

La Figura 50 muestra la actividad GSNO reductasa de una línea transgénica de sobreexpresión y de una línea transgénica de cosupresión en relación con el control.





**Figura 50.** Actividad GSNO reductasa de una línea transgénica de sobreexpresión (L1) y una línea transgénica de cosupresión (L9). La actividad específica se midió tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

## 9.2 Infección de plantas de *Arabidopsis thaliana* con patógenos bacterianos y oomicetos.

Todos los estudios de interacción planta-patógeno se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Chris Lamb del John Innes Centre, Norwich, Reino Unido, bajo la supervisión de la Dra. Christine Rusterucci.

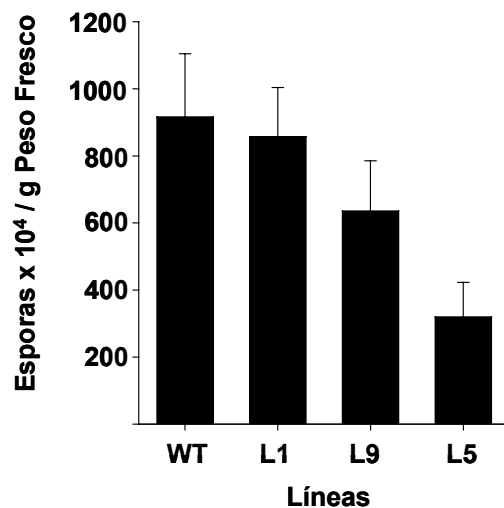
Para realizar los experimentos que se describen a continuación, utilizamos 3 líneas transgénicas con niveles modificados de la FALDH: una línea de sobreexpresión (L1); una línea de cosupresión (L9) y una línea antisentido (L5). La sobreexpresión de la FALDH de la línea 1 era de 18 veces, mientras que la inhibición de las líneas 5 y 9 era del 50 % aproximadamente. Como control usamos plantas de *Arabidopsis* de fenotipo salvaje sin transformar genéticamente (plantas wt).

## 9.2.1 Papel de la FALDH / GSNO reductasa en la resistencia basal.

### 9.2.1.1 Infección con *Peronospora parasitica*.

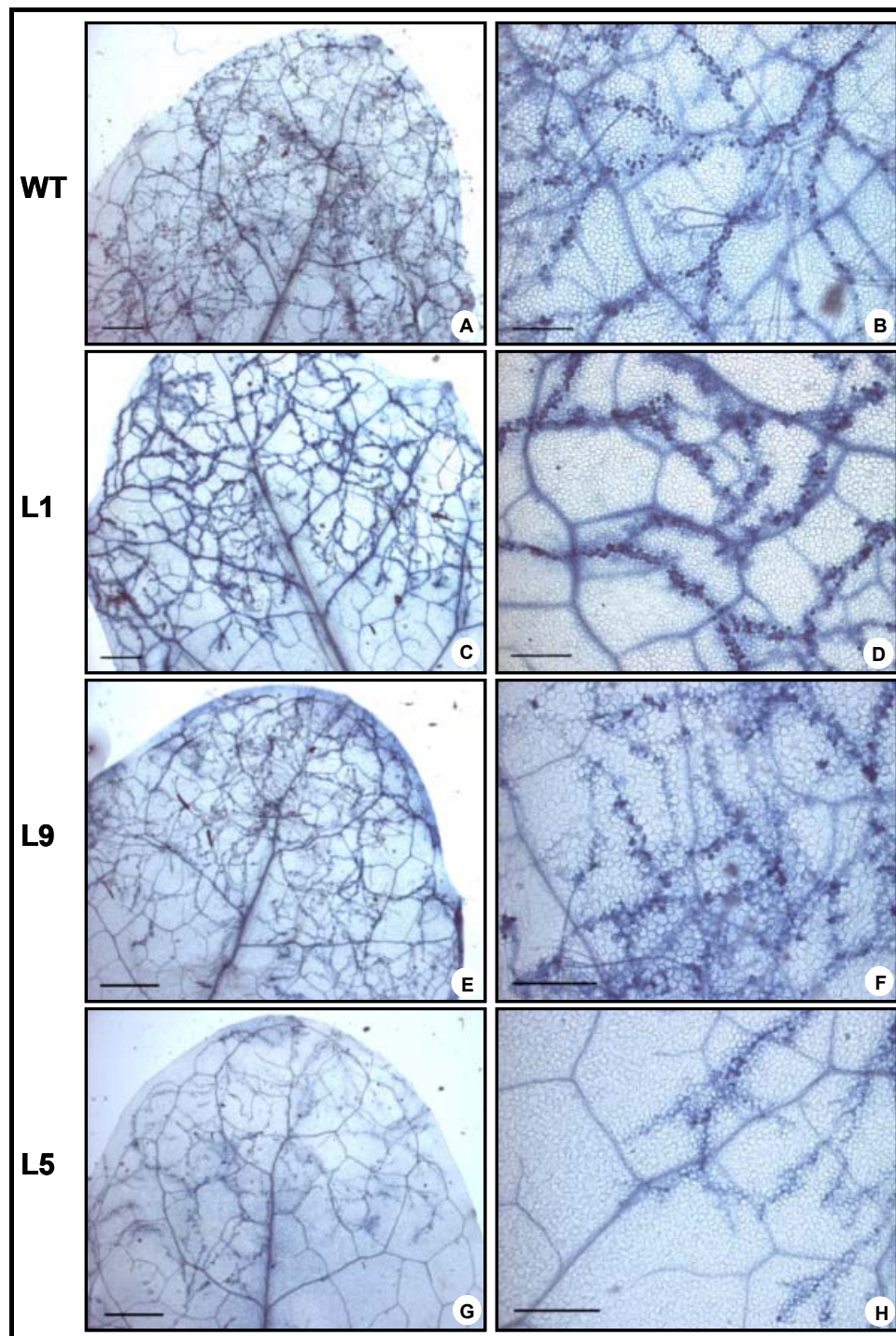
En la familia de las Crucíferas, el oomiceto *Peronospora parasitica* causa una infección con aspecto de moho. Esta enfermedad prevalece en condiciones de frío y humedad, las cuales favorecen la producción de esporas y su diseminación (Koch y Slusarenko, 1990).

Para la infección con el oomiceto de tipo virulento (*Peronospora parasitica* Noco2), utilizamos plantas de 4 semanas que fueron inoculadas mediante spray con una suspensión de dicho oomiceto. Seis días después de la inoculación se procedió al conteo de esporas. El número de esporas en la línea control (*Arabidopsis* sin transformar, wt) fue similar al de la línea transgénica de sobreexpresión (L1). La esporulación en la línea transgénica de cosupresión (L9) estaba ligeramente disminuida (entre el 20-25 %), mientras que en la línea transgénica antisentido (L5) observamos una fuerte reducción del número de esporas, aproximadamente un 60 % (Figura 51).



**Figura 51.** Resistencia basal frente a *Peronospora parasitica* (cepa Noco2) en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Se realizó el conteo de esporas 6 días después de la inoculación con la cepa. Las abreviaturas utilizadas son las siguientes: wt, plantas de fenotipo salvaje de *Arabidopsis thaliana*; L1, línea transgénica de sobreexpresión; L9, línea transgénica de cosupresión; L5, línea transgénica antisentido. Las barras representan los valores medios  $\pm$  SD de 5 mediciones independientes. Obtuvimos resultados similares en 2 experimentos independientes.

Utilizando tinciones con lactophenol trypan blue, estudiamos el crecimiento del oomiceto y su esporulación asexual (Figura 52). Tanto en la línea control (wt) como en las líneas transgénicas de sobreexpresión (L1) y de cosupresión (L9) apreciamos un extenso crecimiento de *Peronospora parasitica*. Sin embargo, en la línea transgénica antisentido (L5) el crecimiento estaba muy limitado, confirmando su mayor resistencia a la infección con la cepa Noco2.



**Figura 52.** Crecimiento de *Peronospora parasitica* Noco2 en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Las abreviaturas utilizadas son las siguientes: wt, plantas de fenotipo salvaje de *Arabidopsis thaliana*; L1, línea transgénica de sobreexpresión; L9, línea transgénica de cosupresión; L5, línea transgénica antisentido. Las hojas fueron teñidas con lactophenol-trypan blue. Barras de calibración: A, C, E y G, 800  $\mu\text{m}$ ; B, D, F y H, 300  $\mu\text{m}$ .

### 9.2.2 Infección con *Pseudomonas syringae*.

*Pseudomonas syringae* es una bacteria gram-negativa con flagelo polar que le permite moverse por un medio acuoso (Agrios, 1997). *P. syringae* penetra en el tejido huésped (preferiblemente por las hojas) ya sea a través de una herida o aprovechando alguna apertura natural como los estomas, multiplicándose en los espacios intracelulares. Las hojas infectadas muestran zonas con una apariencia como si estuvieran mojadas, y pueden llegar a convertirse en lesiones necróticas (Katagiri et al., 2002). *P. syringae* puede infectar una amplia variedad de plantas, incluyendo *Arabidopsis*.

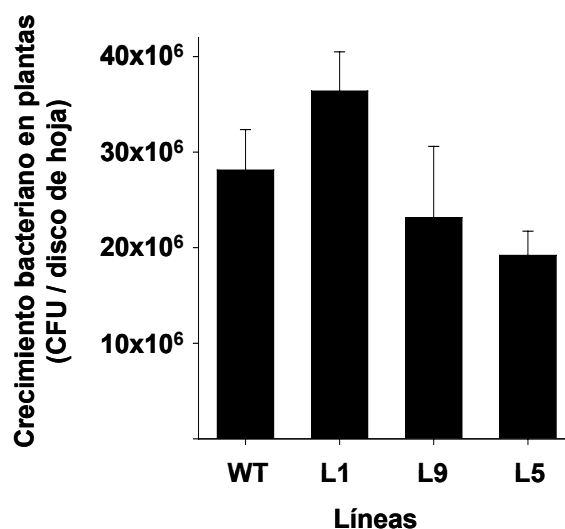
Las hojas de las plantas de *Arabidopsis* fueron infiltradas con la solución bacteriana por medio de una jeringa, como se muestra en la Figura 53. Para que la solución penetre mejor en la hoja se recomienda infiltrar la zona abaxial de la misma, con mucho cuidado para evitar que se produzcan heridas.



**Figura 53.** Infiltración de *P. syringae* en hojas de *Arabidopsis thaliana*.

Transcurridos 2 días después de la inoculación con *Pseudomonas syringae* pv *maculicola* (*Psm*), observamos un mayor crecimiento de la bacteria en la línea transgénica de sobreexpresión, lo que implica una mayor susceptibilidad a la infección.

La línea transgénica antisentido mostraba un crecimiento bacteriano de casi la mitad que el de la línea transgénica de sobreexpresión y de aproximadamente un 32 % menor que el de las plantas control, implicando la presencia de una mayor resistencia a la infección. La línea de cosupresión (L9) presentaba un comportamiento similar al de las plantas control (Figura 54). Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la infección con *Peronospora parasitica* Noco2.



**Figura 54.** Resistencia basal frente a *Pseudomonas syringae* pv *maculicola* (*Psm*) en *Arabidopsis thaliana*. La inoculación se realizó en plantas de 4 semanas. Dos días después de la inoculación se tomaron muestras y se observó el crecimiento bacteriano en placas con medio de cultivo KM durante 48 horas. La inoculación se realizó con  $10^6$  CFU/ml de la bacteria virulenta *Psm*. Las abreviaturas utilizadas son las siguientes: wt, plantas de fenotipo salvaje de *Arabidopsis thaliana*; L1, línea transgénica de sobreexpresión; L9, línea transgénica de cosupresión; L5, línea transgénica antisentido. Las barras representan los valores medios  $\pm$  SD de 3 mediciones independientes.

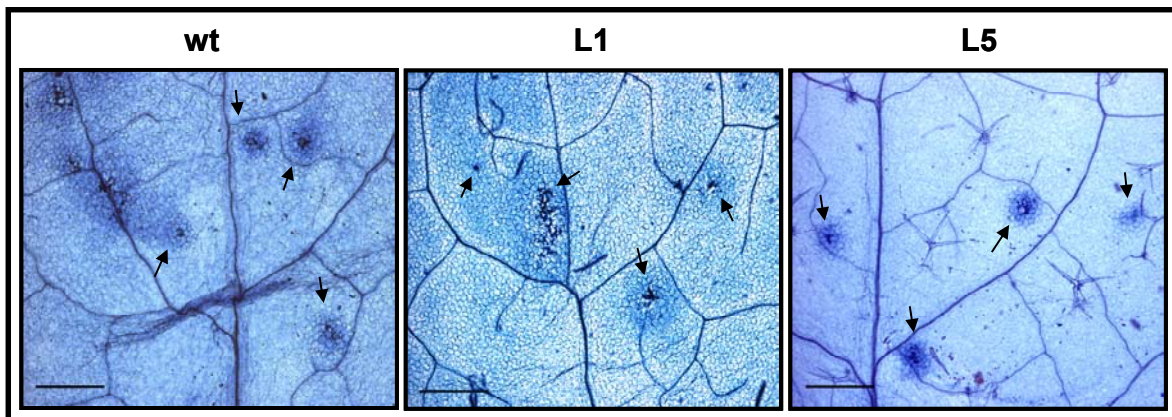
### 9.3 Papel de la FALDH / GSNO reductasa en las interacciones incompatibles planta-patógeno.

#### 9.3.1 Papel en la respuesta de hipersensibilidad (HR) con oomicetos.

En las interacciones planta-patógeno de tipo incompatible el reconocimiento específico gen a gen (avr-R) induce respuestas defensivas tanto en el sitio local de la

interacción como en órganos de la planta alejados del mismo. Una de las primeras manifestaciones es la llamada respuesta de hipersensibilidad (HR), que implica una muerte celular localizada en el lugar de la infección. La respuesta de hipersensibilidad puede ser medida por tinción con lactophenol trypan blue.

En hojas infectadas con la cepa avirulenta Cala2 del oomiceto *Peronospora parasitica* (Figura 55) observamos que no existen diferencias significativas entre las diferentes líneas transgénicas y el control. Por tanto, no parece que la variación en los niveles de la FALDH / GSNO reductasa afecte a la respuesta local en las interacciones planta-patógeno de tipo incompatible, por lo menos a nivel fenotípico.

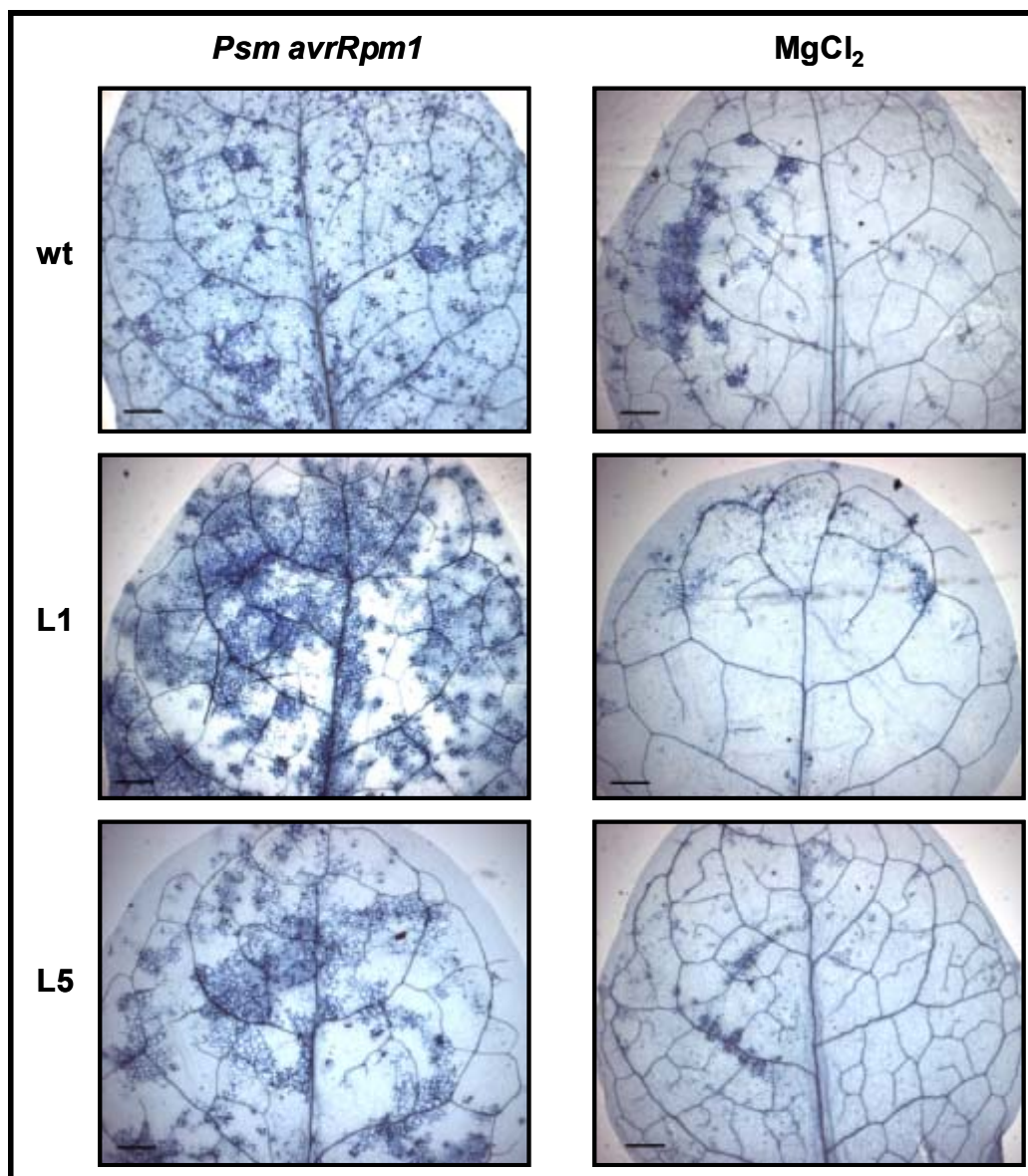


**Figura 55.** Infección de plantas de *Arabidopsis thaliana* con la cepa avirulenta Cala2 de *Peronospora parasitica*. Las abreviaturas utilizadas son las siguientes: wt, plantas de fenotipo salvaje de *Arabidopsis thaliana*; L1, línea transgénica de sobreexpresión, L5, línea transgénica antisentido. Las hojas fueron teñidas con lactophenol-trypan blue. Las flechas negras indican la muerte celular por HR. Barras de calibración: 500  $\mu$ m.

### 9.3.2 Papel en la respuesta de hipersensibilidad (HR) con bacterias.

Cuando infiltramos hojas de las diferentes líneas de *A. thaliana* con la cepa avirulenta *Psm avrRpm1* de *Pseudomonas syringae*, observamos que la línea de sobreexpresión (L1) mostraba mayor respuesta de hipersensibilidad que la línea

transgénica antisentido y que las plantas control. Las líneas L5 y wt presentaron una respuesta de hipersensibilidad similar (Figura 56). Como control del experimento utilizamos hojas infiltradas con cloruro de magnesio, que fue el medio utilizado en la suspensión bacteriana.



**Figura 56.** Infección de plantas de *Arabidopsis thaliana* mediante infiltración con la cepa avirulenta *Psm avrRpm1* de *Pseudomonas syringae*. Las abreviaturas utilizadas son las siguientes: wt, plantas de fenotipo salvaje de *Arabidopsis thaliana*; L1, línea transgénica de sobreexpresión, L5, línea transgénica antisentido. Las hojas fueron teñidas con lactophenol-trypan blue. Barras de calibración: 500  $\mu\text{m}$ .



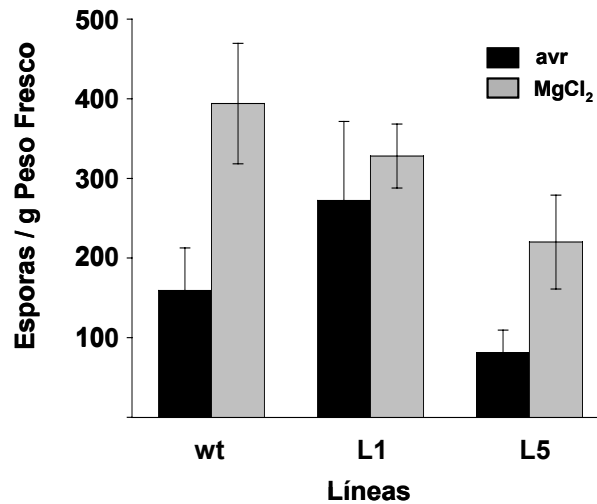
#### 9.4 Papel de la FALDH / GSNO reductasa en el establecimiento de la resistencia sistémica adquirida (SAR).

La interacción planta-patógeno también provoca un tipo de respuesta defensiva que actúa en toda la planta e implica la síntesis y transporte de una señal móvil que induce un conjunto de genes de defensa. A esta respuesta se le conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR) (Azcón-Bieto y Talón, 2001).

Realizamos los experimentos de SAR utilizando una combinación de bacteria avirulenta con oomiceto virulento. De esta forma las hojas fueron infiltradas con la bacteria y después rociadas con un spray conteniendo la suspensión del oomiceto. La respuesta se midió por contaje de esporas. No se utilizó la combinación bacteria / bacteria porque se necesita realizar 2 infiltraciones en la misma hoja, lo cual es mucho más laborioso y conlleva un mayor riesgo de producir daño mecánico indeseado.

Se contó el número de esporas en hojas de *Arabidopsis* rociadas con la cepa virulenta *Peronospora parasitica* Noco2. Estas plantas habían sido infiltradas 2 días antes con la bacteria avirulenta *Pseudomonas syringae* pv maculicola (que contenía el plásmido pLAFR3 ± *avrRpm1*) en 2 hojas de la roseta. Como control se utilizaron plantas infiltradas con MgCl<sub>2</sub> a la misma concentración que el utilizado para realizar la suspensión de bacterias. En la Figura 57 puede verse que la línea de sobreexpresión (L1) apenas muestra respuesta SAR (el número de esporas en las plantas infiltradas previamente con la bacteria avirulenta con respecto a las infiltradas con cloruro de magnesio no presentaban diferencias significativas,  $p > 0,1$ ), lo cual indica que un aumento de los niveles intracelulares de la FALDH, provoca una drástica disminución de la señal necesaria para que se active SAR. La línea transgénica antisentido (L5) muestra una buena respuesta SAR parecida a la del control (ambas presentaban diferencias altamente significativas entre el número de esporas de las plantas infiltradas

previamente con la bacteria avirulenta con respecto a las infiltradas con cloruro de magnesio,  $p \leq 0,01$ ).



**Figura 57.** Resistencia sistémica adquirida (SAR) en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Las abreviaturas utilizadas son las siguientes: wt, plantas de fenotipo salvaje de *Arabidopsis thaliana*; L1, línea transgénica de sobreexpresión; L5, línea transgénica antisentido. Las barras representan los valores medios  $\pm$  SD de 5 mediciones independientes.

Actualmente estamos analizando a nivel molecular esta respuesta, midiendo si existen variaciones en los niveles de mRNA de diferentes genes de defensa (PAL, GST, PR1) que normalmente se inducen en las interacciones incompatibles. Estos análisis los realizaremos tanto en las interacciones con oomicetos (Noco2 y Cala2) como con las bacterias (*Psm* y *avrRpm1*). Los resultados que obtengamos con esta serie de experimentos aportarán las bases para seguir investigando la importancia de la enzima FALDH / GSNO reductasa en los mecanismos de defensa en plantas.



## DISCUSIÓN

En esta Tesis Doctoral se ha profundizado en el estudio de la FALDH / GSNO reductasa de *Arabidopsis thaliana* con el objetivo general de obtener datos funcionales sobre dicha proteína. Durante este capítulo discutiremos y demostraremos que:

- La expresión de la FALDH está regulada por diferentes hormonas vegetales y por herida.
- En las plantas transgénicas antisentido existe una relación entre la disminución de la actividad enzimática y los niveles de proteína.
- Las plantas transgénicas antisentido presentan una menor capacidad de metabolizar formaldehído exógeno.
- Las plantas transgénicas con niveles de FALDH modificados presentan un fenotipo diferente.
- La FALDH presenta un patrón de expresión en hojas y en raíz que es específico del tipo celular.
- La FALDH está presente en citoplasma, núcleo y cloroplasto.
- Las plantas transgénicas con niveles disminuídos de FALDH (plantas antisentido) presentan un aumento de la resistencia basal a patógenos fúngicos y bacterianos.

Para nuestros experimentos hemos utilizado los siguientes sistemas biológicos: células de tabaco en suspensión (línea BY2), plantas de *Arabidopsis thaliana* y plantas de *Raphanus sativus*.

Los cultivos celulares vegetales son muy utilizados para investigar la fisiología y la bioquímica de las plantas, ya que son sistemas sencillos y sus condiciones de crecimiento pueden ser bien controladas. Además, constituyen una herramienta importante en biotecnología vegetal. Por las razones expuestas, por su rápido crecimiento, y por su homogeneidad en la respuesta, consideramos que la línea celular de tabaco BY2 era un sistema idóneo para comenzar a estudiar la respuesta de la FALDH frente a diferentes moléculas señalizadoras que intervienen en las interacciones planta-patógeno, tales como el ácido salicílico o el ácido jasmónico.

Las plántulas germinadas y crecidas en medio líquido también constituyen un buen modelo para estudios moleculares, principalmente cuando se quiere investigar el efecto de determinados compuestos, ya que se pueden controlar muy bien las condiciones de crecimiento, y las sustancias suministradas en el medio de cultivo son absorbidas rápidamente. A diferencia de los cultivos celulares, las plántulas están formadas por diferentes tipos celulares, los mismos que constituyen la planta adulta, y esto hace que los resultados en este sistema sean más cercanos a la realidad.

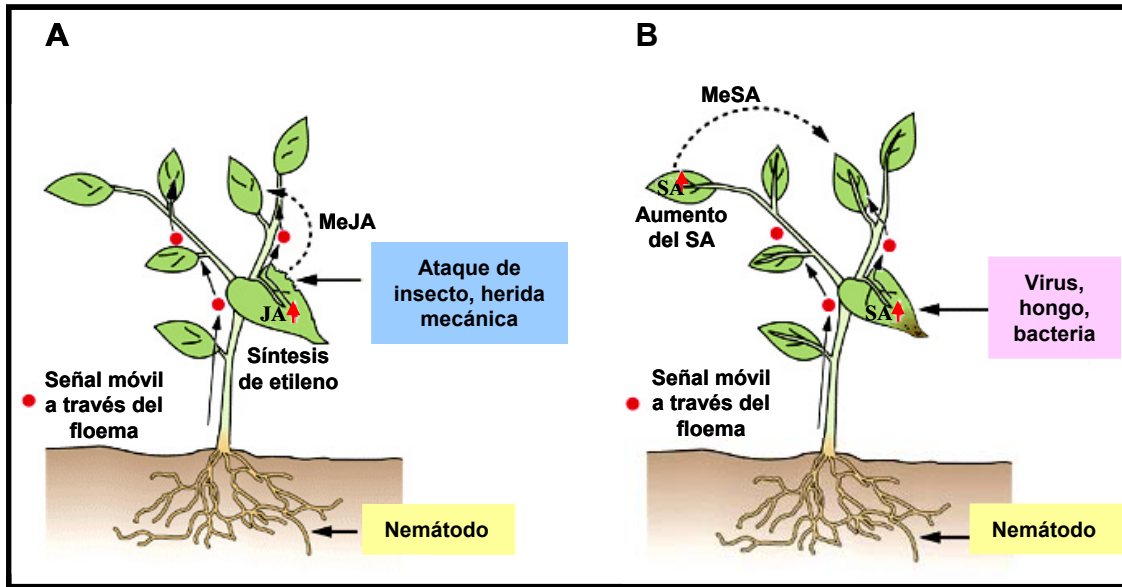
## **1. La expresión de la FALDH está regulada por diferentes hormonas vegetales y por herida.**

El ácido jasmónico y el metil jasmonato se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas. El JA altera específicamente la expresión génica. Las lesiones físicas, el déficit hídrico y elicitores obtenidos de la pared celular de hongos originan acumulación de JA y MeJA en plantas. Estos resultados indican que el jasmonato tiene un papel de defensa en las plantas. El JA activa genes implicados en la resistencia frente a

insectos, y genes que codifican por proteínas de reserva. En respuesta a herida, se acumulan transcritos que codifican por genes implicados en la síntesis de JA y genes que responden a JA (Figura 58 A). Se ha demostrado que la sistemina, un polipéptido de 18 aminoácidos, se mueve por el floema e induce la síntesis de JA y la expresión de genes que responden al mismo en las zonas más apicales de las plantas. Además de la sistemina, el ABA, el etileno y la corriente eléctrica desempeñan un papel importante transmitiendo la señal de la herida a jasmonatos. También se ha comprobado que tanto el JA como el MeJa modulan múltiples aspectos del desarrollo de las plantas (Azcón-Bieto y Talón, 2001).

Las plantas responden a un gran número de condiciones adversas desfavorables, como déficit hídrico, salinidad, encharcamiento, calor, frío, producción de lesiones y ataque de patógenos, incrementando la síntesis de ABA. En respuesta a las lesiones o heridas mecánicas, los niveles de ABA aumentan 5 veces en tomate y patata, incluso en aquellos tejidos que no han sido lesionados, por lo que se ha descrito que el incremento de ABA en respuesta a herida es sistémico. El ácido jasmónico induce algunos genes que también se expresan por ABA, incluyendo los *pin2*, lo que indica que las rutas de estos dos reguladores del crecimiento pueden interactuar modulando elementos comunes en respuesta a la herida (Azcón-Bieto y Talón, 2001).

El ácido salicílico participa en la protección de la planta a diferentes tipos de estrés actuando como molécula señalizadora (Figura 58 B). Cuando la planta advierte el ataque de un patógeno, se activa la síntesis de SA a partir de ácido benzoico. El SA libre se une entonces a la enzima catalasa y bloquea su capacidad para convertir el  $H_2O_2$  en oxígeno y agua. El incremento del nivel de  $H_2O_2$  y de otras ROS, estimula la expresión de genes de defensa, como los que codifican por las proteínas PR. El SA también induce la llamada respuesta SAR (Azcón-Bieto y Talón, 2001).



**Figura 58.** Representación esquemática de las vías de señalización en las respuestas de defensa frente a diferentes patógenos. La figura fue extraída del libro *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Buchanan, Gruisen and Jones, Eds. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA. ISBN 0-943088-40-2.

### 1.1 Ácido Abscísico (ABA).

Los resultados obtenidos en células de tabaco BY2 mostraban que no se producía ninguna variación en la actividad específica de la FALDH en respuesta a ABA. Diferentes genes de respuesta a herida en tomate, que son fuertemente activados por señalizadores primarios tales como oligosacáridos (Walker-Simmons y Ryan, 1986), sistemina (Pearce et al., 1991; Schaller et al., 1995) y JA (Farmer et al., 1992; Peña-Cortés et al., 1996; Wasternack et al., 1996), son débilmente activados por ABA o simplemente no activados.

Originalmente se propuso un modelo para la cascada de señalización sistémica en el cual las heridas y los elicitores activaban los genes de defensa a través de la vía de los octadecanoides (Farmer et al., 1992; Doares et al., 1995). Este modelo fue posteriormente modificado para incluir el ABA como componente obligatorio, que se situaría entre el JA y el péptido sistemina (Peña-Cortés et al., 1996; Wasternack y

Parthier, 1997), basándose en la capacidad del ABA para activar algunos genes de defensa (Peña- Cortés et al., 1989, 1996; Herde et al., 1996; Wasternack et al., 1996). El modelo modificado predijo también que el ABA se acumulaba en respuesta a heridas. Sin embargo, recientemente se ha descubierto que la acumulación de ABA aumenta en tejidos heridos en un radio de 0,5 cm alrededor del lugar de la lesión, lo cual puede ser debido a una deshidratación local provocada por la herida. Además, no se ha detectado acumulación de ABA en hojas distantes (Birkenmeier y Ryan, 1998). La imposibilidad de los mutantes deficientes de ABA en tomate para activar los genes de defensa a heridas (Peña-Cortés et al., 1989, 1996; Herde et al., 1996) indica que la presencia de niveles fisiológicos de ABA puede ser necesaria para potenciar la cascada de señalización de herida aunque se desconoce la forma específica en que esto pueda ocurrir. Sin embargo, parece claro que ABA actualmente no es un componente fundamental de la cascada sistémica de transducción de señales, y que por lo tanto, su función podría ser la de mantener las condiciones fisiológicas de la planta de forma tal que permita que su respuesta a herida funcione eficazmente.

## 1.2 Ácido Salicílico (SA).

Los tratamientos de las células BY2 con SA se llevaron a cabo a una concentración de 150  $\mu$ M. Previamente habíamos observado que la concentración de 1 mM de SA, frecuentemente utilizada en la literatura, resultaba ser una dosis letal, ya que solo el 1 % de las células sobrevivían al tratamiento. Sin embargo, a 150  $\mu$ M de SA obteníamos un 95 % de viabilidad, similar a la del control. Observamos un notable incremento en la actividad específica de la FALDH a partir de las 5 horas de tratamiento, que era directamente proporcional al aumento de la cantidad de enzima.

Los mismos experimentos se realizaron en plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en medio líquido. En este caso fue necesaria la utilización de una concentración de 0,5 mM de SA para observar un aumento en la cantidad de proteína y de mRNA del gen *ADH2*. No observamos síntomas de necrosis ni de muerte celular



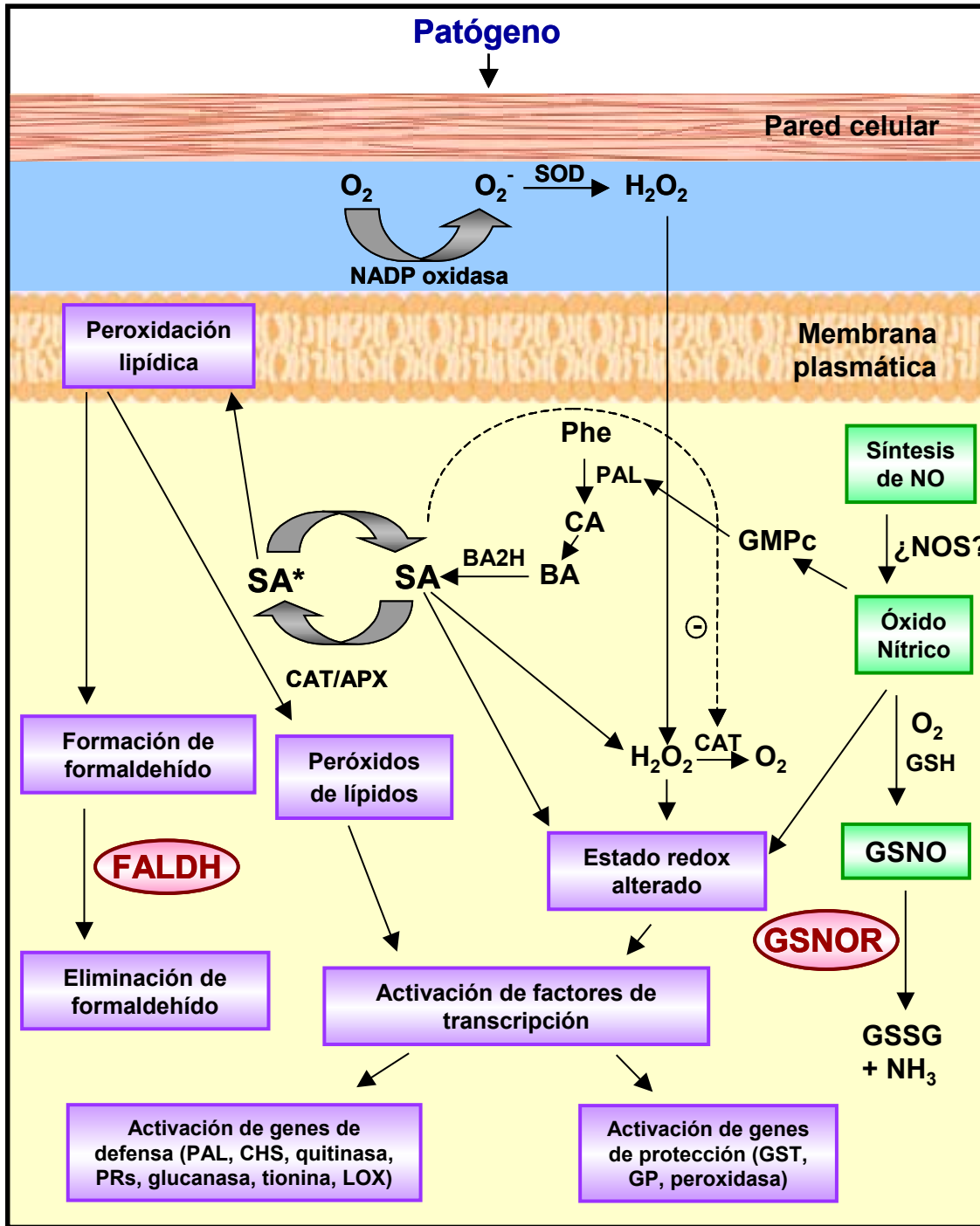
después de 48 horas de incubación con SA, lo que demuestra que existen diferencias importantes en la sensibilidad al SA de la suspensión celular de tabaco y de las plántulas de *Arabidopsis*. La inducción del gen *ADH2* en respuesta a SA sugiere que la FALDH puede jugar un papel importante en la protección de las células vegetales frente al estrés oxidativo y/o nitrosativo. Aún no está claro cual es la relación que existe entre las vías de señalización del NO y de ROS, compuestos que estimulan la acumulación de SA (Durner et al., 1998; Kumar y Klessig, 2000). Por otro lado, la importancia de la FALDH frente al estrés nitrosativo ha sido demostrada en levadura y en rata, donde la delección del gen que codifica por la FALDH incrementa la susceptibilidad de las células al estrés nitrosativo, observándose la acumulación de proteínas nitrosiladas (Liu et al., 2001).

Desde hace algún tiempo se ha asociado el SA con la inducción de los mecanismos de defensa en las plantas, ya que su aplicación exógena es suficiente para activar la expresión de algunos genes de defensa. Además, el ataque por patógenos provoca la acumulación de ácido benzoico (BA) y SA en las inmediaciones del lugar de la infección. La inducción de estos compuestos se asocia normalmente con la respuesta de hipersensibilidad (Raskin, 1992), que viene precedida por la síntesis de especies reactivas del oxígeno (ROS), tales como el  $O_2^-$ , que es transformado en  $H_2O_2$  por la acción de la superóxido dismutasa (SOD) (Rao et al., 1997), provocando un estado de estrés oxidativo en la célula. Por otra parte, el aumento de los niveles de SA genera más  $H_2O_2$ , probablemente a través de la inhibición de una catalasa, resultando en altas concentraciones de radicales libres que alteran el estado redox celular y que activan varios genes involucrados en la defensa (Levine et al., 1994). Además, la interacción entre SA y catalasas (CAT) y ascorbato peroxidasas (APX) podría dar lugar a la formación del radical libre  $SA^*$  (Durner y Klessig, 1996), que iniciaría la peroxidación de los lípidos de la membrana. Los peróxidos de lípidos liberados podrían actuar como señales moleculares para la activación de algunos genes de defensa (Durner y Klessig, 1996). Entre los productos de la peroxidación lipídica se encuentra el formaldehído, un producto muy citotóxico (Figura 59). Por tanto, la inducción de la FALDH que nosotros

observamos como consecuencia de los tratamientos con SA, podría responder a la necesidad de eliminación del exceso de formaldehído que se forma como consecuencia del estrés oxidativo causado por la aplicación exógena de SA. Esto indicaría un papel activo de la FALDH en los mecanismos de protección celular provocado por un exceso de radicales libres.

Por otra parte, se conoce que el NO y los metabolitos relacionados con el NO, tales como los S-nitrosotioles, juegan un papel importante en la traducción de señales de las reacciones de defensa de las plantas (Wendehenne et al., 2001; Delledonne et al., 1998). El S-nitrosoglutatión (GSNO) es uno de los metabolitos endógenos más abundantes del NO, formado por reacción del NO con el glutatión en presencia de oxígeno (Gaston et al., 1993). Como ya hemos descrito en la Introducción, la FALDH tiene también actividad S-nitrosoglutatión reductasa. Cuando una planta es atacada por patógenos, se incrementan los niveles de NO y se activa la molécula señalizadora GMPc que a su vez es capaz de activar la expresión de la fenilalanina amonio liasa (PAL) e inducir la biosíntesis de SA (Klessig et al., 2000). Al aumentar los niveles de NO podrían aumentar también los de GSNO, por lo que la FALDH / GSNOR podría participar en la eliminación de GSNO protegiendo así a la planta de los efectos tóxicos del NO.

Por todo lo antes expuesto, pensamos que la activación de la FALDH /GSNOR por SA, podría ser debido por una parte a su actividad enzimática frente al formaldehído y por otra a su participación en la vía de señalización del NO.



**Figura 59.** Modelo hipotético para explicar la inducción de la expresión de la FALDH por ácido salicílico. Las abreviaturas utilizadas son las siguientes: SA, ácido salicílico; SOD, superóxido dismutasa; PAL, fenilalanina amonio liasa; CA, ácido cinámico; BA, ácido benzoico; BA2H, 2-hidrolasa del ácido benzoico; CAT, catalasa; APX, ascorbato peroxidasa; Phe, fenilalanina; NOS, óxido nítrico sintasa; CHS, chalcona sintasa; LOX, lipooxigenasa; GST, glutatión S-transferasa; GP, glutatión peroxidasa.

### 1.3 Ácido Jasmónico (JA) y herida.

Nuestros resultados demuestran que el gen *ADH2* es regulado negativamente por herida, siendo la respuesta transitoria y sistémica. Observamos una fuerte represión del gen en las hojas heridas y en las hojas sistémicas (de 2 veces aproximadamente), y en ambos casos la expresión vuelve a los niveles basales al cabo de 48 horas después del daño mecánico. El análisis por Western Blot confirmó que también existía una disminución considerable de la cantidad de proteína FALDH al cabo de 2 horas de producida la herida, que se mantenía durante las 48 horas siguientes.

Se han propuesto dos vías diferentes de señalización en la respuesta a herida (Titarenko et al., 1997). Una de ellas no requiere JA, y la activación de los genes involucrados ocurre principalmente en el lugar donde se produce el daño. La otra vía es dependiente de JA y activa genes tanto en el lugar de la herida como de forma sistémica.

Para dilucidar si la respuesta a herida del gen *ADH2* era dependiente del JA, medimos los niveles de mRNA en respuesta a la adición exógena de JA en células de tabaco BY2 y en plántulas de *Arabidopsis*. También estudiamos la respuesta del gen a herida en el mutante de *Arabidopsis* insensible a JA, *coi1*.

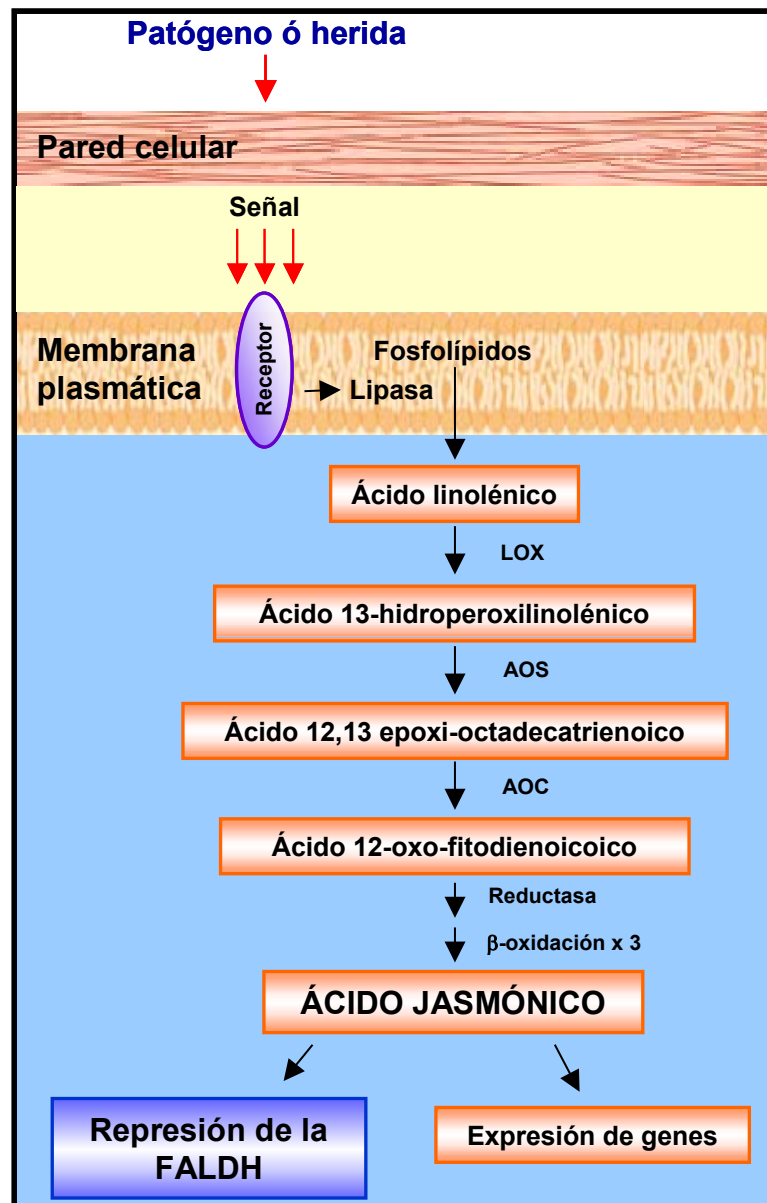
Los tratamientos de las células BY2 con JA se llevaron a cabo a una concentración de 50  $\mu$ M. Observamos una represión de la FALDH de aproximadamente 3 veces en la cantidad de proteína, que se correlacionaba con la disminución de la actividad específica. La disminución de la cantidad de proteína se observó desde las 24 horas y se mantuvo hasta las 72 horas después del tratamiento.

Los tratamientos de plantas de *A. thaliana* con concentraciones de JA comprendidas entre 50  $\mu$ M y 1 mM, no dieron lugar a variaciones en los niveles de FALDH. Estos resultados discrepan de los obtenidos con las células BY2. Ello podría ser debido a que

las células BY2 constan de un solo tipo celular, mientras que las plantas están constituidas por una amplia variedad de tipos celulares que pueden tener diferentes respuestas frente a la fitohormona. También, al tratarse de especies vegetales distintas, la respuesta puede ser cuantitativamente diferente. Nosotros proponemos que quizás sea necesaria la acción coordinada de varios señalizadores moleculares o fitohormonas para observar una disminución de la FALDH por JA en *Arabidopsis*.

Para comprobar si JA estaba involucrado en la regulación por herida del gen *ADH2* realizamos estudios en el mutante *coi1* de *Arabidopsis* (insensible a JA). No observamos represión del gen después del daño mecánico; por el contrario, los niveles de mRNA fueron ligeramente superiores tanto en las hojas heridas como en las sistémicas. Por tanto, nuestros resultados demuestran que la represión del gen *ADH2* por herida en *Arabidopsis* es dependiente de JA.

La concentración de JA en los tejidos vegetales varía con el estado de desarrollo, el tipo de tejido, y la presencia o ausencia de estímulos externos, tales como heridas ó agentes patógenos. Las membranas de las plantas, particularmente las de los plástidos, son ricas en ácido linolénico (LA), precursor del JA, esterificado en forma de glicerolípidos y fosfolípidos. Esto sugiere que el aumento de JA intracelular puede ser causado por la activación de fosfolipasas que liberan LA de las membranas (Farmer et al., 1992) cuando la señal emitida por patógenos o insectos interacciona con un posible receptor de membrana. El LA liberado es después oxidado a ácido 13-hidroperoxilínolénico por la lipoxigenasa (LOX) (Creelman y Mullet, 1997) y después de varias reacciones enzimáticas, convertido en JA (Figura 60). Se ha sugerido que puedan existir dos vías para la síntesis de JA, una en el citoplasma y la otra en los plástidos (Creelman y Mullet, 1995) puesto que la enzima LOX se localiza tanto en plástidos, como en vacuolas y en citoplasma (Vick y Zimmerman, 1987; Grimes et al., 1992) y los plástidos contienen actividad AOS y AOC (Vick y Zimmerman, 1987).



**Figura 60.** Diagrama que describe la biosíntesis de JA provocada por el ataque de insectos o patógenos y su acción como señalizador de la respuesta a herida. Las abreviaturas utilizadas son las siguientes: LOX, lipoxigenasa; AOS, aleno oxidasa sintasa; AOC, aleno oxidasa ciclasa.

En esta Tesis discutiremos más adelante que la FALDH está presente en cloroplastos y en citoplasma. La curva de actividad de la FALDH que nosotros observamos durante el crecimiento de las células BY2, con 2 picos de actividad

situados en los días 2 y 5 respectivamente, es perfectamente superponible con la curva de división de los plástidos en las mismas células (Nagata et al., 1992). Por ende, si el JA puede ser sintetizado en las membranas de los plástidos puesto que existe todo el sistema enzimático para ello, y la FALDH está regulada por JA, es plausible pensar en una FALDH plastídica específica de células vegetales, y como consecuencia de una adaptación a las características propias funcionales de estos organismos.

## **2. Utilización de plantas para la eliminación del formaldehído exógeno.**

El formaldehído es, tal como se mencionó en la Introducción, uno de los contaminantes más abundantes y que está estrictamente asociado a la contaminación de interiores y de aguas residuales. Su elevada solubilidad le permite ser absorbido por las vías respiratorias altas, aunque pequeñas cantidades pueden penetrar en los pulmones.

En la década de los años 80, La Organización Mundial de la Salud (OMS) tipificó entre los males contemporáneos “el síndrome del edificio enfermo”. Dicho síndrome ha sido definido como un conjunto de molestias y enfermedades provocadas por la contaminación del aire en espacios cerrados. En la construcción de viviendas se utilizan materiales que liberan formaldehído, de forma que se puede encontrar mayores concentraciones en el espacio interior que en el exterior. Las plantas tienen la capacidad de disminuir la cantidad de formaldehído y de muchos otros contaminantes, como es el caso del dióxido de nitrógeno o del monóxido de carbono, que también se encuentran en espacios cerrados ya que pueden captar dichos gases a través de sus estomas o de su cutícula e incorporarlos a su metabolismo celular (Wolverton et al., 1989; Giese et al., 1994).

Hace ya algunos años, la NASA descubrió que algunas variedades de plantas podrían disminuir la concentración de un amplio espectro de contaminantes, entre ellos el formaldehído (Tabla 12).

<b>Nombre común</b>	<b>Nombre científico</b>
Palma enana	<i>Chamadorea</i>
Perenne china	<i>Aglaonema Modestum</i>
Hiedra	<i>Hedera Helix</i>
Marginata gerbera	<i>Gerbera Jasmesonii</i>
Margarita dracanea	<i>Marginata</i>
Planta del maíz	<i>Dracaena Massangeana</i>
Crisantemo	<i>Chrysanthemum morifolium</i>
Sanseveria	<i>Sansevieria Laurenti</i>

**Tabla 12.** Algunas de las plantas más efectivas en la eliminación de formaldehído.

Diferentes autores han estudiado el uso de plantas de interior para reducir las concentraciones de formaldehído, revitalizando y purificando de esta forma los espacios cerrados (Dingle et al., 2000). En nuestro grupo hemos demostrado que la sobreexpresión de la FALDH ayuda a mejorar la eliminación de formaldehído exógeno a concentraciones muy elevadas (2 mM y 5 mM) (Achkor et al., 2003). Por tal motivo decidimos estudiar si la presencia de menores niveles de la FALDH en plantas de *Arabidopsis* disminuía su capacidad de descontaminación.



## **2.1 En las plantas transgénicas antisentido existe una relación directa entre la disminución de la actividad enzimática y los niveles de proteína.**

En esta Tesis se generaron plantas transgénicas de *A. thaliana* portadoras de una construcción en la que un fragmento del cDNA de la FALDH fue clonado en sentido inverso. Dicho fragmento era de 425 pares de bases y fue clonado bajo el control del promotor CaMV35S.

La disminución de los niveles de la FALDH se comprobó por experimentos de actividad enzimática y de Western Blot, utilizando extractos proteicos de plantas transgénicas hemicigotas (resultados no mostrados) y de plantas homocigotas. Inicialmente obtuvimos 40 transformantes, de los cuales 17 presentaron segregación de tipo mendeliana. Finalmente obtuvimos 15 líneas transgénicas antisentido homocigotas.

El análisis de las plantas transgénicas homocigotas por medida de la actividad enzimática demostró que la mayoría de las líneas presentaban una disminución de los niveles de la FALDH. Pudimos observar que en algunas líneas la disminución era de aproximadamente un 50 %. La expresión del transgen varía en las diferentes líneas transgénicas, ya que depende del lugar en que se integra en el genoma.

De las 15 líneas homocigotas, seleccionamos las seis que presentaban una mayor disminución de la actividad enzimática, para analizarlas por Western Blot. Los resultados obtenidos mostraban que existía una correlación entre los niveles de proteína FALDH detectados por Western Blot y la actividad enzimática FALDH. Como control de todos los experimentos utilizamos plantas de *Arabidopsis thaliana* que no habían sido modificadas genéticamente (plantas wt).

## **2.2 Las plantas transgénicas antisentido presentan una menor capacidad de metabolizar formaldehído exógeno.**

Como consecuencia de la alta contaminación ambiental, se está comenzando a aplicar la bioremediación utilizando plantas para eliminar compuestos tóxicos (fitoremediación) (Cunningham y Ow, 1996; Salt et al., 1998). Esta tecnología utiliza las propiedades naturales de las plantas para extraer del medio ambiente compuestos orgánicos volátiles (VOCs), en particular aquellos que abundan en el interior de ambientes de trabajo como industrias o laboratorios (Raskin, 1996), ó para degradar y metabolizar compuestos tóxicos en suelos o en aguas, como los metales pesados (Nieboer y Richardson, 1980; Nriagu y Pacyna, 1988; Bizily et al., 1999; Blaylock y Huang, 2000) o elementos radiactivos (Ebbs et al., 1998; Huang et al., 1998).

El formaldehído es un contaminante muy reactivo, que está presente en el medio ambiente en concentraciones elevadas, como resultado de las actividades industriales humanas. Está listado por la IARC (International Agency for Research on Cancer) y por la OSHA (Occupational Safety and Health Administration) como un probable compuesto carcinogénico en humanos (IARC, 1995). El NTP (National Toxicology Program, USA) incluye el formaldehído en el Catálogo Anual de Compuestos Carcinogénicos.

Las plantas modificadas por métodos biotecnológicos han demostrado ser útiles en la fitoremediación. Uno de los propósitos de esta Tesis fue demostrar una vez más la importancia de la FALDH como enzima descontaminante, y averiguar qué pasaba cuando la planta presentaba niveles de FALDH inferiores a los normales. Nos interesaba estudiar si las plantas transgénicas antisentido presentaban una disminución de la capacidad de metabolizar altas concentraciones de formaldehído exógeno. Para ello, seleccionamos 4 líneas transgénicas entre las que presentaban una mayor disminución de la actividad enzimática y de los niveles de la proteína FALDH. Los resultados obtenidos en esta Tesis muestran una clara disminución de la velocidad de metabolizar 2 mM de formaldehído (50 ppm) en las 4 líneas transgénicas antisentido

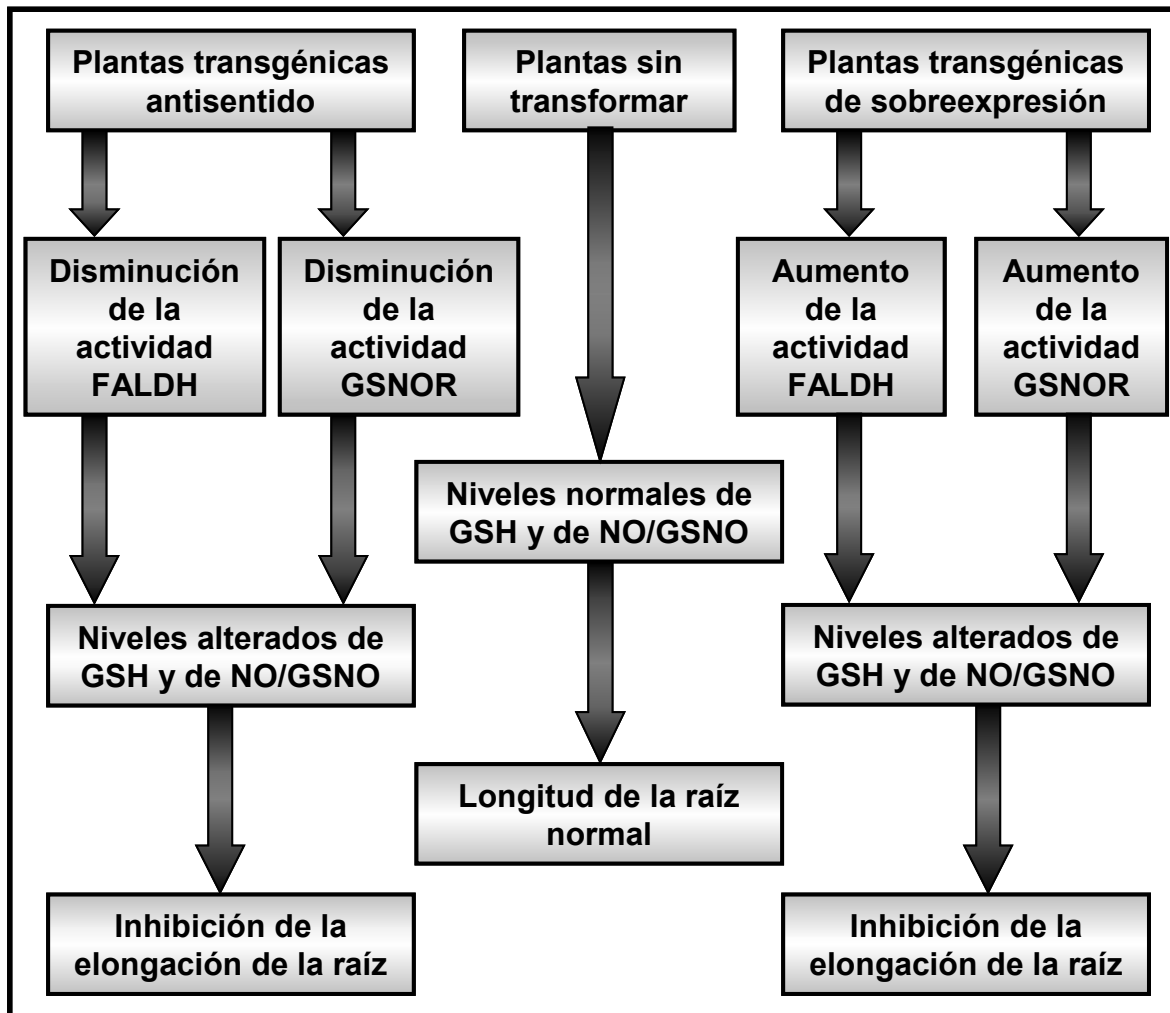
estudiadas. La mayor diferencia la observamos a las 48 horas, donde las plantas wt metabolizan aproximadamente el 50 % del formaldehído inicial, mientras que las transgénicas consumieron entre un 15 y 30 %. Cabe destacar que el formaldehído a una concentración de 2 mM no es tóxico para ninguna de las plantas después de 48 horas de incubación.

### **2.3 Las plantas transgénicas con niveles de FALDH modificados presentan un fenotipo diferente.**

En esta Tesis hemos estudiado el fenotipo de las plantas transgénicas antisentido obtenidas y también de una línea transgénica de sobreexpresión de la FALDH, obtenida por otro miembro del grupo. Nuestros resultados muestran que la mayoría de las plantas transgénicas antisentido tenían el diámetro de las rosetas ligeramente más grande y las raíces más cortas que la línea control de *Arabidopsis* sin transformar genéticamente. Se realizó un análisis estadístico mediante un test de hipótesis de comparación de medianas con la prueba T para muestras independientes, teniendo en cuenta un valor de confianza del 95 % y del 99 %. Este efecto lo observamos tanto en las plantas transgénicas antisentido de 8 días como en las de 30 días. Las plantas transgénicas de sobreexpresión estudiadas también presentaron una inhibición en el crecimiento de las raíces.

Diferentes autores han descrito que en la proliferación celular en la raíz de *Arabidopsis* intervienen mecanismos de control del estado redox (Sánchez-Fernández, et al., 1997). El glutatión puede influir en los procesos de división celular. Se ha demostrado que la adición exógena de glutatión (GSH) incrementa el número de células meristemáticas que están en mitosis (Sánchez-Fernández, et al., 1997). Por otra parte, se ha descrito que el óxido nítrico es requerido en la organogénesis de la raíz, y que un incremento transitorio de la concentración de NO podría formar parte de los eventos moleculares involucrados en el desarrollo de la raíz, inducidos éstos por el ácido indol acético (IAA) (Pagnussat et al., 2002).

Recordemos una vez más que uno de los sustratos de la FALDH es el S-hidroximetilglutión, formado espontáneamente a partir de formaldehído y glutión. Además la FALDH es una GSNO reductasa y por tanto participa en el metabolismo del S-nitrosoglutión, uno de los metabolitos más abundantes del NO. Nuestra hipótesis es que para que la elongación de la raíz no se vea afectada, es necesario que existan unos niveles determinados de glutión y de NO / GSNO (Figura 61). En el caso de las plantas con menores niveles de FALDH / GSNO reductasa (plantas transgénicas antisentido), existe un 50 % de disminución tanto en la actividad formaldehído deshidrogenasa como en la actividad S-nitrosoglutión reductasa, como se ha visto a lo largo de esta Tesis. En aquellas plantas con niveles elevados de FALDH / GSNO reductasa (plantas transgénicas de sobreexpresión) las actividades FALDH y GSNO reductasa aumentan considerablemente (18 veces). Estas variaciones de actividad podrían resultar en una modificación de los niveles intracelulares de GSH y NO / GSNO, lo que explicaría la existencia de un fenotipo similar (inhibición de la elongación de la raíz) en las plantas transgénicas antisentido y en las de sobreexpresión (Figura 61).



**Figura 61.** Modelo hipotético para explicar la inhibición de la elongación de la raíz en plantas transgénicas con niveles modificados de la FALDH / GSNO reductasa de *Arabidopsis thaliana*.

### 3. Localización celular de la FALDH en hojas de *Arabidopsis thaliana* y en raíz de *Raphanus sativus*.

En las plantas, la FALDH se ha estudiado en *Arabidopsis thaliana* (Martínez et al., 1996), maíz (Fliegmann y Sandermann, 1997), arroz (Dolferus et al., 1997) y guisante (Shafqat et al., 1996). En *Arabidopsis*, los niveles de RNA del gen *ADH2* (que codifica por la FALDH de *Arabidopsis*) eran similares en todos los tejidos analizados (Martínez et al., 1996). En esta Tesis hemos estudiado la localización de la FALDH en los

diferentes tipos celulares de hoja y raíz. Como se demostró por experimentos de Western Blot, la proteína se encuentra en todos los tejidos de la planta (raíz, hoja de roseta, tallo, hoja caulinar y flor), aunque la mayor expresión se observó en raíz y en hoja.

La inmunolocalización sobre cortes de hoja de *A. thaliana* muestra que la FALDH se encuentra localizada principalmente en las células del mesófilo (particularmente en los cloroplastos) el floema y en el cambium. No observamos presencia de la FALDH en las células de la epidermis adaxial y abaxial, ni en el xilema. Tampoco en la capa de células parenquimáticas que se encuentra debajo del cilindro vascular. Además, observamos una intensa señal de la proteína en los tricomas. En *Arabidopsis thaliana* la biosíntesis de glutatión es muy elevada en los tricomas (Gutiérrez-Alcalá et al., 2000), los cuales están involucrados en los procesos de defensa de la planta. Más adelante comentaremos que la FALDH podría tener un papel importante en las reacciones de defensa. Estos resultados fueron confirmados realizando la inmunolocalización en hojas de una línea transgénica de sobreexpresión de la FALDH (Achkor et al., 2003), encontrando que el patrón de expresión era idéntico al de la planta sin transformar.

La localización de la FALDH en raíz de rábano, mostró un marcaje en las células acompañantes del floema, el periciclo, el cambium, en la epidermis y en la primera capa de células del córtex adyacente a aquella. Los cortes longitudinales confirmaron su presencia en la epidermis y la endodermis de la región de elongación, y en todos los tipos celulares de la región meristemática. No se apreció ninguna señal en las células del córtex. Por tanto, al contrario de lo que ocurre en la hoja, la raíz sí expresa la FALDH en la epidermis.

#### 4. La FALDH está presente en citoplasma, núcleo y cloroplasto.

Estudios realizados por diversos autores en levadura y rata, mostraban que la FALDH era una enzima de localización citoplasmática y nuclear (Fernández et al., 2003; Iborra et al., 1992). Los ensayos de inmunocitoquímica realizados en esta Tesis en hojas de *A. thaliana* detectaban la FALDH en los cloroplastos de las células del mesófilo. Para comprobar estos resultados, realizamos experimentos de localización de la FALDH al microscopio electrónico. El análisis de los resultados demuestra que la FALDH se encuentra en el citoplasma, el núcleo y los cloroplastos, y está ausente de la pared celular, la vacuola y las mitocondrias. Los estudios se realizaron también en cortes de hoja de una línea transgénica de sobreexpresión de la FALDH, portadora de una construcción en que el gen de la FALDH estaba bajo el control del promotor CaMV35S (Achkor et al., 2003). La línea transgénica mostró un patrón de expresión idéntico al de la planta sin transformar, pero con más abundancia de marcaje debido a la modificación de los niveles de la enzima.

Muchas proteínas presentes en los cloroplastos son sintetizadas en el citosol por los ribosomas libres. Estas proteínas son transportadas al cloroplasto gracias a la presencia de un péptido de tránsito de 40-50 aminoácidos (TP, transit peptide) en el extremo N-terminal. Durante el transporte, el TP es eliminado por la acción de una peptidasa específica (Buchanan et al., 2000). Para conocer si la FALDH tenía en su extremo N-terminal una secuencia con las características del TP, utilizamos los programas SignalIP V 1.1, TargetP V 1.0 y el ChloroP 1.1. Los resultados obtenidos fueron negativos por lo que pensamos que o bien existe una FALDH codificada en el genoma de cloroplasto, o quizás no tenga un TP claro. El 50 % de las proteínas de cloroplasto, como la anhidrasa carbónica CAH1, no tienen TP (Arsenio Villarejo, Umea Plant Science Center, University of Umea, Suiza, comunicación personal). Cabe resaltar que esta es la primera vez que se describe la localización de la FALDH en cloroplastos.

La utilización de un programa informático que predice la localización intracelular de proteínas, como el PSORT, dio como resultado una localización cloroplástica y citoplasmática para la FALDH. Sin embargo, según este programa, la FALDH no era una proteína nuclear. Se ha descrito que muchas proteínas nucleares no tienen una señal de localización nuclear (NLS, nuclear localization signal), pudiendo ser cotransportadas por otras proteínas (Nigg, 1997).

#### 4.1 Posible función de la FALDH en núcleo.

El núcleo es el centro de la herencia y está involucrado en el control del proceso metabólico celular. La información genética que pasa a las células hijas en la división nuclear está contenida en una macromolécula de DNA. Las proteínas están también asociadas con el DNA, y forman el complejo de nucleoproteína conocido como cromatina. El núcleo es, generalmente, más o menos esférico. Se rodea de una envoltura nuclear y tiene en su interior al nucleolo que es denso, granular y fibroso en su estructura (Fahn, 1985).

Mediante el análisis al microscopio electrónico de cortes ultrafinos de células del mesófilo de la hoja de *Arabidopsis* incubados con el anticuerpo anti-FALDH, hemos observado que la FALDH se encontraba en el núcleo. La FALDH ha sido también localizada en núcleo de hepatocitos (Iborra et al., 1992) y en el núcleo de levadura (Fernández et al., 2003). En nuestro grupo se ha encontrado que la FALDH está presente en el núcleo y en los microtúbulos de células de tabaco BY2 (resultados no publicados). Se cree, por lo tanto, que una de las funciones de la FALDH podría ser la protección de las estructuras celulares, incluido el DNA, de los efectos tóxicos del formaldehído endógeno. La toxicidad del formaldehído en la célula se debe a que reacciona con las proteínas produciendo entrecruzamientos de cadenas peptídicas o de éstas con los grupos aminos del DNA (Hayat, 1981). Esta reacción es mucho más rápida con los nucleótidos libres o con el DNA desnaturalizado que con el DNA nativo (Grossman, 1967; Hayat, 1981). Dado el alto contenido en glutatión en el núcleo y en el



citoplasma, cabe esperar que la mayoría del formaldehído que se genera en la célula esté unido reversiblemente a glutatión para formar el S-hidroximetilglutatiión que es el sustrato específico de la FALDH (Uotila y Koivusalo, 1989).

También existe la hipótesis de que la FALDH nuclear podría jugar un papel importante en la replicación del DNA, que sería independiente de su función como formaldehído deshidrogenasa. Se ha demostrado que el bloqueo con anticuerpos de los sitios de interacción de la FALDH con proteínas del aparato replicacional, era capaz de inhibir parcialmente la replicación (Iborra, 1994).

La FALDH es una enzima ancestral, que probablemente ha estado siempre en el núcleo. El núcleo ha evolucionado conjuntamente con esta proteína que está muy conservada, de modo que al encontrarse en las inmediaciones del DNA que está replicando, para evitar la formación de entrecruzamientos, ha podido evolucionar como un elemento más del sistema y ha desarrollado interacciones con otras proteínas del aparato replicacional (Iborra, 1994).

Es conocido que algunos factores de transcripción y otras proteínas nucleares son regulados por NO / GSNO (Shinyashiki et al, 2000; Vossen y Erard, 2002). Se ha demostrado que el óxido nítrico también se encuentra en el núcleo de las células vegetales (Pedroso et al., 2000). La presencia de la FALDH / GSNO reductasa en núcleo podría ser debido a su participación en el metabolismo del GSNO endógeno y para proteger a la célula de los efectos tóxicos que provocan el NO y sus metabolitos.

#### **4.2 Posible función de la FALDH en citoplasma.**

En nuestros experimentos de inmunolocalización en cortes ultrafinos de células de mesófilo de la hoja, hemos detectado la FALDH en el citoplasma. La FALDH es una proteína preferentemente citoplasmática en células animales (Uotila y Koivusalo, 1974; Parés et al., 1984; Farrés et al., 1988), aunque en algunos casos también se ha

encontrado una pequeña cantidad asociada con el núcleo (en torno al 2 %). Se considera que la función de la FALDH en el citoplasma consiste en la protección de las estructuras celulares de los efectos tóxicos del formaldehído, que se genera de forma endógena en diversos procesos metabólicos. La mayor parte del formaldehído que se genera en el citoplasma, se conjuga reversiblemente con el glutatión para formar el S-hidroximetilglutatión, sustrato de la FALDH.

Por otra parte, se sabe que el óxido nítrico está presente en el citoplasma de las células vegetales (Whendehenne et al., 2001). Se ha demostrado que algunos compuestos intracelulares, como el antioxidante glutatión, protegen a la célula del ataque citotóxico por NO. En las células microgliales de rata y en neutrófilos humanos, se ha descrito que la inducción de la síntesis de NO reduce drásticamente el contenido de glutatión intracelular, y paralelamente se produce un incremento en la cantidad de GSNO (Clancy et al., 1994; Chatterjee et al., 2000). Por tanto, concluimos que la FALDH podría participar en la eliminación de GSNO y la regeneración del glutatión intracelular, protegiendo así a la célula de los efectos tóxicos de NO.

Es conocido que el NO y los metabolitos relacionados con el NO, tales como los S-nitrosotioles, juegan un papel importante en la traducción de señales de las reacciones de la defensa de las plantas (Wendehenne et al., 2001; Delledonne et al., 1998). Uno de los metabolitos endógenos más abundantes del NO es el S-nitrosoglutatión (GSNO). El GSNO es uno de los sustratos de la FALDH ya que esta proteína también actúa como GSNO reductasa (Sakamoto et al., 2002). Por tanto, la FALDH también podría jugar un papel importante en la vía de señalización del NO o del GSNO en las reacciones de defensa de la planta.

#### **4.3 Posible función de la FALDH en cloroplastos.**

La gran cantidad de reacciones que se producen durante la fotosíntesis, se pueden agrupar en dos grandes categorías. La primera está constituida por las reacciones de

transferencia de electrones (llamadas también reacciones de la fase luminosa) donde ocurre la producción de ATP y NADPH. Estas reacciones se producen siempre en los cloroplastos. La segunda categoría está constituida por las reacciones de fijación de carbono (conocidas también como reacciones de la fase oscura) donde el ATP y el NADPH producidos anteriormente se utilizan como fuente de energía y de poder reductor respectivamente, para fijar  $\text{CO}_2$  y sintetizar carbohidratos. Estas reacciones comienzan en el estroma del cloroplasto y continúan en el citosol celular (Alberts et al., 1992).

Además del proceso de fotosíntesis, el cloroplasto también realiza otros procesos biosintéticos. Todos los ácidos grasos de la célula y un número determinado de aminoácidos están sintetizados por enzimas del estroma del cloroplasto. En dicho organelo celular, el poder reductor de los electrones activados por la luz impulsa la reducción de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) a amoníaco ( $\text{NH}_3$ ); este amoníaco proporciona a la planta el nitrógeno necesario para la síntesis de aminoácidos y nucleótidos (Alberts et al., 1992).

El cloroplasto es una fuente importante de producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en plantas. La formación de ROS se produce cuando los electrones son transferidos directamente desde el fotosistema I (PSI) al  $\text{O}_2$ , lo cual tiene como resultado la formación del anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). La reducción de  $\text{O}_2^-$  produce peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) (Beligni y Lamattina, 2002) que son muy destructivos para lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Entre los productos de la peroxidación lipídica causada por los ROS se encuentra el formaldehído, y por tanto, la localización cloroplástica de la FALDH tendría un papel protector frente a los efectos del estrés oxidativo.

En los cloroplastos es donde se sintetiza mayor cantidad de glutatión (Azcón-Bieto y Talón, 1993), y el óxido nítrico (NO) también está presente en los cloroplastos (Pedroso et al., 2000). Recientemente se han descrito 3 vías para la S-nitrosación *in vivo* del

glutación para formar el nitrosoglutación (GSNO): a partir del óxido nítrico, del peroxinitrito y de la combinación de óxido nítrico-superóxido (Schrammel, et al., 2003).

La reacción de NO con  $O_2^-$  da como resultado la formación de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), un potente oxidante (Ducrocq et al., 1999). La FALDH en el cloroplasto podría jugar un papel en la protección frente al estrés nitrosativo gracias a su actividad como GSNO reductasa.

## 5. Detección de la actividad FALDH por tinción histoquímica.

En esta Tesis se ha desarrollado un nuevo método para la detección colorimétrica de la actividad enzimática de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutación en plántulas enteras de *Arabidopsis thaliana*, logrando una rápida y eficaz localización de la enzima activa durante las diferentes etapas del desarrollo. Ese método utiliza formaldehído y glutación que, adicionados exógenamente reaccionan de manera espontánea para formar el S-hidroximetilglutación, que es el verdadero sustrato de la FALDH. También se adiciona exógenamente el cofactor  $NAD^+$ . Para facilitar la penetración de los reactivos en la planta, se aplicó vacío de forma suave para no dañar la morfología de los tejidos. Se incluyó también el piruvato en la reacción, que es un inhibidor de la lactato deshidrogenasa, para evitar la oxidación del  $NAD^+$  a NADH. Otro de los reactivos utilizados en el protocolo que aquí describimos fue la fenazina metosulfato (PMS) que actúa como acelerador del transporte electrónico, y el nitro-blue tetrazolium (NBT) que acepta los electrones procedentes del NADH y forma un precipitado de color azul oscuro. Este protocolo ha sido generado a partir de la combinación de dos métodos descritos anteriormente: el de detección de la actividad de alcohol deshidrogenasas *in situ* mediante electroforesis en geles de almidón (Uotila y Koivusalo, 1987) y el de localización histoquímica de la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) en plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Jefferson et al., 1987).

En las células eucariotas existen diferentes alcohol deshidrogenasas, por lo que, cuando se mide la actividad por métodos *in situ*, es difícil obtener altos niveles de especificidad. Algunas de estas alcohol deshidrogenasas no son muy específicas cuando se usan altas concentraciones de un determinado sustrato (como es el caso de los métodos *in vitro*). Por tal motivo es importante controlar la reacción para eliminar la inespecificidad no deseada. Además del S-hidroximetilglutación, hay en la solución de tinción formaldehído y glutatión libres, debido a que la reacción es reversible. Por tal motivo, se puede observar una señal tenue producto de la oxidación del glutatión por la glutatión reductasa donde también se genera NADH, o por la acción de la aldehído deshidrogenasa que participa en el metabolismo del formaldehído. Ambas enzimas podrían estar contribuyendo a la aparición de background. Por tanto, para asegurar la detección específica de la actividad FALDH, se realizaron siempre dos controles en paralelo, uno adicionando solo formaldehído como sustrato y el otro adicionado solo glutatión. Estos controles se utilizan rutinariamente para medir la actividad de la FALDH en extractos proteicos crudos y eliminar la interferencia de la actividad de otras enzimas.

Este método de detección es bastante rápido y permite la detección de la enzima activa en diferentes etapas del desarrollo, o en respuesta a elicitores. Además este protocolo podría ser aplicado a otras deshidrogenasas usando los sustratos específicos de cada una.

## **6. FALDH y defensa.**

En nuestro laboratorio se habían generado previamente plantas transgénicas de sobreexpresión de la FALDH (Achkor et al., 2003) y en esta Tesis se describe la producción de plantas transgénicas antisentido. Se conoce que tanto el NO como el GSNO son moléculas señalizadoras involucradas en la defensa de la planta (Durner et al., 1998), y que la FALDH tiene actividad GSNO reductasa. Además, nuestros

resultados demuestran que la FALDH está regulada por herida y por JA (Apartado 1.3 de este capítulo). Estas razones nos llevaron a estudiar la respuesta de nuestras plantas transgénicas en las interacciones con 2 tipos de patógenos, el oomiceto *Peronospora parasitica* y la bacteria *Pseudomonas syringae*, y averiguar como influía la modificación de los niveles de la FALDH /GSNOR en las reacciones de defensa de la planta.

Recordemos que la resistencia basal es aquella que desarrolla la planta por la infección de un patógeno compatible. Los resultados obtenidos muestran que la reducción de la cantidad de FALDH intracelular incrementa la resistencia basal frente a los dos patógenos utilizados. La línea transgénica antisentido se mostró menos susceptible a la infección que la línea control. Esto podría apoyar la hipótesis de que al existir menor cantidad de FALDH / GSNOR, haya mayor cantidad de GSNO disponible como señalizador para establecer la resistencia de la planta frente a la invasión por el patógeno. La FALDH podría jugar un doble papel en las reacciones de defensa: en la activación / desactivación de la vía de señalización de NO ó de GSNO, y modulando la concentración intracelular de los compuestos tipo tioles que pueden generar estrés nitrosativo.

El establecimiento de la resistencia sistémica adquirida (SAR) ocurre cuando la planta es atacada por un patógeno y se genera una señal en el sitio infectado que migra hacia las partes más distantes del lugar de la infección. Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de la FALDH / GSNOR dificulta el establecimiento de SAR, mientras que las plantas con un 50 % menos de actividad FALDH / GSNOR no presentan interferencia en el establecimiento de SAR, que es similar a la de las plantas control. Estos resultados sugieren que a mayor actividad GSNO reductasa, menor cantidad de GSNO libre, el cual es necesario para establecer la resistencia de la planta a las enfermedades. Se conoce que el SA actúa como señal endógena que induce ciertos genes relacionados con la defensa y que son necesarios para el establecimiento de SAR. Además, está ampliamente demostrado que SAR es dependiente de ácido

salicílico (SA) (Uknes et al., 1992; Delaney et al., 1994; Klessig y Malamy, 1994; Pieterse et al., 1996; Hammond-Kosack y Jones, 1996). La FALDH / GSNO reductasa es también regulada por SA tal y como se ha demostrado en esta Tesis por lo que las dos líneas convergen para señalar a la FALDH como una proteína involucrada en el establecimiento de SAR.

## CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se puede concluir que:

1. El gen *ADH2* es regulado negativamente por herida, siendo la respuesta transitoria y sistémica. El análisis por Western Blot confirmó que también se producía una disminución considerable de la cantidad de proteína FALDH, en respuesta a herida, disminución que se mantenía durante al menos 48 horas.
2. La adición exógena de JA a células de tabaco provoca una disminución de 3 veces en la cantidad de FALDH y en su actividad específica. Sin embargo, los tratamientos de plantas de *A. thaliana* con concentraciones de JA comprendidas entre 50  $\mu$ M y 1 mM, no dieron lugar a variaciones en los niveles de FALDH. Proponemos que es necesaria la acción coordinada de varios señalizadores moleculares o fitohormonas para observar una disminución de la FALDH por JA en *Arabidopsis*.
3. Los experimentos de herida realizados en el mutante *coi1* de *Arabidopsis* (insensible a JA) nos permite concluir que la represión del gen *ADH2* por herida es dependiente de JA.



4. La aplicación exógena de 150  $\mu$ M de ácido salicílico a las células de tabaco BY2 provocó un marcado incremento tanto de la actividad específica como de la acumulación de proteína FALDH. En plantas de *A. thaliana* crecidas en medio líquido, tanto la aplicación exógena de 500  $\mu$ M como de 1 mM de SA provocaron una acumulación de la proteína FALDH y un aumento de los niveles de mRNA. Estos resultados sugieren que existe una fuerte activación transcripcional del gen *ADH2* por ácido salicílico.

5. El ácido abscísico no produce variaciones significativas en la FALDH intracelular, y por tanto, no sería un señalizador en la respuesta a herida para esta enzima.

6. Se han generado plantas transgénicas antisentido que muestran una disminución en los niveles de la FALDH intracelular de hasta el 50 %. Dichas plantas presentan una menor capacidad de metabolizar formaldehído exógeno. Estos resultados confirman una vez más el papel esencial de la FALDH en el metabolismo del formaldehído *in vivo*.

7. Las plantas transgénicas con niveles de FALDH modificados presentan ligeros cambios de fenotipo, principalmente en la raíz, donde observamos una disminución de la elongación con respecto a las plantas sin transformar genéticamente.

8. La FALDH presenta un patrón de expresión en hojas y en raíz que es específico del tipo celular. La inmunolocalización sobre cortes de hoja de *A. thaliana* demostró que la FALDH se encuentra localizada principalmente en las células del mesófilo (particularmente en los cloroplastos) el floema y en el cambium. En raíz de rábano, la FALDH se detectó en las células acompañantes del floema, el periciclo, el cambium, la epidermis y la primera capa de células del córtex adyacente a aquella.

9. La inmunolocalización a nivel subcelular de la FALDH en células del mesófilo de hoja demuestra que la enzima está presente en citoplasma, núcleo y cloroplasto. Es la primera vez que se describe la localización cloroplástica de la FALDH.

10. Las plantas transgénicas con niveles inferiores de FALDH (plantas antisentido) presentan un aumento de la resistencia basal a patógenos fúngicos y bacterianos. Los resultados obtenidos muestran que la reducción de la cantidad de FALDH intracelular incrementa la resistencia basal frente a los dos patógenos utilizados: el oomiceto *Peronospora parasitica* y la bacteria *Pseudomonas syringae*.

11. La sobreexpresión en *Arabidopsis* de la FALDH / GSNOR dificulta el establecimiento de SAR, mientras que las plantas transgénicas antisentido con un 50 % menos de actividad FALDH / GSNOR no presentan interferencia en el establecimiento de la respuesta SAR, que es similar a la de las plantas control.

12. Hemos puesto a punto una nueva técnica para la detección colorimétrica de la actividad enzimática de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión en plántulas enteras de *Arabidopsis thaliana*, logrando una rápida y eficaz localización de la enzima activa durante las diferentes etapas del desarrollo.



## BIBLIOGRAFÍA

**Achkor, H., Díaz, M., Fernández, R., Biosca, J.A., Parés, X. and Martínez, M.C.** (2003) Enhanced formaldehyde detoxification by overexpression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132, 2248-2255.

**Agrios, G.N.** (1997) *Plant Pathology*. San Diego, Academic Press. USA.

**Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D.** (1992) *Biología Molecular de la célula*. Segunda edición. Eds. Omega, S.A. Barcelona.

**Allali-Hassai, A., Peralba, L.M., Martras, S., Farrés J. and Parés, X.** (1998) Retinoids,  $\omega$ -hydroxyfatty acids and cytotoxic aldehydes as physiological substrates, and H<sub>2</sub>-receptor antagonists as pharmacological inhibitors, of human class IV alcohol dehydrogenase. *FEBS lett* 426, 362-366.

**Azcón-Bieto, J. y Talón, M.** (1993) *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Eds. Mc Graw-Hill-Interamericana de España.

**Azcón-Bieto, J. y Talón, M.** (2001) *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Eds. Mc Graw-Hill-Interamericana de España.

**Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E. and Stohs, S.J.** (1993) Carbon-tetrachloride- induced urinary excretion of formaldehyde, malondialdehyde, acetaldehyde and acetone in rats. *Pharmacology* 47 , 209-216.

**Barber, R.D., Rott, M.A. and Donohue, T.J.** (1996) Characterization of glutathione-dependent formaldehyde from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bact.* 178, 1386-1393.

- Bartels, D., Singh, M. and Salamini, F.** (1988) Onset desiccation tolerance during development of the barley embryo. *Planta*. 175, 485-492.
- Beligni, M.V. and Lamattina, L.** (2000) Nitric oxide induces seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyls elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta*. 210, 215-221.
- Beligni, M.V. and Lamattina, L.** (2001) Nitric oxide in plants: history is just beginning. *Plant, Cell and Environ.* 24, 267-278.
- Beligni, M.V. and Lamattina, L.** (2002) Nitric oxide interferes with plant photo-oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. *Plant, Cell and Environ.* 25, 737-748.
- Benkovic, S.J.** (1980) On the Mechanism of Folate- and Biopterin-Requiring enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 227-251.
- Berger, S., Bell, E. and Mullet, J.E.** (1996) Two methyl jasmonate-insensitive mutants show altered expression of AtVsp in response to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol.* 111, 523-531.
- Berger, S.L.** (1987) Quantifying <sup>32</sup>P-labeled and unlabeled nucleic acids. *Methods Enzymol.* 152, 49-54.
- Bevan, M.** (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.* 12, 8711-8721.
- Birkenmeier, G.F. and Ryan, C.A.** (1998) Wound signaling in tomato plants. Evidence that ABA is not primary signal for defense gene. *Plant Physiol.* 117, 687-693.
- Bizily, S.P., Rugh, C.L., Summers, A.O. and Meagher R.B.** (1999) Phytoremediation of methylmercury pollution: merB expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 6808-6813.
- Björkhem, I., Jörnvall, H. and Zeppezauer, E.** (1973) Oxidation of omega-hydroxylated fatty acids and steroids by alcohol dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52, 413-420.
- Blakley, R.L.** (1960) Spectrophotometric studies on the combination of formaldehyde with tetrahydropteroylglutamic acid and other hydropteridines. *Biochem. J.* 74, 71-82.
- Blaylock, M.J. and Huang, J.W.** (2000) Phytoextraction of metals. In: Raskin I, Ensley B.D. (eds) *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean-up the environment*. Wiley, New York. 53-70.

**Bol, J.F., Linthorst, H.J.M. and Cornelissen, B.J.C.** (1990) Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annu. Rev. Phytopatol.* 28, 113-118.

**Boleda, M.D., Julià, P., Moreno, A. and Parés, X.** (1989) Role of extrahepatic alcohol dehydrogenase in rat ethanol metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 74-81.

**Boleda, M.D., Saubi, N., Farrés, J. And Parés, X.** (1993) Physiological substrates for rat alcohol dehydrogenase classes. Aldehydes of lipid peroxidation,  $\omega$ -hydroxyfatty acids, and retinoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 307, 85-90.

**Bowles, D.J.** (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 813-907.

**Bowman, J.** (1994) *Arabidopsis: an atlas of morphology and development*. First Edition. Springer-Verlag New York, USA.

**Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

**Buchanan, B.B., Gruissen, W. and Jones, R.L.** Eds. (2000) *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of plants physiologists. Rockville, Maryland. USA

**Bunker, T.W., Koetje, D.S., Stephenson L.C., Creelman, R.A, Mullet, J.E. and Grimes H.D.** (1995) Sink limitation induces the expression of multiple soybean vegetative lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. *Plant Cell.* 7, 1319-1331.

**Carrera, E. and Prat, S.** (1998) Expression of the *Arabidopsis abi-1* mutant allele inhibits proteinase inhibitor wound-induction in tomato. *Plant J.* 15, 765-771.

**Casanova-Schmitz, M., David, R.M. and Heck, H.D'A.** (1984) Oxidation of formaldehyde and acetaldehyde by NAD<sup>+</sup>-dependent dehydrogenases in rat nasal mucosal homogenates. *Biochem. Pharmacol.* 33, 1137-1142.

**Chadha, K.C. and Brown, S.A.** (1974) Biosynthesis of phenolic acids in tomato infected with *Agrobacterium tumefaciens*. *Can. J. Bot.* 52, 2041-2046.

**Chatterjee, S., Noack, H., Possel, H. and Wolf, G.** (2000). Induction of nitric oxide synthesis lowers intracellular glutathione in microglia of primary glial cultures. *Glia.* 29, 98-101.

- Chen, C.S. and Yoshida, A.** (1991) Enzymatic properties of the protein encoded by newly cloned human alcohol dehydrogenase ADH6 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 743-747.
- Chivasa, S., Murphy, A.M., Naylor, M. and Carr, J.P.** (1997) Salicylic acid interferes with tobacco mosaic virus replication via a novel salicylhydroxamic acid-sensitive mechanism. *Plant Cell.* 9, 547-557.
- Cinti, D.L., Keyes, S.R., Lemelin, M.A., Denk, H. and Schenkman** (1976) Biochemical properties of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase with respect to oxidation of formaldehyde. *J. Biol. Chem.* 251, 1571-1577.
- Clancy, M., Levartovsky, D., Leszczynska-Piziak, J., Yegudin, J. and Abramson, S.B.** (1994) Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: Evidence for S-nitrosoglutathione as bioactive intermediary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 3680-3684.
- Cleland, F.C. and Ajami, A.** (1974) Identification of the flower-inducing factor isolated from aphid honeydew as being salicylic acid. *Plant Physiol.* 54, 904-906.
- Consalvi, V., Mardh, G. and Vallee B.L.** (1986) Human alcohol dehydrogenases and serotonin metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139, 1009-1016.
- Cooper, J.R. and Kini, M.M.** (1962) Biochemical aspects of methanol poisoning. *Biochem. Pharmacol.* 11, 405-416.
- Creelman, R.A. and Mullet, J.E.** (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 4114-4119.
- Creelman, R.A. and Mullet, J.E.** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 355-381.
- Creelman, R.A., Tierney, M.L. and Mullet, J.E.** (1992) Jasmonic acid/ methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 4938-4941.
- Crosas, B., Allali-Hassani, A., Martínez, S.E., Martras, S., Persson, B., Jörnvall, H., Parés, X. and Farrés, J.** (2000) Molecular basis for differential substrate specificity in class IV alcohol dehydrogenase: a conserved function in retinoid metabolism but not in ethanol metabolism. *J. Biol. Chem.* 275, 25180-25187.

- Cryer, P.E., Haymond, M.W., Santiago, J.V. and Shad, S.D.** (1967) Norepinephrine and epinephrine release and adrenergic mediation of smoking-associated haemodynamic and metabolic events. *N. Engl. J. Med.* 295, 573-577.
- Cunningham, S.D. and Ow, D.W.** (1996) Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.* 110, 715-719.
- Danielsson, O. and Jörnvall, H.** (1992) "Enzymogenesis": classical liver alcohol dehydrogenase origin from the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 9241-9251.
- Danielsson, O., Atrian, S., Luque, T., Hjelmqvist, L., González-Duarte, R. and Jörnvall, H.** (1994) Fundamental molecular differences between alcohol dehydrogenase classes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 91, 4980-4984.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernoij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaggney, T., Gut-Rella, M., Kassmann, H., Ward, E. and Ryals, J.** (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science.* 266, 1247-1250.
- Delledonne M., Xia, Y., Dixon, R.A. and Lamb, C.** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature.* 394, 585-588.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A. and Lamb, C.** (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 13454-13459.
- Dicker, E. and Cederbaum, A.I.** (1996) Inhibition of CO<sub>2</sub> production from aminopyrine or methanol by cyanamide or crotonaldehyde and the role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase in formaldehyde oxidation. *Biochem. Biophys. Acta.* 883, 91-97.
- Dingle, P., Tapsell, P. and Hu, S.** (2000) Reducing formaldehyde exposure in office environments using plants. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 64 (2), 302-308.
- Ditlow, C.C., Holmquist, B., Morelock, M.M. and Vallee, B.L.** (1984) Physical and enzymatic properties of class II alcohol dehydrogenase isozyme of human liver: pi-ADH. *Biochemistry* 23, 6363-6368.
- Dittrich, H., Kutchan, T. and Zenk, M.H.** (1992) The jasmonate precursor 12-oxo-phytodienoic acid, induces phytoalexin synthesis in *Petroselinum hortense* cell cultures. *FEBS Lett.* 309, 33-36.



- Doares, S.H., Syrovets, T., Weiler, E.W. and Ryan, C.A.** (1995) Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 4095-4098.
- Dolferus, R., Osterman, J.C., Peacock, W.J. and Dennis, E.S.** (1997) Cloning of the Arabidopsis and Rice Formaldehyde Dehydrogenase Genes: implications for the origin of plant ADH enzymes. *Genetics* 146, 1131-1141.
- Donnelly, P.M., Boneta, D., Tsukaya, H., Dengler, R.E. and Dengler, N.G.** (1999) Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of Arabidopsis. *Dev. Biol.* 215, 407-419.
- Ducrocq, C., Blanchard, B., Pignatelli, B. and Ohshima, H.** (1999) Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cell. and Mol. Life Sci* 55, 1068-1077.
- Duester, G., Farrés, J., Felder, M.R., Holmes, R.S., Höög, J.-O., Parés, X., Plapp, B.V., Yin, S.-J. and Jörnvall, H.** (1999) Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family. *Biochem. Pharmacol.* 58, 389-395.
- Dunner, J. and Klessig, D.F.** (1996) Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. *J. Biol. Chem.* 272, 28492-28501.
- Durner, J., Wendehenne, D., and Klessig, D.F.** (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 10328-10333.
- Ebbs, S.D., Brady, D.J. and Kochian, L.V.** (1998) Role of uranium speciation in the uptake and translocation of uranium by plants. *J. Exp. Bot.* 49, 1183-1190.
- Edenberg, H.J.** (2000) Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase genes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 64, 295-341.
- Edenberg, H.J. and Bosron, W.F.** (1997) Alcohol dehydrogenase. *Comprehensive Toxicology*, vol. 3: Biotransformation (Guengerich F. P., Ed.) Pergamon, New York, USA.
- Espunya, M.C., Combettes, B., Dot, J., Chaubet-Gigot, N. and Martínez, M.C.** (1999) Cell-cycle modulation of CK2 activity in tobacco BY-2 cells. *Plant J.* 19, 655-666.
- Fahn, A.** (1985) Anatomía vegetal. Eds Pirámide S.A. Madrid.

- Farey, R.C. and Sundquist, A.R.** (1991) Evolution of glutathione metabolism. In: *Advances in Enzymology* 64 (A. Meister, Ed.), pp 1-53, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Farmer, E.E., Johnson, R.R. and Ryan, C.A.** (1992) regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmónico acid. *Plant Physiol.* 98, 995-1002.
- Farrés, J.** (1985) Alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa de placenta humana. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Farrés, J., Julià, P. And Parés, X.** (1988) Aldehyde oxidation in human placenta. Purification and properties of 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. *Biochem. J.* 256, 461-467.
- Feldman, M.Y.** (1973) Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 13, 1-49.
- Fernández, M.R., Biosca, J.A. and Parés, X.** (2003) S-nitrosoglutathione reductase activity of human and yeast glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and its nuclear and cytoplasmic localisation. *Cell. Mol. Life. Sci.* 60, 1013-1018.
- Fernández, M.R., Biosca, J.A., Norin, A., Jörnvall, H. and Parés, X.** (1995) Class III alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: Structural and enzymatic features differ toward the human/ mammalian forms in a manner consistent with functional needs in formaldehyde detoxification. *FEBS Lett.* 370, 23-26.
- Feys, B.J.F., Benedetti, C.E., Penfold, C.N. and Turner, J.G.** (1994) Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell.* 6, 751-759.
- Fliegman, J. and Sandermann, H.Jr.** (1997) Maize glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase cDNA: a novel plant gene detoxification. *Plant Mol. Biol.* 34, 843-854.
- Foodor, J., Gullner, G., Adam, A.L., Barna, B, Komives, T. and Király, Z.** (1997) Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco. *Plant Physiol.* 114, 1443-1451.
- Foyer, C.H. and Halliwell, B.** (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta.* 133, 21-25.

**Fries, R.W., Bohlken, D.P. and Plapp, B.V.** (1979) 3-Substituted pyrazole derivatives as inhibitors and inactivators of liver alcohol dehydrogenase. *J. Med. Chem.* 22, 356-359.

**Gabriel, R., Schafer, L., Gerlach, C., Rausch, T. and Kesselmeier, J.** (1999) Factor controlling the emissions of volatile organic acids from leaves of *Quercus ilex* L. (Holm oak). *Atmos. Environ.* 33, 1347-1355.

**Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. and Ryals, J.** (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science.* 261, 754-756.

**García, C. and Lamattina, L.** (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol.* 126, 1196-1204.

**Gaston, B., Reilly, J., Drazen, J.M., Fackler, J., Ramdev, P. and Arnette, D.** (1993) Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 10957-10961.

**Giese, M., Bauer-Doranth, U., Langebartels, C. And Sandermann, H. Jr** (1994) Detoxification of formaldehyde by the spider plant (*Chlorophytum comosum* L.) and by soybean (*Glycine max* L.) cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 104, 1301-1309.

**Giri, P.R., Linnoila, M, O'Neill, J.B. and Goldman, D.** (1989) Distribution and possible metabolic role of class III alcohol dehydrogenase in the human brain. *Brain Res.* 481, 131-141.

**Glazebrook, J.** (1999) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 280-286.

**Goffner, D., Van Doorselaere, J., Yahiaoui, N., Samaj, J., Grima-Pettenati, J. and Boudet, A.M.** (1998) A novel aromatic alcohol dehydrogenase in higher plants: molecular cloning and expression. *Plant. Mol. Biol.* 36, 755-765.

**Gouvea, C.M.C.P., Souza, J.F., Magalhaes, A.C.N. and Martins, I.S.** (1997) NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regul.* 21, 183-187.

**Griffith, O.W. and Stuehr, D.J.** (1995) Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanisms. *Annual Review of Physiol.* 57, 707-736.

- Grimes, H.D., Koetje, D.S. and Franceschi, V.R.** (1992) Expression, activity, and cellular accumulation of methyl jasmonate-responsive lipoxigenase in soybean seedlings. *Plant Physiol.* 100, 433-443.
- Grossmann, L.** (1967) The reaction of formaldehyde with denatured DNA. *Met. Enzymol.* 12, 131.
- Grubisic, D. and Konjevic, R.** (1990) Light and nitrate interaction in phytochrome-controlled germination of *Paulownia tormentosa* seeds. *Planta.* 181, 239-243.
- Gutheil, W.G., Holmquist, B. and Valle, B.L.** (1992) Purification, characterization and partial sequence of the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*: A class III alcohol dehydrogenase. *Biochemistry.* 31, 475-481.
- Gutiérrez-Alcalá, G., Gotor, C., Meyer, A.J., Fricker, M., Vega, J.M. and Romero, L.C.** (2000) Glutathione biosynthesis in *Arabidopsis* trichome cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 11108-11113.
- Hallier, E., Schröder, K.R., Asmuth, K., Dommermuth, A., Aust, B. and Goergens, H.W.** (1994) Metabolism of dichloromethane (methylene chloride) to formaldehyde in human erythrocytes: influence of polymorphism of glutathione transferase Theta (GST T1-1). *Ach. Toxicol.* 68, 423-427.
- Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G.** (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8, 1773-1791.
- Han, C.-L., Liao, C.-S., Wu, C.-W., Hwong, C.-L., Lee, A.-R. and Yin, S.-L.** (1998) Contribution to first-pass metabolism of ethanol and inhibition by ethanol for retinal oation in human alcohol dehydrogenase family. *Eur. J. Biochem.* 254, 24-31.
- Hayat, M.A.** (1981) Fixation of electron microscopy. New York, Acad. Press.
- Heck, H. d'A. and Casanova-Schmitz, M.** (1984) Biochemical toxicology of formaldehyde. In *Review of Biochemical Toxicology*. Vol. 6 (Hodgson, E., Bend, J.R., Philpot, R.M. eds), 155-189. Elsevier: Amsterdam.
- Hedberg, J.J., Griffiths, W.J., Nilsson, S.J.F. and Höög, J.O.** (2003) Reduction of S-nitroglutathione by human alcohol dehydrogenase 3 is an irreversible reaction as analysed by electrospray mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.* 270, 1249-1256.
- Herde, O., Atzorn, R., Fisahn, J., Wasternack, C., Willmitzer, L. and Peña-Cortés, H.** (1996) Localized wounding by heat initiates the accumulation of proteinase inhibitor II in abscisic acid-deficient plants by triggering jasmonic acid biosynthesis. *Plant Physiol.* 112, 853-860.

**Hildmann, T., Ebneith, M., Peña-Cortés, H., Sánchez-Serrano, J.J., Willmitzer, L. and Prat, S.** (1992) General roles of abscisic and jasmonic acid in gene activation as a result of mechanical damage. *Plant Cell*. 4, 1157-1170.

**Hirata, T., Tamura, Y., Yokobatake, N., Shimoda, K. and Ashida, Y.** (2000) A 38 kDa allylic alcohol dehydrogenase from the cultured cell of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*. 55, 297-303.

**Holmquist, B. and Vallee, B.L.** (1991) Human liver class III alcohol dehydrogenase and glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase are the same enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 1371-1377.

**Höög, J.O. and Brandt, M.** (1995) Mammalian class VI alcohol dehydrogenase. Novel types of the rodent enzymes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 372, 355-364.

**Huang, J.W., Blaylock, M.J., Kapulnik, Y. and Ensley, B.D.** (1998) Phytoremediation of uranium-contaminated soils: role of organic acids in triggering uranium hyperaccumulation in plants. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2004-2008.

**Hunt, M.D., Neuenschwander, U.H., Delaney, T.P., Weymann, K.B., Friedrich L.B, Lawton, K.A., Steiner, H.Y. and Ryals, J.A.** (1996) Recent advances in systemic acquired resistance research: a review. *Gene*. 179, 89-95.

**IARC** (1995) Formaldehyde. In IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Wood Dust and Formaldehyde. Vol. 62, 217-362, IARC, Lyon.

**Iborra, F. J., Renau-Piqueras, J., Portoles, M., Boleda, M.D., Guerri, C. and Parés, X.** (1992) Immunocytochemical and Biochemical Demonstration of Formaldehyde Dehydrogenase (Class III Alcohol Dehydrogenase) in the Nucleus. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 1865-1878.

**Iborra, J.R.** (1994) Caracterización de la Formaldehído Deshidrogenasa, una nueva proteína nuclear. Tesis Doctoral.

**Jefferson, S.L., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W.** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6, 3901-3907.

**Jensen, D.E., Belka, G.K. and Dubois, G.C.** (1998) S-nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isozyme. *Biochem. J.* 331, 659-668.

- Jones, D.A. and Jones, J.D.G.** (1997) The role of leucine-rich repeat proteins in plant defenses. *Adv. Bot. Res.* 24, 89-167.
- Jörnvall, H. and Höög, J.O.** (1995) Nomenclature of alcohol dehydrogenases. *Alcohol.* 30, 153-161.
- Jörnvall, H., Danielsson, O., Eklund, H., Hjelmqvist, L., Höög, J.O., Parés, X., Shafqat, J.** (1993) Enzyme and isozyme developments within the medium-chain alcohol dehydrogenase family. *Adv. Exp. Med. Biol.* 328, 533-544.
- Jörnvall, H., Höög, J.O., Persson, B. and Parés, X.** (2000) Pharmacogenetics of the alcohol dehydrogenase system. *Pharmacology.* 61, 184-191.
- Julià, P., Farrés, J. and Parés, X.** (1983) Purification and partial characterization of a rat retina alcohol dehydrogenase active with ethanol and retinal. *Biochem. J.* 213, 547-550.
- Julià, P., Farrés, J. and Parés, X.** (1986) Ocular alcohol dehydrogenase in the rat: regional distribution and kinetics of the ADH-1 isozyme with retinal and retinal. *Exp. Eye. Res.* 42, 305-314.
- Julià, P., Farrés, J. and Parés, X.** (1987) Characterization of three isoenzymes of rat alcohol dehydrogenase. Tissue distribution and physical and enzymatic properties. *Eur. J. Biochem.* 162, 179-187.
- Kaiser, R., Fernández, M.R., Parés, X. and Jörnvall, H.** (1993) Origin of the human alcohol dehydrogenase system: Implications from the structure and properties of the octopus protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 11222-11226.
- Kaiser, R., Holmquist, B., Vallee, B.L. and Jörnvall, H.** (1989) Characteristics of mammalian class III alcohol dehydrogenases, an enzyme less variable than the traditional liver enzyme of class I. *Biochemistry* 28, 8432-8438.
- Katagari, F., Thilmony, R. and Yang He, S.** (2002) The Arabidopsis thaliana - Pseudomonas syringae interaction. *The Arabidopsis Book.* American Society of Plant Biologists.
- Kato, K., Matsumoto, T., Koiwai, A., Mizusaki, S., Nishida, K., Noguchi, M. and Tamki, E.** (1972) In "Fermentation Technology Today" (G.Terui, ed), pp 689-695. Soc. Ferment. Technol., Osaka, Japan.
- Kawano, T., Sahashi, N., Takahashi, K., Uozumi, N. and Muto, S.** (1998) Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant Cell Physiol.* 39, 721-730.

- Keeley, J.E. and Fotheringham, C.J.** (1997) Trace gas emissions and smoke-induced seed germination. *Science*. 276, 1248-1250.
- Keller, D.A., heck, H.D.A., Randall, H.W. and Morgan, K.T.** (1990) Histochemical localization of Formaldehyde Dehydrogenase in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 106, 311-326.
- Kernan, A. and Thornberg, R.W.** (1989) Auxin levels regulate the expression of a wound-inducible proteinase inhibitor II-chloram-phenicol acetyl transferase gene fusion *in vitro* an *in vivo*. *Plant Physiol.* 91, 73-78.
- Klessig, D.F. and Malamy, J.** (1994) The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.* 26, 1439-1458.
- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E. and Silva, H.** (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. USA.* 97, 8849-8855.
- Koch, E. and Slusarenko, A.** (1990) Arabidopsis is susceptible to infection by a downy mildew fungus. *Plant Cell.* 2, 437-445.
- Koivusalo, M., Baumann, M. and Uotila, L.** (1989) Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase. *FEBS lett.* 257, 73-83.
- Kriz, A.R., Wallace, M.S. and Paiva, R.** (1990) Globulin gene expression in embryos of maize viviparous mutants. *Plant Physiol.* 92, 538-542.
- Kukielka, E. and Cederbaum, A.I.** (1995) Increased oxidation of ethylene glycol to formaldehyde by microsomes after ethanol treatment: role of oxygen radicals and cytochrome P450. *Toxicology Letters.* 78, 9-15.
- Kumar, D. and Klessig, D.F.** (2000) Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Mol Plant Microbe Interact.* 13, 347-351.
- Kvalness-Krick, K. and Jorns, M.S.** (1987) Interaction of tetrahydrofolate and other folate derivatives with Bacterial Sarcosine Oxidase. *Biochemistry* 26, 7391-7395.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Latin, S., O'Brien, M. and Maton, P.** (1999) Pollination, wounding and jasmonate treatments induce the expression of a developmentally regulated pistil dioxygenase at a distance, in the ovary, in the potato *Solanum chacoense* bitt. *Plant Mol. Biol.* 41, 371-386.
- Le, L., Ayer, S., Olace, A.R. and Beyajati, C.** (1990) Analysis of formaldehyde-induced *Adh* mutations in *Drosophila* by RNA structure mapping and direct sequencing of PCR-amplified genomic DNA. *Biochem. Genet.* 28, 367-387.
- Lee, J., Parthier, B. and Lobler, M.** (1996) Jasmonate signalling can be uncoupled from abscisic acid signalling in barley: identification of jasmonate-regulated transcripts which are not induced by abscisic acid. *Planta.* 199, 625-632.
- Leshem, Y.Y. and Haramaty, E.** (1996) The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. *Foliage. J. Plant Physiol.* 148, 258-263.
- Leshem, Y.Y., Wills, R.B.H. and Veng-Va Ku, V.** (1998) Evidence for the function of the free radical gas –nitric oxide (NO)- as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol. and Biochem.* 36, 825-833.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, C.** (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease response. *Cell.* 79, 583-593.
- Levy, S., Nocentini, S. and Billardon, C.** (1983) Induction of cytogenetic effects in human fibroblast cultures after exposure to formaldehyde or X-rays. *Mutat. Res.* 119, 309-317.
- Li, L., Cheng, X.F., Leskevich, J., Umezawa, T., Harding, S.A. and Chiang V.L.** (2001) The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. *The Plant Cell.* 13, 1567-1585.
- Liber, H.L., Benforado, K., Crosby, R.M., Simpson, D. and Skopek, T.R.** (1989) Formaldehyde-induced and spontaneous alterations in human hprt DNA sequence and mRNA expression. *Mutant. Res.* 226, 31-37.
- Lidinger, W., Taucher, J., Jordan, A. and Vogel, W.** (1997) Endogenous production of methanol after the consumption of fruit. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 21, 939-943.
- Liu, L., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J. and Stamler, J.S.** (2001) A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature.* 410, 490-494.



**Logemann, J., Schell, J. and Willmitzer, L.** (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. *Anal. Biochem.* 163, 16-20.

**Luque, T., Atrian, S., Danielsson, O., Jörnvall, H. and González-Duarte, R.** (1994) Structure of the *Drosophila melanogaster* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/ octanol dehydrogenase gene (class III alcohol dehydrogenase). Evolutionary pathway of the alcohol dehydrogenase genes. *Eur. J. Biochem.* 225, 985-993.

**Magaña-Schwencke, N., Elkert, B. and Moustachi, H.** (1978) Biochemical analysis of damage induced in yeast by formaldehyde. Induction of single-strand in DNA and their repair. *Mutation Res.* 50, 181-193.

**Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F. and Raskin, I.** (1990) Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science.* 250, 1002-1004.

**Mardh, G. and Vallee, B.L.** (1986) Human class I alcohol dehydrogenase catalyse the interconversion of alcohol and aldehyde in the metabolism of dopamine. *Biochemistry.* 25, 7279-7282.

**Mardh, G., Luerh, C.A. and Vallee, B.L.** (1985) Human class I alcohol dehydrogenases catalyse the oxidation of glycols in the metabolism of norepinephrine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 4979-4982.

**Marschall, H.U., Oppermann, U.C., Svensson, S., Nordling, E., Persson, B., Höög, J.O. and Jörnvall, H.** (2000) Human liver class I alcohol dehydrogenase gamma isoenzyme: the cytosolic 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase of isobile acids. *Hepatology.* 31, 990-996.

**Martínez, M.C., Achkor, H., Persson, B., Fernández, M.R., Shafqat, J., Farrés, J., Jörnvall, H. and Parés, X.** (1996) Arabidopsis formaldehyde dehydrogenase: molecular properties of plant class III alcohol dehydrogenase provide further insights into the origins, structure and function of plant class P and liver class I alcohol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.*, 849-857.

**Mason, H.S. and Mullet, J.E.** (1990) Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wounding and jasmonic acid. *Plant Cell.* 2, 569-579.

**McEvily, A.J., Holmquist, B., Auld, D.S. and Vallee, B.L.** (1988) 3 $\beta$ -Hydroxy-5 $\beta$  steroid dehydrogenase activity of human liver alcohol dehydrogenase is specific to gamma-subunits. *Biochemistry* 27, 4284-4288.

**McKennis, Jr.H., Turnbull, L.B., Schwartz, S.L., Tamake, E. and Bowman, E.R.** (1962) Demethylation in the metabolism of nicotine. *J. Biol. Chem.* 237, 541-546.

- Meister, A.** (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 263, 17205-17208.
- Métraux, J.P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W. and Inverardi, B.** (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science.* 250, 1004-1006.
- Meyerowitz, E.M.** (1989) *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell.* 56, 263-269.
- Migliore, L., Ventura, L., Barale, R., Loprieno, N., Castellino, S. and Pulci R.** (1989) Micronuclei and nuclear anomalies induced in the gastro-intestinal epithelium of rats treated with formaldehyde. *Mutagenesis.* 4, 327-334.
- Moreno, A. and Parés, X.** (1991) Purification and characterization of a new alcohol dehydrogenase from human stomach. *J. Biol. Chem.* 266, 1128-1133.
- Moser, J., Bagchi, D., Akubue, P.I. and Stohs, S.J.** (1993) Excretion of malondialdehyde, formaldehyde, acetaldehyde and acetone in the urine of rats following acute and chronic administration of ethanol. *Alcohol and alcoholism.* 28, 287-295.
- Moulis, J.-M., Homquist, B. and Vallee, B.L.** (1991) Hydrophobic anion activation of human liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry.* 30, 5743-5749.
- Nagata, T., Nemoto, Y. and Hasezawa, S.** (1992) Tobacco BY-2 cell line as the "HeLa" cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 132, 1-30.
- Neely, W.B.** (1964) The metabolic fate of formaldehyde of <sup>14</sup>C intraperitoneally administered to the rat. *Biochem. Pharmacol.* 13, 1137-1142.
- Nieboer, E. and Richardson, D.H.S.** (1980) The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut. Ser B.* 1, 3-26.
- Nigg, E.A.** (1997) Nucleocytoplasmatic transport: signal, mechanisms and regulation. *Nature* 386, 779-787.
- Norin, A., Van Ophem, P.W., Piersma, S.R., Persson, B., Duine, J.A. and Jörnvall, H.** (1997) Mycothiol-dependent formaldehyde dehydrogenase, a prokaryotic medium-chain dehydrogenase/

reductase, phylogenetically links different eukaryotic alcohol dehydrogenases. Primary structure, conformational modelling and functional correlations. *Eur. J. Biochem.* 248, 282-289.

**Nriagu, J.O and Pacyna, J.M.** (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature.* 333, 134-139.

**O'Donnell, P.J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H.M.O. and Bowles, D.J.** (1996) Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science.* 274, 1914-1917.

**Olson, B.J., Skavdahl, M., Ramberg, H., Osterman, J.C. and Markwell J.** (2000) Formate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*: characterization and possible targeting to the chloroplast. *Plant Sci.* 159, 205-212.

**Overmyer, K., Brosché, M. and Kangasjärvi, J.** (2003) Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends in Plant Sci.* 7, 335-342.

**Pagnussat, G.C., Simontacchi, M., Puntarulo, S. and Lamattina, L.** (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol.* 129, 954-956.

**Parés, X. and Vallee, B.L.** (1981) New human liver alcohol dehydrogenase forms with unique kinetic characteristics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98, 122-130.

**Parés, X., Farrés, J., Vallee, B.L.** (1984) Organ specific alcohol metabolism: placental chi-ADH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 1047-1055.

**Parés, X., Julià, P. and Farrés, J.** (1985) Properties of rat retina alcohol dehydrogenase. *Alcohol.* 2, 43-46.

**Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S. and Ryan, C.A.** (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science.* 253, 895-898.

**Pedroso, M.C., Magalhaes, J.R. and Durzan, D.** (2000) A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. *J. Experim. Botany* 347, 1027-1036.

**Pelacho, A.M. and Mingo-Castel, A.M.** (1991) Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured *in vitro*. *Plant Physiol.* 97, 1253-1255.

**Peña-Cortés, H., Fisahn, J. and Willmitzer, L.** (1995) Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 4106-4113.

**Peña-Cortés, H., Prat, S., Atzorn, R., Wasternack, C. and Willmitzer, L.** (1996) Abscisic acid- deficient plants do not accumulate proteinase inhibitor II following systemin treatment. *Planta*. 198, 447-451.

**Peña-Cortés, H., Sánchez-Serrano, J.J., Mertens, R., Willmitzer, L. and Prat, S.** (1989) Abscisic acid is involved in the wound- induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86, 9851-9855.

**Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Hoffland, E. and Van Pelt, J.A.** (1996) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*. 8, 1225-1237.

**Pietruszco, R.** (1979) Nonethanol substrates of alcohol dehydrogenase. *Biochemistry and Pharmacology of Ethanol* (Majchrowicz, E. and Noble, E.P., eds), 87-106. Plenum Press, New York, USA.

**Pietruszco, R., Crawford, K. and Lester, D.** (1973) Comparison of substrate specificity of alcohol dehydrogenases from human liver, horse liver, and yeast towards saturated and 2-enoic alcohols and aldehydes. *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 50-60.

**Pietrzak, M., Shillito, R.D., Hohn, T. and Potrykus, I.** (1986) Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. *Nucl. Acids Res.* 14, 5857-5868.

**Popescu, G. and Napoli, J.L.** (2000) Analysis of rat cytosolic 9-cis-retinol dehydrogenase activity and enzymatic characteriation of rat ADH III. *Biochem. Biophys. Acta*. 1476, 43-52.

**Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., Murr, D.P. and Watkins, C.B.** (1997) Influence of salicylic acid on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, oxidative stress, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzymes. Salicylic acid-mediated oxidative damage requires H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Pysiol.* 115, 137-149.

**Ras, J., Van Ohem, P.W., Reijnders, W.N.M., Van Spanning, R.J.M., Duine, J.A., Stouthamer, A.H. and Harms, N.** (1994) isolation, sequencing and mutagenesis of the gene encoding NAD and glutathione-dependent formaldehyde (GD-FALDH) from *Paracoccus denitrificans*, in with GD-FALDH is essential for methyltrophic grow. *J. Bact.* 177, 247-251.

**Rashba-Step, J., Step, E., Turro, N.J. and Cederbaum, I.** (1994) Oxidation of glycerol to formaldehyde by microsomes: are glycerol radicals produced in the reaction pathway? *Biochemistry*. 33, 9504-9510.

**Raskin, I.** (1992) Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiol.* 99, 799-803.

- Raskin, I.** (1996) Plant genetic engineering may help environmental clean-up. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 3164-3166.
- Raskin, I., Skubatz, H., Tang, W. and Meeuse, B.J.D.** (1990) Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants. Ann. Bot. 66, 369-373.
- Redel, G.P.** (1975) Arabidopsis as a genetic tool. Ann. Rev. Genet. 9, 111-129.
- Reinbothe, S., Mollenhauer, B., and Reinbothe, C.** (1994) JIPs and RIPs: the regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. Plant Cell. 6, 1197-1209.
- Rennenberg, H. and Lamoreux, G.L.** (1990) Physiological processes that modulate concentration of glutathione in plant cells. Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in higher plants. H. Rennenberg, C.H. Brunold, L.J. De Kok, and I. Stulen (eds.) SBP Academic Publishing, The Hague, 53-65.
- Rickauer, M., Bottin, A. and Esquerre-Tugay, M.** (1992) Regulation of proteinase inhibitor production in tobacco cells by fungal elicitors, hormonal factors and methyl jasmonate. Plant Physiol. Biochem. 30, 579-584.
- Rojo, E., Titarenko, E., León, J., Berger, S., Vancanneyt, G., and Sánchez-Serrano, J.J.** (1998) Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid –dependent and –independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 13, 153-165.
- Ronald, P.** (1998) Resistance gene evolution. Curr. Opin. Plant Biol. 1, 294-298.
- Rose, Z.B. and Racker, E.** (1962) Formaldehyde Dehydrogenase from Bakers' Yeast. J. Biol. Chem. 237, 3279-3281.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y. and Hunt, M.D.** (1996) Systemic acquired resistance. Plant Cell. 8, 1809-1819.
- Ryan, C.** (1974) Assay and biochemical properties of the proteinase inhibitor-inducing factor, a wound hormone. Plant Physiol. 54, 328-332.
- Sakamoto, A., Ueda, M. and Moriwaka, H.** (2002) Arabidopsis glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. FEBS Lett. 515, 20-24.
- Salt, D.E., Smith, R.D. and Raskin, I.** (1998) Phytoremediation. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 643-668.

**Sambrook, J., Fritsh, E.F. and Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

**Sánchez-Fernández, R., Fricker, M., Corben, L.B., White, N.S., Sheard, N., Leaver, C.J., Van Montagu, M., Inzé, D. and May, M.J.** (1997) Cell proliferation and hair tip growth in the Arabidopsis root are under mechanistically different forms of redox control. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 2745-2750.

**Sasnauskas, K., Jomantiene, R., Januska, A., Lebediene, E., Lebedys, J. and Janulaitis, A.** (1992) Cloning and analysis of a *Candida maltosa* gene which confers resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 122, 207-211.

**Schaller, A. and Ryan, C.A.** (1996) Systemin- a polypeptide defense signal in plants. Bioessays. 18, 27-33.

**Schaller, A., Bergey, D.R. and Ryan, C.A.** (1995) Systemin- a polypeptide defense signal in plants. Bioessays. 18, 27-33.

**Schmidt, H.H.W. and Walter, U.** (1994) NO at work. Cell. 78, 919-925.

**Sekiwa-Iijima, Y., Aizawa, Y. and Kubota, K.** (2001) Geraniol dehydrogenase activity to aroma formation in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). J. Agric. Food Chem. 49, 5902-5906.

**Sembdner, G. and Parthier, B.** (1993) The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44, 569-589.

**Shafqat, J., El-Ahmad, M., Danielsson, O., Martínez, M.C., Persson, B., Parés, X. and Jörnvall, H.** (1996) Pea formaldehyde-active class III alcohol dehydrogenase: Common derivation of the plant and animal forms but not of the corresponding ethanol-active forms (classes P and I). Proc. Natl. Acad. SCI. USA 93, 5595-5599.

**Shah, J., Tsui, F. and Klessing, D.F.** (1997) Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (sai1) of Arabidopsis, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the tms2 gene. Mol. Plant-Microbe Interact. 10, 69-78.

**Shaham, J., Bomstein, Y., Meltzer, A., Kaufman, Z., Palma, E. and Ribak, J.** (1996) DNA-protein crosslinks, a biomarker of exposure to formaldehyde in vitro and in vivo studies. Carcinogenesis. 17, 121-125.

**Shara, M.A., Dickson, P.H., Bagchi, D. and Stohss, S.J.** (1992) Excretion of formaldehyde, malonaldehyde, acetaldehyde and acetone in the urine of rats in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, paraquat, endrin and carbon tetrachloride. *J. Chromato.* 576, 221-233.

**Shinyashiki, M., Chiang, K.T., Switzer, C.H., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Thiele, D.J. and Fukuto, J.M.** (2000) The interaction of nitric oxide (NO) with the yeast transcription factor Ace1: A model system for NO-protein thiol interactions with implications to metal metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 2491-2496.

**Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V.K., Dixon, R.A. and Lamb, C.** (1997) Salicylic acid potentiates and agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell.* 9, 261-270.

**Shrammel, A., Gorren, A.C.F., Schmidt, K., Pfeiffer, S. and Mayer, B.** (2003) S-nitrosation of glutathione by nitric oxide, peroxynitrite, and  $^{\bullet}\text{NO}/\text{O}_2^{\bullet}$ . *Free Radical Biol. and Medicine.* 8, 1078-1088.

**Shulaev, V., León, J. and Raskin, I.** (1995) Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? *Plant Cell.* 7, 1691-1701.

**Sibout, R., Eudes, A., Pollet, B., Goujon, T., Mila, I., Granier, F., Séguin, A., Lapierre, C. and Jouanin, L.** (2003) Expression pattern of two paralogs encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase in Arabidopsis. Characterization of the corresponding mutants. *Plant Physiol.* 132, 848-860.

**Singh, N.K., Nelson, D.E., Kuhn, D., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A.** (1989) Molecular cloning of osmotin and regulation of its expression by ABA and adaptation to low water potential. *Plant Physiol.* 90, 1096-1101.

**Skriver, K. and Mundy, J.** (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell.* 2, 503-512.

**Smith, M., Hopkinson, D.A. and Harris, H.** (1971) Developmental changes and polymorphism in human alcohol dehydrogenase. *Ann Hum. Genet.* 34, 251-271.

**Somssich, I.M., Wernert, P., Kiedrowski, S. and Hahlbrock, K.** (1996) Arabidopsis thaliana defense-related protein ELI3 is an aromatic alcohol: NADP<sup>+</sup> oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 14199-14203.

**Strimatter, P. and Ball, E.G.** (1955) Formaldehyde dehydrogenase, a glutathione-dependent enzyme system. *J. Biol. Chem.* 213, 445-461.

**Sugiyama, M., Patieznó, S.R., Cantoni, O. and Costa, M.** (1986) Characterization of DNA lesions induced by  $\text{CaCrO}_4$  in synchronous and asynchronous cultured mammalian cells. *Mol. Pharmacol.* 29, 606-613.

**Sureda, A., Shutle, P., Boeniger, M., Hayes, R.B., Liveingston, G.K., Steenland, K., Stewart, P., Herrick, R., Douthit, D. and Fingerhut, H.** (1993) Cytogenetic effects of formaldehyde exposure in students of mortuary science. *Cancer Epidemiol. Biomarker Preven.* 2, 453-460.

**Svensson, S., Stromberg, P. and Höög, J.O.** (1999) A novel subtype of class II alcohol dehydrogenase in rodents. Unique Pro (47) and Ser(182) modulates hybrid transfer in the mouse enzyme. *J. Biol. Chem.* 274, 29712-29719.

**Tamaki, N. and Hama, T.** (1980) Aldehyde dehydrogenase from Baker's yeast. *Methods in Enzymol.* 89, 469-473.

**Tenhaken, R. and Rubell, C.** (1997) Salicylic acid is needed in hypersensitive cell death in soybean but does not act as a catalase inhibitor. *Plant Physiol.* 115, 291-298.

**Titarenko, E., Rojo, E., León, J. and Sánchez-Serrano, J.J.** (1997) Jasmonic acid-dependent and – independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 115, 817-826.

**Tolf, B.-B., Dahlbom, R., Theorell, H. and Akesson, A.** (1982) Synthetic inhibitors of alcohol dehydrogenase. Pyrazoles containing an unsaturated hydrocarbon residue in the 4-position. *Acta Chem. Scand. B.* 36, 101-107.

**Ueda, J., Kato, J., Yamane, H. and Takahashi, N.** (1981) Inhibitory effect to methyl jasmonate and its related compounds on kinetin-induced retardation of oat leaf senescence. *Physiol. Plant.* 52, 305-309.

**Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E. and Ryals, J.** (1992) Acquired resistance in *Arabidopsis* plant. *Cell.* 4, 645-656.

**Uotila, L. and Koivusalo, M.** (1974) Formaldehyde dehydrogenase from human liver. Purification, properties and evidence for the formation of glutathione thiol esters by the enzyme. *J. Biol. Chem.* 249, 7653-7663.

**Uotila, L. and Koivusalo, M.** (1987) Multiple forms of formaldehyde dehydrogenase from human red blood cell. *Hum. Hered.* 37, 102-106.



- Uotila, L. and Koivusalo, M.** (1989) Glutathione-dependent oxidoreductases: Formaldehyde dehydrogenase, Coenzymes and cofactors. Vol. III. In: Glutathione. Chemical, Biochemical and Medical Aspects. Part .A. (Dolphin, D., Poulson, R. and Avramovic, O., eds.), pp. 517-551, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- US Dept Health and Human Services** (1982) Constituents of tobacco smoke. USPHS Publication No. 82-50179, 322.
- Vallee, B.L. and Bazzone, T.J.** (1983) Isozymes of human liver alcohol dehydrogenase. In: Isozymes: Current topics in Biological and Medical Research 8 (Rattazzi, M.C., Scandalios, J.G. and Witt, G.S., eds.). Alan R. Liss, New York. 219-244.
- Van Loon, L.C.** (1990) The nomenclature of pathogenesis-related proteins. Annu. Rev. Physiol. and Plant Mol. Pathol. 37, 229-230.
- Van Ophem, P.W., Van Beeumen, J. and Duine, J.A.** (1992) NAD-linked, factor-dependent formaldehyde dehydrogenase or trimeric, zinc-containing, long –chain alcohol dehydrogenase from *Amycolatopsis methanolica*. Eur. J. Biochem. 206, 511-518.
- Vick, B.A. and Zimmerman, D.C.** (1987) Pathways metabolism in spinach leaf chloroplasts. Plant Physiol. 85, 1073-1078.
- Von Wartburg, P.P., Bethune, J.L. and Vallee, B.L.** (1964) Human liver alcohol dehydrogenase. Kinetic and physiochemical properties. Biochemistry. 3, 1775-1782.
- Vossen, C. and Erard, M.** (2002) Down-regulation of nuclear receptor DNA-binding activity by nitric oxide--HNF4 as a model system. Med Sci Monit. 8, RA217-RA220.
- Wagner F.W., Burger, A.R. and Vallee, B.L.** (1983) kinetic properties of human liver alcohol dehydrogenase: oxidation of alcohols by class I isoenzymes. Biochemistry 22, 1857-1863.
- Wagner, F.W., Parés, X., Holmquist, B. and Vallee, B.L.** (1984) Physical and enzymatic properties of class III isoenzyme of human liver alcohol dehydrogenase:  $\chi$ -ADH. Biochemistry. 23, 2193-2199.
- Walker-Simmons, M. and Ryan, C.A.** (1986) Proteinase inhibitor I accumulation in tomato suspension culture. Induction by plant and fungal cell wall fragments and an extracellular polysaccharide secret into the medium. Plant Physiol. 80, 68-71.

- Wasternack, C. and Parthier, B.** (1997) Jasmonate-signaled plant gene expression. *Trends Plant Sci.* 2, 302-307.
- Wasternack, C., Atzorn, R., Peña-Cortés, H. and Parthier, B.** (1996) Alteration of gene expression by jasmonate and ABA in tobacco and tomato. *J. Plant Physiol.* 147, 503-510.
- Waydhas, C., Weigl, K. and Sies, H.** (1978) The Disposition of Formaldehyde and Formate Arising from Drug N-Demethylations Dependent on Cytochrome P-450 in Hepatocytes and in Perfused Rat Liver. *Eur. J. Biochem.* 89, 143-150.
- Wehner, E.P., Rao, E. and Brendel, M.** (1993) Molecular structure and genetic regulation of SFA, a gene responsible for resistance to formaldehyde in *Sacharomyces cerevisiae*, and characterization of its protein product. *Mol. Gen. Genet.* 237, 351-358.
- Weidhase, R.A.E., Kramell H.M., Lehmann, J., Liebisch, H.W., Lerbs, W. and Parthier, B.** (1987). Methyljasmonate-induced changes in the polypeptide pattern of senescing barley leaf segments. *Plant Sci.* 51, 177-186.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Kessig, D.F. and Durner, J.** (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* 6, 177-183.
- White, R.F.** (1979) Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology.* 99, 410-412.
- Wolverton, B.C., Johnson, A. and Bounds, K.** (1989) Interior Landscape Plants for Indoor Air Pollution Abatement: Final Report. National Aeronautics and Space Administration, John C. Stennis Space Center, Pearl River, MS.
- Xie, Z. and Chen, Z.** (1999) Salicylic acid induces rapid inhibition of mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation in tobacco cells. *Plant Physiol.* 120, 217-226.
- Yalpani, N., Enyedi, A.J., Leon, J. and Raskin, I.** (1994) Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid and pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta,* 193, 373-376.
- Yang, Z.-N., Davis, G.J., Hurley, T.D., Stone, C.L., Li, T.-K. and Bosron, W.F.** (1994) Catalytic efficiency of human alcohol dehydrogenase for retinal oxidation and retinal reduction. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 18, 587-591.

**Yasunami, M., Chen, C.S. and Yoshida, A.** (1991) A human alcohol dehydrogenase gene (*ADH6*) encoding an additional class of isozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 7610-7614.

**Yin, S.J., Wang, M.F., Liao, C.S., Chen, C.M. and Wu, C.W.** (1990) Identification of a human alcohol dehydrogenase with distinctive kinetic properties. *Biochem. Int.* 22, 829-835.

**Yu, P.H., Lai, C.T. and Zuo, D.M.** (1997) Formation of Formaldehyde from Adrenaline in vivo; a Potential Risk Factor for Stress-Related Angiopathy. *Neurochemical Research* 22, 615-620.

**Zambryski, P., Joos, H., Genofello, C., Leemans, J., van Montagu, M. And Schell, J.** (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.

**Zeevaart, J.A.D. and Creelman, R.A.** (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 39, 439-473.

**Zheng, Y.W., Bey, M., Liu, H. and Felder, M.R.** (1993) Molecular basis of the alcohol dehydrogenase-negative deer mouse. Evidence for deletion of the gene for class I enzyme and identification of possible new enzyme calss. *J. Biol. Chem.* 268, 24933-24939.

---

En esta Tesis Doctoral hemos demostrado que la expresión de la FALDH está regulada por herida y por diferentes hormonas vegetales, tales como el ácido jasmónico y el ácido salicílico. También hemos generado plantas transgénicas de *A. thaliana* portadoras de una construcción antisentido, que presenta una importante disminución de la actividad enzimática FALDH, directamente relacionados con los niveles de proteína. Dichas plantas transgénicas tienen una menor capacidad de metabolizar formaldehído exógeno y presentan un aumento de la resistencia basal a patógenos fúngicos y bacterianos. Por otra parte, las plantas transgénicas con niveles de FALDH modificados (tanto las antisentido como las de sobreexpresión) muestran un fenotipo diferente, principalmente en la raíz. La inmunolocalización en tejidos reveló que la FALDH presenta un patrón de expresión en hojas y en raíz que es específico del tipo celular. A nivel subcelular, la FALDH está presente en citoplasma, núcleo y cloroplasto. Esta es la primera vez que se describe la localización cloroplástica de la FALDH.

---

*Barcelona, 2004*