

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Departamento de Biomedicina y Biotecnología



TESIS DOCTORAL

RESPUESTAS DE LOS FICOBIONTES DE
***Ramalina farinacea* FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO**

Raquel Álvarez Cubero

Alcalá de Henares, 2015

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Departamento de Biomedicina y Biotecnología



TESIS DOCTORAL

RESPUESTAS DE LOS FICOBIONTES DE
***Ramalina farinacea* FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO**

Memoria presentada en la Universidad de Alcalá
por la Licenciada *Raquel Álvarez Cubero*
para optar al grado de Doctor en Genética y
Biología Celular.

EVA MARÍA DEL CAMPO LÓPEZ, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de Alcalá

LEONARDO CASANO MAZZA, Profesor Titular del Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de Alcalá, y

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria titulada “**Respuestas de los ficobiontes de *Ramalina farinacea* frente al estrés oxidativo**” ha sido realizada por Dña. Raquel Álvarez Cubero en el Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de Alcalá, con nuestra inmediata dirección y autorizamos su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Alcalá de Henares, diciembre 2014

Fdo.: Dra. Eva M^a del Campo López Fdo.: Dr. Leonardo Casano Mazza

JUAN SOLIVERI DE CARRANZA, Director del Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá

CERTIFICA:

Que la presente Memoria titulada “**Respuestas de los ficobiontes de *Ramalina farinacea* frente al estrés oxidativo**” ha sido realizada por Dña. Raquel Álvarez Cubero en el programa de Doctorado “Genética y Biología Celular”, adscrito al Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá, y cumple todos los requisitos para su presentación como Tesis Doctoral.

Alcalá de Henares, diciembre 2014

Fdo.: Dr. Juan Soliveri de Carranza

Al fin, ha llegado el momento en el que se acaba un proceso que sin duda ha sido una carrera de fondo, y la verdad es que son muchas las personas a las que tengo que agradecer su ayuda, su apoyo y su compañía. Gracias a todos por estar ahí en los momentos duros, esos en los que las fuerzas flaquean.

A mis directores de tesis, Leonardo y Eva, gracias por animarme a continuar con mi formación y por haber hecho posible que el trabajo y el esfuerzo de estos años haya merecido la pena. Gracias a Leonardo por no dar un experimento por perdido, por enseñarme a tener paciencia y constancia. Gracias a Eva por todos los consejos y por su ayuda.

A las personas que forman parte de este equipo de investigación, Myriam, Alfredo... y especialmente a Eva Barreno, Fran García por las maravillosas fotos de los fotobiontes (la portada ha quedado muy alegre gracias a esta foto tan representativa).

A los miembros del Dpto. de Ciencias de la Vida, en especial Carmen Bartolomé y Carlos Illana, que me han apoyado y con los que me encanta conversar.

A Luis y a Juan, del Dpto. de Biología de la UAM, donde he tenido un ambiente de trabajo excepcional. Muchas gracias por todo vuestro tiempo y esfuerzo, el apoyo y la ayuda con el trabajo de las biotioles.

A Manolo y Alba, del Dpto. de Biomedicina y Biotecnología de la UAH, por el liofilizado de las muestras y enseñarme a usar la French Press. Muchas gracias por vuestra ayuda y amabilidad.

A otras personas que trabajan en la UAH. Gracias, Fernando Flores, por estar siempre ahí solucionando los problemas que surgen en el día a día, y brindarme su apoyo y su confianza. Y también a Rufino y Antonio, porque sois geniales y habéis hecho que los descansos sean mucho más graciosos e interesantes.

A mi gran amiga Alicia, por acompañarme a lo largo de este recorrido, ayudarme en los momentos difíciles, escucharme cuando necesitaba desahogarme y entenderme siempre. Estar a tu lado es un lujo, SD ya sabes que no tiene por qué ser desvío estándar. Estoy segura de que siempre recordaremos esta etapa con una sonrisa en la cara, y por supuesto que lo lograremos...

A todos mis amigos, Txomin que siempre consigue contagiarme de su entusiasmo, con el que me encanta debatir de cualquier tema y que me obliga a salir al monte. Gracias a Javi, por ser una persona auténtica y porque sé que estarás ahí para lo que sea. Gracias a Bea y a David, para mi Córdoba es un refugio y eso es porque me encanta pasar tiempo con vosotros. Amiga gracias por consolarme y animarme en los momentos difíciles, de verdad que parece que estas aquí al lado.

A mis padres, ya que sin su infinita paciencia, complicidad y generosidad no hubiera podido continuar. Es una maravilla tener unos padres que te quieren y apoyan de forma tan incondicional. Gracias por haber luchado tanto para darnos a mi hermano y a mí todo y más, por protegernos, enseñarnos y hacernos felices. Ya sabéis lo mucho que os quiero...

A mi hermano, gracias por ser un ejemplo para mí, eres un crack, estoy muy orgullosa de mi hermanito pequeño. Contigo tengo algunos de los mejores recuerdos de mi vida y sé que siempre estas a mi lado. También quiero darle las gracias a Carol, si hubiera tenido una hermana me hubiera encantado que fuese como ella, tan alegre y cariñosa. Tengo mucha suerte de que hayas sido tú, gracias por ser buena conmigo. Os quiero mucho mis niños, gracias por hacerme sonreír.

A los demás miembros de mi familia, gracias por creer que mi trabajo y esfuerzo tenían valor. En especial a mi tía, Emi, porque siempre has estado pendiente, dándome ánimos y alegrándote por mí. También a Paqui y a Elena, gracias por creer que lo que hacía era importante y que yo podía lograrlo, por vuestros consejos y por hacerme sentir tan bien.

Y gracias a Fran, te quiero.

A Fran

ABREVIATURAS

Para facilitar la lectura de los capítulos, tablas, esquemas y figuras incluidas en la presente memoria, a continuación se incluye una ordenación alfabética de las abreviaturas más utilizadas:

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	ADN ribosomal
ARN	Ácido ribonucleico
ADNc	ADN copia
APX	Ascórbico peroxidasa
BHT	2,6-di-tert-butil-4-metilfenol
BSA	Albúmina sérica bovina
BSO	Butionina sulfoximina
c.a.	Cifra aproximada
CAT	Catalasa
CBB	Azul de Coomassie
Cd	Cadmio
cps.	Cantidad suficiente para
CuHP	Hidroperóxido de cumeno
DCF	2',7'- diclorofluoresceína
DCFH	2',7'-diclorohidrofluoresceína
DCFH ₂ -DA	Diacetato de 2', 7-dihidro dicloro fluoresceína
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen diaminotetraacético
γ-ECS	γ-glutamyl cisteinil sintetasa
EPS	Sustancias poliméricas extracelulares
GSH	Glutation reducido
GR	Glutation reductasa

GSSG	Glutation oxidado
h	Horas
HM	Metales pesados
HSP	Proteínas de choque térmico
IEF	Isoelectroenfoque
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
ITS	Espaciadores transcritos internos
Kb	Kilobase
Knt	Kilonucleótido
KDa	KiloDalton
min	Minutos
MDA	Malondialdehído
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio
N-AcCys	N-acetilcisteína
NBT	Azul de tetrazolio
ND-PAGE	Electroforesis en gel nativo
nt	Nucleótido
pb	Pares de bases
Pb	Plomo
PBST	Tampón fosfato salino con 0,1% Tween 20
PCs	Fitoquelatinas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Proteínas Extracelulares
PF	Peso fresco
PI	Punto isoeléctrico
Pm	Peso molecular
PS	Peso seco
PSI	Fotosistema I

PSII	Fotosistema II
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel desnaturalizante
SOD	Superóxido dismutasa
TBARS	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
U	Unidades enzimáticas

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	3
1.1. Simbiosis liquénica.....	5
1.1.1. Micobionte	6
1.1.2. Fotobionte.....	7
1.1.3. Integración anatómica y funcional de los simbioses.....	8
1.1.4. El origen de la simbiosis liquénica	11
1.1.4.1. Primeras evidencias fósiles	12
1.1.4.2. Establecimiento de la simbiosis liquénica	16
1.2. Propiedades de los líquenes	18
1.3. Estrés oxidativo	20
1.3.1. Estrés oxidativo y mecanismos de defensa	20
1.3.2. Tolerancia al estrés por metales pesados	22
1.4. El líquen <i>Ramalina farinacea</i>	25
1.4.1. <i>Ramalina farinacea</i>	25
1.4.2. Evidencias morfológicas y moleculares de la coexistencia de dos fotobiontes en <i>Ramalina farinacea</i>	26
1.4.3. Estudios fisiológicos previos con TR1 y TR9.....	31
1.5. Hipótesis y Objetivos	33
2. MATERIALES Y MÉTODOS	37
2.1. Material biológico	39
2.2. Métodos	41

2.2.1. Aislamiento de ficobiontes liquénicos	41
2.2.1.1. Ficobiontes del género <i>Trebouxia</i>	41
2.2.1.2. Fotobiontes del género <i>Coccomyxa</i>	41
2.2.2. Cultivo de ficobiontes en medio de cultivo líquido y semisólido	42
2.2.3. Tratamientos de estrés	44
2.2.3.1. Tratamientos con hidroperóxido de cumeno	44
2.2.3.2. Tratamientos con plomo	45
2.2.3.3. Tratamientos de deshidratación-rehidratación en presencia de plomo	46
2.2.3.4. Tratamientos con cadmio	47
2.2.3.5. Tratamientos con cadmio y plomo en microalgas pre-tratadas con BSO	47
2.2.4. Medida de pigmentos fotosintéticos	48
2.2.5. Extracción, amplificación y secuenciación de ADN genómico	48
2.2.5.1. Aislamiento de ADN total.....	49
2.2.5.2. Amplificación por PCR del ADN aislado.....	49
2.2.5.3. Separación electroforética, purificación de productos de amplificación y secuenciación	50
2.2.6. Preparación de extractos proteicos	51
2.2.6.1. Proteínas solubles	51
2.2.6.2. Proteínas insolubles (o Proteínas de membrana)	52
2.2.6.3. Extracción de exoproteínas de pared por métodos no disruptivos	52
2.2.7. Actividad de enzimas antioxidantes	53
2.2.7.1. Zimogramas de Superóxido Dismutasa y Glutathion Reductasa	53
2.2.7.1.1. Revelado de actividad Superóxido Dismutasa	54

2.2.7.1.2. Revelado de actividad Glutation Reductasa.....	55
2.2.7.2. Medida espectrofotométrica de actividades enzimáticas	55
2.2.7.2.1. Actividad Superóxido Dismutasa.....	56
2.2.7.2.2. Actividad Glutation Reductasa	56
2.2.7.2.3. Actividad Ascórbico Peroxidasa	57
2.2.7.2.4. Actividad Catalasa	57
2.2.8. Inmunodetección de proteínas por Western-blot.....	58
2.2.9. Electroforesis bidimensional	61
2.2.10. Tinción de geles.....	61
2.2.11. Cinéticas de generación de radicales libres (ROS)	62
2.2.12. Cinéticas de autofluorescencia de clorofila	63
2.2.13. Medidas de peroxidación lipídica	63
2.2.14. Análisis de biotioles por HPLC	64
2.2.15. Análisis de polímeros extracelulares	65
2.2.15.1. Azúcares neutros	65
2.2.15.2. Ácidos urónicos	65
2.2.15.3. N-acetil aminoazúcares	66
2.2.15.4. Capacidad de quelación de cationes	66
2.2.15.5. Composición glicosídica por HPLC.....	67
2.2.15.6. Proteínas extracelulares.....	67
2.2.16. Estudio de la incorporación y distribución de plomo y cadmio en las células	68
2.2.16.1. Especiación de plomo y cadmio en medio de cultivo	68

2.2.16.2. Incorporación de plomo al interior celular	68
2.2.16.3. Microanálisis de la distribución del plomo	68
2.2.16.4. Determinación de cadmio en diferentes compartimentos celulares....	69
2.2.17. Microscopía electrónica de transmisión.....	70
2.2.18. Análisis estadístico.....	70
2.3. Productos	71
2.3.1. Aparatos y Equipos	71
2.3.2. Esterilización de material y soluciones	71
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
3.1. Respuesta al estrés oxidativo agudo de los ficobiontes aislados de <i>Ramalina farinacea</i>	75
3.1.1. Resultados.....	76
3.1.1.1. Efecto del CuHP sobre pigmentos y proteínas fotosintéticas	76
3.1.1.1.1. Efecto del CuHP sobre pigmentos fotosintéticos	76
3.1.1.1.2. Efecto del CuHP sobre proteínas fotosintéticas	80
3.1.1.2. Estudio comparativo de la modulación de diferentes enzimas antioxidantes	81
3.1.1.2.1. Medida espectrofotométrica de la actividad SOD y GR	82
3.1.1.2.2. Zimogramas de SOD y GR	83
3.1.1.2.3. Inmunodetección de GR por Western-blot.....	87
3.1.1.3. Mecanismos de reparación. Inmunodetección de la chaperona (HSP70)	88
3.1.2. Discusión	89

3.2. Mecanismos de defensa frente al estrés producido por plomo en los ficobiontes aislados de <i>Ramalina farinacea</i>	95
3.2.1. Resultados.....	96
3.2.1.1. Especiación de plomo en medio de cultivo	96
3.2.1.2. Acumulación y distribución subcelular de plomo.....	97
3.2.1.2.1. Contenido intracelular de plomo.....	97
3.2.1.2.2. Distribución subcelular de plomo	98
3.2.1.3. Efectos del plomo sobre los niveles de pigmentos y proteínas fotosintéticos	100
3.2.1.4. Estudio comparativo de la modulación de enzimas antioxidantes ante exposiciones prolongadas con plomo.....	103
3.2.1.5. Sistema de reparación celular. Inmunodetección de la chaperona (HSP70)	108
3.2.2. Discusión	109
3.3. Síntesis de biotioles en ficobiontes de los géneros <i>Trebouxia</i> y <i>Coccomyxa</i> como mecanismo de desintoxicación de metales pesados	115
3.3.1. Resultados.....	117
3.3.1.1. Medida de biotioles en microalgas tratadas con plomo.....	117
3.3.1.2. Análisis de las especies químicas de cadmio en el medio de cultivo .	119
3.3.1.3. Acumulación de cadmio en los diferentes compartimentos celulares y morfología de las paredes celulares.....	120
3.3.1.4. Síntesis de biotioles en ficobiontes tratados con cadmio	123
3.3.1.5. Importancia de la síntesis de biotioles en TR1 y TR9 en la tolerancia al estrés oxidativo por metales pesados	127

3.3.2. Discusión	132
3.4. Contribución a la tolerancia al plomo de los polímeros extracelulares de los ficobiontes aislados de <i>Ramalina farinacea</i>	136
3.4.1. Resultados	137
3.4.1.1. Polisacáridos extracelulares de TR1 y TR9	137
3.4.1.2. Efecto del plomo sobre los EPS de TR1 y TR9.....	138
3.4.1.3. Efecto del plomo sobre los exopolisacáridos de TR1 y TR9	141
3.4.1.4. Estudio preliminar del efecto del plomo sobre el proteoma extracelular de TR1 y TR9.....	143
3.4.1.4.1. Validación del método de extracción de proteínas extracelulares	143
3.4.1.4.2. Efecto del plomo sobre el proteoma extracelular (exoproteoma) de TR1 y TR9	144
3.4.2. Discusión	150
3.5. Efecto del plomo sobre el estado oxidativo de <i>Ramalina farinacea</i> y sus fotobiontes aislados durante la rehidratación.....	155
3.5.1. Resultados	156
3.5.1.1. Caracterización molecular de los talos de <i>R. farinacea</i>	156
3.5.1.2. Efecto del plomo en el estado oxidativo de <i>R. farinacea</i> y en la autofluorescencia de clorofila durante la rehidratación	158
3.5.1.3. Formación intracelular de ROS y parámetros oxidativos durante la rehidratación en ficobiontes aislados de <i>R. farinacea</i>	162
3.5.1.3.1. Efecto en TR1 y TR9 de la rehidratación con agua ultrapura	162
3.5.1.3.2. Efecto en TR1 y TR9 de la rehidratación en presencia de plomo	165
3.5.2. Discusión	169

4. CONSIDERACIONES FINALES Y CONCLUSIONES	173
4.1. Consideraciones finales	175
4.2. Conclusiones.....	178
BIBLIOGRAFÍA	181
PUBLICACIONES	197

RESUMEN

Ramalina farinacea (L.) Ach. es un ascoliquen epífito de tipo fruticuloso con una amplia distribución geográfica, en el que coexisten los mismos dos ficobiontes (provisionalmente: *Trebouxia* sp. TR1 y *Trebouxia* sp. TR9) predominando uno u otro dependiendo del área geográfica. En este trabajo se plantea la hipótesis de que la asociación selectiva de *Ramalina farinacea* con TR1 y TR9 podría determinar su capacidad para colonizar ambientes muy diversos. Esta hipótesis podría explicarse en base a que cada uno de los ficobiontes tuviera comportamientos diferentes frente a condiciones ambientales más o menos estresantes.

La presente memoria de Tesis Doctoral describe los estudios comparativos de las respuestas fisiológicas y mecanismos celulares presentes en los ficobiontes TR1 y TR9, que les permiten hacer frente a situaciones de estrés oxidativo. Se analizaron las respuestas a dos grados diferentes de estrés oxidativo: (i) estrés agudo inducido por el agente pro-oxidante Hidroperóxido de Cumeno; (ii) estrés sub-agudo o crónico generado por la presencia de metales pesados plomo (Pb) y cadmio (Cd) y por la rehidratación en presencia de Pb. En conjunto los resultados obtenidos sugieren que *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 representan dos modelos diferentes de respuesta frente a condiciones ambientales estresantes. TR1 parece tener un sistema de defensa constitutivamente muy activo y responde al patrón clásico de organismo poiquilohídrico. TR9, en cambio, está protegida por una barrera exterior más potente que le permite mantener un sistema defensivo constitutivamente menos activo, el cual puede ser inducido bajo condiciones de estrés. Por otra parte, estudios previos indican la predominancia de uno u otro ficobionte dependiendo del área geográfica. En este trabajo, el análisis comparativo del comportamiento de los ficobiontes aislados y liquenizados durante la rehidratación en presencia de Pb indica que el ficobionte predominante es el principal responsable de la homeostasis rédox del liquen.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Simbiosis líquénica

En 1879 Anton de Bary introduce el término “simbiosis” definiéndolo como la asociación viva de especies diferentes. Esta definición incluye asociaciones tanto mutualistas (con beneficio mutuo) como parasíticas (un organismo resulta perjudicado). En la actualidad es la definición más aceptada, puesto que en muchos casos es difícil determinar cuál es el beneficio ya que ciertas asociaciones pueden ser parasíticas o mutualistas en diferentes etapas y circunstancias ambientales (Smith & Douglas, 1987). La simbiosis puede ser obligada para un organismo que no pueda sobrevivir y reproducirse en ausencia de su compañero y facultativa si no existe dependencia de la asociación. Estos dos tipos de simbiosis no siempre son fáciles de distinguir, ya que existen, por ejemplo, ciertos hongos que pueden crecer aislados en laboratorio pero sólo son hallados en la naturaleza viviendo en simbiosis.

Un tipo de asociación simbiótica la constituyen los talos líquénicos que son sistemas complejos, entidades nuevas que se individualizan a partir de asociaciones simbióticas cíclicas (Chapman & Margulis, 1998; Barreno, 2004) entre, al menos, un micobionte heterótrofo y un socio fotosintético (fotobionte) que puede ser un alga (ficobionte), una cianobacteria (cianobionte) o ambos. Alrededor de un 30% de los hongos conocidos han adoptado algún tipo de asociación, existiendo aproximadamente unas 13.500 especies fúngicas formadoras de asociaciones líquénicas (Hawksworth, 1989). La mayoría de especies pertenecen a la división Ascomycota (80-85%) y un pequeño porcentaje a la Basidiomycota. En cuanto a fotobiontes, el 90-95% pertenecen a la división Chlorophyta, siendo los géneros más comunes: *Trebouxia*, *Trentepohlia*, *Coccomyxa*, *Asterochloris* y *Dictyochloropsis*. Existen también en menor proporción (5-10%) líquenes que contienen cianobacterias como fotobiontes, generalmente del género *Nostoc*.

La integración es una de las características más importantes en la simbiosis: la mayoría de las simbiosis resultan, al menos temporalmente, en algo más que la suma

de las partes (Starr, 1975). En líquenes, la forma, color y tamaño del talo es completamente diferente a la de los simbiontes crecidos en cultivo axénico (DePriest, 2004), indicando que las características liquénicas particulares van más allá de aquellas que muestran mico y fotobionte aisladamente. Una de las más elementales y notables es el amplio rango de distribución geográfica de los líquenes, que sitúa a estos organismos entre los más ubicuos del planeta, habitando en un gran número de ecosistemas (Kershaw, 1985; Longton, 1988; Kappen, 2000). Son capaces de vivir incluso en condiciones extremas que no permiten la supervivencia de otros vegetales y son los pioneros en la colonización de diversos hábitats terrestres (Oksanen, 2006), lo que demuestra el éxito evolutivo de la simbiosis liquénica.

1.1.1. Micobionte

Los hongos formadores de líquenes suelen comportarse como simbiontes obligados que cuando encuentran un fotobionte adecuado son competentes para establecer la simbiosis. Sin embargo, aislados en cultivo no llegan a generar una estructura de talo liquénico, tan sólo producen esporas asexuales pero prácticamente nunca producen estructuras reproductoras organizadas como los hongos de vida libre. En la actualidad no se ha demostrado que existan diferencias morfológicas fundamentales entre hongos liquénicos y de vida libre (Honegger & Bartnicki-Garcia, 1991). Si bien se creía que la presencia de unos orgánulos denominados cuerpos esféricos en algunos grupos de Ascomycetes liquénicos se debía a que cumplía una función específica relacionada con la simbiosis (Griffiths & Greenwood, 1972), esta hipótesis fue descartada puesto que también están presentes en hongos patógenos de plantas y saprófitos (Honegger, 1993; 2001).

1.1.2. Fotobionte

En la actualidad se conocen unos 40 géneros de algas y cianobacterias que establecen simbiosis líquénica y se clasifican en ficobiontes (algas eucariotas) y cianobiontes (cianobacterias) (Friedl & Budel, 2008). Los ficobiontes pueden pertenecer al menos a cinco clases filogenéticamente diversas: Chlorophyceae, Trebouxiophyceae, Ulvophyceae (de la división Chlorophyta), Xantophyceae y Phaeophyceae. Los cianobiontes generalmente pertenecen al género *Nostoc* (DePriest, 2004).

Cerca del 90% de los líquenes tienen algas verdes (división Chlorophyta) como fotobiontes, la mayoría de los cuales pertenecen a la clase Trebouxiophyceae (Nash, 2008). El género *Trebouxia* es el más frecuente y se encuentra en aproximadamente el 20% de los líquenes, la mayor parte pertenecientes al orden Lecanorales. El género *Coccomyxa* es mucho menos frecuente como fotobionte, encontrándose asociado tanto a hongos ascomicetos (p.e. de los géneros *Peltigera* y *Solorina*) como a hongos basidiomicetos (p.e. de los géneros *Multiclavula* y *Omphalina*, actualmente conocido como *Lichenomphalia*) (Peveling & Galum, 1976). Las algas del género *Trebouxia* no suelen encontrarse en forma libre (no simbiótica) en la naturaleza. Sin embargo, las del género *Coccomyxa* se encuentran frecuentemente en forma libre (Honegger, 1991). Otra peculiaridad del género *Coccomyxa* es su capacidad de establecer diferentes tipos de asociaciones con diversos organismos. Se han encontrado en asociaciones simbióticas algas de este género dentro de células de plantas como *Ginkgo biloba* (Tremouillaux-Guiller *et al.*, 2002; Tremouillaux-Guiller & Huss, 2007) y de ciliados unicelulares como *Paramecium bursaria* (Hoshina & Imamura, 2008). También se han encontrado como parásitos en animales como el bivalvo *Mytilus edulis* (Gray *et al.*, 1999). Análisis filogenéticos del género *Coccomyxa*, indican que las especies que establecen simbiosis ya sea de líquenes, plantas o ciliados, se agrupan en un mismo clado mientras que las especies parásitas como *C. parasitica* no se

engloban dentro del mismo (Hoshina & Imamura, 2008; Rodríguez *et al.*, 2008). Esta gran variabilidad en la forma de vida de las algas es indicadora de su enorme versatilidad adaptativa.

La identificación de fotobiontes liquénicos en talo es muy compleja debido a las modificaciones en morfología y ciclos de vida que sufren estos organismos al estar asociados. En el caso de los cianobiontes, las especies que poseen heterocistes aumentan la frecuencia de producción de estas células cuando se encuentran en simbiosis. En el caso de los ficobiontes, la situación es similar ya que se ha suprimido la reproducción sexual y la morfología del cloroplasto puede variar. Por todo ello las investigaciones centradas en clasificar estos organismos han recurrido a su cultivo en condiciones de esterilidad y análisis genético-moleculares con marcadores específicos.

1.1.3. Integración anatómica y funcional de los simbioses

En el talo liquénico las hifas del micobionte se disponen rodeando a los fotobiontes, estableciendo contacto con ellos mediante unas estructuras de penetración denominadas haustorios (**Figura 1.1**). Existen diferentes grados de penetración, unos muy patentes y otros difíciles de observar cuando los haustorios no profundizan mucho en las células algales, debido a que nunca atraviesan la pared celular de éstas (Ahmadjian, 1993).

En cualquier caso, la interacción entre simbioses permite el intercambio de sustancias entre ambos. El hongo se alimenta de nutrientes producidos por el alga a través de la fotosíntesis. La transferencia metabólica depende en gran medida del tipo de fotobionte presente, ya que el azúcar sintetizado es diferente entre algas verdes (ribitol) y cianobacterias (glucosa); ambos azúcares son transferidos al hongo por difusión y posteriormente transformados por este en manitol. El alga por su parte

consigue protección frente al estrés ambiental, incrementando la capacidad de absorber agua y sales minerales gracias a las hifas del hongo (Nash, 2008).

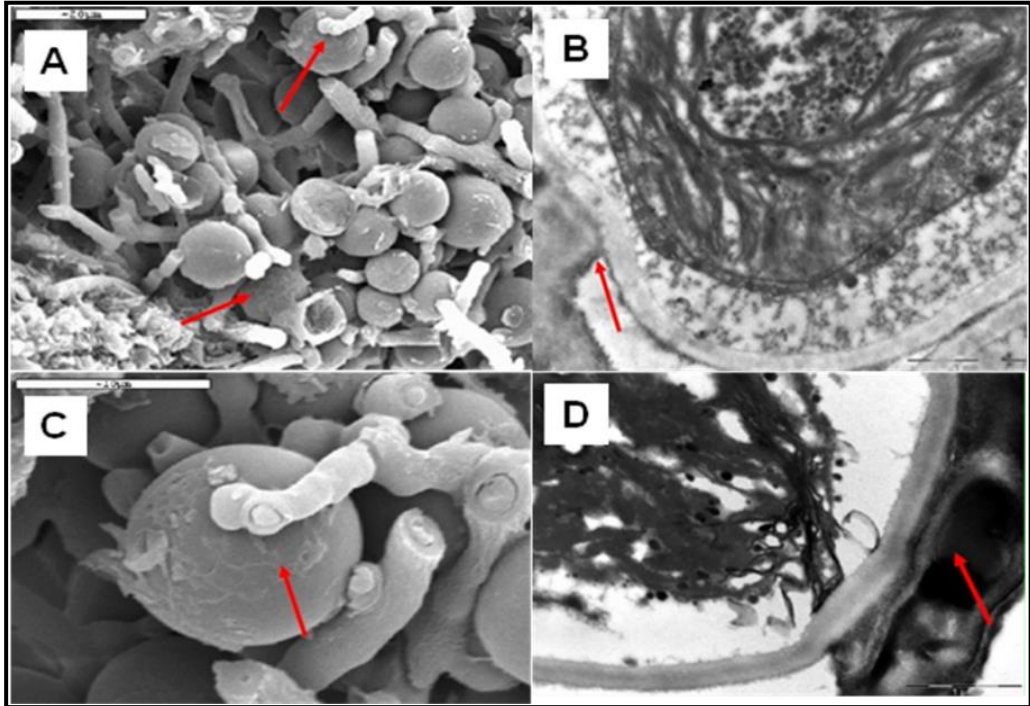


Figura 1.1. Hifas del micobionte contactando con algas del género *Trebouxia*. A, C: SEM. B, D: TEM. Las flechas rojas indican la presencia de haustorios. Obsérvese en B y D la presencia del cloroplasto del alga.

La integración morfológica y metabólica producida entre los simbioses posibilita la aparición de nuevas propiedades emergentes que representan innovaciones evolutivas (Margulis & Barreno, 2003; Barreno, 2004). De esta forma, el diferente grado de asociación entre los componentes determina las variadas estructuras liquénicas que pueden hallarse en la naturaleza y que han sido sujeto de distintas clasificaciones (**Figura 1.2**).

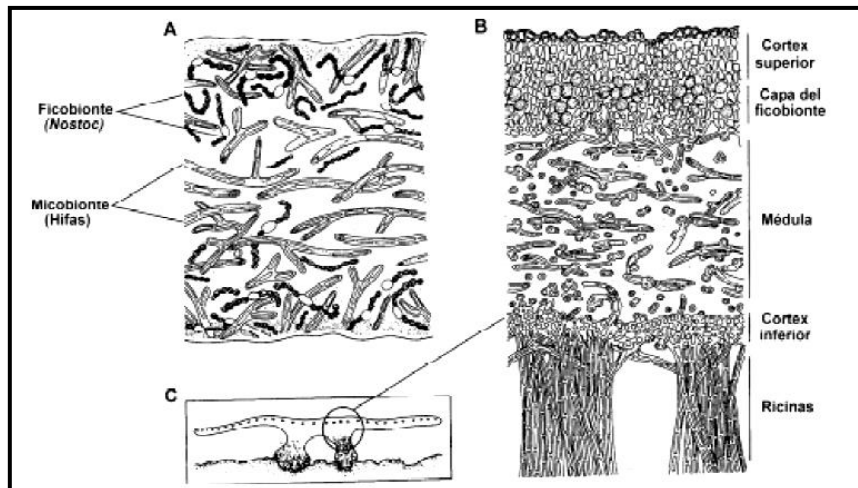


Figura 1.2. Estructuras líquénicas. A. Homómera. B. Heterómera.

En la estructura homómera, micobionte y fotobionte se encuentran distribuidos de forma homogénea, es la típica estructura de líquenes que contienen cianobacterias. Mientras que en la heterómera, micobionte y fotobionte ocupan diferentes estratos dentro del líquen. Se distingue un córtex superficial, de hifas muy apretadas donde por lo general nunca se encuentran rastros del alga. A continuación aparece la capa gonidial, con hifas laxas mezcladas con algas, donde se produce la fotosíntesis en el alga y la interacción de ésta con el hongo se hace más patente por la presencia de los haustorios. Por último se encuentra la médula, que presenta hifas poco apretadas.

La estructura heterómera presenta además diferentes variaciones morfológicas que originan fundamentalmente tres tipos de líquenes (**Figura 1.3**):

1. *Crustáceos*: Crecen fuertemente unidos al sustrato, hasta el punto de que es imposible separarlos de él sin destruirlos.
2. *Foliosos*: El talo se encuentra parcialmente despegado del sustrato, aunque puede estar fijado por un conjunto de ricinas.
3. *Fruticulosos*: Poseen por lo general un único punto de unión al sustrato (disco de fijación), quedando el resto del organismo péndulo o extendido.

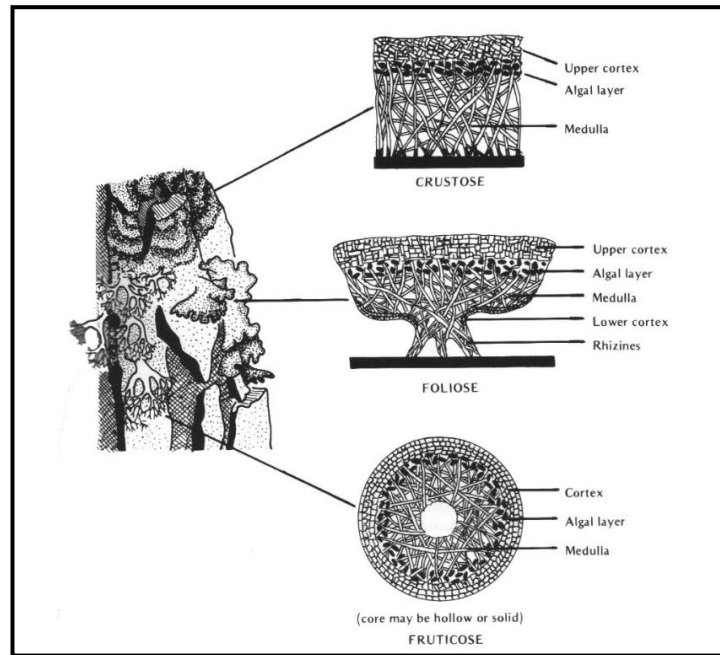


Figura 1.3. Variaciones morfológicas del talo liquénico: crustáceo, folioso y fruticulado (Ahmadjian, 1993).

Los diferentes estratos y su posición en el talo son el resultado de respuestas adaptativas entre cada simbionte y su ambiente externo (Jahns, 1987). En la mayoría de los líquenes los fotobiontes tan sólo representan un 5-10% de la masa total.

1.1.4. El origen de la simbiosis liquénica

A fin de conocer cuántas veces se ha originado la liquenización a lo largo de la historia evolutiva, en los últimos 15 años se han realizado un gran número de estudios filogenéticos basados en diversas secuencias génicas de hongos y fotobiontes liquénicos. Gargas *et al.* (1995) determinaron cinco linajes independientes de hongos liquénicos, siendo tres de ellos del grupo de los Basidiomycetes y dos pertenecientes a Ascomycetes. Además, la simbiosis liquénica ha podido evolucionar en varias ocasiones, produciéndose adquisiciones y pérdidas del hábito liquénico: sólo unos pocos hongos formadores de líquenes han sido hallados en condiciones de vida libre (Smith & Douglas, 1987).

Los talos liquénicos presentan gran originalidad morfológica, fisiológica, adaptativa y reproductiva que les ha hecho ser interpretados como “micro-ecosistemas” peculiares. El reciente descubrimiento de fósiles bien conservados (Yuan *et al.*, 2005; Karatygin *et al.*, 2009) sustenta el criterio de que los líquenes han estado interviniendo desde el Proterozoico sobre la meteorización de las rocas y ciclos biogeoquímicos globales del sistema Tierra, antes que las plantas vasculares.

1.1.4.1. Primeras evidencias fósiles

Rhynie Chert es un yacimiento paleontológico datado en 410 millones de años (Devónico inferior) en los alrededores de la ciudad escocesa de Aberdeen. Es un lugar de alta importancia paleontológica, ya que los fósiles presentes en él revelan gran cantidad de información acerca de las primeras etapas de colonización del medio terrestre. Entre los sedimentos pueden encontrarse fósiles de las primeras plantas terrestres, hongos, algas, líquenes y diversos artrópodos, que han sido conservados entre depósitos de sílice.

Hasta los años noventa, los estudios sobre fósiles liquénicos no proporcionaban gran información, debido en parte a la dificultad de encontrar un fósil que representara fielmente la asociación simbiótica entre el hongo y el alga. Un fósil liquénico debería mostrar la presencia de ambos biontes y un talo diferenciado de las formas de vida libre. Además, deberían existir evidencias de interacción fisiológica entre ambos componentes (Taylor *et al.*, 1997). La primera evidencia celular de un fósil liquénico en el yacimiento de Rhynie Chert fue estudiada exhaustivamente por Taylor *et al.* (1997). Las muestras halladas mostraban a los simbiontes muy bien conservados y en una posición que indicaba claramente la interacción que existió entre ambos. El fósil fue denominado *Winfrenatia reticulata* y en la actualidad sigue despertando el interés de paleontólogos, puesto que se considera el cianoliquen terrestre más antiguo descubierto hasta el momento (Karatygin *et al.*, 2009).

Morfológicamente, *Winfrenatia* presenta un micelio estratificado, con hifas aseptadas superpuestas y entrelazadas que forman una red tridimensional, sobre la que se sitúan los fotobiontes. Las células del fotobionte presentan características morfológicas similares a tres géneros de cianobacterias actuales: *Gloeocapsa*, *Chroococcus* y *Chroococidiopsis*, que presentan una larga historia geológica. La presencia de hifas aseptadas y esporas ornamentadas indica que el micobionte pudiera estar relacionado con algún grupo de Glomeromycota, hecho que es respaldado por Taylor *et al.* (1995), cuando afirman que este grupo era común en el ecosistema de Rhynie Chert. A pesar de que los micobiontes de líquenes actuales son de tipo Ascomyceto/Basidiomyceto existe un hongo Glomeromyceto (*Geosiphon pyriforme*) que establece una relación endosimbiótica con la cianobacteria del género *Nostoc* (Gehrig *et al.*, 1996). Los últimos descubrimientos paleontológicos han determinado la existencia de un segundo fotobionte, también cianobacteria, pero de tipo filamentoso, hecho que se ve constatado por la presencia de tricomas (Figura 1.4).

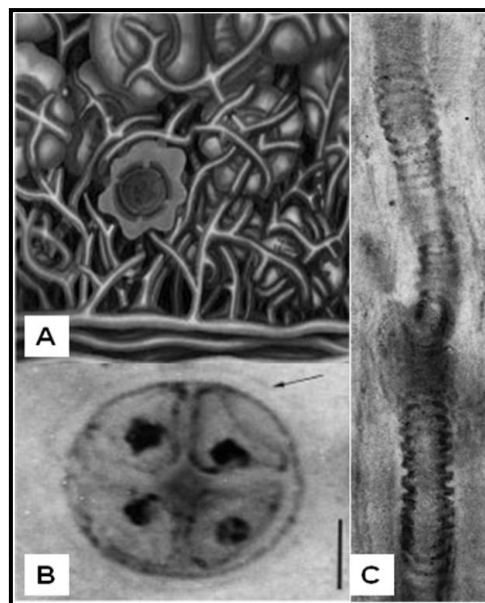


Figura 1.4. Morfología de *Winfrenatia reticulata*. A: reconstrucción hipotética del líquen (Taylor *et al.*, 1997). B: Cianobionte globular semejante al género actual *Gloeocapsa* (Taylor *et al.*, 1997). C: Cianobionte filamentoso que forma un tricoma de células con heterociste central (Karatygin *et al.*, 2009).

Winfrenatia representa una simbiosis liquénica primitiva que pudo haber evolucionado de un parasitismo controlado por parte del hongo. Estudios realizados en comunidades cianobacterianas de la Antártida han llevado a la hipótesis de que la asociación establecida entre los dos biontes habría estado relacionada con altos niveles de radiación Ultravioleta presentes en el Devónico, y que habrían sido deletéreos para las cianobacterias. Al asociarse, estos fotobiontes habrían estado menos expuestos a la radiación y aumentado su capacidad de explotar nuevos nichos ecológicos, los cuales habrían resultado inasequibles.

Las limitaciones en el estudio del registro fósil hacen que sea imposible conocer si las cianobacterias de *Winfrenatia* presentaban capacidad para fijar Nitrógeno. Es razonable pensar que la capacidad de fijar nitrógeno podría ofrecer ventajas selectivas a la hora de establecer una asociación simbiótica, especialmente en un hábitat como Rhynie Chert donde habría limitación de nutrientes (Taylor *et al.*, 1997). En los líquenes actuales que contienen dos fotobiontes, al menos uno de ellos es un alga verde. En este tipo de asociaciones las cianobacterias suelen actuar como fotobiontes secundarios, ya que en hábitats con escasez de nutrientes pueden fijar N₂, aumentando así las probabilidades de supervivencia del talo liquénico.

No existen en la actualidad líquenes análogos a *Winfrenatia reticulata*, ya que no se ha encontrado ningún micobionte perteneciente a la división Glomeromycota. Por lo tanto, *Winfrenatia reticulata* es la única asociación simbiótica entre dos fotobiontes (representados por dos cianobacterias) y un hongo Glomeromycete (Karatygin *et al.*, 2009).

Otro yacimiento paleontológico importante es el de Doushantuo situado en el sur de China, constituido por fósiles de organismos acuáticos entre los que se localizaron tres especímenes que posiblemente correspondan a simbiosis liquénicas. La formación Doushantuo es de gran importancia, pues contiene fósiles de grupos de

células que pudieron ser parte de embriones de los animales más antiguos que se hayan conocido hasta ahora y que han sido datados entre 635 a 551 millones de años de antigüedad. Este hallazgo junto con *W. reticulata* son los más antiguos hasta la fecha, suscitando nuevas preguntas sobre la evolución de la simbiosis liquénica. El estudio de los fósiles contenidos allí es de gran interés para esclarecer los acontecimientos previos a la Explosión Cámbrica. Morfológicamente estos fósiles liquénicos presentan dos componentes íntimamente asociados: células cocoides agrupadas y filamentos delgados. Las células cocoides han sido interpretadas como cianobacterias (del tipo *Gloeocapsa* o *Chroococcus*) o algas verdes. Es difícil determinar la naturaleza de los filamentos, pero parecen ser hifas aseptadas, que hacen pensar que el micobionte pueda pertenecer a un grupo similar al de *Winfrenatia reticulata*. Debido a las secciones diferentes en las que se encuentran los tres especímenes, resulta imposible reconstruir la estructura tridimensional de la asociación (Yuan *et al.*, 2005). Aun así, se pueden observar agrupaciones de células cocoides compartimentalizadas y rodeadas por abundantes hifas, similar a la estructura del cianoliquen de Rhynie Chert (**Figura 1.5**).

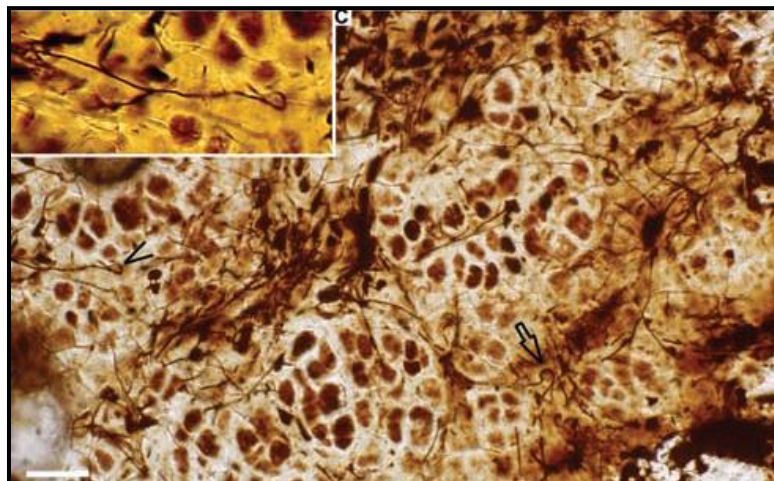


Figura 1.5. Fósil liquénico hallado en la formación Doushantuo. Observar las agrupaciones de hifas filamentosas y las células cocoides cianobacterianas. (Yuan *et al.*, 2005).

En *Winfrenatia* y líquenes actuales los filamentos del hongo proporcionan protección contra la desecación. Pero en el ambiente marino, la deshidratación no es un problema y las rocas de hace 600 millones de años también contienen muchos fósiles de células cocoidales que no están rodeadas por filamentos fúngicos. Estos hechos han llevado a pensar a los autores en una asociación más flexible, en la que los organismos no estarían obligados a vivir juntos. Si esta relación simbiótica se estableció hace unos 600 millones de años, ¿fue exportada hacia la tierra, o cada organismo estableció una nueva una vez allí, independientemente de la relación marina anterior? Si sucedió lo último, los fósiles hallados en Doushantuo no serían antepasados directos del fósil de Rhynie Chert. Esto es bastante probable ya que como se mencionó con anterioridad, el hábito liquénico se ha podido adquirir y perder en varias ocasiones y por tanto los linajes pueden ser independientes.

Quizás los primeros pasos hacia la simbiosis liquénica podrían haber surgido de interacciones facultativas entre hongos y cianobacterias o algas. Los fósiles de Doushantuo sugieren que esos primeros pasos podrían haber ocurrido tiempo antes de la colonización terrestre por parte de las plantas vasculares, en un ecosistema marino donde un gran número de cianobacterias, algas y hongos vivían en estrecha asociación, siendo por tanto un punto clave en la evolución de la simbiosis (Yuan *et al.*, 2005).

1.1.4.2. Establecimiento de la simbiosis liquénica

Los patrones de asociación entre los diferentes constituyentes liquénicos no están completamente claros, por lo que resulta difícil su identificación detallada desde el punto de vista taxonómico e incluso geográfico. Estos patrones pueden ser descritos en términos de especificidad (rango de diversidad taxonómica o genética permitida para la asociación) y selectividad (frecuencia de la asociación entre organismos compatibles) (DePriest, 2004; del Campo *et al.*, 2013). En los primeros estadios de la

asociación, se produce el contacto inicial entre las algas y el hongo (Honegger, 1998); durante esta fase los fotobiontes podrían ser reemplazados por otros presentes en el entorno, lo que lleva a pensar que diferentes poblaciones de un mismo líquen contendrían la misma especie fúngica pero las especies de algas, al menos probabilísticamente, deberían ser diferentes y guardar relación con las características del medio. Algunos estudios moleculares han revelado que existe gran selectividad de los micobiontes líquénicos respecto a su fotobionte (Beck *et al.*, 1998; Yahr *et al.*, 2006; del Campo *et al.*, 2013), insinuando que esta especialización podría ser debida a la adaptación de estos organismos a un ambiente dinámico y cambiante.

Para conocer las interacciones producidas durante la simbiosis líquénica es necesario el análisis básico de la estructura, biología y fisiología del líquen intacto (Smith & Douglas, 1987). Debido a las bajas tasas de crecimiento que muestran estos organismos, el estudio íntegro de la simbiosis en la naturaleza se hace difícil, de ahí que la mayoría de procedimientos experimentales hayan estudiado los componentes por separado o síntesis artificial en laboratorio.

La síntesis *in vitro* es clave para comprender mejor la simbiosis líquénica. Para que se inicie la asociación, la concentración de nutrientes presentes en el medio debe ser baja, ya que en condiciones de alta concentración nutricional los elementos crecen independientemente y no muestran tendencia a asociarse (Ahmadjian, 1993). Existe cierta dificultad a la hora de establecer la asociación entre el alga y el hongo. En ciertos fotobiontes se han visto cambios morfológicos al interactuar con el micobionte, mientras que en otros la síntesis artificial es compleja y relacionada con problemas de contaminación. Deben existir moléculas de señalización entre los biontes, permitiendo el reconocimiento, influencia y regulación recíproca. En periodos de crecimiento, el hongo produce ureasa, un enzima que hidroliza la urea presente en el líquen descomponiéndola en CO₂ y NH₃. Ambos compuestos estimulan la tasa fotosintética en el alga, por lo que el hongo podría disponer de un suplemento de

energía y esqueletos carbonados con los que llevar a cabo sus procesos metabólicos (Ahmadjian, 1987). A su vez, existen otras sustancias excretadas por el hongo y que actúan como inhibidores del crecimiento de las algas, regulando el tamaño de la población (Takahagi *et al.*, 2008); estas sustancias son metabolitos secundarios específicos del micobionte e independientes del fotobionte con el que esté asociado (Ahmadjian, 1993).

Los estudios de translocación de nutrientes en líquenes siempre se han centrado en la transferencia de sustancias desde el alga al hongo, pero, ¿existe movimiento de nutrientes desde el micobionte al fotobionte? El cultivo de fotobiontes líquénicos en laboratorio requiere de suplementos nutricionales (glucosa y caseína), lo que demostraría un posible comportamiento heterótrofo del alga en cultivo. En la naturaleza se ha demostrado que el hongo, aparte de ofrecer protección, proporciona al alga micronutrientes necesarios para su metabolismo. De esta forma el fotobionte es también sustentado nutricionalmente por su micobionte, al mismo tiempo que sintetiza productos fotosintéticos.

Aunque los estudios de simbiosis artificial han ayudado a comprender el establecimiento de la asociación simbiótica, en los últimos años los estudios moleculares, bioquímicos y fisiológicos han sido muy importantes para esclarecer el funcionamiento de la simbiosis líquénica.

1.2. Propiedades de los líquenes

Los líquenes presentan gran longevidad, crecimiento a menudo muy lento (unos pocos milímetros anuales) y características fisiológicas únicas, debidas una vez más, a la sinergia de las interacciones entre ambos simbiontes.

Son organismos poiquilohídricos, es decir que no pueden controlar activamente su contenido hídrico, el cual se encuentra en equilibrio con la disponibilidad de agua

en el ambiente, por lo que son capaces de vivir metabólicamente inactivos durante períodos de tiempo prolongados, dependiendo en gran medida de la humedad atmosférica. En estado de desecación, su nivel de humedad puede llegar a suponer alrededor del 10% de su peso fresco (Gasulla *et al.*, 2009). Este estado sería letal para la mayoría de las plantas vasculares (Bewley, 1979; Kranner, 2002; Alpert, 2006). Sin embargo, casi todas las especies liquénicas pueden sobrevivir en estado latente hasta que vuelve a aumentar el agua disponible en el ambiente, para rehidratarse y reasumir un metabolismo normal (Beckett *et al.*, 2008).

Los líquenes, son productores de metabolitos secundarios conocidos como “ácidos liquénicos”. Estos metabolitos de composición química variada son sintetizados por el hongo (a veces con participación del alga) y son acumulados en forma de pequeños gránulos en la superficie de las hifas. En la actualidad se conocen alrededor de 400 compuestos diferentes (Takahagi *et al.*, 2008) con numerosas funciones, entre ellas: protección frente a herbívoros, efecto alelopático, protección frente al exceso de radiación ultravioleta y degradación de sustratos. Gracias a esto último, intervienen en la meteorización de las rocas aparte de contribuir al ciclo del nitrógeno, facilitando el desarrollo de las plantas vasculares (Chen *et al.*, 2000). Muchos de estos metabolitos secundarios tienen gran interés farmacológico debido a sus propiedades antibióticas (Boustie & Grube, 2005) y han sido la base de muchos estudios de taxonomía de líquenes.

Los líquenes presentan diferentes sensibilidades a contaminantes atmosféricos dependiendo de la especie. Algunas especies son sensibles a contaminantes atmosféricos mientras que otras son muy resistentes pudiendo acumular gran cantidad de minerales, lo cual los hace especialmente útiles como bioindicadores de lectura inmediata de la contaminación medioambiental (Garty *et al.*, 2001; Loppi & Frati, 2006; Cristofolini *et al.*, 2008; Fuga *et al.*, 2008). El uso de líquenes como bioindicadores se extendió a partir de los años sesenta, al ser

identificado el dióxido de azufre como un importante factor que influencia el crecimiento, distribución y salud de estos organismos (Hawksworth *et al.*, 2005; Nash, 2008). En la actualidad, son numerosos los estudios que los emplean como bioindicadores de contaminación atmosférica (Cristofolini *et al.*, 2008; Fuga *et al.*, 2008; Paoli *et al.*, 2012; Malaspina *et al.*, 2014), contaminación por HM (Dzubaj *et al.*, 2008; Carreras *et al.*, 2009) o tendencias medioambientales como el calentamiento global (Aptroot & van Herk, 2007; Sancho *et al.*, 2007). En general, la simbiosis líquénica resulta de gran éxito ya que está presente en casi todos los hábitats terrestres desde los trópicos y los desiertos hasta las regiones polares (Nash, 2008). Este hecho da cuenta de la capacidad de los líquenes de sobrevivir en condiciones ambientales muy diversas y a menudo estresantes. Condiciones ambientales desfavorables como el déficit hídrico, las temperaturas extremas, la contaminación atmosférica y otros tipos de estrés que alteran el metabolismo de las células dando como resultado un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno o “*Reactive Oxygen Species*” (ROS) (Miller *et al.*, 2010) que pueden llegar a provocar situaciones de estrés oxidativo.

1.3. Estrés oxidativo

1.3.1. Estrés oxidativo y mecanismos de defensa

Los organismos aerobios necesitan el oxígeno para realizar sus procesos metabólicos. Sin embargo, el oxígeno es susceptible de desarrollar reducciones parciales, produciéndose ROS como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($HO\cdot$), muy reactivas. En general, se considera que a bajas concentraciones las ROS tienen un papel importante en la señalización y en las respuestas defensivas en las células. Sin embargo, cuando el nivel de ROS excede la capacidad de degradación de los mecanismos de defensa antioxidantes, supone una amenaza para las células; pudiendo causar peroxidación lipídica,

oxidación de proteínas y ácidos nucleicos; y se considera entonces que una célula se encuentra en un estado de estrés oxidativo (Jubany-Mari *et al.*, 2010).

La formación de ROS tiene por tanto, un origen endógeno, pudiéndose generar en cualquier compartimento celular como resultado normal de su actividad metabólica. Así, en cloroplastos las interferencias en la fotosíntesis inducen una mayor tasa de transferencia de electrones desde los transportadores fotosintéticos hacia el O₂, conduciendo a un aumento en la generación de ROS.

A lo largo de la evolución, los organismos vegetales han desarrollado unos complejos sistemas de defensa, capaces de prevenir el estrés oxidativo mediante un estricto control de los niveles estacionarios de las ROS, entre los que se encuentran antioxidantes no enzimáticos y enzimas antioxidantes. Los antioxidantes no enzimáticos son compuestos de bajo peso molecular como ascorbato, glutatión y carotenoides (Noctor & Foyer, 1998). Las actividades enzimáticas más importantes son las que constituyen el ciclo ascorbato-glutatión (Lascano *et al.*, 2001), superóxido dismutasa (SOD) (Casano *et al.*, 1997; Alscher *et al.*, 2002), peroxidasas (Asada, 1999) y catalasa (Mittler, 2002). Además, para revertir los daños producidos por ROS, los organismos vegetales cuentan con sistemas de proteínas de choque térmico (HSP) y chaperonas. Entre ellas, la chaperona HSP70 participa en el plegamiento y mantenimiento de una correcta conformación y función de una serie de proteínas. Esta proteína reparadora tiene un papel fundamental en la respuesta celular frente a diferentes tipos de estrés (Duan *et al.*, 2011).

La tolerancia al estrés en general es un carácter multigénico y multifactorial muy complejo en el que concurren procesos genéticos, metabólicos y sistemas de protección junto con adaptaciones macromoleculares y estructurales (Dinakar *et al.*, 2012). Se conoce muy poco sobre las bases moleculares, estructurales y fisiológicas que sustentan la extraordinaria capacidad de supervivencia que ha permitido a los

líquenes colonizar los más diversos e inhóspitos ambientes de la tierra, en condiciones extremas, desde zonas antárticas (Schroeter *et al.*, 2011) hasta soportar las radiaciones cósmicas (Raggio *et al.*, 2011). Sin embargo, se ha constatado que estos presentan los principales mecanismos antioxidantes comunes con plantas vasculares; como son SOD (Weissman *et al.*, 2005), peroxidasas (Silberstein *et al.*, 1996; Kranner *et al.*, 2005), enzimas del ciclo ascórbico-glutation (Kranner, 2002; Kranner *et al.*, 2005) y antioxidantes de bajo peso molecular (Deltoro *et al.*, 1998; Kranner, 2002; Kranner *et al.*, 2005).

Tradicionalmente la mayor parte de investigaciones de los mecanismos fisiológicos subyacentes a la capacidad de los líquenes de colonizar los más diversos e inhóspitos ambientes se han centrado en el estudio de los micobiontes. Sin embargo, existen cada vez más evidencias de que los fotobiontes tienen un papel esencial en la respuesta del líquen a situaciones de estrés, ya que la fotosíntesis es uno de los procesos fisiológicos más sensibles. Por ello, en los últimos años se ha incrementado considerablemente el interés por conocer la diversidad de los fotobiontes liquénicos, sus adaptaciones ecológicas, y los mecanismos fisiológicos y moleculares subyacentes que posibilitan las extraordinarias capacidades biológicas de estos organismos.

1.3.2. Tolerancia al estrés por metales pesados

La acumulación de metales pesados (HM) es uno de los aspectos de la biología de estos organismos que ha sido más estudiado, debido a que los elementos de este tipo constituyen una de las formas más frecuentes de contaminación, ocasionando graves problemas tanto a nivel de ecosistemas como en el ser humano (Blacksmith Institute & Green Cross Switzerland, 2013).

Los líquenes no desarrollan raíces y carecen de una cutícula impermeable protectora, lo que significa que son muy permeables a todo tipo de contaminantes

ambientales, incluyendo HM, que se acumulan en los talos. Para hacer frente a las potenciales alteraciones metabólicas producidas por la acumulación intracelular del metal, los talos liquénicos han desarrollado multitud de respuestas biológicas. Más aún, entre los líquenes existe una enorme diversidad en cuanto a la tolerancia a HM, existiendo desde especies moderadamente tolerantes, como por ejemplo *Lecanora conizaeioides* (Hauck *et al.*, 2007) y *Ramalina farinacea* (Branquinho *et al.*, 1997), hasta las más sensibles como *Hypogymnia physoides* y *Pseudoevernina* sp. (Hauck *et al.*, 2007). Desde este punto de vista, y como se comentaba en el apartado anterior, los líquenes son extraordinariamente útiles como bioindicadores de contaminación ambiental.

Puesto que la tolerancia/sensibilidad de los líquenes a HM estaría relacionada con su carácter simbiótico, los estudios deben incluir el análisis del comportamiento de cada simbiote separadamente. En este sentido, los fotobiontes son los componentes clave en la respuesta a estrés por metales pesados, ya que los mismos afectan principalmente al aparato fotosintético y sistema antioxidante presente en dichas algas (Ahmadjian, 1993). Los HM influyen negativamente en el balance metabólico de las células. En cloroplastos, interfieren en los procesos fotosintéticos, induciendo la transferencia de electrones al O₂, incrementándose por tanto la producción de especies reactivas (ROS) (Miller *et al.*, 2010), que desencadenan procesos degradativos de componentes cloroplásticos clave, tales como proteínas tilacoidales (Casano *et al.*, 1994; Song *et al.*, 2006), enzimas del ciclo de Calvin, pigmentos y lípidos de membrana (Asada, 1999).

El nivel de tolerancia/sensibilidad del líquen estará fundamentalmente determinado por el simbiote más sensible. En este sentido, un estudio realizado por Hauck *et al.*, (2007) en el que analizaron la selectividad de fotobiontes en líquenes epífitos con diferente grado de tolerancia a HM, demuestra que la misma especie de fotobionte (*Trebouxia hypogymniae*) podía estar presente tanto en líquenes sensibles

(*Hypogymnia physodes*) como tolerantes (*Lecanora conizaeoides*). Los resultados de este estudio indican que los fotobiontes no parecen ser factores determinantes en la sensibilidad o tolerancia a HM en algunos de los líquenes más comunes. Sin embargo, Branquinho *et al.* (1997), Beck (1999), Branquinho (2001), Bačkor y Vaczi (2002), y Bačkor *et al.* (2007) proporcionaron evidencias que indican la implicación de los fotobiontes en la tolerancia de los talos liquénicos a la exposición con HM. Por ejemplo, Branquinho *et al.* (1997) observaron que los efectos del Pb en cuatro especies de líquenes, que contenían diferentes fotobiontes, dependían fundamentalmente de la naturaleza de dicho fotobionte. Mediante medidas de eficiencia fotoquímica del PSII demostraron que el cianobionte del líquen *Peltigera canina* es el más sensible a Pb, mientras que los ficobiontes del género *Trebouxia* sp. de los líquenes *Ramalina farinacea* y *Parmelia caperata* son moderadamente tolerantes a Pb.

Actualmente los mecanismos fisiológicos de tolerancia a HM en los fotobiontes son todavía poco conocidos. Uno de los estudios más interesantes al respecto (Sanità di topi *et al.*, 2008) realizado en *Trebouxia impresa*, hace una distinción entre mecanismos de desintoxicación de “primera” y “segunda línea”.

Los mecanismos de “primera línea” son aquellos que bloquean o contribuyen a reducir la cantidad de metal libre en el citosol, limitando su reactividad y solubilidad, e incluyen: la inmovilización extracelular de HM a nivel de pared celular, la compartimentalización vacuolar, y la síntesis de compuestos quelantes (como las fitoquelatinas y su precursor glutatión (Cobbett & Goldsbrough, 2002)).

Los mecanismos de “segunda línea” son aquellos que se activan cuando se sobrepasa la capacidad de los mecanismos de primera línea. Por tanto, incluyen los antioxidantes solubles, la inducción de enzimas antioxidantes y otras proteínas relacionadas con el estrés. Los antioxidantes solubles, ascorbato y glutatión, y las

enzimas antioxidantes SOD, GR, CAT y peroxidasas, participan en la quelación (“primera línea”) y en la protección antioxidante (“segunda línea”), por lo que en realidad estos elementos antioxidantes se encuentran involucrados en el proceso completo de detoxificación de HM.

1.4. El líquen *Ramalina farinacea*

1.4.1. *Ramalina farinacea*

Ramalina farinacea (L.) Ach. es un ascolíquen epífito de tipo fruticuloso (**Figura 1.6**) perteneciente al orden Lecanorales, cuyo modo de reproducción es asexual, mediante propágulos vegetativos de tipo soredio.



Figura 1.6. Talo de *Ramalina farinacea*. *Ramalina farinacea* Photo © George Hounsome LNHS. 17 Nov 2012.

Esta especie es muy abundante en áreas del hemisferio norte sometidas a regímenes climáticos templados o mediterráneos (Barreno *et al.*, 2008) pudiéndose encontrar en otros ambientes más restrictivos como los de alta montaña, o bien en ambientes más benignos como áreas boscosas del Norte de España. Estos hábitats naturales están sujetos a variaciones de temperatura y humedad a lo largo del año, donde el líquen queda sometido a ciclos de desecación-rehidratación durante un mismo día o periodos estacionales.

1.4.2. Evidencias morfológicas y moleculares de la coexistencia de dos fotobiontes en *Ramalina farinacea*

La mayoría de estudios sobre la estructura de poblaciones y patrones de asociación simbiótica en líquenes habían descrito la presencia de una única especie de fotobionte por talo. Sin embargo, cada vez existen más evidencias de la coexistencia de más de un genotipo de alga en talos liquénicos, como en las especies *Evernia mesomorpha* (Piercey-Normore, 2006) y *Protoparmeliopsis muralis* (Guzow-Krzeminska, 2006).

En trabajos recientes de nuestro grupo de investigación, se estudió la composición de ficobiontes de diferentes poblaciones de *R. farinacea* procedentes de áreas geográficas distantes: Península Ibérica, Islas Canarias y California (del Campo *et al.*, 2010, Casano *et al.*, 2011; del Campo *et al.*, 2013). Mediante el análisis comparativo de su morfología con técnicas de microscopía óptica y electrónica, se demostró la presencia de un patrón de asociación altamente específico entre el líquen *R. farinacea* y dos fotobiontes del género *Trebouxia*, provisionalmente llamados TR1 y TR9 (**Figura 1.7**).

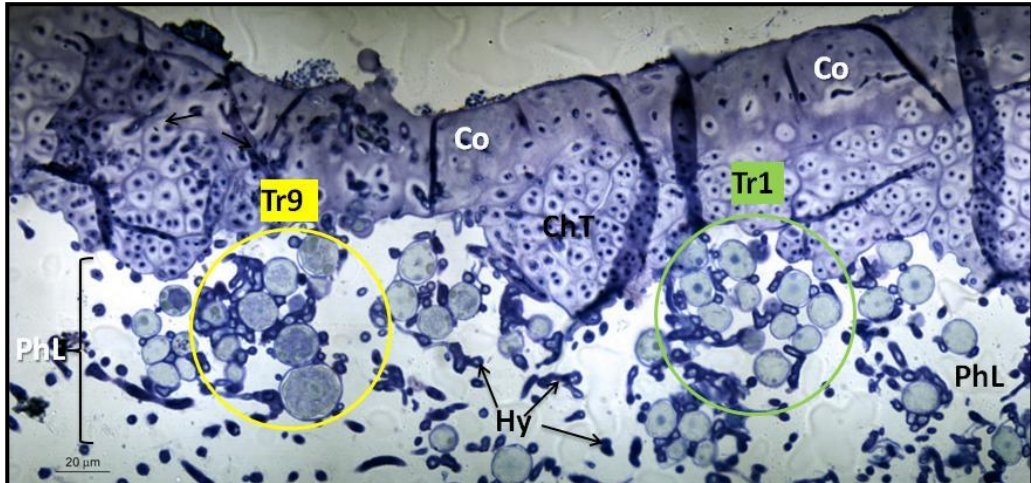


Figura 1.7. Sección transversal del talo de *Ramalina farinacea* teñida con azul de toluidina y observada con microscopio óptico, mostrando la localización de TR1 y TR9. Abreviaturas: (Co) Cortex; (ChT) Tejido condroide; (Hy) Hifas; (PhL) Capa gonidial. (Imagen tomada de Casano *et al.*, 2011).

Este patrón de asociación ha sido verificado en cada uno de los talos de todas las poblaciones estudiadas mediante análisis moleculares basados en la secuenciación de una región del gen 23S ADNr (**Figuras 1.8 y 1.9**) y ITSnr (**Figura 1.10**), siendo consistentes con la diferenciación de ambos fotobiontes en base a su morfología (Casano *et al.*, 2011; del Campo *et al.*, 2013). Las secuencias obtenidas de los diferentes fotobiontes aislados en cultivo con cebadores que cubrían la región del gen 23S ADNr comprendida entre las posiciones 759-2596 del ortólogo de *E. coli*, resultaron ser idénticas a las de *T. jamesii* UTEX 2233 en el caso de TR1. Sin embargo, las secuencias obtenidas a partir de ADN de TR9, si bien eran muy similares a las de TR1 y *T. jamesii*, presentaba algunas diferencias notables. Como se observa en las **Figuras 1.8 y 1.9**, los tamaños de la porción secuenciada del gen 23S ADNr son muy diferentes en ambos fotobiontes (4352 nt en TR1 y 6655 nt en TR9). Esta diferencia de tamaños se debe a la presencia de intrones de tipo I distintos en número, distribución, longitud (**Figura.1.8**) y secuencia.

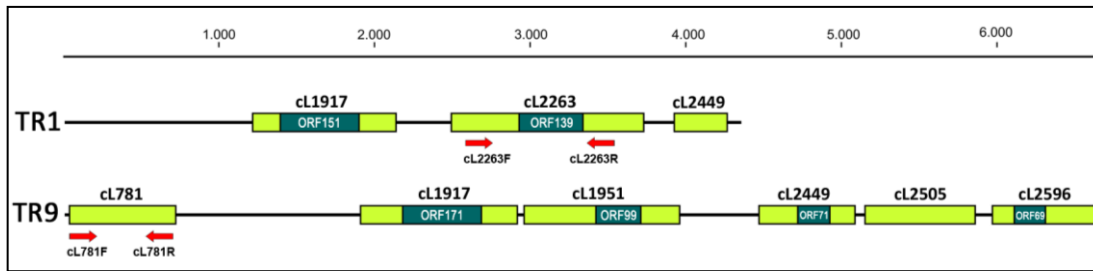


Figura 1.8. Mapas genéticos de la región del 23S ADNr secuenciada en TR1 y TR9. Las líneas negras representan los exones. Los intrones son representados con rectángulos verde claro. Los nombres de los intrones (de acuerdo con Johansen & Haugen, 2001) se indican encima de los mismos. Los marcos de lectura abierta, cuando existen, se señalan en el interior de cada intrón indicando el número de aminoácidos de las proteínas hipotéticas. La posición de los cebadores se indica en cada mapa mediante flechas rojas.

En base a las secuencias del gen 23S ADNr de las microalgas TR1 y TR9 aisladas, se realizó una primera caracterización molecular de los fotobiontes de *R. farinacea* en talos recolectados en diferentes localidades de la Península Ibérica, Islas Canarias y California. La **Figura 1.9** muestra los productos de amplificación obtenidos a partir del ADN extraído de cada talo analizado, obtenidos con las parejas de cebadores: cL2263-F/cL2263-R, específica de TR1 o cL781-F/cL781-R, específica de TR9 cuyas posiciones se indican en **Figura 1.8**. Estos resultados y la posterior secuenciación de cada producto de amplificación, confirmaron la coexistencia de los dos fotobiontes en todos los talos analizados.

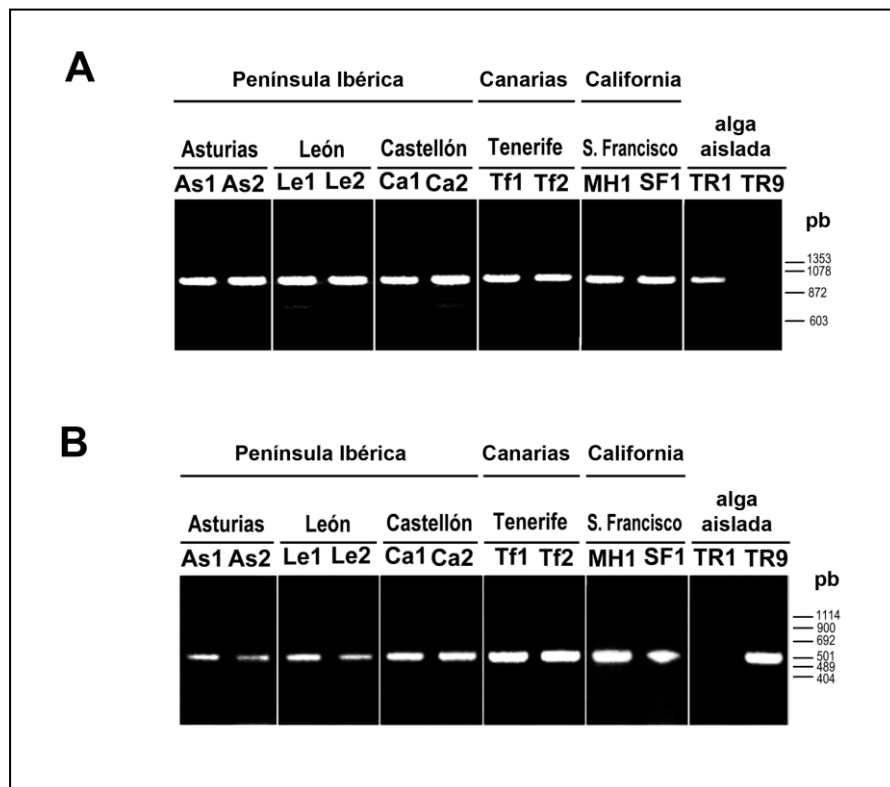


Figura 1.9. Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de los productos de amplificación por PCR obtenidos con las parejas de cebadores cL781-F/cL781-R (A) y cL2263-F/cL2263-R (B) a partir de ADN de talos de *Ramalina farinacea* recolectados en diferentes localidades (As, Asturias; Le, León; Ca, Castellón; Tf, Tenerife; MH, Monte Hamilton; SF, San Francisco) así como de fotobiontes TR1 y TR9 aislados en cultivo. Los tamaños de los marcadores de peso molecular (pb) se indican a la derecha. (Imagen tomada de Casano *et al.*, 2011).

Con el objeto de confirmar los resultados obtenidos en base a secuencias del gen 23S ADNr, se utilizó un marcador adicional de codificación nuclear: los ITS del operón de ARNs ribosomales. Para ello, en base a las secuencias obtenidas de TR1 y TR9 con los cebadores de Kroken & Taylor (2000), se diseñaron otras dos parejas de cebadores específicas de TR1 o de TR9: la pareja ITS-TR1f/ITS-TR1r, que solamente amplificaba ADN de TR1; y la pareja ITS-TR9f/ITS-TR9r, que solamente amplificaba ADN de TR9.

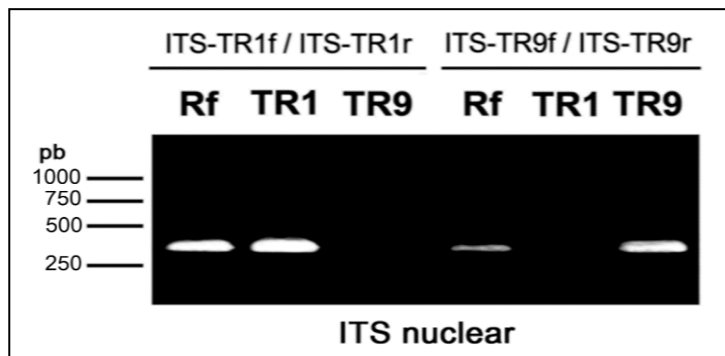


Figura 1.10. Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de los productos de amplificación por PCR obtenidos con las parejas de cebadores ITS-TR1f/ITS-TR1r y ITS-TR9f/ITS-TR9r a partir de ADN extraído de talos de *Ramalina farinacea* recolectados en la Sierra del Toro (Castellón), así como de TR1 y TR9 aisladas en cultivo. Los tamaños de los marcadores de peso molecular (pb) se muestran a la izquierda. (Imagen tomada de Casano *et al.*, 2011).

La **Figura 1.10** muestra la electroforesis en un gel de agarosa de los productos de amplificación obtenidos con la pareja de cebadores ITS-TR1f/ITS-TR1r y ITS-TR9f/ITS-TR9r. El par ITS-TR1f/ITS-TR1r amplificó el ADN de los talos liquénicos y del fotobionte TR1, pero no de TR9. Por el contrario, el par ITS-TR9f/ITS-TR9r amplificó en los talos liquénicos y en el fotobionte TR9, pero no en TR1. La obtención de secuencias tanto de TR1 como de TR9 con los cebadores específicos para cada tipo de fotobionte confirmó la coexistencia de ambos tipos de fotobiontes en todos los talos. Sin embargo, cuando se emplearon cebadores “generales para algas del género *Trebouxia*” de Kroken & Taylor (2000) que amplificaban el ADN tanto de TR1 como de TR9 se obtuvo una única secuencia a partir de cada talo. Esta secuencia única resultó ser similar a la de TR9 aislada en todas las muestras procedentes de las Islas Canarias y similar a la de TR1 aislada en todas las muestras procedentes del resto de localidades.

Estos resultados fueron interpretados como consecuencia de diferencias en la abundancia relativa de las dos algas dentro de cada talo: TR1 sería más abundante en los talos de Península Ibérica y California mientras que TR9 sería más abundante en

los talos Canarios. De acuerdo con ello, se definió el término “ficobionte predominante” como el alga cuya secuencia de ITSnr es obtenida mediante la amplificación con cebadores genéricos de *Trebouxia* (Kroken & Taylor, 2000) y “ficobionte no predominante” como el alga cuya secuencia es obtenida sólo mediante la amplificación con el cebador específico de TR1 o TR9.

1.4.3. Estudios fisiológicos previos con TR1 y TR9

Trabajos previos de nuestro equipo sobre el efecto de la luz y la temperatura sobre el crecimiento y la actividad fotosintética de TR1 y TR9 en cultivo axénico (Casano *et al.*, 2011) muestran comportamientos diferentes de ambos ficobiontes (**Figuras 1.11 y 1.12**). Mientras que TR9 tiene un mejor comportamiento fotosintético (Fv/Fm) en condiciones de temperatura e irradiancia relativamente elevadas, TR1 se desarrolla mejor con temperaturas más bajas y en condiciones más sombreadas (**Figura 1.11**). Estos resultados fueron corroborados mediante estudios de eficiencia fotoquímica del PSII, el estado de reducción de Q_A y de disipación no fotoquímica de la energía (**Figura 1.12**).

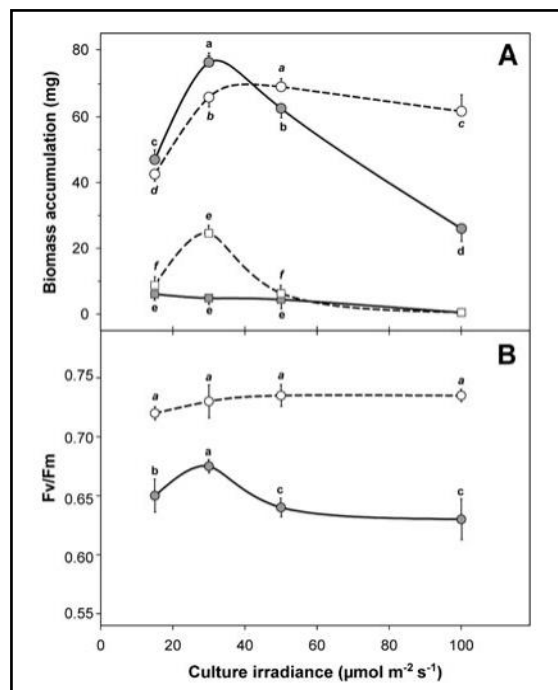


Figura 1.11. Efecto de la temperatura y la irradiancia durante el cultivo, sobre el crecimiento y la fotosíntesis de los ficobiontes *Trebouxia* TR1 y *T. TR9* aislados. (A) Crecimiento de TR1 (gris) y TR9 (blanco) durante 30 días de cultivo a 17°C (círculos) y 20°C (cuadrados). (B) Tasa de actividad fotosintética (Fv/Fm) de TR1 (gris) y TR9 (blanco) cultivados a 17°C durante 30 días. (Imagen tomada de Casano *et al.*, 2011).

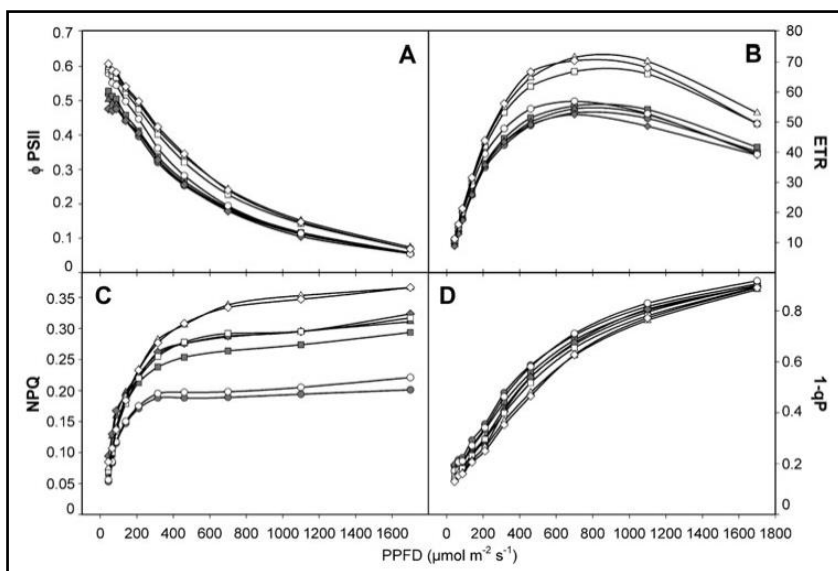


Figura 1.12. Efecto de la irradiancia sobre los parámetros de fluorescencia de los ficobiontes *Trebouxia* TR1 y *T. TR9* aislados durante el cultivo. (Imagen tomada de Casano *et al.*, 2011). Las medidas fotosintéticas fueron realizadas sobre TR1 (gris) y TR9 (blanco) cultivadas a 17°C durante 30 días.

1.5. Hipótesis y Objetivos

Estudios realizados en otras asociaciones simbióticas, como por ejemplo los arrecifes de coral, en los que un hospedador heterótrofo constituye el hábitat de microalgas, han demostrado que varias especies de estos productores primarios frecuentemente coexisten dentro de un mismo hospedador (Wegley *et al.*, 2007). La demostración de la existencia de alteraciones muy profundas en la “comunidad simbiótica de algas” de algunas especies coralinas, en respuesta a condiciones ambientales estresantes, desvió la atención hacia la importancia de los fotobiontes en la fisiología y adaptación al ambiente del holobionte (Jones *et al.*, 2008).

En el caso de los líquenes, hay cada vez más evidencias experimentales que indican que *R. farinacea* no es el único líquen en el que coexiste más de un ficobionte. Otros ejemplos son: *Evernia mesomorpha* (Piercey-Normore, 2006), *Protoparmeliopsis muralis* (Guzow-Krzeminska, 2006) , *Ramalina fraxinea* (Catalá *et al.* 2012) y *Parmotrema pseudotinctorum* (Molins *et al.*, 2013). Sin embargo, hasta ahora *R. farinacea* es el ejemplo mejor documentado de dicha coexistencia (Casano *et al.*, 2011), ya que ha sido constatada en poblaciones adaptadas a condiciones ambientales y contextos ecológicos muy diversos, y a menudo estresantes, lo cual refleja la gran plasticidad ecofisiológica de este líquen.

Basándonos en las evidencias y consideraciones expuestas anteriormente, planteamos la hipótesis de que la gran plasticidad ecofisiológica de *R. farinacea* podría haberse visto favorecida por la presencia, en el mismo talo, de dos especies de microalgas con comportamientos fisiológicos diferentes y posiblemente complementarios. La corroboración de esta hipótesis requiere un estudio más profundo del comportamiento de los ficobiontes *Trebouxia* sp. TR1 y TR9.

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es el de analizar comparativamente las bases estructurales y fisiológicas de las respuestas al estrés oxidativo de TR1 y TR9 tanto aisladas en cultivo como en el contexto de la simbiosis liquénica. Consecuentemente, los objetivos específicos del presente trabajo son:

1. Estudiar comparativamente el efecto del estrés oxidativo agudo producido por el agente pro-oxidante Hidroperóxido de Cumeno (CuHP) sobre componentes clave del aparato fotosintético de TR1 y TR9, y determinar la respuesta fisiológica de defensa de cada microalga.
2. Analizar, mediante observaciones microscópicas y determinaciones cuantitativas, la distribución de HM entre la pared y el interior celular en TR1 y TR9.
3. Determinar la actividad de los sistemas de protección antioxidante y de reparación celular en células de TR1 y TR9 expuestas a tratamientos de Pb.
4. Estudiar la composición de los polímeros extracelulares de TR1 y TR9 a fin de correlacionar estos datos con posibles diferencias en la inmovilización de HM a nivel de pared entre ambos ficobiontes.
5. Establecer la posible participación de los compuestos tiólicos como mecanismo de protección frente a los efectos de Cd y Pb en dichos ficobiontes.
6. Analizar comparativamente los efectos de la rehidratación en presencia de Pb sobre la producción de ROS, el daño oxidativo a membranas y autofluorescencia de clorofila en talos de *R. farinacea* y en sus ficobiontes aislados.

7. Establecer las posibles diferencias en la respuesta fisiológica frente a condiciones ambientales estresantes de los dos ficobiontes que coexisten en talos de *R. farinacea*; así como, al menos algunas de las causas estructurales y funcionales que sustentan dichas diferencias.

8. Estimar el impacto que el comportamiento fisiológico de los ficobiontes puede tener sobre el del talo liquénico en su conjunto.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material biológico

La consecución de los objetivos del presente trabajo de Tesis Doctoral hizo necesario aislar y/o mantener ficobiontes liquénicos en cultivo axénico. Estos cultivos permitirían estudiar el comportamiento fisiológico y bioquímico de los ficobiontes fuera del contexto de la simbiosis liquénica. Se utilizaron algas verdes con diferentes modos de vida y pertenecientes a dos géneros distintos (*Trebouxia* y *Coccomyxa*): ficobiontes de ascolíquenes, ficobiontes de basiolíquenes y ficobiontes facultativos. Todos los ficobiontes estudiados fueron aislados en nuestro laboratorio a partir de talos liquénicos recolectados en diferentes puntos de la geografía española, o bien procedían de bancos de algas.

En primer lugar, se utilizó el ascolíqueno *Ramalina farinacea* (**Figura 2.1 A**), cuyos talos fueron recolectados al aire libre sobre especímenes de *Quercus rotundifolia* en dos localizaciones diferentes: la Sierra del Toro (Castellón, España; 39° 54' 16" N, 0° 48' 22" W) y El Escorial (Madrid, España; 39° 34' 16", 0° 48' 22"W). Dichos talos fueron secados al aire libre en condiciones de oscuridad y posteriormente almacenados a -20°C durante tres meses. A partir de este material se aislaron dos ficobiontes pertenecientes al género *Trebouxia*, que fueron caracterizados genética y morfológicamente como dos especies diferentes, denominándolas de forma provisional *Trebouxia* sp. TR1 y *Trebouxia* sp. TR9 (Casano *et al.*, 2011). En segundo lugar, se emplearon muestras del basidiolíqueno *Lichenomphalia umbellifera* (**Figura 2.1 B**) recolectadas en el Parque Natural de la Sierra Norte de Guadalajara (Guadalajara, España, 41° 11' 34" N, 03° 04' 40" O). A partir de los talos frescos fue posible el aislamiento de un ficobionte perteneciente al género *Coccomyxa* (Lutzoni & Vilgalys, 1995) (Provisionalmente *Coccomyxa* LU). Además, se adquirieron cultivos del alga verde *Coccomyxa solorina saccatae* (cepa SAG 216-12), en el banco de algas Sammlung von Algenkulturen de la Universidad de Göttingen (Alemania) (SAG).



Figura 2.1. Talo de *Ramalina farinacea* (A). Talo de *Lichenomphalia umbellifera* (B).

2.2. Métodos

2.2.1. Aislamiento de ficobiontes liquénicos

2.2.1.1. Ficobiontes del género *Trebouxia*

Con el fin de lograr cultivos axénicos de los ficobiontes presentes en el líquen *Ramalina farinacea* con la mayor brevedad posible, se incluyeron unas ligeras modificaciones al método de aislamiento propuesto por Gasulla *et al.* (2010) que permitieron reducir al máximo la contaminación en los cultivos por otros microorganismos. Para ello se desarrollaron todas las etapas del aislamiento en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar y se incluyeron dos pasos previos al protocolo antes citado, que consistieron en lavados del material liquénico de partida con diferentes líquidos esterilizantes. Concretamente, fragmentos de talos liquénicos de 15-25 mg (PS) fueron lavados sucesivamente con 2,5 ml de 70% (v/v) etanol durante 30 segundos, seguido de 20 minutos con una solución de hipoclorito sódico al 10% (v/v) y 0,1% (v/v) del detergente no iónico Tween 20. Ambos tratamientos son utilizados frecuentemente como desinfectantes en el comienzo de cualquier procedimiento de cultivo *in vitro* de plantas.

2.2.1.2. Fotobiontes del género *Coccomyxa*

El aislamiento de ficobiontes del género *Coccomyxa* se realizó mediante un protocolo propio desarrollado en nuestro laboratorio. Los ejemplares recolectados se homogenizaron en mortero estéril con 1 ml de agua ultrapura. El homogenado resultante se sembró en placas Petri que contenían medio Bold 3N (Bold & Parker, 1962) sin suplementar con glucosa ni caseína. De esta forma se intentó minimizar la contaminación por microorganismos como bacterias u hongos, a la vez que se favorecía el crecimiento del organismo autótrofo de interés. Tras varias siembras por agotamiento en nuevas placas y tubos con medio Bold 3N sin suplementar, se fueron

obteniendo colonias verdes limpias, las cuales fueron transferidas a tubos con medio Bold 3N suplementado con glucosa y caseína. El mantenimiento posterior del cultivo de este ficobionte fue realizado bajo las mismas condiciones que las establecidas para los ficobiontes del género *Trebouxia*.

2.2.2. Cultivo de ficobiontes en medio de cultivo líquido y semisólido

Los ficobiontes fueron cultivados axénicamente en medio de cultivo Bold 3N, suplementado con glucosa (20 g l⁻¹) y caseína (10 g l⁻¹) (Ahmadjian, 1973), ya que las condiciones heterótrofas favorecen un mayor rendimiento de los cultivos.

El medio Bold 3N contiene, por litro, las siguientes sales de macronutrientes: 0,75 g NaNO₃; 0,175 g KH₂PO₄; 0,075 g K₂HPO₄; 0,075 g MgSO₄·7H₂O; 0,025 g CaCl₂ y 0,025 g NaCl. Además, 1 l de medio contiene las siguientes sales de micronutrientes: 11,42 mg H₃BO₃; 4,98 mg FeSO₄·7H₂O; 8,82 mg ZnSO₄·7H₂O; 1,44 mg MnCl₂·4H₂O; 0,71 mg MoO₃; 1,57 mg CuSO₄·5H₂O; 0,49 mg Co(NO₃)₂·6H₂O; 50 mg EDTA y 31 mg KOH.

Las siembras se realizaron en condiciones de esterilidad, dentro de una cabina de flujo laminar y sobre medio de cultivo estéril en estado líquido y también semisólido (1,5% (p/v) agar bacteriológico). En medio semisólido, los ficobiontes fueron inoculados sobre discos de acetato de celulosa o membranas de nylon, lo que permitió una mayor localización de la masa de las algas y favoreció su crecimiento (**Figura 2.2**).

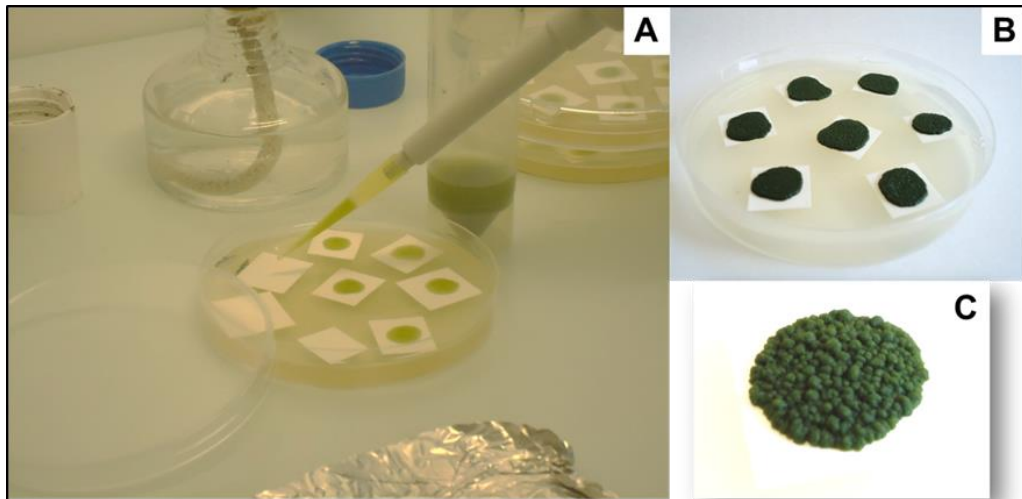


Figura 2.2. A. Siembra de ficobiontes liquénicos sobre soportes de nylon. B. Cultivo de ficobiontes en medio semisólido. C. Detalle de la morfología de un agregado de células de TR9 sp., creciendo sobre membrana de nylon.

La preparación de cultivos líquidos se realizó a partir de cultivos semisólidos, suspendiendo la masa de células crecida sobre discos con 2 ml de medio de cultivo líquido. Posteriormente se inoculó en botellas que contenían entre 150 y 300 ml de medio de cultivo líquido estéril (**Figura 2.3**). Ambos tipos de ficobiontes crecieron en cámaras de cultivo a 15°C, bajo ciclos de luz/oscuridad de 14h/10h y con una intensidad lumínica de $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

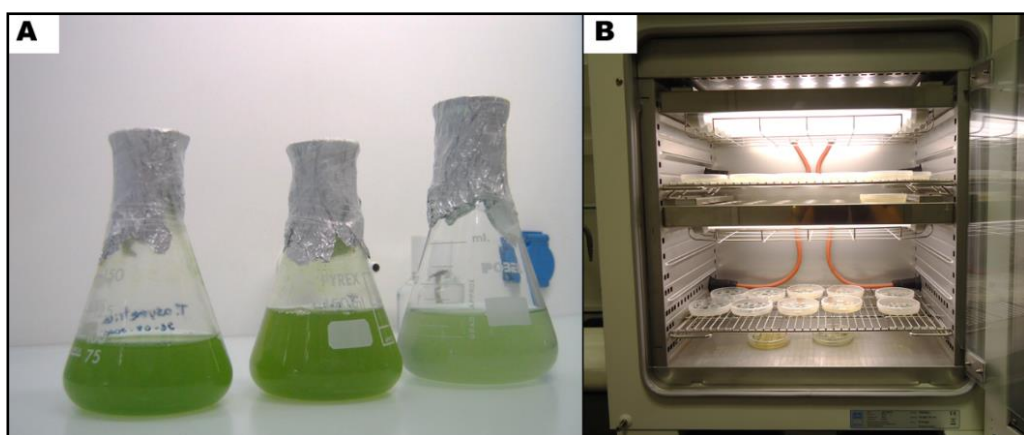


Figura 2.3. A. Ficobiontes creciendo en medio de cultivo líquido dentro de matraces Erlenmeyer. B. Cámara de cultivo en la que se crecen diferentes cultivos de ficobiontes liquénicos.

2.2.3. Tratamientos de estrés

Con el fin de analizar el comportamiento fisiológico de los diferentes ficobiontes estudiados y los mecanismos celulares que les permiten hacer frente a situaciones ambientales estresantes, los ficobiontes fueron sometidos a diferentes tratamientos capaces de estimular la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en sistemas biológicos, pudiendo causar estrés oxidativo.

Para la realización de estos experimentos de estrés oxidativo *in vitro*, fue necesario definir diferentes parámetros en los cultivos de *Trebouxia* sp., con el fin de que todos los cultivos empleados para los tratamientos fueran lo más homogéneos posible y, por tanto, mejorar la reproducibilidad de los experimentos.

En primer lugar, se realizaron contajes directos de células en cámara de Neubauer que no proporcionaron datos fiables ya que la mayoría de las células estaban agregadas entre sí. Por ello, se optó por una cuantificación indirecta mediante medida de absorbancia de clorofilas a 650 nm, complementada con medidas directas de biomasa de células/ml y contador de células. De esta forma, los cultivos líquidos fueron estandarizados pudiendo establecerse una relación constante entre Absorbancia a 650 nm y N° células/ml ($DO_{650} = 0,7$ es equivalente a 2×10^6 cels ml⁻¹). Asimismo, en 50 ml de un cultivo ajustado según esta relación, la biomasa de células es de aproximadamente 300 mg de peso fresco.

2.2.3.1. Tratamientos con hidroperóxido de cumeno

Los tratamientos fueron realizados sobre cultivos de TR1 y TR9 en medio líquido crecidos durante tres semanas en condiciones controladas, de cámara de cultivo (Ver apartado 2.2.2.). Tomando estos cultivos como material de partida, se diluyeron con medio de cultivo líquido estéril para obtener nuevos cultivos con un

volumen final de 100 ml, y en los que la densidad se ajustaba a los parámetros previamente descritos en el apartado anterior ($DO_{650}=0,7$).

Los tratamientos se administraron directamente sobre estos cultivos inoculando 80% CuHP ($C_9H_{12}O_2$) hasta conseguir concentraciones de entre 0 y 1000 μM . Tras permanecer 0, 3 y 6 horas en la cámara de cultivo, se recolectaron las células por centrifugación a 10.000 xg durante 5 minutos, a 4°C.

Con el fin de evitar que posibles residuos de CuHP en las células pudieran interferir en análisis posteriores, se realizaron dos lavados secuenciales de las mismas con agua ultrapura fría (4°C). Para facilitar el pesado, procesado y almacenado de las muestras se separaron varias alícuotas de cada tratamiento en tubos eppendorf (1,5 ml), que fueron preservadas a -80°C hasta su posterior uso.

2.2.3.2. Tratamientos con plomo

Los tratamientos fueron realizados empleando cultivos líquidos de los ficobiontes TR1 y TR9, cuyas características específicas (edad, densidad celular y condiciones de la cámara de cultivo) fueron las mismas que las ya descritas en el apartado anterior para los cultivos de partida de los tratamientos con CuHP. En algunos experimentos se emplearon también cultivos axénicos del alga *Coccomyxa solorina saccatae* y *Coccomyxa subellipsoidea*, que fueron tratados con Pb de la misma manera que TR1 y TR9.

Los tratamientos se realizaron adicionando diferentes cantidades de la sal Pb (NO_3)₂ a matraces con 100 ml de medio de cultivo líquido no estéril, hasta obtener tres concentraciones distintas de Pb (NO_3)₂: 0, 100 μM y 200 μM . Tras su esterilización en autoclave (20 minutos, 121°C y 0,8 atm), se inocularon 100 ml de algas ($DO_{650}=0,7$) en cada matraz, a partir de los cultivos líquidos mencionados en el párrafo anterior, en cabina de flujo laminar, lográndose tratamientos de 0, 50 y 100 μM Pb. Estos cultivos

fueron colocados en cámara de cultivo durante una semana, y agitados periódicamente. Al cabo de este tiempo, las células fueron recolectadas por centrifugación a 10.000 xg durante 5 min, a 4°C. Con el objeto de eliminar restos de Pb adheridos inespecíficamente a la pared celular, las algas fueron lavadas 2 veces con una solución que contenía 50 mM tampón fosfato pH 7, 100 mM NaCl y 2,5 mM EDTA, y luego con agua ultrapura. Para facilitar el pesado, procesado y almacenado de las muestras se separaron varias alícuotas de cada tratamiento en tubos eppendorf (1,5 ml), que fueron preservadas a -80°C hasta su posterior uso.

2.2.3.3. Tratamientos de deshidratación-rehidratación en presencia de plomo

Para estos experimentos se emplearon cultivos de TR1 y TR9 crecidos en medio semisólido e idénticas condiciones a las descritas en el apartado 2.2.2., pero esta vez los discos de nylon fueron de menor tamaño (5 mm de diámetro). Pasados 21 días de cultivo, los discos (con 20-30 mg de PF de células/disco) fueron retirados del medio de cultivo y sometidos a una desecación lenta en un recipiente cerrado con una concentración saturada de K₂SO₄ (80% humedad relativa) durante 24 h (a 20°C y bajo ciclos de luz/oscuridad de 12h/10h y una intensidad lumínica de 2-5 μmol⁻²s⁻¹).

Los fragmentos de talos de *R. farinacea* empleados (aproximadamente 30 mg PF) en estos experimentos fueron secados para su conservación tal y como se describió en el apartado 2.1.

El material deshidratado, tanto los fragmentos de líquen como los discos con los ficobiontes, fueron colocados uno a uno en microplacas Greiner de 96 pocillos de fondo plano y posteriormente rehidratados con 100-150 μl de 0, 50 o 100 μM Pb (NO₃)₂ en agua. Transcurridos 5 min se descartó el exceso de solución y se procedió a medir las cinéticas de formación de ROS y de autofluorescencia de clorofila tal y como se describe en los apartados 2.2.11. y 2.2.12., respectivamente.

2.2.3.4. Tratamientos con cadmio

Al igual que en los tratamientos de CuHP y Pb, para estos tratamientos se emplearon cultivos líquidos de TR1 y TR9 crecidos durante tres semanas en condiciones controladas, dentro de una cámara de cultivo. En algunos experimentos se emplearon también cultivos axénicos del alga *Coccomyxa solorina saccatae* y *Coccomyxa subellipsoidea*, los cuales fueron tratados con Cd de la misma manera que TR1 y TR9.

Los tratamientos se realizaron adicionando diferentes cantidades de la sal CdSO_4 a matraces con 50 ml de medio de cultivo líquido no estéril, hasta obtener tres concentraciones distintas de CdSO_4 : 0, 100 μM y 200 μM . Tras su esterilización en autoclave (20 minutos, 121°C y 0,8 atm), se inocularon 50 ml de algas ($\text{DO}_{650}=0,7$) en cada matraz, a partir de los cultivos líquidos mencionados en el párrafo anterior, en cabina de flujo laminar, lográndose tratamientos de 0, 50 y 100 μM Cd. Estos cultivos fueron colocados en cámara de cultivo, y agitados periódicamente. A las 24 y 72 horas se tomaron muestras de 25 ml. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 10.000 xg durante 5 minutos, a 4°C y lavadas 2 veces con 50 mM tampón fosfato pH 7, 100 mM NaCl y 2,5 mM EDTA, y luego con agua ultrapura. Para facilitar el pesado, procesado y almacenado de las muestras se separaron varias alícuotas de cada tratamiento en tubos eppendorf (1,5 ml), que fueron preservadas a -80°C hasta su posterior uso.

2.2.3.5. Tratamientos con cadmio y plomo en microalgas pre-tratadas con BSO

Para estos experimentos se emplearon cultivos de TR1 y TR9 crecidos en medio líquido en las mismas condiciones a las descritas en el apartado 2.2.2., pero añadiendo al cultivo 5 mM BSO a través de un filtro esterilizante. Posteriormente, se cultivaron las células durante una semana en las mismas condiciones que los cultivos estándar. Pasado este tiempo se ajustó la densidad de cultivos, de forma que se

podiera dispensar 10 mg de células en cada uno pocillos de una microplaca Greiner de 96 pocillos de fondo plano. Después se añadieron 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ o CdSO_4 en agua hasta un volumen final de 150 μl , para seguidamente medir la cinética de formación de ROS tal y como se describe en el apartado 2.2.11.

2.2.4. Medida de pigmentos fotosintéticos

Los pigmentos fotosintéticos fueron extraídos a partir de alícuotas de algas de 10 mg (PF), resuspendidas en 1 ml de 100% Dimetilsulfóxido (DMSO) e incubadas durante 30 minutos a 65°C, siguiendo un procedimiento similar al de Nikolopoulos *et al.* (2008). Después de centrifugar a 10.000 xg durante 5 minutos, se midió espectrofotométricamente el contenido de pigmentos de los sobrenadantes, empleando las siguientes longitudes de onda: 665 nm, para clorofila a, 650 nm, para clorofila b y 480 nm, para carotenoides, de acuerdo con Wellburn (1994).

2.2.5. Extracción, amplificación y secuenciación de ADN genómico

Como comentábamos anteriormente, el éxito en el estudio de las respuestas bioquímicas y fisiológicas de los diferentes ficobiontes aislados depende en buena medida de la pureza de dichos cultivos. Gracias a los estudios sobre marcadores moleculares realizados en nuestro grupo de investigación, dispusimos de las herramientas moleculares adecuadas para identificar los diferentes ficobiontes liquénicos de una forma rápida y relativamente sencilla.

Las técnicas de extracción, amplificación y secuenciación de ADN que se describen a continuación, fueron empleadas de forma rutinaria con diferentes propósitos: caracterizar las microalgas presentes en los talos liquénicos recolectados, identificar las diferentes colonias de células algales aisladas a partir de talos liquénicos ambientales, verificar las condiciones de axenicidad de dichos cultivos y comprobar el

grado de pureza de los cultivos masivos de células que serían empleados en los distintos experimentos.

2.2.5.1. Aislamiento de ADN total

El ADN total fue extraído tomando como base el método de Cenis (1992). Las células de las algas (aproximadamente 100 mg de PF) se centrifugaron durante 5 minutos a 14.000 xg y se homogeneizaron en mortero frío adicionándose 300 µl de tampón de extracción (200 mM Tris-HCl pH 8,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS). Posteriormente se añadieron 150 µl de 3M acetato sódico a pH 5,2, y se mantuvieron a -20 °C durante 15 min. Después de centrifugar a 14.000 xg durante 15 minutos, el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo. Los ácidos nucleicos fueron precipitados adicionando un volumen igual de isopropanol incubando durante al menos 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugando a 14.000 xg durante 15 min. Tras el lavado con 70% (v/v) etanol el precipitado de ADN fue resuspendido en 50 µl de agua ultrapura estéril. Complementariamente, se empleó el kit comercial DNeasyPlant Mini Kit de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.5.2. Amplificación por PCR del ADN aislado

El gen que codifica la subunidad 23S del ARN ribosomal en cloroplastos (23S ADN_r) ha sido propuesto como un nuevo marcador molecular que permite la identificación de especies de ficobiontes del género *Trebouxia*. Este gen presenta una serie de intrones de tipo I cuyo número, secuencia y sitio de inserción son muy diferentes entre diferentes especies de ficobiontes (del Campo *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2012). En base a estas diferencias se diseñaron varios pares de cebadores que nos permitieron diferenciar fehacientemente TR1 y TR9. Los pares de cebadores empleados fueron: cL2263F/cL2263R y cL781F/cL781R descritos por Casano *et al.* (2011) y 23Sps1/23Sps2 (23Sps1: 5'-CAT GAC CAG GAT GAA GCT TG-3' y 23Sps2: 5'-TAC TCA AGC CGA CAT TCT C-3'). Además se emplearon los cebadores para

ITSnr de algas descritos por Kroken y Taylor (2000) y los cebadores ITS1F (Gardes & Bruns, 1993) e ITS4 (White *et al.*, 1990) para ITSnr de hongos.

En general, las reacciones de amplificación se realizaron empleando los reactivos para PCR estables a temperatura ambiente Illustra Hot Start Mix RTG (GE Healthcare) en un volumen de reacción variable, empleando 25 µl para chequeos y 50 µl para amplificaciones preparativas. El empleo de este sistema permitió mejorar la reproducibilidad y minimizar las posibles contaminaciones debido a que sólo era necesario adicionar la muestra de ADN, los cebadores específicos y agua ultrapura estéril. De forma complementaria se empleó el kit comercial Phire Plant Direct PCR Kit de Thermo Scientific, que ofrece la ventaja de amplificar ADN a partir de las muestras de algas sin necesidad de realizar un aislamiento previo de ADN.

En cada ronda de amplificación se incluyeron controles negativos, sin muestra de ADN, para asegurar la ausencia de falsos positivos debidos a la presencia de contaminantes en los reactivos. Las condiciones de amplificación empleadas fueron las siguientes: 1 ciclo de: 2 min 94°C; 40 ciclos de: 30 s 94°C; 60 s 55°C, y 2 min 72°C; 1 ciclo de: 5 min 72°C.

2.2.5.3. Separación electroforética, purificación de productos de amplificación y secuenciación

Los productos de PCR obtenidos fueron separados por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,5%. Estos geles eran teñidos antes de la electroforesis con el reactivo SYBR Safe, que permite visualizar las bandas correspondientes a los productos de amplificación en un transiluminador de luz azul (Safe Imager™ 2.0). Eventualmente, las bandas visibles fueron recortadas y purificadas con el kit de purificación suministrado por GE Healthcare, siguiendo las instrucciones del fabricante. El volumen de elución fue de 20 µl que posteriormente se ajustaba para obtener la concentración de ADN adecuada para su secuenciación. Dicha secuenciación se llevó

a cabo en la Unidad de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá, donde emplearon los reactivos para secuenciación incluidos en Big Dye™ Terminator Cycle Sequence Ready Reaction kit II (Applied Biosystems Co.), un secuenciador multicapilar ABI PRISM 3130 XL (Applied Biosystems Co.) y un analizador genético ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems Co.).

2.2.6. Preparación de extractos proteicos

A la hora de elegir un protocolo apropiado para realizar extractos de proteínas se tuvieron en cuenta las características del material de partida y el uso que posteriormente se iba a dar a dicho extracto. Además, se tuvieron en cuenta características propias de las proteínas de interés, como su localización celular y su solubilidad, aplicándose diferentes procedimientos en la realización de los extractos de proteínas. En general, para obtener un buen rendimiento en los extractos proteicos se trató de evitar la exposición a altas temperaturas de las proteínas y que estas sufrieran alteraciones como pueden ser proteólisis, oxidación, etc.

2.2.6.1. Proteínas solubles

Los extractos se elaboraron a partir de muestras de algas cuyo peso fresco es entre 200 y 250 mg. El material fue homogeneizado en mortero, previamente enfriado a -80°C, junto con tierra silíceas y 500 µl de medio de extracción que contenía: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 10% (v/v) glicerol y 1% (p/v) polivinil polipirrolidona (PVPP). El homogeneizado del material resultante fue centrifugado a 4°C durante 20 minutos a 20.000 xg para obtener las proteínas “solubles” en el sobrenadante. La concentración de proteínas se valoró siguiendo el ensayo de Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina como patrón.

2.2.6.2. Proteínas insolubles (o Proteínas de membrana)

Al igual que para los extractos de proteínas solubles, se partió de muestras de algas con un peso fresco de entre 200 y 250 mg que se homogeneizaron en mortero, previamente enfriado a -80°C , junto con tierra silíce a y 500 μl de medio de extracción cuya composición se describe en 2.2.6.1. El homogeneizado fue centrifugado a 4°C durante 20 min a 1.000 xg con el objeto de eliminar la tierra silíce a, fibras, restos celulares de gran tamaño y células enteras. El sobrenadante resultante fue fraccionado por centrifugación a 20.000 xg durante 20 min, quedando en el sobrenadante las proteínas solubles como se describió anteriormente, y por otro lado, las proteínas de membrana (insolubles) en el precipitado. Estos fueron lavados dos veces con 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM EDTA y 100 mM NaCl y posteriormente fueron resuspendidos en 100 μl de medio de extracción (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM EDTA y 10% (v/v) glicerol) sin PVPP. Estas proteínas de membrana fueron valoradas siguiendo el ensayo de Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina como patrón. Para ello, es necesario realizar un procesamiento previo de las proteínas de membrana, basado en la digestión básica, que permite separar las proteínas insolubles de los componentes lipídicos a los que se encuentran unidas. Para realizar esta digestión básica, se mezclaron 5 μl de extracto de proteínas con 5 μl de 2 N NaOH y se calentó la mezcla a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 20.000 xg durante 5 min y se recuperó el sobrenadante para realizar la valoración de proteínas.

2.2.6.3. Extracción de exoproteínas de pared por métodos no disruptivos

La extracción de exoproteínas de pared o proteínas extracelulares (PE) de los ficobiontes estudiados fue llevada a cabo adaptando otros métodos previamente descritos para extraer biopolímeros extracelulares en otras algas verdes microscópicas (Wang *et al.*, 2004; Pereira *et al.* 2009). Brevemente, las algas (ca. 500 mg cél.) fueron

resuspendidas en 12 ml de agua ultrapura conteniendo 0,5% (v/v) de Cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) y 1 mM de PMSF, a 40°C durante 40 min con agitación continua y suave. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron las muestras a 10.000 xg durante 10 min. Los sobrenadantes, portadores de las proteínas extracelulares, se filtraron (por filtro de celulosa GF de 10 µm) para eliminar posibles células en suspensión, se dializaron contra agua destilada (24 h, 3 cambios, 4°C), se liofilizaron y se resuspendieron en volumen mínimo de agua ultrapura (50-100µl). La concentración de proteínas en el extracto se valoró siguiendo el ensayo de Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina como patrón. Las muestras se conservaron a -80°C para su posterior estudio.

2.2.7. Actividad de enzimas antioxidantes

La actividad de enzimas antioxidantes fue analizada en la fracción de proteínas solubles, mediante métodos espectrofotométricos y zimogramas.

2.2.7.1. Zimogramas de Superóxido Dismutasa y Glutation Reductasa

Para valorar la actividad de las posibles isoformas de los enzimas antioxidantes SOD y GR presentes en los extractos de proteínas solubles, se realizaron zimogramas consistentes en la separación de dichas isoformas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida nativos o ND-PAGE (Davis, 1964) seguidas de tinciones específicas que permiten revelar únicamente aquellas bandas proteicas que presentan la actividad enzimática buscada.

Los geles se construyeron con un gel de concentración compuesto por acrilamida al 4% y un tampón de concentración (0,22 M Tris-HCl pH 7) y otro gel de separación compuesto por acrilamida al 10% y un tampón de separación (1,3 M Tris-HCl pH 8,2). Se empleó un tampón de electrodo para correr las muestras cuya composición fue 25 mM Tris-HCl pH 8,3 y 20 mM glicina.

Una vez construidos los geles, las muestras de proteínas se mezclaron con el tampón de carga (0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 20% (v/v) glicerol; 0,01% (p/v) azul de bromofenol). Se cargaron 2 o 3 cantidades de proteínas por cada muestra (usualmente entre 5 y 20 µg por carril) con el objetivo de comprobar si la intensidad de la señal obtenida era proporcional a la cantidad de muestra presente. La electroforesis se corrió a 100 V hasta que las proteínas concentraron creando un frente para posteriormente subir el voltaje a 180 V durante 2 horas, todo ello realizado a 4°C y con agitación.

Al finalizar la electroforesis, se revelaron las actividades SOD y GR mediante tinciones específicas según se describe en Lascano *et al.* (2001).

2.2.7.1.1. Revelado de actividad Superóxido Dismutasa

Los geles fueron incubados en oscuridad durante 20 minutos a 37°C con una mezcla de reacción (25 ml/gel) que incluía los siguientes componentes: Riboflavina (1,25 mg); nitroazul de tetrazolio (NBT, 2,5 mg); 10 mM EDTA y 50 mM Tris-HCl pH 8,3. Posteriormente, los geles eran expuestos a luz fluorescente suave hasta que comenzaban a aparecer bandas sin color sobre un fondo gris. En ese momento, se retiraba la mezcla de reacción y se añadían 5 ml de 50% Glicerol, exponiéndolos a luz fluorescente más intensa. Para lograr el mejor contraste posible, se controlaba el viraje de color en el gel hasta que las bandas de actividad se veían nítidas sobre el fondo del gel oscurecido. La reacción se detenía añadiendo una disolución de 0,01% ácido acético.

La enzima SOD presenta típicamente tres tipos de isoformas según el cofactor metálico que forma parte de su grupo prostético: Mn-SOD; Fe-SOD y Cu-Zn-SOD (Asada, 1988). Cada uno de estos tipos presenta una sensibilidad diferente frente a inhibidores específicos como KCN y H₂O₂. Con el objetivo de distinguir los diferentes tipos de isoformas dentro de cada patrón isoenzimático observado, en algunos

experimentos, los geles fueron cortados en tres fragmentos, incubándose cada uno con: (1) Mezcla de reacción o control; (2) Mezcla de reacción + 2 mM KCN; (3) Mezcla de reacción + 5 mM H₂O₂.

Mn-SOD es resistente a cianuro y H₂O₂, Fe-SOD es resistente a cianuro pero inhibida por H₂O₂ y ambos inhibidores inactivan Cu/Zn-SOD (Fridovich, 1986). La comparación de los patrones isoenzimáticos de los tres fragmentos permite distinguir, dentro de (1) el tipo metálico de cada una de las bandas.

2.2.7.1.2. Revelado de actividad Glutathion Reductasa

Los geles se incubaron a temperatura ambiente con agitación suave en una mezcla de reacción (25 ml/gel) que incluía los siguientes componentes: DPIP (2,6-diclorofenol indofenol, 2,5 mg); MTT (5 mg); GSSG (62,5 mg); NADPH (6,25 mg); 3 mM EDTA; 3 mM MgCl₂; 200 mM Tris-HCl pH 8,3. La reacción no era instantánea, sino que transcurrían 10-20 minutos hasta la aparición de bandas azules intensas. Para disminuir el fondo del gel se lavaba este con agua destilada y se almacenaba a 4°C para evitar la difusión de las bandas. Además, para distinguir las bandas correspondientes a la actividad diaforasa de las bandas correspondientes a isoformas de GR genuinas, se incubó una réplica de cada gel en una mezcla de reacción sin GSSG.

2.2.7.2. Medida espectrofotométrica de actividades enzimáticas

La medida de la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD, GR, APX y CAT; se llevó a cabo a través de medidas de cinética enzimática. Las diferentes mezclas de reacción se elaboraron con extractos de proteínas solubles y la cinética enzimática se midió en un espectrofotómetro (V-630 Jasco) empleando cubetas de 1 ml de plástico/cuarzo, en función de la longitud de onda a la que se midió el progreso de la reacción.

2.2.7.2.1. Actividad Superóxido Dismutasa

La medida de la actividad SOD fue realizada de acuerdo con Stewart & Bewley (1980). El método se basa en la capacidad de esta enzima para evitar la reducción fotoquímica del nitroazul de tetrazolio oxidado (conocido por las siglas: NBT; de “*Nitro blue tetrazolium*”) que se transforma en azul de formazán (de color gris-azulado) en presencia del ión superóxido. El ión superóxido es producido durante el ensayo por la reacción fotoquímica del oxígeno con la riboflavina. La mezcla de reacción tiene los siguientes componentes: entre 50 y 100 μl de extracto conteniendo 50 μg de proteínas solubles, 50 mM tampón fosfato (pH 7,8), 100 nM EDTA y 0,1 mg de NBT. En último lugar, se agregan 0,05 mg de riboflavina y agua ultrapura hasta completar un volumen de 1 ml. La reacción comenzaba cuando los tubos con la mezcla se colocaban a 30 cm de distancia de una luz fluorescente intensa. Transcurridos 2 min, se detenía la reacción retirando los tubos de la luz. Estos se mantenían en condiciones de oscuridad hasta la lectura de la absorbancia de la mezcla a 560nm (A_{650}). Cuanto mayor es la actividad de SOD en el extracto, mayor es la inhibición de la reacción, por lo que no se produce un aumento en la cantidad de formazán ni tampoco el aumento de la A_{650} . Como control negativo, se midió la A_{650} en una reacción en la que no se añadió extracto de proteínas, obteniéndose la máxima señal.

2.2.7.2.2. Actividad Glutation Reductasa

La actividad GR fue ensayada a 25°C, de acuerdo con Schaedle & Bassham (1977), siguiendo el consumo de NADPH a A_{340} acoplado a la reducción del glutatión oxidado (GSSG). Las medidas se realizaban en un volumen de reacción de 1 ml y esta mezcla contenía: 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 3 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 0,15 mM NADPH, 0,5 mM GSSG y entre 50 y 100 μl de extracto conteniendo 50 μg de proteínas solubles. La reacción comenzaba con la adición de NADPH, y la actividad de la enzima producía la oxidación del NADPH cuya absorbancia se medía durante 2

minutos a una longitud de onda de 340 nm. También se midió la oxidación espontánea del NADPH en una mezcla de reacción que contenía todos los componentes salvo extracto de proteínas, con el fin de realizar las correcciones pertinentes a la hora de calcular la actividad específica de la enzima.

2.2.7.2.3. Actividad Ascórbico Peroxidasa

La actividad APX fue medida empleando el protocolo descrito por Amako y colaboradores (1994). Este ensayo determina la actividad de la enzima siguiendo el descenso en la absorbancia a 290nm, como consecuencia de la oxidación del ácido ascórbico por acción de APX en presencia H_2O_2 . Para cada medida se preparaba 1ml de una mezcla de reacción que contenía: tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7,0), 5 mM ácido ascórbico, 1 mM H_2O_2 y entre 50 y 100 μ l de extracto conteniendo 50 μ g de proteínas. La reacción comenzaba con la adición de H_2O_2 y durante un minuto se monitorizaban los cambios en la A_{290} . Para el cálculo de la actividad específica de APX se tuvo en cuenta la oxidación espontánea del ácido ascórbico.

2.2.7.2.4. Actividad Catalasa

Las medidas de actividad CAT fueron realizadas según el método propuesto por Aebi. (1984), valorando la descomposición del H_2O_2 en H_2O y O_2 , que puede estimarse mediante el descenso en la A_{240} . La reacción enzimática se desarrollaba en un medio compuesto por: tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7), 30 mM H_2O_2 y entre 50 y 100 μ l de extracto conteniendo 50 μ g de proteínas de proteínas solubles. Catalasa es un enzima que presenta una K_m relativamente baja, pero al mismo tiempo, su V_{max} es muy alta, por lo que sólo es activa frente a altas concentraciones de H_2O_2 . Por ello, el medio de reacción contenía una concentración elevada del substrato. Esta circunstancia trae aparejada una consecuencia indeseada, si el enzima está expuesto a dichas concentraciones de H_2O_2 por más de 1 minuto, puede resultar inactivado por éste. Por ello y a fin de que las medidas reflejen la actividad enzimática real, los

ensayos deben realizarse a tiempos cortos, para lo cual se deberá asegurar que la temperatura del medio de reacción esté a 30°C desde el inicio de la medición y que ésta registre el descenso de la A_{240} durante los primeros 30 segundos. Para el cálculo de la actividad específica de CAT se hicieron las correcciones correspondientes a la descomposición espontánea de H_2O_2 , cuyo valor fue calculado en mezclas de reacción sin extracto de proteínas.

2.2.8. Inmunodetección de proteínas por Western-blot

Para el estudio de la expresión de ciertas proteínas se utilizó la técnica de Western-blot que permite en un primer paso la separación de proteínas por peso molecular y la posterior detección de la proteína de interés empleando anticuerpos que la reconocen específicamente (Towbin *et al.*, 1979). Mediante este ensayo se detectaron diferentes tipos de proteínas: dos proteínas de los fotosistemas I y II (psaC del PSI y D1 del PSII), la proteína de choque térmico: HSP-70 y la enzima antioxidante GR.

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Los geles se construyeron con un gel de concentración compuesto por acrilamida al 5% y un tampón conteniendo: 0,5 M Tris-HCl, 8 mM EDTA y 0,4% SDS, pH 6,8; y otro gel de separación compuesto por acrilamida al 12,5% y un tampón conteniendo: 1,5 M Tris-HCl, 8 mM EDTA y 0,4% SDS, pH 8,8. La relación acrilamida/bisacrilamida en ambos geles fue 40:1. Se empleó un tampón de electrodo compuesto por: 25 mM Tris-HCl pH 8,3; 20 mM glicina; 0,1% (p/v) SDS y 1 mM EDTA.

Las muestras de proteínas se mezclaron con tampón de carga (0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 20% (p/v) SDS; 20% (v/v) glicerol; 3,5% (v/v) β -mercaptoetanol; 0,01% (p/v) azul de bromofenol), se calentaron a 95°C durante diez minutos y se mantuvieron en frío hasta su carga en el gel. En general, se cargaron entre 5 y 20 μ g de proteínas de

cada variante experimental por carril, con el objetivo de comprobar si la intensidad de la señal obtenida era proporcional a la cantidad de muestra presente. La electroforesis se corrió a 100 V hasta que las proteínas concentraron creando un frente, para posteriormente subir el voltaje a 180 V, hasta el final de la separación electroforética.

Una vez que las proteínas fueron separadas en la electroforesis, se procedió a su electrotransferencia a una membrana de PVDF (Fluoruro de polivinilideno) (Hybond™-P, Amersham Biosciences) en un sistema de “Trans-Blotting” líquido con refrigeración. En primer lugar, los geles y las membranas fueron equilibrados en tampón de transferencia (20 mM Tris; 0,2 M glicina; 10 mM SDS y 20 % (v/v) metanol, pH 8,3), para después realizar la transferencia empleando este mismo tampón y usando el sistema de transferencia “Mini Trans-Blot Cell” de BioRad. Usualmente la transferencia se realizó a 100 V, durante una hora y a una temperatura de 4°C.

Posteriormente, los espacios libres de la membrana fueron bloqueados con proteínas de leche desnatada en polvo al 5% en PBST (750 mM NaCl, 45 mM Na₂HPO₄, 30 mM KCl, 15 mM KH₂PO₄ y 0,5% (v/v) Tween 20) durante una hora a temperatura ambiente y con agitación. Seguidamente, la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 2.1**) resuspendido en PBST y 5% (p/v) BSA. El exceso de anticuerpo fue retirado lavando la membrana cuatro veces con leche desnatada en polvo al 5% en PBST durante 10 minutos a una temperatura ambiente y con agitación.

Los complejos antígeno:anticuerpo primario formados en la etapa anterior fueron revelados mediante el empleo de anticuerpos secundarios que, por una parte reconocen la cadena pesada del anticuerpo primario y, por otra parte, tienen una actividad enzimática conjugada (fosfatasa alcalina, en nuestro caso) que puede ser visualizada mediante una reacción de color. Para ello la membrana fue incubada en una solución del anticuerpo secundario (Anti-IgG de conejo y Anti-IgG de ratón, según

se hubieran empleado anticuerpos primarios de conejo o ratón, respectivamente, Sigma-Aldrich) resuspendido en una dilución de 1:5000 en PBST y 5% (p/v) BSA durante una hora a temperatura ambiente y con agitación suave. El anticuerpo secundario no unido fue eliminado lavando la membrana dos veces con PBST, durante 10 minutos a temperatura ambiente y con agitación.

Tabla 2.1. Relación de anticuerpos primarios y principales condiciones de inmunodetección.

Nombre Anticuerpo	Proteínas cargadas (µg)		Dilución
	Solubles	Insolubles	
Anti-psaC		5-20	1:5000
Anti-psbA		5-20	1:5000
Anti-HSp70	10-20		1:5000
Anti-GR	10-60		1:5000
Anti-RPL10A	10-15		1:2500

Los anticuerpos primarios empleados fueron adquiridos a través de diferentes casas comerciales. Anti-psaC, Anti-psbA, Anti-HSP70 y RPL10a en la casa comercial SIGMA-Aldrich Co, USA; mientras que Anti-GR fue adquirido en Agrisera, Suecia.

En la última etapa tiene el lugar el revelado de los complejos antígeno:anticuerpo primario:anticuerpo secundario mediante el desarrollo de la actividad enzimática fosfatasa alcalina, conjugada al anticuerpo secundario. La membrana se incubó durante 10 minutos con un tampón de fosfatasa alcalina (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 5 mM MgCl₂; 100 mM NaCl) para su equilibrado. El revelado de la membrana se realizó incubándola con una mezcla de 66 µl de solución de NBT (50 mg disueltos en 70% dimetilformamida) y 30 µl de solución de BCIP (50 mg disueltos en 100% dimetilformamida) en 10 ml de tampón fosfatasa. La reacción debía

desarrollarse en oscuridad y a temperatura ambiente. Se detenía diluyendo con agua destilada.

2.2.9. Electroforesis bidimensional

Para el IEF se emplearon tiras IPG (BioRad Co.) (7cm, pH 4-7 o 3-6) rehidratadas a 20°C durante 15 horas con la siguiente mezcla: entre 10 y 30 µl de extracto conteniendo 10 µg de proteínas extracelulares, 4% (p/v) CHAPS, 130 mM DTT, 2% (v/v) Triton X100, 2% (v/v) IPG buffer 3-10, 1µl azul de bromofenol, 8 M urea, 2 M tiourea y agua ultrapura csp. 125µl. El IEF tuvo lugar a 20°C en 4 etapas: 1) 0 a 250 V, 15 min, gradiente rápido; 2) hasta 4000 V, 5 h, gradiente gradual; 3) 4000 V, 6 h, gradiente rápido y 4) a 500 V, hasta 20 h a gradiente rápido. Tras el IEF, las tiras IPG fueron conservadas a -80°C. Para separar las proteínas en una segunda dimensión, se realizó un SDS-PAGE (4-15% (p/v) acrilamida), para lo cual las tiras de IEF fueron equilibradas con 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 6 M Urea, 20% (v/v) de glicerol, 2% (p/v) SDS, 10 µl azul de bromofenol y 2% (p/v) DTT, durante 15 min, y posteriormente con 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 6 M Urea, 20% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS, 10 µl de azul de bromofenol y 2,5% iodoacetamida, por otros 15 minutos.

2.2.10. Tinción de geles

Tras las electroforesis mono y bidimensionales (SDS-PAGE en ambos casos), los polipéptidos fueron teñidos empleando diferentes técnicas. La elección del método de tinción más conveniente dependió del rango de sensibilidad deseada y de la cantidad de proteína utilizada en cada análisis. Los métodos empleados fueron las tinciones con Azul de Coomassie, con Sypro Ruby y con Plata.

Para la tinción de Coomassie, el gel se sumergió en una solución de tinción [0,1% (p/v) CBB-G, 45% (v/v) metanol y 10% (v/v) ácido acético glacial] durante 2 horas a temperatura ambiente, con agitación continua y suave. El exceso de colorante

se eliminó mediante la incubación del gel con una solución decolorante [20% (v/v) metanol y 7,5% (v/v) ácido acético glaci ar] durante una hora a temperatura ambiente y con agitación suave. Las incubaciones con la solución decolorante se repitieron dos o tres veces hasta que en el gel aparecerían las bandas teñidas de azul sobre un fondo casi transparente.

La tinción con plata se realizó empleando el kit comercial “Silver staining Kit, Protein”, compatible con el análisis de bandas/*spots* por espectrometría de masas, siguiendo las indicaciones del fabricante.

La tinción fluorescente de geles con el agente SYPRO[®]Ruby, fue realizada en la unidad de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología-CSIC. Para esta tinción los geles son fijados en una solución que contiene: 50% (v/v) metanol y 10% (v/v) ácido acético glaci ar. Tras la incubación con la sonda fluorescente, se retira el exceso de sonda lavando el gel con 10% (v/v) metanol y 7% (v/v) acético glaci ar, para después ser visualizado y/o fotografiado en un transiluminador equipado con luz ultravioleta, azul o con un equipo de imagen de luz láser (450, 473, 488 o 532 nm).

2.2.11. Cinéticas de generación de radicales libres (ROS)

Para la detección de la formación de radicales libres intracelulares se empleó la sonda diacetato DCFH₂-DA (Wardman, 2007), a una concentración final de 10 μM en los experimentos de rehidratación de talos de *R. farinacea* y sus ficobiontes aislados en presencia de Pb (ver apartado 2.2.3.3.) y también en los experimentos con Cd y Pb en células pre-tratadas con 0 y 5 mM BSO durante una semana (apartado 2.2.3.5.). La molécula de DCFH₂-DA puede pasar libremente a través de las membranas celulares, y solo una vez dentro de la célula es hidrolizada a DCFH. Esta nueva molécula queda atrapada en el interior celular debido a su naturaleza polar, pudiendo ser oxidada por radicales libres a su estado fluorescente (DCF, λ_{exc} =504, λ_{em} =524, verde). La emisión de fluorescencia de DCF fue medida durante 4 horas en un lector de placas

SPECTRAFluor Plus (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). Se hicieron 12 réplicas de cada muestra por tratamiento y los valores obtenidos fueron referidos al peso de cada muestra.

2.2.12. Cinéticas de autofluorescencia de clorofila

Para analizar la funcionalidad del aparato fotosintético se realizaron medidas de autofluorescencia de clorofila en los experimentos de rehidratación de talos de *R. farinacea* y sus ficobiontes aislados en presencia de Pb (ver apartado 2.2.3.3.). Para ello se midió la emisión de fluorescencia de clorofila usando filtros de $\lambda_{exc} = 485$ nm y $\lambda_{em} = 635$ nm, durante 4 horas en un lector de placas SPECTRAFluor Plus (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). Se hicieron 12 réplicas de cada muestra por tratamiento y los valores obtenidos fueron referidos al peso de cada muestra.

2.2.13. Medidas de peroxidación lipídica

Se midieron los niveles de MDA como marcador de peroxidación lipídica, y consecuentemente de estrés oxidativo. Para ello se empleó la modificación del método de Reilly & Aust (1999) descrita por Catalá *et al.* (2010). Como patrón se emplearon diluciones seriadas de 0-50 μ M tetraoxipropano (TEP) que es un precursor del MDA, en 80% (v/v) etanol y suplementado con 2% (p/v) BHT, sustancia antioxidante que evita la descomposición de los peróxido lípidos durante el ensayo.

Los fragmentos de talo liquénico fueron rehidratados en presencia de Pb tal y como se describe en el apartado 2.2.3.3. A los diferentes tiempos (0, 30, 60, 90, 120, 240 min), los talos fueron homogeneizados a 4°C con 1ml de agua destilada y centrifugados a 16.060 xg durante 10 min. Los precipitados se resuspendieron en 500 μ l de la solución previamente descrita de etanol-BHT. Las muestras de ficobiontes aislados fueron homogeneizadas en 500 μ l de etanol-BHT. Posteriormente, se añadió a cada muestra 900 μ l de 257 mM TBA; 0,918 M ácido tricloroacético y 3,20 M HCl.

Después, se incubaron las muestras en un baño a 70°C durante 30 min, se enfriaron en hielo y centrifugaron a 16060 xg durante 10 min. Por último se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 532 nm (A_{532}) y 600 nm (A_{600}). Este último valor se restó al primero para eliminar posibles interferencias de azúcares solubles en las muestras (Du & Bramlage, 1992).

2.2.14. Análisis de btiolos por HPLC

La determinación de tiores no-proteicos o btiolos en los fotobiontes tuvo lugar empleando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para su extracción se homogeneizaron muestras de algas (0,15 g PF) con 400 µl de 0,125 N HCl en un mortero con nitrógeno líquido. Durante la extracción se añadió a cada muestra 15 µl de 5 mM N-AcCys como patrón interno. El homogenado resultante se centrifugó dos veces consecutivas a 14.000 xg durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un vial de vidrio borosilicato para inyección, empleando el auto-inyector del equipo de cromatografía (inyección de 100 µl de extracto ácido) en una columna Mediterránea SEA18 (5 µm, 250 x 4,6 mm; Teknokroma, España) y se eluyó con un gradiente de disolvente A [98:2 agua desionizada MiliQ: acetonitrilo (v/v), además de 0,01 % ácido trifluoroacético (TFA)] y disolvente B [2:98 agua desionizada MiliQ: acetonitrilo (v/v), además de 0,01% (v/v) TFA]. El programa de gradiente en función del disolvente B (%) fue: 2 min, 0%; 25 min, 25%; 26 min, 50%; 30 min, 50%; 35 min, 0%, 45 min, 0%. La cromatografía se realizó en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC Agilent 1200, Santa Clara, CA, EE.UU.). La detección de los tiores no-proteicos se realizó por derivatización post-columna con el reactivo de Ellman [1,8 mM (ácido 5,5-ditio-bis (2 nitrobenzoico) en tampón fosfato potásico 300 mM pH 7,0 DTNB suplementado con 15 mM EDTA]. La reacción se llevó a cabo en un reactor termostático de 1,8 ml a 37°C (Rauser, 1991). El compuesto derivado, 5-mercapto-2-nitrobenzoato, tiene un máximo de absorbancia a 412 nm que se midió con un detector

de array de fotodiodos (Ortega-Villasante *et al.*, 2005). La cuantificación de los tioles presentes en la muestra se realizó integrando el área de pico en base al área de pico del patrón interno de N-AcCys.

2.2.15. Análisis de polímeros extracelulares

Se determinó la cantidad total de azúcares neutros, ácidos urónicos, capacidad de quelación de cationes, composición glicosídica y proteínas solubles de las EPS de las algas *Trebouxia* TR1 y TR9, cultivadas en medio líquido conteniendo 0 y 100 μM Pb. La extracción de los EPS se realizó como se describe en apartado 2.2.6.3. para el análisis de proteínas extracelulares. Para las determinaciones de exopolisacáridos, los EPS fueron precipitados con 3 volúmenes de 93% (v/v) etanol, a 4°C, durante toda la noche. Los precipitados fueron recuperados por centrifugación, lavados con etanol, resuspendidos en 4-5 ml de agua a 40°C y centrifugados (90 segundos a 14.500 xg) para eliminar cualquier material insoluble.

2.2.15.1. Azúcares neutros

El método de fenol-sulfúrico (Hodge & Hofreiter, 1962) nos permite cuantificar los azúcares neutros de la fracción aislada. Los azúcares simples, oligosacáridos y polisacáridos, incluidos sus derivados los metiléteres con grupos libres o potencialmente libres, dan un color amarillo anaranjado al ser tratados con fenol y ácido sulfúrico. Esta reacción es sensible (nos permite utilizar cantidades muy bajas) y estable. Para su cuantificación, se añadieron 0,5 ml de fenol al 5% al extracto diluido en agua (20 μl de volumen total) y tras mezclarlo con 2,5 ml de ácido sulfúrico al 98% se procedió a medir la absorbancia a 490 nm. Se empleó D-glucosa como patrón.

2.2.15.2. Ácidos urónicos

Estos ácidos se midieron en mayores volúmenes de muestra que los utilizados para azúcares totales, debido a su menor abundancia, siguiendo el protocolo

propuesto por Filisetti-Cozzi & Carpita (1991). Para ello, se resuspendieron 100 µl de extracto en 400 µl de agua ultra pura a los que se añadió ácido sulfámico-sulfamato potásico para reducir la interferencia de los azúcares neutros sobre la medida de los urónicos. Después de mezclar vigorosamente con 2,4 ml de 75 mM tetraborato sódico en ácido sulfúrico al 98% (v/v), se incubó durante 20 minutos a 100°C. Tras enfriarse, se añadieron 80 µl de 0,15% (p/v) hidroxidifenil en 0,5% (p/v) de hidróxido sódico, que reacciona con los ácidos urónicos dando un complejo coloreado con pico de absorbancia a 525 nm. Se empleó ácido galacturónico como patrón.

2.2.15.3. N-acetil aminoazúcares

El método de Reissig, Strominger & Leloir (1955) se llevó a cabo añadiendo a 250 µl de extracto 40 µl de 0,8 M borato potásico pH 9,1, incubando a temperatura de ebullición durante 3 min. La mezcla se enfrió en agua corriente, y se adicionó 1 ml de 10% (p/v) p-dimetilamino baenzaldehído (DMAB) en ácido acético glaciar (el cual contiene 12% (v/v) 10 N HCl). Esta mezcla se incubó a 37°C durante 20 min y una vez enfriada se leyó la absorbancia a 585 nm. Como patrón se empleó N-acetilglucosamina.

2.2.15.4. Capacidad de quelación de cationes

El método de "Alcian Blue" empleado para medir la capacidad de quelación o unión de iones electro-positivos fue el método de Bar-Or & Shilo (1988), modificado por Chang *et al.* (1998). Para ello se añadieron 850 µl del reactivo Alcian Blue (que consiste en 1 mg/ml de Alcian Blue en 0,5 M ácido acético) a 100 µl de muestra. Después de mezclar ambos componentes, se adicionaron 50 µl más de la solución de Alcian Blue. Esta mezcla reposó durante toda la noche a temperatura ambiente, posteriormente fue centrifugada a 15.000 xg durante 30 min y se procedió a leer la absorbancia a 601 nm.

2.2.15.5. Composición glicosídica por HPLC

Para estudiar su composición en monosacáridos, los EPS fueron digeridos mediante hidrólisis ácida. Para ello se tomaron aproximadamente 3 mg de EPS liofilizados y se incubaron con 1 ml de 1N H₂SO₄, a 100°C, durante 8 h. Posteriormente, los hidrolizados fueron neutralizados con OHNH₄ y desalados mediante una cromatografía de intercambio iónico rápido empleando 2 columnas de resina Dowex aniónica y catiónica, respectivamente. Con el objeto de reducir el volumen de los hidrolizados, se los liofilizó y re-solubilizó en agua ultrapura para llegar a una concentración de azúcares totales de ca. 1mg/ml, adecuada para el análisis de monosacáridos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los monosacáridos fueron analizados por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) en un sistema Dionex modelo ICS 3000 utilizando columna CarboPac PA1 de 2x250mm. El gradiente para separación de los monosacáridos fue realizado mezclando los eluyentes A (agua) y B (250 mM hidróxido de sodio) de acuerdo con la siguiente secuencia: 0-25 min, 16 mM B; 25,1-30 min, 200 mM B; 30,1-35 min, 16 mM B. Los potenciales aplicados al PAD fueron: 0-0.4 s, 0.1; 0.41-0.42 s, -2,0; 0.43 s, 0.6; 0.44-0.5, -0.1. El flujo aplicado fue de 0,250 ml min⁻¹.

2.2.15.6. Proteínas extracelulares

La fracción proteica de los EPS de TR1 y TR9 fue analizada mediante electroforesis monodimensionales (SDS-PAGE) y bidimensionales que incluyeron una primera separación por isoelectroenfoque dentro del rango de pH 3-6 o 4-7, seguida de una segunda electroforesis por SDS-PAGE.

2.2.16. Estudio de la incorporación y distribución de plomo y cadmio en las células

2.2.16.1. Especiación de plomo y cadmio en medio de cultivo

Las especies de Pb y Cd disociadas en el medio de cultivo líquido Bold 3N con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ o CdSO_4 , fueron estimadas empleando el programa MINTEQ ver.3.0. (<http://www2.lwr.kth.se/English/OurSoftware/vminteq>) que se basa en el modelo de equilibrio químico para el cálculo de la especiación de metales.

2.2.16.2. Incorporación de plomo al interior celular

Con el fin de evaluar el contenido intracelular de metal/masa células se realizaron lavados de alícuotas de TR1 y TR9 de aproximadamente 0,15 g de peso fresco tratadas con 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ con 20 mM EDTA pH 4,5. Las muestras fueron procesadas en la Unidad de Análisis Elemental de la Universidad Autónoma de Madrid, empleando la técnica analítica de: Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS), que permite la determinación de elementos traza y sus isótopos en todo tipo de matrices en disolución. Por su elevada sensibilidad, esta técnica es idónea para la detección de metales pesados en muestras biológicas. Para ello, las muestras fueron liofilizadas y luego digeridas con 60% (v/v) HNO_3 y 30% (v/v) H_2O_2 , tras lo que se analizó el contenido en plomo en base a un patrón de calibración previamente establecido.

2.2.16.3. Microanálisis de la distribución del plomo

Se emplearon alícuotas de TR1 y TR9 tratadas con 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y lavadas dos veces con una solución compuesta por: 50 mM tampón fosfato (pH 7,0), 100 mM NaCl y 2,5 mM EDTA, seguido de dos lavados con agua ultrapura (Branquinho & Brown, 1994; Branquinho *et al.*, 1997). Estos lavados permitieron eliminar solamente el Pb débilmente adherido a la pared. La distribución de Pb en los fotobiontes TR1 y TR9

fue estudiada a nivel extracelular e intracelular mediante TEM acoplada a espectroscopía dispersiva de rayos-X (EDX). Estas técnicas fueron realizadas en la Universidad de Valencia por el Dr Francisco García Breijo y el Dr José Reig Armiñana. El procesamiento de las imágenes fue realizado por el SCSIE (Servicio Central de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de Valencia.

2.2.16.4. Determinación de cadmio en diferentes compartimentos celulares

Las determinaciones de Cd fueron realizadas en la fracción intracelular y pared de cuatro especies de microalgas diferentes: TR1, TR9, *Coccomyxa solorina* y *Coccomyxa subellipsoidea*. En primer lugar, las células fueron tratadas con 100 μM Cd en cultivo líquido durante 72 h, como se detalla en el apartado 2.2.3.4. Se emplearon matraces con 200 ml de medio de cultivo líquido, puesto que para hacer estas determinaciones se requería una mayor cantidad de material de partida (aproximadamente entre 0,8 y 1 g de peso fresco). Además, se incluyeron dos controles (0 μM Cd), uno para cada género englobando ambas especies (Control *Trebouxia*: TR1+TR9; Control *Coccomyxa*: *C. solorina* + *C. subellipsoidea*).

Las células fueron recolectadas por centrifugación a 10.000 xg durante 5 min a 4°C, lavadas 2 veces con agua ultrapura y resuspendidas en 10 ml de agua ultrapura para después ser lisadas físicamente por medio de pases en una French Press, a 1.350 atm. Una vez procesadas se observaron los homogenados a través del microscopio óptico para corroborar la separación de las paredes del resto de las células. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 1.000 xg durante 5 min, a 4°C. Se reservó el sobrenadante y se realizó un lavado del precipitado con 1 ml de 5 mM EDTA pH 4,5 que se mezcló con el anterior. El precipitado resultante correspondió principalmente a la fracción de paredes celulares, y por otro lado los sobrenadantes constituyeron el contenido intracelular. Las dos fracciones fueron liofilizadas y después digeridas con 60% (v/v) HNO_3 y 30% (v/v) H_2O_2 . El contenido en Cd fue analizado

mediante la técnica de ICP-MS en la Unidad de Análisis Elemental de la Universidad Autónoma de Madrid, de la misma forma que se hizo para el contenido de Pb (ver apartado 2.2.16.2.).

2.2.17. Microscopía electrónica de transmisión

Las células de *Trebouxia* sp. TR1, *T.* sp. TR9, *Coccomyxa solorina saccatae* y *C.* "LU" fueron equilibradas y fijadas en el propio medio Bold 3N con la adición de 4% glutaraldehído durante 2 h a 4°C. Las células fueron lavadas con 0,01 M tampón fosfato pH 7,4 y posteriormente post-fijadas durante 2 h y a 4°C, con tetraóxido de osmio al 1% en 0,01 M tampón fosfato pH 7,4. Dichas muestras se deshidrataron en series crecientes de etanol y se incluyeron en una resina Spurr siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secciones ultrafinas fueron teñidas posteriormente con citrato de plomo (Reynolds 1963) y observadas en TEM modelo JEOL JEM1010 (100 KV).

2.2.18. Análisis estadístico

Los experimentos fueron repetidos entre dos y nueve veces, partiendo en todas las réplicas de nuevos cultivos de la misma edad (tres semanas). El análisis estadístico de los datos obtenidos en cada uno de los experimentos se realizó empleando el programa Statgraphics para Windows (versión SPSS 19.0, SPSS Inc., Chicago, USA). Para el análisis estadístico de los datos se realizó un ANOVA factorial, junto con la prueba t-Student cuando fue necesario evaluar las diferencias entre medias. Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar, y las diferencias fueron consideradas significativas para valores de $P < 0.05$.

2.3. Productos

Para la realización del presente trabajo de Tesis Doctoral se han empleado productos de casas comerciales conocidas (GE Healthcare, Invitrogen, Merck, Panreac, Promega, Pronadisa, Qiagen, Serva, Sigma y Thermo Scientific), siendo químicamente puros o de la máxima calidad posible.

Se utilizó agua ultrapura obtenida con el sistema “Milli-Q Academic” y agua destilada “Elix 10”, ambas de Millipore, para la preparación de disoluciones y tampones.

2.3.1. Aparatos y Equipos

Se utilizaron: cámaras climatizadas para el cultivo de ficobiontes liquénicos (Fisher y Snijders Scientific). Centrífugas refrigeradas Thermo Scientific (modelos Heraeus Multifuge X1R y Fresco 21). Termocicladores SensoQuest Lab cycler y Boeco. Transiluminador de luz azul Safe Imager™ 2.0 (Invitrogen). Analizador de imágenes Quantum ST4 (Vilber Lourmat). Arcón congelador de -85°C Labfrost (LabNet). Cabina de flujo laminar Cruma 870 FL. Autoclave modelo Med 20 de Selecta. Espectrofotómetro (V-630 Jasco). Aparato isoelectroenfoque Protean IEF Cell (Biorad).

También se utilizó un variado equipo de laboratorio que incluía cubetas de electroforesis, microcentrífugas, balanza de precisión, termobloque, pH-metro, etc.

2.3.2. Esterilización de material y soluciones

Todo el material de plástico y vidrio empleado para el trabajo con ácidos nucleicos así como las disoluciones y medios de cultivo de ficobiontes fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 121°C y 0,8 atm de presión.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Respuesta al estrés oxidativo agudo de los ficobiontes aislados de *Ramalina farinacea*

El objetivo de estos experimentos fue estudiar la respuesta fisiológica frente a estrés oxidativo agudo de cada uno de los dos ficobiontes que coexisten en el líquen *R. farinacea*, sin la influencia del micobionte. Para ello, se utilizaron cultivos axénicos de TR1 y TR9 sometidos a tratamientos oxidativos de diferente intensidad mediante la adición de CuHP al medio de incubación en concentraciones variables, entre 0 y 1mM. El CuHP es un compuesto orgánico pro-oxidante, capaz de atravesar las rígidas y químicamente resistentes paredes celulares de este grupo de microalgas y de propagar ROS a nivel intracelular.

La respuesta fisiológica frente al estrés oxidativo de los ficobiontes aislados fue estudiada mediante el análisis de cambios en componentes clave del aparato fotosintético, en el sistema de protección antioxidante y en los niveles de la proteína HSP70, relacionada con mecanismos de reparación frente a diversos tipos de estrés (Duan *et al.*, 2011).

3.1.1. Resultados

3.1.1.1. Efecto del CuHP sobre pigmentos y proteínas fotosintéticas

Para comprobar el efecto del estrés oxidativo causado por CuHP sobre componentes clave del aparato fotosintético de los ficobiontes TR1 y TR9, se estudiaron cambios en los niveles de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides) y de proteínas fotosintéticas de ambos fotosistemas: PsaC (PSI) y D1 (PSII).

3.1.1.1.1. Efecto del CuHP sobre pigmentos fotosintéticos

A fin de realizar una primera aproximación y ajustar las condiciones de los tratamientos, se midieron los niveles de pigmentos fotosintéticos en cultivos líquidos de TR1 incubados con diferentes concentraciones de CuHP (0-1000 μM) durante distintos periodos de tiempo en un intervalo de 24 horas. Las condiciones de incubación fueron 15°C y luz continua de 30-35 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (igual nivel de irradiancia que el de cultivo). Los efectos que los tratamientos oxidativos tuvieron sobre la cantidad de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides se muestran en la **Figura 3.1**, expresándose el nivel de cada pigmento como porcentaje respecto al valor inicial del mismo en células de TR1 sin tratar. Los valores iniciales de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides fueron de 1,98 ($\pm 0,10$), 0,35 ($\pm 0,013$) y 0,86 ($\pm 0,039$) $\mu\text{g}/10^6$ células, respectivamente.

Los resultados muestran como los niveles de clorofila *a* y los de carotenoides, experimentaron disminuciones significativas a medida que aumentaban la intensidad y la duración del tratamiento oxidativo. Sin embargo, en el gráfico B (**Figura 3.1**), puede observarse que la clorofila *b* no mostró variaciones superiores al 10% respecto del control en las células de TR1 expuestas a CuHP durante 24 horas. En el otro extremo se encuentran los carotenoides, los cuales evidenciaron la mayor sensibilidad al

CuHP, disminuyendo hasta en un 70% tras 24 h de incubación con el tratamiento más intenso. La clorofila *a* mostró una tasa de degradación intermedia, reduciendo sus niveles hasta en un 40% del valor inicial.

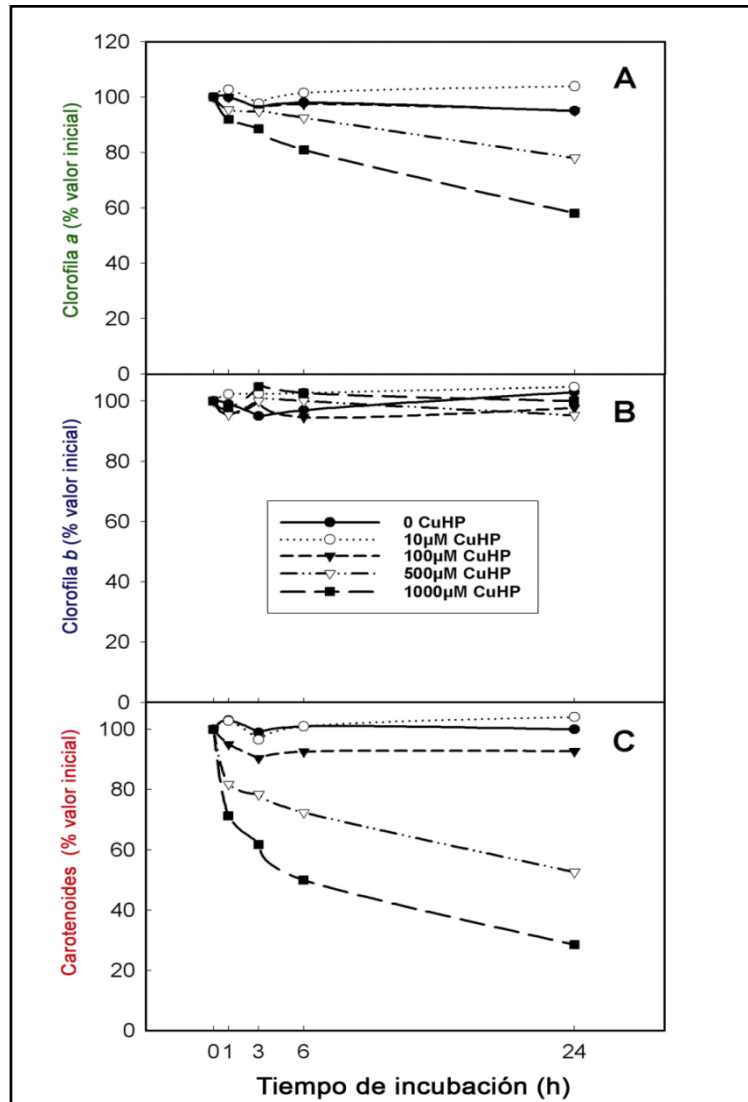


Figura 3.1. Efecto del estrés oxidativo, producido por el agente propagador de ROS CuHP, sobre los pigmentos fotosintéticos de *Trebouxia* sp. TR1. Los resultados representados muestran las medias de cuatro experimentos independientes, siendo los desvíos estándar asociados (SD) menores del 5 % en todos los casos.

Estos resultados indican que el CuHP produjo una reducción significativa en el nivel de pigmentos fotosintéticos durante las primeras horas de incubación, al menos de clorofila *a*, y especialmente de carotenoides en células aisladas de TR1. A partir de

esta información fue posible ajustar el rango dinámico de los tratamientos, estableciéndose unos tiempos de exposición de entre 0 y 6 horas, y concentraciones del CuHP de entre 0,1 y 1 mM, ya que no se observaron cambios en ninguno de los pigmentos estudiados bajo condiciones control, durante 24 h de incubación (**Figura 3.1**). Por lo tanto, seguidamente se realizó un nuevo estudio para medir cambios en el contenido de clorofila *a* y carotenoides en cultivos líquidos de TR1 y TR9 tratadas con concentraciones de CuHP de 100, 500 y 1000 μM , durante 3 y 6 horas.

Los valores basales de clorofila *a* y de carotenoides en las dos especies de ficobiontes se muestran en la **Figura 3.2**. Estos resultados indicaron que existen diferencias en los niveles de pigmentos fotosintéticos entre ambas algas, en condiciones de cultivo, siendo TR1 el ficobionte que posee una concentración de clorofilas y carotenoides ligera pero significativamente mayor que TR9.

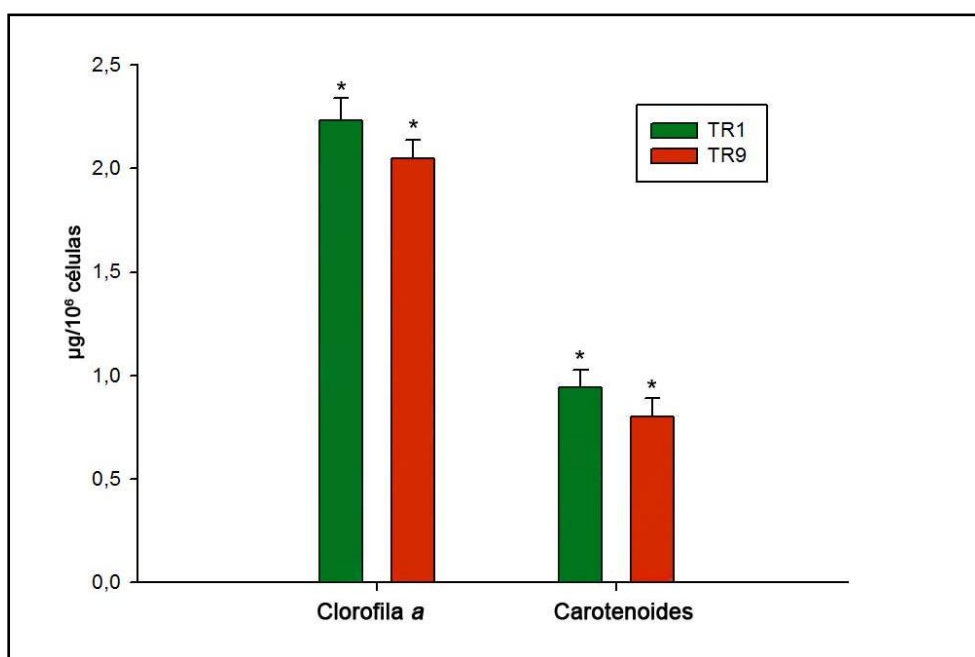


Figura 3.2. Niveles basales de pigmentos fotosintéticos observados en *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 en condiciones control (cultivo líquido durante una semana a 15°C). Los resultados representados muestran las medias de cuatro experimentos independientes, así como los desvíos estándar asociados. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA unifactorial, considerando como factor el tipo de ficobionte. Los asteriscos indican las diferencias significativas en la concentración de cada pigmento entre TR1 y TR9 (* $P < 0,05$).

El efecto que el estrés oxidativo tiene sobre los pigmentos fotosintéticos de TR1 y TR9 se muestra en la **Figura 3.3**. En esta figura puede observarse que hubo una clara disminución de los niveles de clorofila *a* y carotenoides a medida que aumentaron la concentración del agente oxidante y el tiempo de incubación, para las dos especies de ficobiontes.

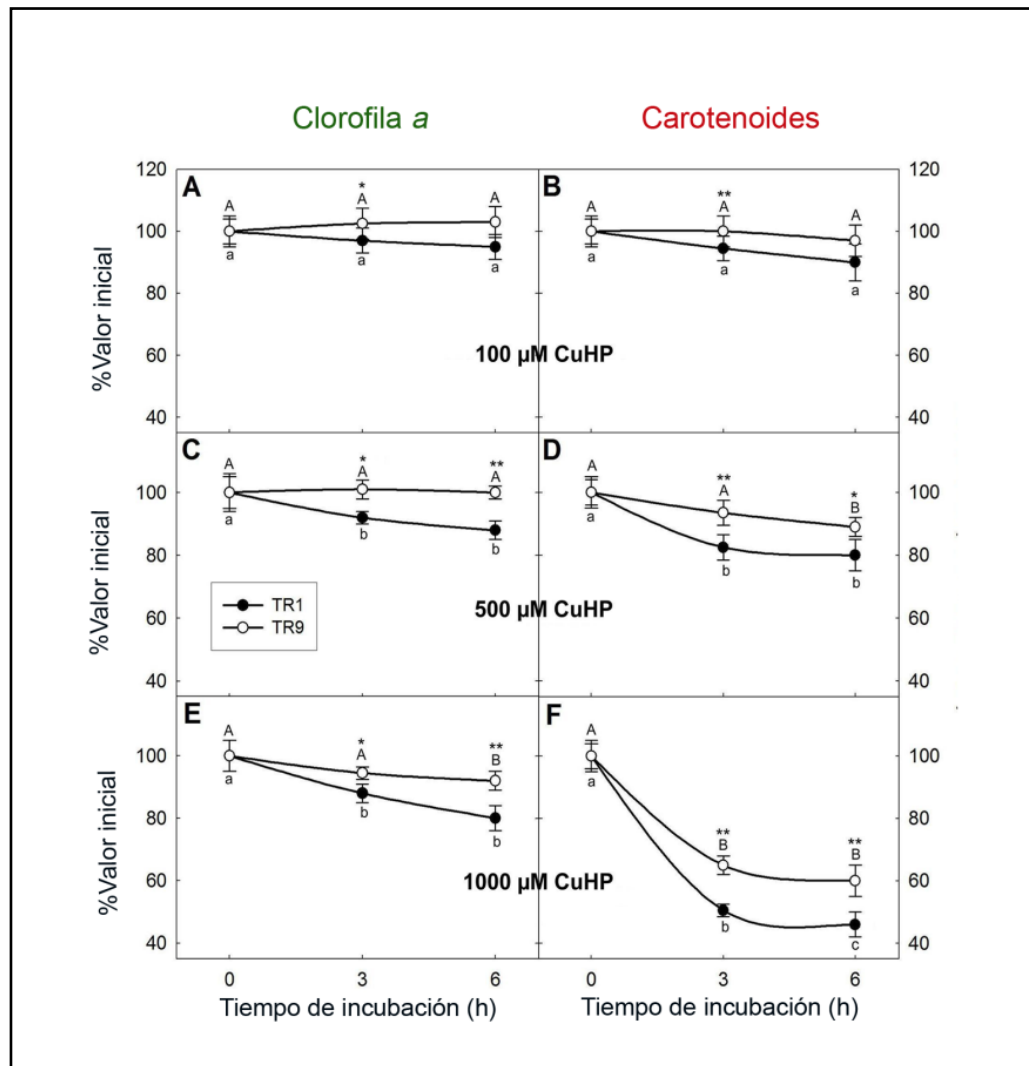


Figura 3.3. Cambios en los niveles de clorofila *a* y carotenoides en los ficobiontes *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 expuestos a estrés oxidativo. Cultivos líquidos de TR1 y TR9 aislados fueron sometidos a tratamientos con 100 µM (A y B), 500 µM (C y D) y 1000 µM (E y F) CuHP. Los valores representados muestran el valor medio de cuatro experimentos independientes así como los desvíos estándar asociados. Los datos fueron analizados estadísticamente por un ANOVA factorial, en el que la especie de ficobionte y el tiempo de incubación junto a la concentración de CuHP fueron considerados factores. Las diferencias entre medias fueron evaluadas mediante la prueba t-Student. Las diferentes letras minúsculas o mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre 0, 3 y 6 h de incubación con CuHP para TR1 y TR9, respectivamente; y los asteriscos indican diferencias significativas entre TR1 y TR9 para cada tratamiento de CuHP (* $P < 0,05$ o ** $P < 0,01$).

Sin embargo, el efecto del estrés oxidativo inducido por CuHP tuvo un mayor impacto sobre los pigmentos de TR1 que sobre los de TR9, siendo únicamente significativa la caída de los niveles de clorofila *a* en TR9 para el tratamiento más intenso (1000 μM de CuHP durante 6h), como se observa en el apartado E de la **Figura 3.3**. Además, TR9, también conservó un mayor nivel de carotenoides que TR1 en todos los tratamientos.

Estos resultados pusieron de manifiesto que a pesar de que TR9 posee un menor contenido por unidad celular de clorofila *a* y carotenoides que TR1, es capaz de conservar mejor los niveles de estos pigmentos en condiciones de estrés oxidativo.

3.1.1.1.2. Efecto del CuHP sobre proteínas fotosintéticas

El efecto del estrés oxidativo generado por CuHP sobre los niveles de proteínas fotosintéticas fue analizado mediante ensayos tipo Western-blot empleando anticuerpos policlonales específicos (**Figura 3.4**). El estudio de cambios en las proteínas que forman parte de los centros de reacción del fotosistema I (PsaC) y del fotosistema II (D1), fue realizado sobre células de TR1 y TR9 tratadas con concentraciones de CuHP de 100, 500 y 1000 μM , durante 0, 3 y 6 horas. Como puede observarse en la **Figura 3.4**, los niveles de PsaC no presentaron variaciones significativas por efecto del CuHP en ninguno de los ficobiontes. En cambio, los niveles de proteína D1 disminuyeron significativamente en ambos ficobiontes como consecuencia de la exposición al agente propagador de ROS, siendo esta disminución notablemente más intensa en TR1.

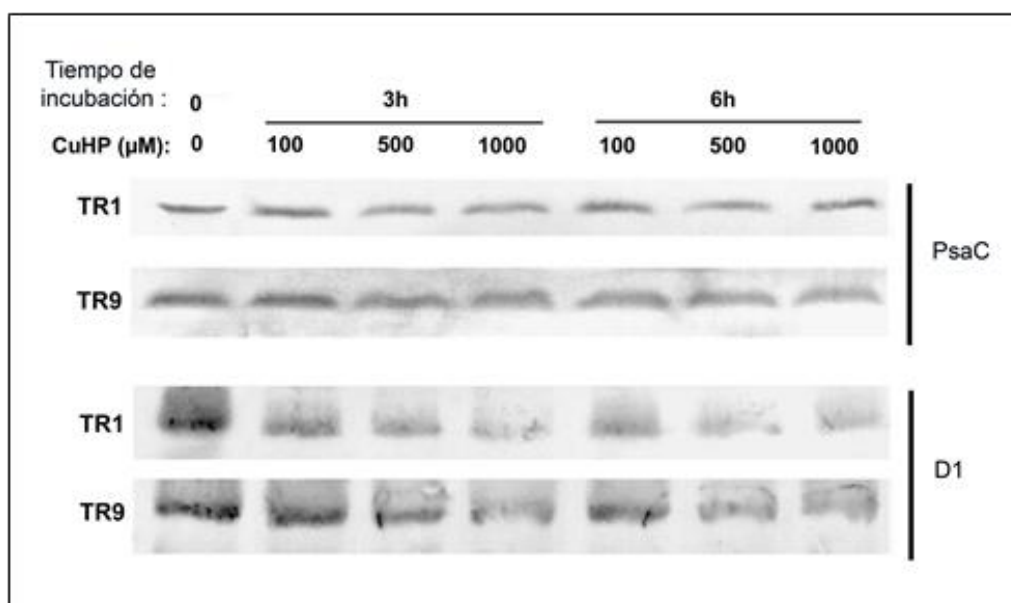


Figura 3.4. Cambios en las proteínas fotosintéticas PsaC y D1 en los ficobiontes *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 expuestos a estrés oxidativo. TR1 y TR9 fueron tratadas con CuHP (100, 500 y 1000 μ M) durante 0, 3 y 6 h. La detección inmunoquímica de las proteínas PsaC y D1 fue realizada por Western-blot en la fracción insoluble de extractos de proteínas.

3.1.1.2. Estudio comparativo de la modulación de diferentes enzimas antioxidantes

El estudio comparativo de la capacidad de TR1 y TR9 para modular la actividad de las diferentes enzimas antioxidantes, en respuesta a un incremento de los niveles de ROS, podría ayudarnos a esclarecer la diferente capacidad que tienen ambos ficobiontes para preservar, en condiciones de estrés oxidativo, los niveles de pigmentos y proteínas fotosintéticas. Por consiguiente, se estudiaron los efectos de diferentes concentraciones de CuHP sobre los niveles y la actividad de las enzimas antioxidantes GR y SOD en los ficobiontes TR1 y TR9, mediante zimogramas, ensayos espectrofotométricos y, en el caso de GR, inmunodetección en ensayos tipo Western-blot.

3.1.1.2.1. Medida espectrofotométrica de la actividad SOD y GR

La **Figura 3.5** muestra la actividad total de las enzimas antioxidantes GR y SOD en TR1 y TR9 sometidas a estrés oxidativo. Los resultados indicaron que la actividad GR inicial (medida en células sin tratar) fue menor en TR9 que en TR1 (21 y 50 nmol NADPH min⁻¹·mg⁻¹, respectivamente). Sin embargo, la actividad GR en TR1 disminuyó significativamente a medida que aumentaron los tiempos de incubación y la concentración de CuHP. Por el contrario, en TR9 la actividad de la enzima GR se indujo de forma drástica al incrementarse la intensidad del tratamiento oxidativo.

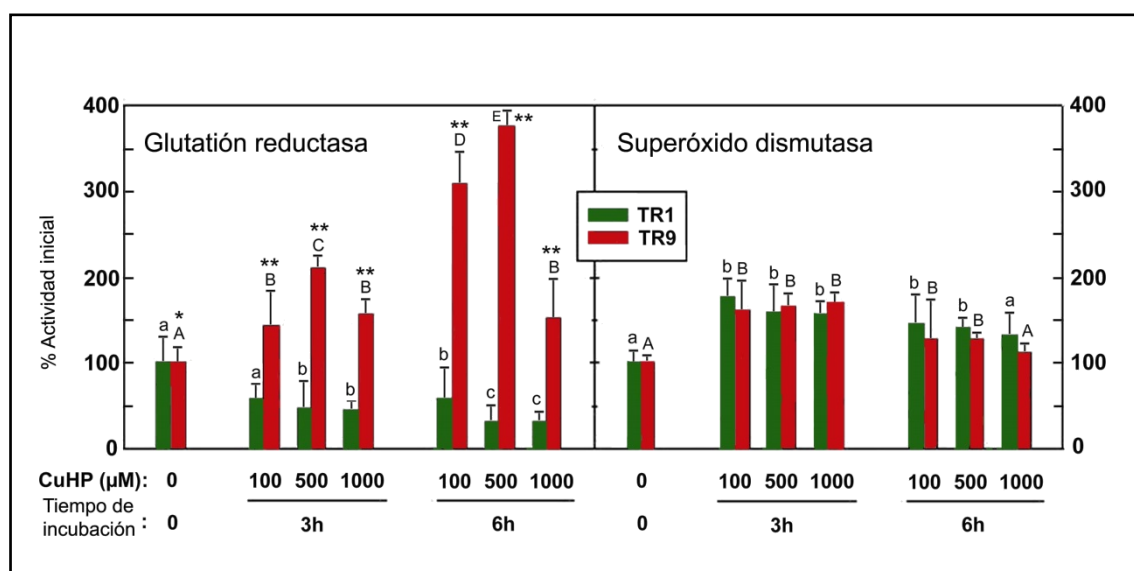


Figura 3.5. Medidas espectrofotométricas de cambios en las actividades GR y SOD en *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 expuestas a estrés oxidativo. TR1 y TR9 fueron tratadas con CuHP (100, 500 y 1000 µM) durante 0, 3 y 6 h. La actividad total de GR y SOD fue medida en extractos de proteínas solubles mediante ensayos espectrofotométricos. Los valores representados muestran el valor medio de 3-4 experimentos independientes así como los desvíos estándar asociados. Los datos fueron analizados estadísticamente por un ANOVA factorial, en el que la especie de ficobionte y el tratamiento de CuHP (tiempo de incubación y concentración de CuHP) fueron considerados factores. Las diferencias entre medias fueron evaluadas mediante la prueba t-Student. Las diferentes letras minúsculas o mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos con CuHP para TR1 y TR9, respectivamente; y los asteriscos indican diferencias significativas entre TR1 y TR9 para cada tratamiento de CuHP (* $P < 0,05$ o ** $P < 0,01$).

En principio, cabe señalar que, a diferencia de lo observado respecto de la actividad GR, no se observaron diferencias significativas entre TR1 y TR9 en cuanto a los niveles iniciales de actividad SOD ($31,95$ y $30,30$ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$, respectivamente). Asimismo, los resultados que se muestran en la **Figura 3.5** indicaron que el tratamiento oxidativo produce un aumento significativo en los niveles de actividad SOD en ambas especies de ficobiontes, en relación a sus respectivos valores iniciales, salvo en el caso de máximo estrés (1000 μM CuHP durante 6h). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de actividad total de esta enzima entre TR1 y TR9 en ninguno de los tratamientos.

3.1.1.2.2. Zimogramas de SOD y GR

Los zimogramas de actividad GR se presentan en la **Figura 3.6**, encontrándose una única isoforma de esta enzima mediante ND-PAGE monodimensional. Los patrones de bandas que presentan estos zimogramas corroboraron los resultados obtenidos mediante ensayos espectrofotométricos en la actividad total de GR, y que se describen en el apartado anterior (3.1.1.2.1.). Para los tiempos 0, podemos observar que la intensidad de la banda fue mayor en TR1 que en TR9, por lo que confirmamos que la actividad GR inicial fue más alta en TR1. El zimograma de actividad GR para TR1 puso de manifiesto que al aumentar la magnitud del tratamiento oxidativo, disminuyó la intensidad de la banda correspondiente a la actividad GR.

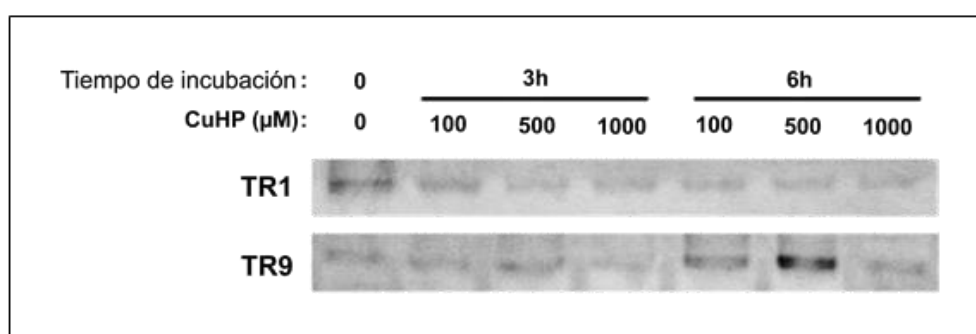


Figura 3.6. Zimogramas de actividad GR en *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 tratadas con CuHP. TR1 y TR9 fueron tratadas con CuHP (100, 500 y 1000 μ M) durante 0, 3 y 6 h. Los zimogramas muestran la existencia de una sola banda tras la separación de las isoenzimas putativas por electroforesis en ND-PAGE (se cargaron 10 μ g de proteínas por carril) y la posterior tinción específica de actividad GR (Lascano *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos en el caso de TR9 demostraron que frente al estrés oxidativo se produjo un aumento drástico en los niveles de actividad GR. La banda más intensa, y por lo tanto la de mayor actividad GR, corresponde al tratamiento de 6h y 500 μ M CuHP, siendo consistentes estos resultados con los obtenidos mediante ensayos espectrofotométricos.

Las imágenes de la **Figura 3.7** muestran como el patrón isoenzimático de SOD fue mucho más complejo que el de GR en los ficobiontes estudiados, encontrándose diferentes bandas de actividad correspondientes a SOD. Además, los patrones isoenzimáticos de SOD fueron diferentes entre los dos ficobiontes tanto a nivel cualitativo como cuantitativo. Mientras que en TR9 distinguimos tres bandas (o grupos de bandas próximas) diferentes, TR1 presenta un patrón isoenzimático más complejo con al menos seis bandas de diferente migración e intensidad.

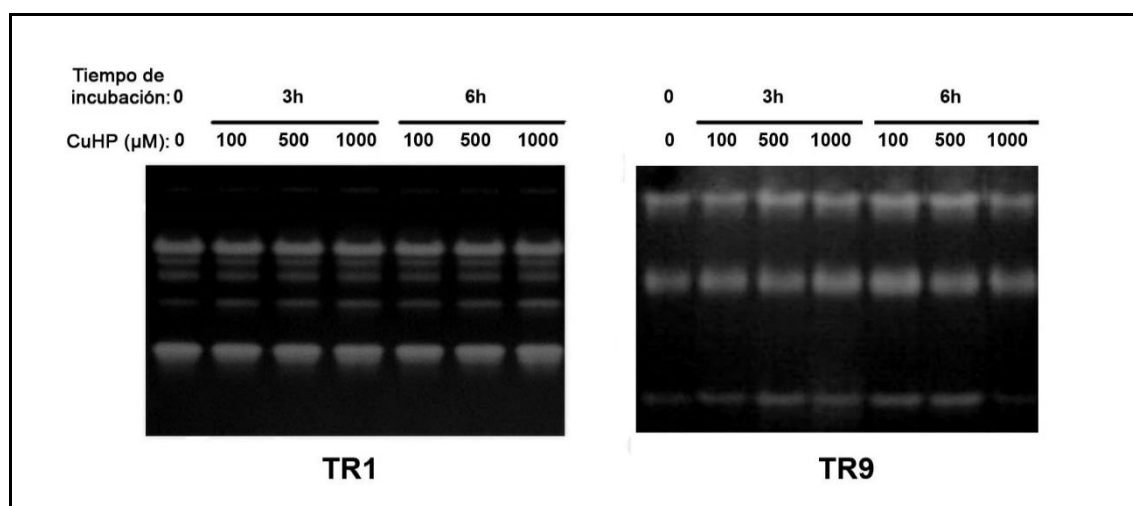


Figura 3.7. Zimograma de actividad SOD en *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 tratadas con CuHP. TR1 y TR9 fueron tratadas con CuHP (100, 500 y 1000 μ M) durante 0, 3 y 6 h. Los zimogramas muestran los patrones de isoenzimas de SOD presentes en cada especie de *Trebouxia* tras la separación de las proteínas solubles (10 μ g por carril) mediante electroforesis en ND-PAGE y el posterior revelado específico de actividad SOD (Lascano *et al.*, 2001).

Asimismo, los zimogramas presentados en la **Figura 3.7** indicaron que no existen cambios drásticos en la actividad de las diferentes isoenzimas de SOD en función de los tratamientos. Sin embargo, se percibieron variaciones en la actividad de las bandas de menor movilidad e intermedias en TR9 tratada con CuHP respecto de sus valores iniciales. En tratamientos de 3 h, dichas bandas aumentaron progresivamente con la concentración del agente pro-oxidante, mientras que a las 6 h se observa una tendencia opuesta. En el caso de TR1, solo pudimos encontrar cambios sutiles en la intensidad de las bandas de mayor y menor movilidad electroforética. En general, estos resultados corroboraron los obtenidos en la medida espectrofotométrica de la actividad SOD total, descritos en el apartado anterior (3.1.1.2.1.).

A fin de conocer a cuál de los tres tipos de isoformas conocidas de SOD (Mn-SOD, Fe-SOD y Cu-Zn-SOD) corresponden las diferentes bandas encontradas entre los zimogramas de SOD en TR1 y TR9, se realizaron ensayos de sensibilidad frente a los inhibidores específicos: KCN y H₂O₂ (Ver apartado 2.2.7.1.1. de Materiales y Métodos).

Los resultados obtenidos se recogen en la **Figura 3.8** en la que las bandas superior e intermedias (señaladas en la figura con flechas azules) corresponderían a isoformas de tipo Mn-SOD mientras que las bandas de mayor migración (indicadas con flechas rojas) serían de tipo Fe-SOD, ya que fueron inhibidas por el tratamiento con 5 mM H₂O₂. Por lo tanto, podemos afirmar que la actividad SOD total medida en TR1 y TR9, fue el resultado de la actividad de dos isoformas diferentes: Mn-SOD y Fe-SOD, presentes en ambas algas. Además, observamos dos bandas de actividad SOD exclusivas de TR1 (flechas azules pequeñas), respecto de TR9, que correspondieron a isoformas de tipo Mn-SOD. Por otra parte, ambas microalgas poseen una isoforma Fe-SOD con la misma movilidad electroforética. Sin embargo, TR1 presentó por encima otra banda más de menor migración, que también correspondió a Fe-SOD puesto que

se inhibió significativamente en presencia de 5 mM H₂O₂. Esta inhibición parcial de una isoforma en presencia de su inhibidor específico es habitual cuando se trata, como en este caso, de isoformas con gran actividad. No fue posible atribuir ninguna de las bandas a isoformas del tipo Cu-Zn-SOD, pues aunque el tratamiento con 2 mM KCN redujo la intensidad general de las bandas, no se produjo una alteración del patrón isoenzimático respecto del obtenido en el control, tanto en TR1 como en TR9.

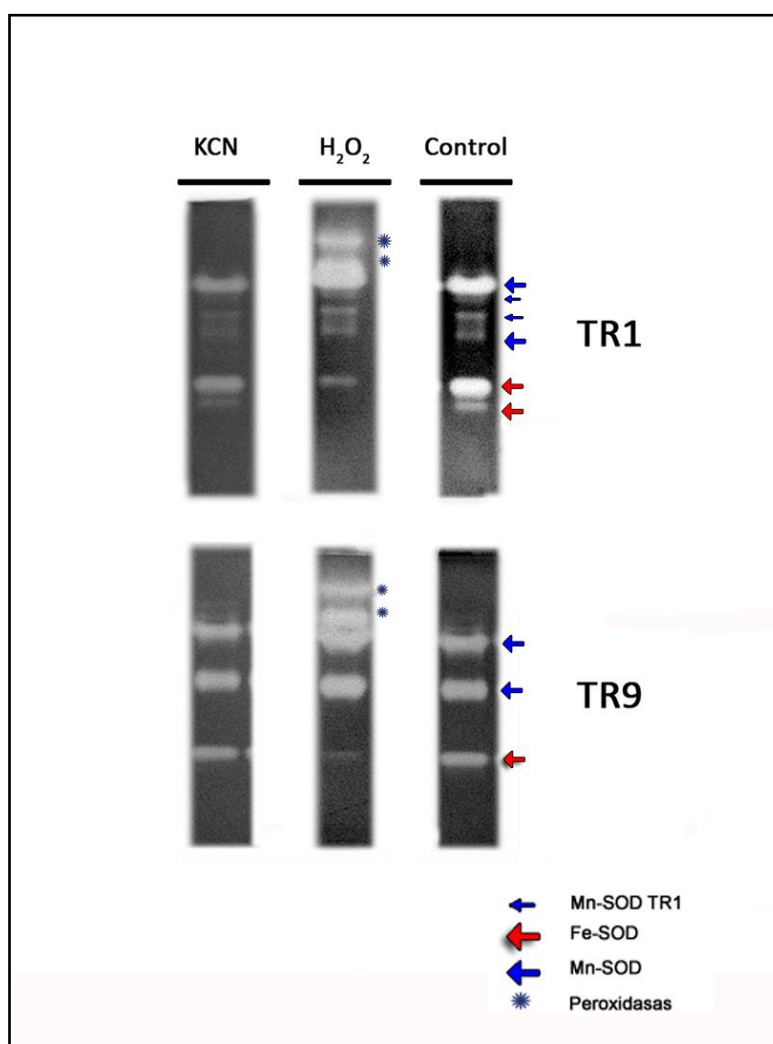


Figura 3.8. Zimograma de SOD revelando las diferentes isoenzimas presentes en los ficobiontes *Trebouxia* sp. TR1 y TR9. Las proteínas solubles (10 µg) fueron separadas por electroforesis en ND-PAGE y posteriormente se realizó el revelado específico de actividad SOD (Lascano *et al.*, 2001). Las diferentes isoenzimas de SOD fueron determinadas en función de su sensibilidad diferencial frente a la inhibición por 2 mM KCN y 5 mM H₂O₂ (Fridovich, 1986). Las bandas señaladas con flechas azules corresponden a isoformas de tipo Mn-SOD mientras que las bandas indicadas con flechas rojas sería de tipo Fe-SOD. Los asteriscos señalan las bandas inespecíficas, resultado de la actividad de peroxidasas en presencia de 5 mM H₂O₂. El tratamiento con 2 mM KCN no altera el patrón isoenzimático aunque sí disminuyen la actividad de las bandas de ambos ficobiontes.

3.1.1.2.3. Inmunodetección de GR por Western-blot

Los niveles estacionarios de proteína GR obtenidos a través de inmunodetección por Western-blot con anticuerpos policlonales Anti-GR se muestran en la **Figura 3.9**. En la misma se observa que el nivel inicial de proteína GR fue mayor en TR1 que en TR9. Además, en TR9 vemos que la cantidad de proteína GR aumentó con la intensidad del estrés oxidativo, siendo máxima para el tratamiento de 500 μM de CuHP durante 6 h.

Estos resultados sugirieron que, al menos en parte, los cambios en la actividad GR demostrados en los ensayos previos (medidas espectrofotométricas y zimogramas, apartados 3.1.1.2.1 y 3.1.1.2.2, respectivamente) fueron ocasionados por variaciones en la cantidad de proteína GR.

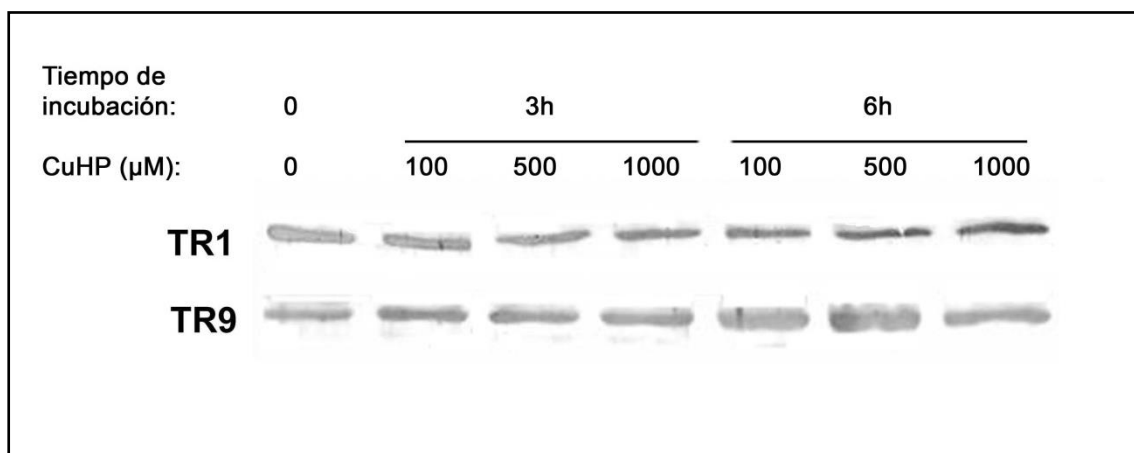


Figura 3.9. Inmunodetección de GR por Western-blot en *Trebouxia* TR1 y *T. TR9* tratadas con CuHP. TR1 y TR9 fueron tratadas con CuHP (100, 500 y 1000 μM) durante 0, 3 y 6 h. Las proteínas solubles (se cargaron 40 μg por carril) fueron separadas mediante electroforesis en SDS-PAGE y después se realizó la inmunodetección de la proteína GR con anticuerpos policlonales Anti-GR que se encuentran disponibles comercialmente (Agrisera, Suecia).

3.1.1.3. Mecanismos de reparación. Inmunodetección de la chaperona (HSP70)

La **Figura 3.10** muestra los resultados del análisis por Western-blot de la proteína de choque térmico HSP70 en células de TR1 y TR9 tratadas con CuHP. Los resultados muestran diferencias tanto en los niveles iniciales como en la regulación por estrés oxidativo de los niveles de dicha proteína. Partiendo de una cantidad relativamente mayor respecto de TR9, en TR1 se produjo una disminución en los niveles de HSP70 para tratamientos de 3 h con 1000 μM CuHP y para todas las concentraciones en exposiciones de 6 h de duración. Sin embargo, en TR9 los cambios se produjeron en sentido inverso. Este ficobionte partió de un nivel inicial notablemente menor de HSP70 que se incrementó visiblemente con el tratamiento estresante, fundamentalmente en presencia de 500 y 1000 μM durante 6 h.

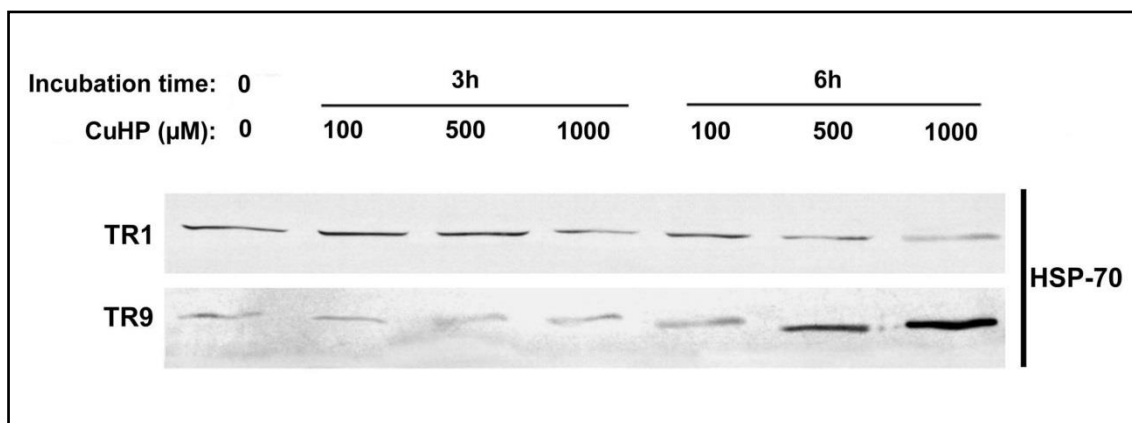


Figura 3.10. Inmunodetección de HSP70 por Western-blot en *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 tratadas con CuHP. TR1 y TR9 fueron tratadas con CuHP (100, 500 y 1000 μM) durante 0, 3 y 6 h. Se cargaron 15 μg de proteínas solubles en cada carril que fueron separadas mediante electroforesis en SDS-PAGE. Después se realizó la inmunodetección de la proteína HSP70 con anticuerpos policlonales anti-HSP70 que se encuentran disponibles comercialmente (SIGMA-Aldrich Co, USA).

3.1.2. Discusión

El CuHP es considerado un agente oxidante efectivo para realizar estudios de estrés oxidativo *in vitro* en diferentes sistemas biológicos (Taffe *et al.*, 1987; Ayala *et al.*, 1996; Kang *et al.*, 2013) Los resultados obtenidos tras los tratamientos de TR1 y TR9 con CuHP y el posterior análisis de cambios en: pigmentos y proteínas fotosintéticos, modulación de enzimas antioxidantes y de los niveles de la chaperona HSP70; indican que los dos ficobiontes presentes en *Ramalina farinacea* han desarrollado diferentes respuestas fisiológicas frente a situaciones ambientales que generan endógenamente un estrés oxidativo agudo comparable al ensayado en nuestros experimentos. En dichas condiciones de estrés, TR9 ha demostrado poseer una mayor capacidad que TR1 para preservar algunos de los componentes clave del aparato fotosintético, como son: clorofila *a*, carotenoides y la proteína D1 (**Figuras 3.3 y 3.4**).

La disminución de los niveles de clorofila *a* y carotenoides registrada en los ficobiontes sometidos a tratamientos oxidativos está en consonancia con los resultados obtenidos en otros estudios sobre estrés abiótico en plantas (Gadallah, 1999; Nyachiro *et al.*, 2001; Mitra & Banerjee, 2010). Asimismo, Herbinger y colaboradores (2002) sugieren que en organismos fotosintéticos sometidos a condiciones estresantes se produce la disminución controlada de los niveles de pigmentos fotosintéticos (clorofilas) como una respuesta que permitiría reducir la producción de ROS. Dichas ROS se generan en mayor medida cuando hay un exceso de absorción de energía lumínica en el aparato fotosintético, en relación con la capacidad de disipación de dicha energía por parte del organismo. Por otra parte, los carotenoides son una de las primeras líneas de defensa en plantas contra los efectos tóxicos del radical superóxido y el oxígeno singlete. Cuando esto sucede la molécula de carotenoide se oxida, generándose como producto de esta reacción diferentes moléculas volátiles de cadena corta (Stratton *et al.*, 1993). Estudios recientes

realizados en plantas, demuestran que estos productos de la oxidación de carotenoides son moléculas señalizadoras que median procesos de desarrollo, y la respuesta frente a estrés biótico y abiótico (Li *et al.*, 2008; Ramel *et al.*, 2012).

La proteína D1 es uno de los componentes fundamentales del centro de reacción del fotosistema II, el cual se encuentra embebido en las membranas tilacoidales desde donde realiza reacciones clave para la fotosíntesis (Shi *et al.*, 2012). El fotosistema II es particularmente sensible a daños foto-oxidativos en condiciones de estrés abiótico (Aro *et al.*, 1993; Asada *et al.*, 1999), siendo la proteína D1 la principal diana de dicho daño por lo que es “sacrificada” para evitar que se produzca el desensamblaje y la inactivación completa del fotosistema II. La reposición de la proteína D1 dañada se produce mediante síntesis proteica *de novo*, en un proceso conocido como ciclo de reparación del fotosistema II (Nishiyama *et al.*, 2006). En el presente estudio, el ficobionte TR9 es el que mantuvo los niveles más elevados de proteína D1 y de carotenoides, en todas las condiciones de estrés oxidativo ensayadas. Trebst y colaboradores (2002), demostraron que en *Chlamydomonas reinhardtii* la proteína D1 se pierde durante la fotoinhibición al ser oxidada por el radical superóxido. La reactividad del radical superóxido contra la proteína D1 es amortiguada por los pigmentos carotenoides (Krieger-Liszkay, 2005). Cabe destacar que es también TR9 el alga que presentó mayor inducción en la síntesis de la chaperona HSP70 (**Figura 3.10**). Esta proteína reparadora participa en el plegamiento y en el mantenimiento de la correcta conformación y funcionalidad de otras proteínas. Además, existen diversas evidencias experimentales que demuestran que bajo diferentes tipos de estrés se produce inducción de proteínas HSP70 (Li *et al.*, 1999; Sung *et al.*, 2001; Duan *et al.*, 2011). Un estudio reciente realizado en tomate (*Lycopersicon esculentum*), revela que la proteína Dnaj de diana cloroplástica (LeCDJ1) actúa como una co-chaperona asociada a HSP70 y tiene un marcado efecto protector sobre la conformación de la proteína D1 en condiciones de estrés (Kong *et*

al., 2014). Este descubrimiento indica que posiblemente la capacidad de TR9 para producir más HSP70 que TR1, proporcione una mayor capacidad de dicha alga para preservar los niveles de proteína D1 y por lo tanto para mantener un mejor funcionamiento del fotosistema II en condiciones de estrés oxidativo agudo.

La interpretación de los resultados aquí presentados es coherente con otros análisis complementarios sobre parámetros de fluorescencia modulada de clorofila *a* (realizados por otros miembros de nuestro grupo de investigación) que aparecen en la **Figura 3.11**. En general, podemos observar como la actividad fotosintética de ambas algas se ve negativamente afectada por efecto del estrés oxidativo agudo, tal y como indican los descensos en la eficiencia fotosintética máxima del PSII (F_v/F_m), en la disipación fotoquímica (qP), en la eficiencia cuántica del PSII (Φ_{PSII}) y en la disipación no fotoquímica de la energía (NPQ). Sin embargo, podemos observar como esta caída es significativamente más intensa en TR1, siendo TR9 el ficobionte que presenta un mejor comportamiento fotosintético en todos los tratamientos de estrés oxidativo.

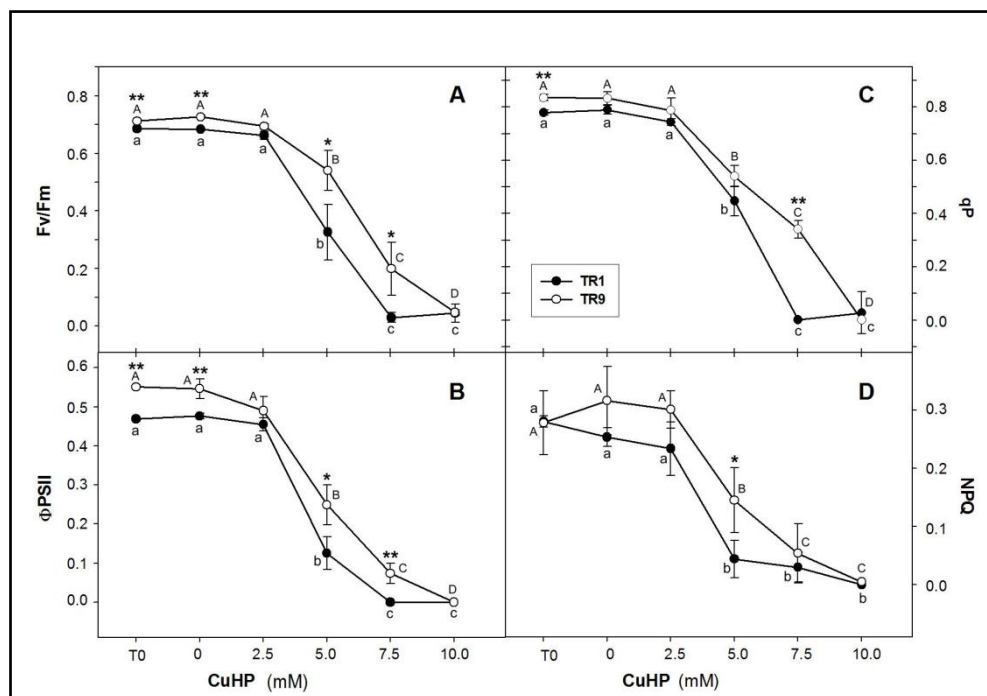


Figura 3.11. Efecto del estrés oxidativo sobre el comportamiento fotosintético de *Trebouxia* sp. TR1 y TR9. Los resultados representados muestran las medias de cinco experimentos independientes así como los desvíos estándar asociados (SD) menores del 5 % en todos los casos. Los datos fueron analizados estadísticamente por un ANOVA factorial, en el que la especie de ficobionte y el tiempo de incubación junto a la concentración de CuHP fueron considerados factores. Las diferencias entre medias fueron evaluadas mediante la prueba t-Student. Las diferentes letras minúsculas o mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos de CuHP para TR1 y TR9, respectivamente; y los asteriscos indican diferencias significativas entre TR1 y TR9 para cada tratamiento de CuHP (* $P < 0,05$ o ** $P < 0,01$).

Con el propósito de identificar las principales diferencias metabólicas que expliquen la distinta tolerancia al estrés oxidativo agudo de ambos ficobiontes, estudiamos la actividad de dos de las principales enzimas antioxidantes: SOD y GR. Estos estudios fueron realizados mediante ensayos espectrofotométricos y también a través de zimogramas que nos permiten valorar cuál es la contribución a la actividad global de la enzima de cada una de las posibles isoformas de la misma. Mediante este abordaje se puso de manifiesto la diferente capacidad de TR1 y TR9 para modular la actividad de dichas enzimas antioxidantes en respuesta al estrés oxidativo generado por CuHP (**Figuras 3.5-3.7**).

Las ventajas de estudiar estas actividades enzimáticas mediante dos abordajes diferentes son claras cuando se analizan los resultados obtenidos para SOD. Si consideramos únicamente los datos espectrofotométricos, estos parecen indicar que SOD no jugaría un papel relevante en la diferente respuesta frente al estrés oxidativo producido por CuHP entre ambas especies de ficobiontes. Sin embargo, los zimogramas obtenidos nos permiten conocer que ambos ficobiontes se caracterizan por presentar patrones de bandas muy diferentes, especialmente en lo referente a isoformas del tipo Mn-SOD. Además, mediante este abordaje fue posible observar como en cada alga la actividad SOD total se correspondía aproximadamente a la suma de la actividad de las diferentes isoformas de Mn-SOD y de Fe-SOD; así como comprobar que existen variaciones, a veces sutiles (en TR1) otras veces más notables (en TR9), en la actividad de isoformas distintas en respuesta a incrementos en la

formación de ROS inducido por CuHP. En este sentido, queda por analizar un aspecto importante de las Fe- y Mn-SOD, que es la localización a nivel intracelular de cada isoenzima, en ambas algas. En plantas vasculares, las ubicaciones más habituales descritas para las Fe-SOD son el citoplasma y el cloroplasto (Kliebenstein *et al.* 1998, Fink & Scandalios 2002), mientras que las Mn-SOD se encuentran casi siempre en mitocondrias y a su vez representan una fracción minoritaria de la actividad SOD total (Kitayama *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 2001). Asimismo, la mayor parte de la actividad SOD celular en plantas vasculares es llevada a cabo por un tercer tipo de isoformas, las Cu-Zn-SOD. Cabe señalar que tanto *Trebouxia* sp. TR1 como TR9 carecen de este tipo isoenzimático (**Figura 3.8**). En contrapartida, en ambas microalgas se observa un predominio cuali y cuantitativo de las Mn SOD. Si consideramos además que la mayor parte de la biomasa celular está ocupada por un gran cloroplasto en las dos especies estudiadas, la distribución subcelular de ambos tipos de SOD podría ser bastante diferente en microalgas unicelulares respecto de las plantas vasculares. Concretamente, sería entonces posible que el cloroplasto de estas algas contuviese, junto con Fe-SOD, una o varias isoenzimas de Mn-SOD.

Respecto a la segunda enzima antioxidante estudiada, cabe señalar que tanto la actividad como la cantidad de proteína GR iniciales fueron mayores en TR1 respecto de TR9 (**Figuras 3.6 y 3.9**). En ambas especies de algas, esta actividad enzimática antioxidante es llevada a cabo por una única isoforma, distinguible en ND-PAGE monodimensional. TR1 y TR9 modularon su actividad GR bajo condiciones de estrés oxidativo agudo de manera totalmente contrastante. En TR1, los tratamientos con el agente oxidante CuHP disminuyeron significativamente los niveles de proteína y de actividad GR. Por el contrario, TR9 fue capaz de inducir su actividad GR bajo las mismas condiciones de estrés.

Tal y como se describe en la Introducción de esta Tesis, *Ramalina farinacea* tiene un patrón de asociación simbiótica altamente específico y selectivo, en el cuál un

único micobionte se asocia con los dos mismos ficobiontes del género *Trebouxia* (TR1 y TR9), en todas las poblaciones estudiadas de diferentes áreas geográficas (Casano *et al.*, 2011; del Campo *et al.*, 2013). Si examinamos los datos obtenidos durante las primeras caracterizaciones fisiológicas de TR1 y TR9 (Casano *et al.*, 2011), los resultados de crecimiento y fotosíntesis sugieren que bajo condiciones de irradiancia y temperaturas relativamente elevadas, TR9 presenta una mayor tasa de crecimiento y un mejor comportamiento fisiológico que TR1. Por otro lado, estos resultados apuntan a que TR1 tendría preferencia de ambientes más templados y sombreados para un óptimo crecimiento y proliferación.

Los resultados del presente estudio, demuestran que el ficobionte con mayor capacidad para preservar, en condiciones de estrés oxidativo agudo, los componentes clave de su aparato fotosintético es TR9. Esta mayor tolerancia al estrés agudo podría ser consecuencia de una mayor capacidad de TR9 para acometer ajustes metabólicos clave (preservando sus mecanismos de disipación de energía luminosa absorbida), así como para inducir sus sistemas de protección antioxidante y de reparación celular.

3.2. Mecanismos de defensa frente al estrés producido por plomo en los ficobiontes aislados de *Ramalina farinacea*

De acuerdo con los resultados mostrados en el apartado anterior de Resultados y Discusión (apartado 3.1.), los ficobiontes de *Ramalina farinacea* (*Trebouxia* sp. TR1 y TR9) presentan respuestas fisiológicas diferentes frente al estrés oxidativo agudo. Asimismo, *Ramalina farinacea* se considera un líquen moderadamente tolerante al Pb (Branquinho *et al.*, 1997; Fadila *et al.*, 2009), un metal pesado cuyos efectos tóxicos dependen en gran medida de su capacidad para promover la generación intracelular de ROS (Verma & Dubey, 2003; Liu *et al.*, 2008; Slomka *et al.*, 2008; Phang *et al.*, 2011). Por ello, nos propusimos estudiar si los dos ficobiontes también presentan respuestas fisiológicas diferentes frente a los efectos oxidantes y citotóxicos generados por la exposición continuada a este metal pesado.

Para estudiar la respuesta fisiológica de TR1 y TR9 frente a Pb, se partió de cultivos líquidos de ambos ficobiontes aislados tratados con diferentes concentraciones de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ durante una semana. Posteriormente, se determinó la acumulación de Pb a nivel extra e intracelular y se analizaron los efectos del metal sobre los niveles de pigmentos fotosintéticos. Además, se estudió la respuesta de detoxificación frente a estrés por Pb determinando la actividad de varias enzimas antioxidantes como SOD, GR, APx y CAT, así como el nivel de proteína HSP70, relacionada con procesos de estrés celular.

3.2.1. Resultados

3.2.1.1. Especiación de plomo en medio de cultivo

Dado que los tratamientos consistieron en la adición de 50 y 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ al medio de cultivo (Bold-3N) de los ficobiontes, en primer lugar, se realizó un estudio de especiación química del Pb empleando el programa MINTEQ ver.3.0 (ver apartado 2.2.16.1.) para estimar cuál sería la distribución de las diferentes especies químicas de Pb disueltas en dicho medio.

Los resultados obtenidos (**Tabla 3.1**) muestran que teóricamente todas las especies químicas formadas a partir de Pb en ambos tratamientos fueron compuestos solubles en agua, y que la suma de Pb libre y acomplejado con EDTA supusieron más del 60% del total. Más aún, estudios realizados en plantas vasculares demuestran que el EDTA mantiene la solubilidad del Pb incrementando su disponibilidad, por lo que se facilita la adsorción y translocación del metal hacia los tejidos vegetales cuando este se encuentra en forma de complejos Pb-EDTA (Epstein *et al.*, 1999).

Tabla 3.1. Especies químicas de Pb presentes en medio Bold 3-N suplementado con 50 y 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

Tratamiento $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	Concentración Pb^{2+} libre (M)	Actividad Pb^{2+} libre (M)	Formas solubles (%)	Complejo con EDTA (M)	Complejo con OH^- (M)	Complejo con PO_4 (M)	Complejo con SO_4 (M)
50 μM	$3,15 \times 10^{-5}$	$2,13 \times 10^{-5}$	100%	$1,11 \times 10^{-5}$	$1,88 \times 10^{-7}$	$1,81 \times 10^{-6}$	$2,21 \times 10^{-6}$
100 μM	$7,10 \times 10^{-5}$	$4,79 \times 10^{-5}$	100%	$1,22 \times 10^{-5}$	$4,23 \times 10^{-7}$	$4,01 \times 10^{-6}$	$4,94 \times 10^{-6}$

Las distribuciones cualitativas y cuantitativas de las especies de Pb, incluyendo los criterios de solubilidad, fueron estimadas empleando el programa Visual MINTEQ (ver.3.0.), que se basa en el modelo de equilibrio químico para el cálculo de la especiación de metales.

3.2.1.2. Acumulación y distribución subcelular de plomo

3.2.1.2.1. Contenido intracelular de plomo

Tras siete días de tratamiento de los ficobiontes con 50 y 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, el metal unido a las paredes (Pb extracelular) fue eluido mediante lavados con 20 mM EDTA (pH 4,5). Sobre estas células lavadas se determinó la acumulación de Pb intracelular mediante ICP-MS en la Unidad de Análisis Elemental de la Universidad Autónoma de Madrid (Ver apartado 2.2.16.2. de Materiales y Métodos).

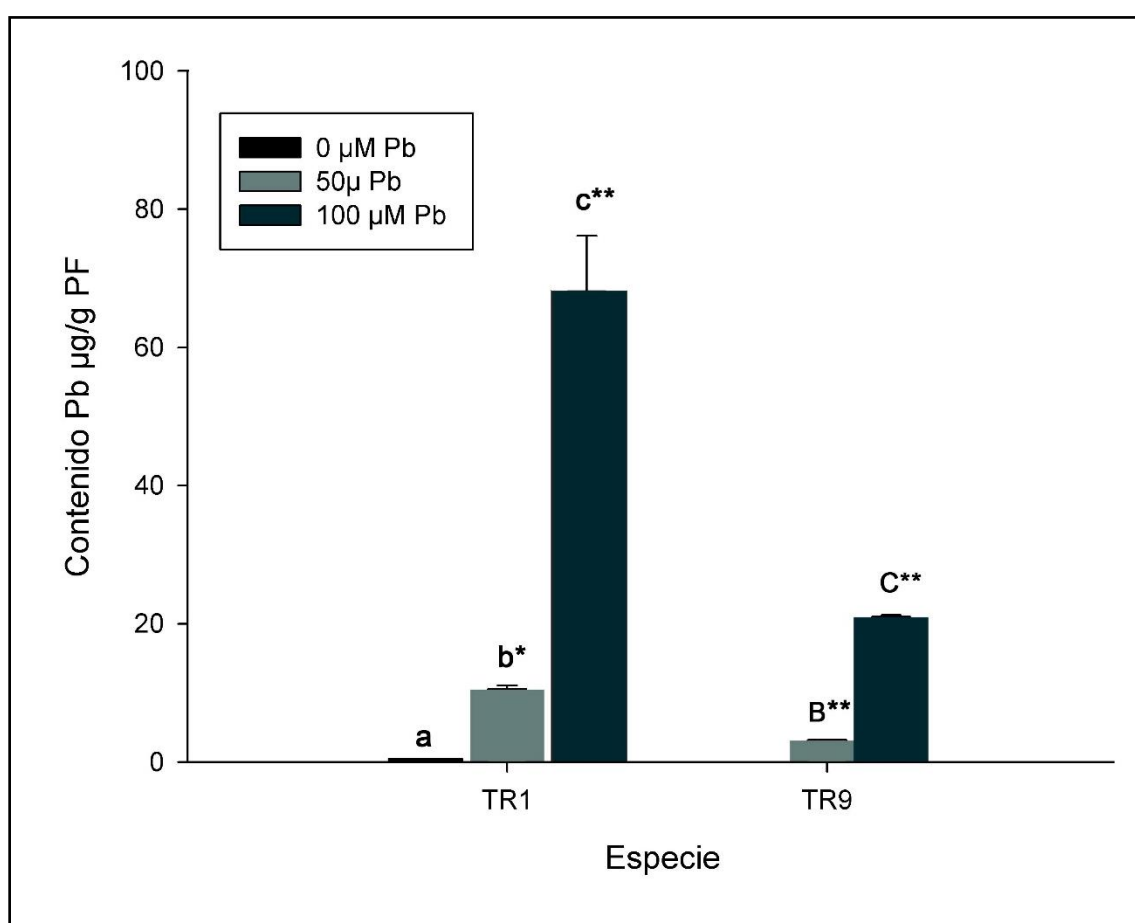


Figura 3.12. Contenido intracelular de Pb en *Trebouxia* sp. TR1 y TR9, tratadas con 50 y 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Los resultados representados muestran las medias de tres experimentos independientes, así como los desvíos estándar asociados. Las diferentes letras minúsculas o mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ para TR1 y TR9, respectivamente, al realizarse un ANOVA factorial (considerando como factores la especie de *Trebouxia* y la concentración de Pb) y la prueba t-Student. Los asteriscos indican diferencias significativas entre TR1 y TR9 para cada tratamiento de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (** $P < 0,01$).

Tal como cabía esperar, la captación de Pb en las dos especies de *Trebouxia*, TR1 y TR9, se incrementó con el aumento de la cantidad de Pb suministrada al medio (**Figura 3.12**). Sin embargo, las concentraciones del metal en las células de TR1 fueron prácticamente tres veces mayores que las de TR9 para el mismo tratamiento de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

3.2.1.2.2. Distribución subcelular de plomo

Puesto que la acumulación intracelular de Pb fue tan diferente en ambos ficobiontes, y teniendo en cuenta que en tejidos vegetales la compartimentalización y formación de complejos de metales pesados a nivel subcelular son fundamentales para su detoxificación, se determinó la distribución intra y extracelular de Pb en los dos ficobiontes en busca de nuevas diferencias. Para ello, se utilizó TEM-EDX sobre células de TR1 y TR9 tratadas con $100 \mu\text{M}$ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Es importante destacar que estas células recibieron lavados menos exhaustivos (Ver apartado 2.2.16.3. de Materiales y Métodos) que los realizados sobre las muestras empleadas para las determinaciones cuantitativas de Pb intracelular, con el fin de no eliminar el Pb retenido en la pared celular de los ficobiontes.

Los datos semicuantitativos proporcionados por los microanálisis de TEM-EDX confirmaron los resultados obtenidos previamente en las determinaciones cuantitativas de contenido intracelular de Pb (**Tabla 3.2**). Al comparar la suma del Pb acumulado en los diferentes compartimentos intracelulares (citosol-cloroplasto + vesículas) comprobamos que esta cantidad fue significativamente mayor en TR1 que en TR9. Por otro lado, estos resultados también indican que la proporción de Pb retenido en pared celular fue significativamente mayor en TR9 en comparación con la de TR1.

Tabla 3.2. Distribución subcelular de plomo en los ficobiontes *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 tratados con 100 μ M $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

	TR1			TR9		
	Media (%)	SD	n	Media (%)	SD	n
Citosol-cloroplasto	8,61***	3,44	30	4,95	3,15	30
Vesículas	11,11***	4,07	30	3,90	3,35	30
Pared celular	0,50***	0,75	30	12,20	3,60	30

La distribución de plomo se expresa como un porcentaje de los niveles de Osmio (elemento de referencia). Los asteriscos (***) indican que existen diferencias estadísticamente muy significativas ($P < 0,0001$). Las células control [tratadas con 0 μ M $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$], no mostraron ninguna señal de Pb detectable.

Estos resultados fueron corroborados por las imágenes obtenidas mediante el TEM-EDXS. En la **Figura 3.13** pueden apreciarse los diferentes patrones de depósitos electro-densos de plomo formados en las paredes celulares, citoplasma y vesículas de los ficobiontes TR1 y TR9.

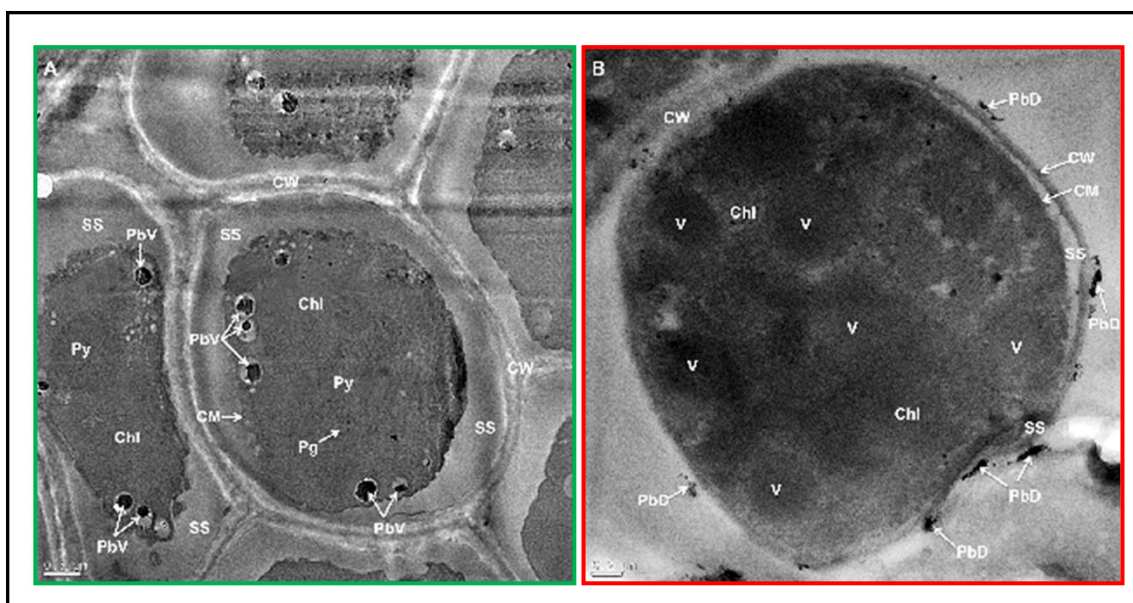


Figura 3.13. Fotografía obtenida mediante TEM-acoplado a EDXS que muestra la acumulación de Pb a nivel de ultraestructura celular en *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 tratadas con 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. La imagen de TR1 aparece remarcada en verde y la de TR9 en rojo. Abreviaturas: Chl, cloroplasto; CM, membrana celular, CW, pared celular; PbD, depósitos de plomo; PbV, vesículas con depósitos de plomo; Pg, pirenoglóbulos; Py, pirenoide; SS, espacio de secreción; V, vesículas. Barras: (A) 0,5 μm y (B) 0,2 μm .

En TR9 los depósitos de Pb se acumularon principalmente en la pared celular, por lo que se redujo la captación de plomo al interior de la célula. Al contrario ocurrió en TR1, donde no se apreciaron grandes acumulaciones de Pb en la pared celular, pero sí a nivel intracelular donde se formaron depósitos de plomo de tamaño considerable encerrados en pequeñas vesículas. En TR9 sin embargo, no aparecieron estos depósitos intracelulares de Pb dentro de vesículas electro-densas.

3.2.1.3. Efectos del plomo sobre los niveles de pigmentos y proteínas fotosintéticos

Una vez conocidos los patrones de acumulación de plomo de ambos ficobiontes, se analizó el posible impacto de la incorporación intracelular de plomo sobre el comportamiento fisiológico de TR1 y TR9. Para ello se valoró el efecto del estrés producido por plomo sobre componentes clave del aparato fotosintético, estudiando cambios en la concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides) y proteínas fotosintéticas en células de TR1 y TR9 tratadas durante una semana con 0, 50, y 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

Los resultados de la **Figura 3.14** indican que en general los niveles de pigmentos fotosintéticos de los ficobiontes TR1 y TR9 se mantienen en unos valores relativamente estables a pesar de la incorporación de Pb intracelular. En presencia de Pb los niveles de clorofila *b* no experimentaron cambios significativos en ninguno de los dos ficobiontes. Sin embargo, en TR1 se produjo una disminución de los niveles de clorofila *a* y de carotenoides, mientras que en TR9 únicamente el nivel de pigmentos carotenoides experimentó una reducción significativa.

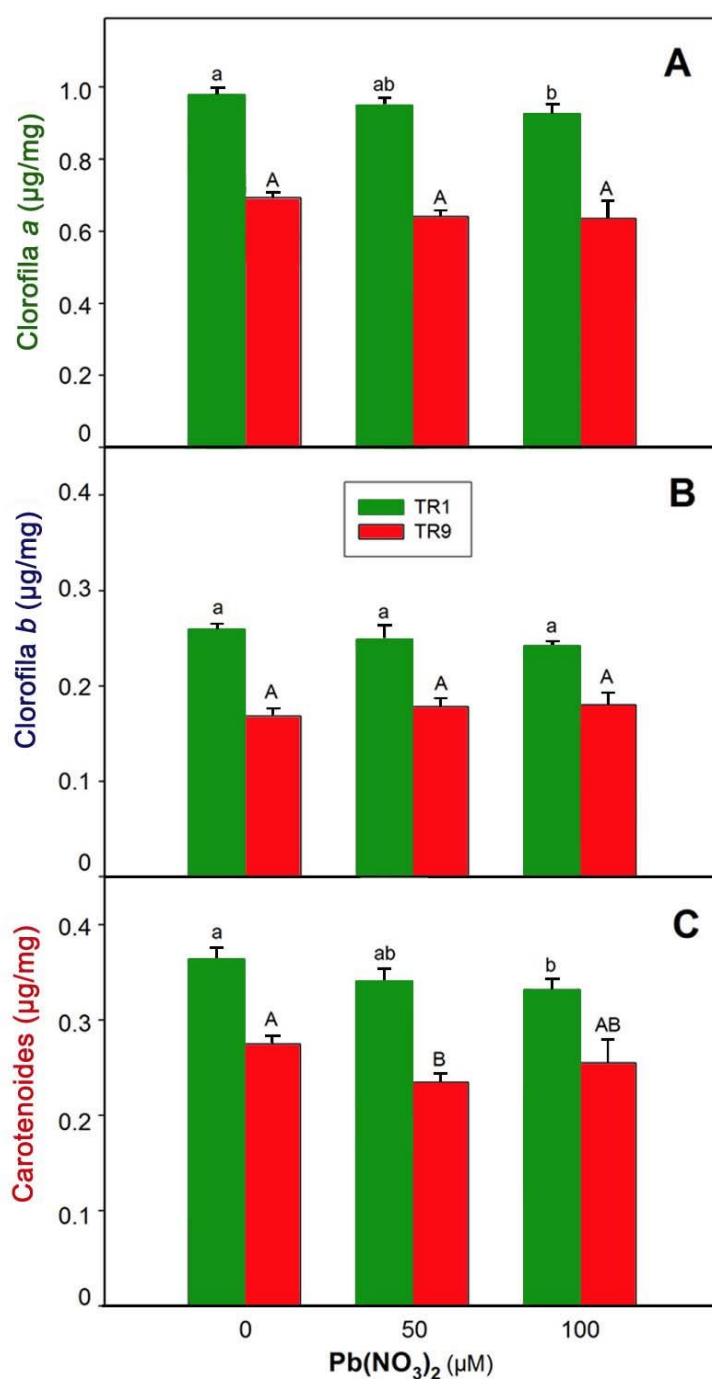


Figura 3.14. Niveles de clorofila a, clorofila b y carotenoides en los ficobiontes *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 tratados con 50 y 100 μM $Pb(NO_3)_2$. Cultivos líquidos de TR1 y TR9 aislados fueron incubados con 0, 50 y 100 μM $Pb(NO_3)_2$ durante una semana. Los valores representados muestran el valor medio de nueve experimentos independientes así como los desvíos estándar asociados. Los datos fueron analizados estadísticamente por un ANOVA factorial, en el que la especie de *Trebouxia* y la concentración de $Pb(NO_3)_2$ fueron considerados factores. Las diferencias entre medias fueron evaluadas mediante la prueba t-Student. Las diferentes letras minúsculas o mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre 0, 50 y 100 μM $Pb(NO_3)_2$ para TR1 y TR9, respectivamente.

Cabe destacar que aunque estos descensos en los niveles de pigmentos son estadísticamente significativos ($p < 0,05$), no suponen en ningún caso una caída de más del 10% respecto de los niveles control (**Tabla 3.3**).

Tabla 3.3. Concentración inicial de pigmentos fotosintéticos en células control (cultivo líquido durante una semana a 15°C) de *Trebouxia* sp. TR1 y TR9.

	Clorofila a ($\mu\text{g/g PF}$)	Clorofila b ($\mu\text{g/g PF}$)	Carotenoides ($\mu\text{g/g PF}$)
TR1	0,995 ($\pm 0,086$)**	0,248 ($\pm 0,019$)*	0,372 ($\pm 0,031$)**
TR9	0,715 ($\pm 0,081$)	0,181 ($\pm 0,013$)	0,286 ($\pm 0,023$)

Los resultados corresponden al valor medio de nueve experimentos independientes así como los desvíos estándar asociados (\pm S.D). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA unifactorial, considerando como único factor la especie de *Trebouxia*. Las diferencias entre medias fueron evaluadas mediante la prueba t-Student y los asteriscos indican que existen diferencias significativas entre TR1 y TR9 (* $P < 0,05$ o ** $P < 0,01$).

El efecto del plomo sobre los niveles de proteínas fotosintéticas en TR1 y TR9 fue analizado mediante Western-blot, estudiando cambios en las proteínas que forman parte de los centros de reacción del fotosistema I (PsaC) y del fotosistema II (proteína D1). Los niveles de PsaC no presentaron variaciones significativas por efecto del plomo en ninguno de los ficobiontes (datos no mostrados). El nivel estacionario de proteína D1 disminuyó significativamente en TR1 como consecuencia de la exposición a la máxima concentración de Pb, mientras que en TR9 no se observaron variaciones aparentes en esta proteína (**Figura 3.15**).

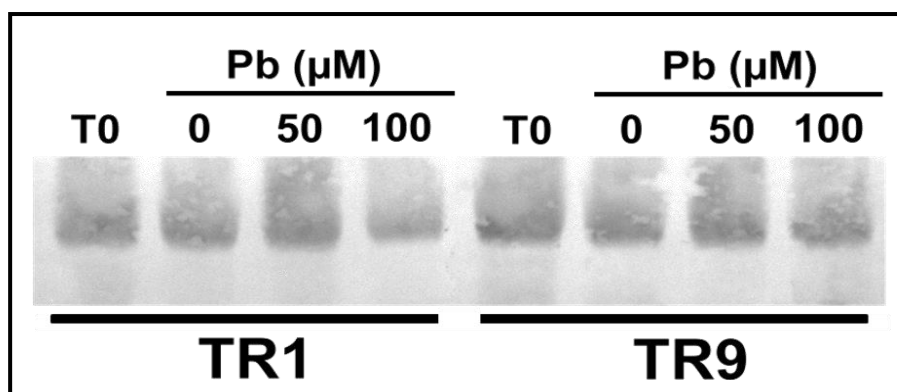


Figura 3.15. Cambios en la proteína fotosintética D1 en los ficobiontes *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 expuestos a 50 y 100 μM Pb(NO₃)₂. TR1 y TR9 aislados fueron incubados con 0, 50 y 100 μM Pb(NO₃)₂ durante una semana. La detección inmunológica de la proteína D1 fue realizada por Western-blot en la fracción insoluble de extractos de proteínas.

En general, la exposición prolongada a Pb no tuvo un efecto deletéreo notable ni sobre los principales pigmentos ni sobre las proteínas fotosintéticas en ambos ficobiontes aislados.

3.2.1.4. Estudio comparativo de la modulación de enzimas antioxidantes ante exposiciones prolongadas con plomo

Con el objetivo de profundizar en el comportamiento frente a plomo de los ficobiontes TR1 y TR9, estudiamos sus respuestas defensivas a nivel de la actividad de varias enzimas antioxidantes. Para ello se analizó el efecto producido por diferentes concentraciones de plomo sobre GR, SOD, APx y CAT en los ficobiontes TR1 y TR9 mediante ensayos espectrofotométricos, complementados con zimogramas para el caso de las actividades GR y SOD.

En base a los resultados obtenidos de la acumulación de Pb, era esperable observar una inducción de todas o al menos alguna de las mencionadas enzimas antioxidantes como respuesta al incremento de ROS que produciría presumiblemente la acumulación de Pb a nivel intracelular. Además, se suponía que esta inducción de los sistemas de defensa antioxidantes sería significativamente mayor en TR1, pues se trató del ficobionte con mayor tasa de acumulación intracelular de Pb.

Los resultados de la **Tabla 3.4** indican que, en general, los valores de actividad inicial de las enzimas antioxidantes estudiadas fueron mayores en los cultivos control de TR1 que en los de TR9. En el caso de CAT no existieron diferencias significativas entre en el nivel de actividad inicial de los dos ficobiontes. Sin embargo, hubo una gran diferencia entre los niveles basales de GR, siendo en TR1 un 160% superior que en TR9. Los niveles de actividades APX y SOD también fueron significativamente superiores en TR1 (un 12 y un 20% superior, respectivamente), sin embargo las diferencias entre ambas algas no fueron tan acusadas como en el caso de actividad GR.

Tabla 3.4. Valores de actividad inicial de las diferentes enzimas antioxidantes en células control (cultivo líquido durante una semana a 15°C) de *Trebouxia* sp. TR1 y TR9.

	GR (nmol NADPH min ⁻¹ mg ⁻¹)	SOD (U mg ⁻¹)	APX (μmol ascorbato min ⁻¹ mg ⁻¹)	CAT (μmol H ₂ O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹)
TR1	52 (± 4,15)**	35,06 (± 3,12)*	0,235 (± 0,0061)*	6,39 (± 0,233)
TR9	20 (± 2,09)	29, 22(5,06)	0,209 (± 0,0041)	7,056 (± 0,408)

Los resultados se refieren al valor medio obtenido de cinco experimentos independientes y sus desvíos estándar asociados (S.D). Los datos fueron analizados estadísticamente por un ANOVA unifactorial, considerando como único factor la especie de *Trebouxia*. Las diferencias entre medias fueron evaluadas mediante la prueba t-Student y los asteriscos indican que existen diferencias significativas entre TR1 y TR9 (*P<0,05 o **P<0,01).

Los resultados de la **Figura 3.16** sobre los niveles de actividad de enzimas antioxidantes en presencia de Pb, muestran claramente un escenario opuesto al esperado, siendo TR9 el alga que presentó la mayor inducción de las actividades GR, SOD y APX (**Figuras 3.16 A, B y D**). La actividad CAT no experimentó cambios por efecto del estrés por Pb en ninguna de las dos especies de *Trebouxia* estudiadas (**Figura 3.16 D**). En TR1 tampoco se observó ninguna inducción significativa para el

resto de las enzimas antioxidantes, incluso fue posible detectar una disminución en la actividad de APX del 20% y 30% para tratamientos de 50 y 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, respectivamente (**Figura 3.16 C**).

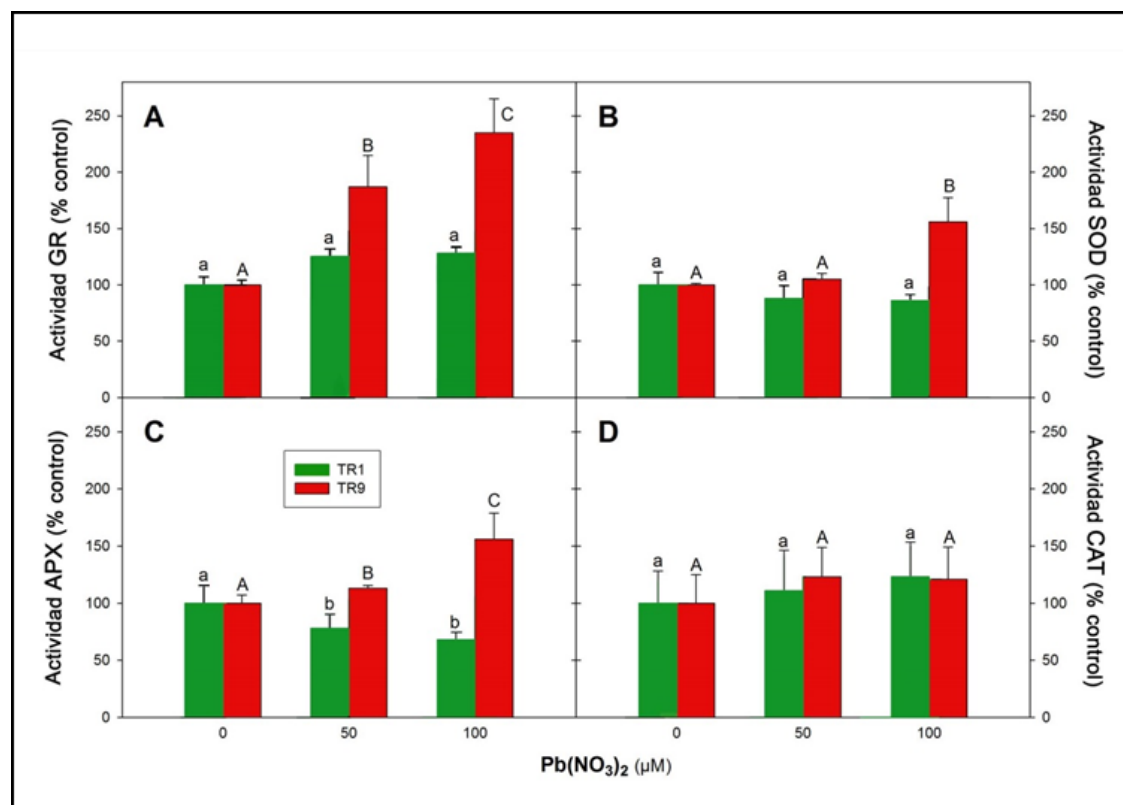


Figura 3.16. Efecto del Pb sobre los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes GR, SOD, APX y CAT en los ficobiontes *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 tratados con 50 y 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. TR1 y TR9 en cultivo líquido fueron tratadas con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (0, 50 y 100 μM) durante una semana. La actividad total de GR, SOD, APX y CAT fue medida en extractos de proteínas solubles mediante ensayos espectrofotométricos. Los valores representados muestran el valor medio de 5 experimentos independientes así como los desvíos estándar asociados. Los datos fueron analizados estadísticamente por un ANOVA factorial, en el que la especie de *Trebouxia* y el tratamiento de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (tiempo de incubación y concentración del metal) fueron considerados factores. Las diferencias entre medias fueron evaluadas mediante la prueba t-Student. Las diferentes letras minúsculas o mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre cada tratamiento para TR1 y TR9; respectivamente.

Además, si comparamos los anteriores resultados de actividad GR realizados a través de ensayos espectrofotométricos (**Figura 3.16 A**) con resultados equivalentes obtenidos mediante zimograma (**Figura 3.17**); corroboramos que mientras que en TR1 no se produjeron cambios en los niveles de actividad GR, en TR9 se produjo una inducción drástica de la actividad de esta enzima por efecto del Pb. Resulta

interesante comprobar que para los tratamientos de 100 μM , la actividad GR en las células de TR9 se indujo de modo tal que llegó a alcanzar los niveles de actividad de TR1 (48 y 51 $\text{nmol NADPH min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, respectivamente).

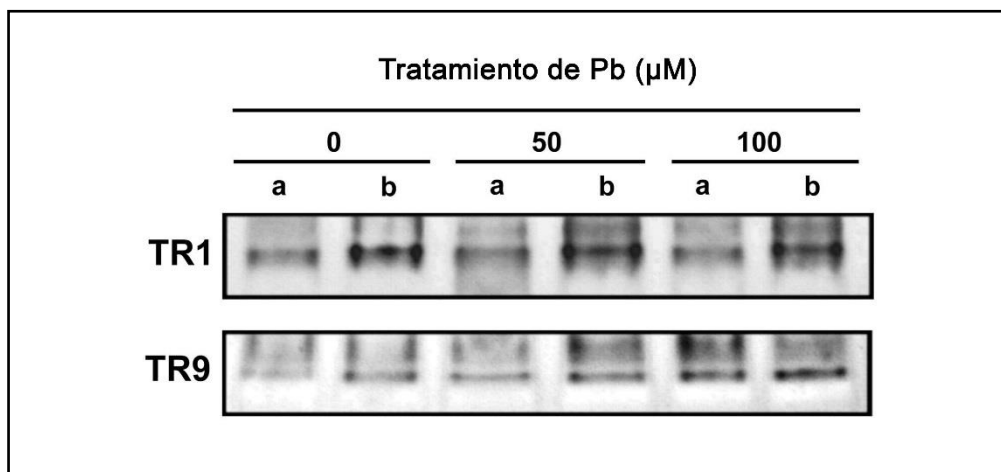


Figura 3.17. Zimogramas de actividad GR en *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 tratadas con Pb. TR1 y TR9 fueron tratadas con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (0, 50 y 100 μM) durante una semana. Los zimogramas muestran la existencia de una sola banda tras la separación de las isoenzimas putativas por electroforesis en ND-PAGE (a y b indican que se cargaron 10 y 20 μg de proteínas por carril, respectivamente) y la posterior tinción específica de actividad GR (Lascano *et al.*, 2001).

Los resultados de las medidas espectrofotométricas de actividad SOD ilustran que mientras que en TR1 no se produjeron cambios significativos en la actividad de esta enzima por efecto del plomo, en TR9 se produce un aumento de más del 55% en las células tratadas con 100 μM Pb (**Figura 3.16 B**).

En la **Figura 3.18** pueden observarse los diferentes patrones isoenzimáticos de SOD, obteniéndose al menos seis bandas discretas para TR1 y siete para TR9. Estas bandas se encuentran distribuidas en tres grupos principales que corresponden a tasas de migración bajas, intermedias y altas, en concordancia con los patrones isoenzimáticos observados anteriormente (**Figuras 3.7 y 3.8**). En algunos casos, la posible ausencia de efecto de un tratamiento en la actividad SOD total medida espectrofotométricamente sobre extractos crudos, puede deberse a la redistribución de la actividad enzimática entre las diferentes isoformas, de forma tal que el

incremento de la actividad de unas puede verse compensado por el descenso de actividad de otras. Este no es el caso en el efecto del plomo sobre la actividad SOD de TR1, donde la actividad de las diferentes isoformas de SOD es muy similar en células tratadas con plomo y en el control. En TR9 se produjo el caso contrario, registrándose en células tratadas con plomo un incremento de la actividad SOD total que correspondía, prácticamente en exclusiva, al aumento de la actividad de las bandas intermedias (sin ninguna pérdida de actividad en el resto de bandas) (**Figura 3.18**).

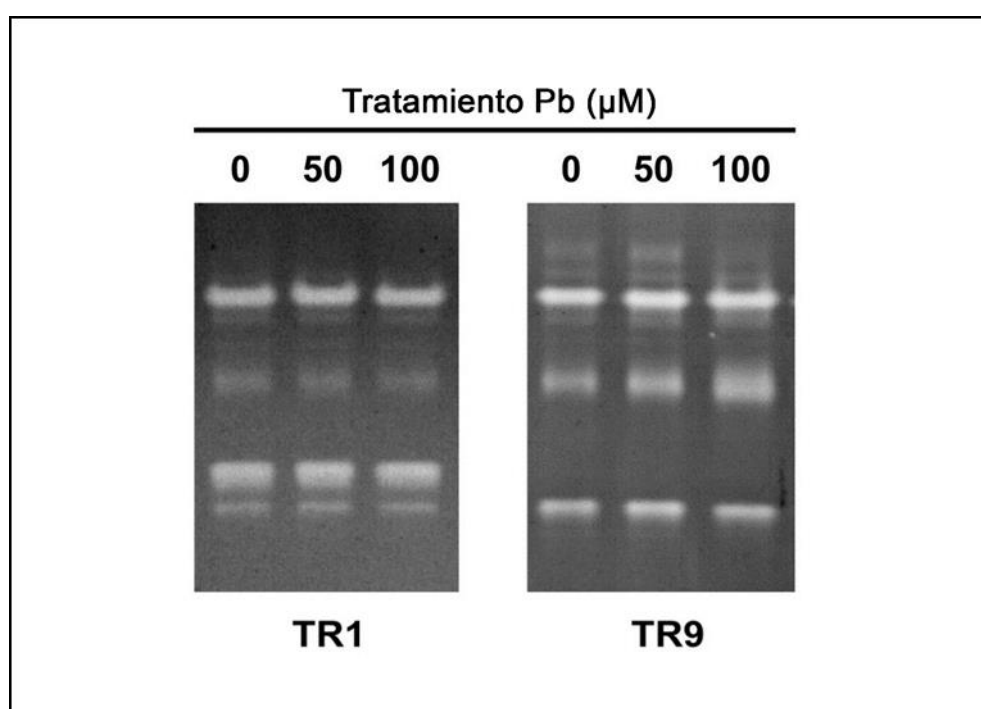


Figura 3.18. Zimograma de actividad SOD en *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 tratadas con Pb. TR1 y TR9 fueron tratadas con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (0, 50 y 100 μM) durante una semana. Los zimogramas muestran los patrones de isoenzimas de SOD presentes en cada especie de *Trebouxia* tras la separación de las proteínas solubles (10 μg por carril) mediante electroforesis en ND-PAGE y el posterior revelado específico de actividad SOD (Lascano et al., 2001).

3.2.1.5. Sistema de reparación celular. Inmunodetección de la chaperona (HSP70)

Para estimar los efectos del plomo sobre otro tipo de proteínas relacionadas con el estrés e involucradas en mecanismos de reparación de componentes celulares dañados, estudiamos cambios en la cantidad de proteína de choque térmico HSP70 en células de TR1 y TR9 tratadas con el metal tóxico. La **Figura 3.19** muestra los resultados del análisis de la cantidad de proteína HSP70 por Western-blot, observándose nuevamente diferencias tanto en los niveles iniciales de dicha proteína, como en la regulación de sus niveles ante la exposición con Pb. En TR1 se produjo una leve disminución de los niveles de HSP70 para las células expuestas a concentraciones de 100 μM plomo, mientras que en TR9 para una idéntica concentración de metal aumentaron los niveles de esta chaperona.

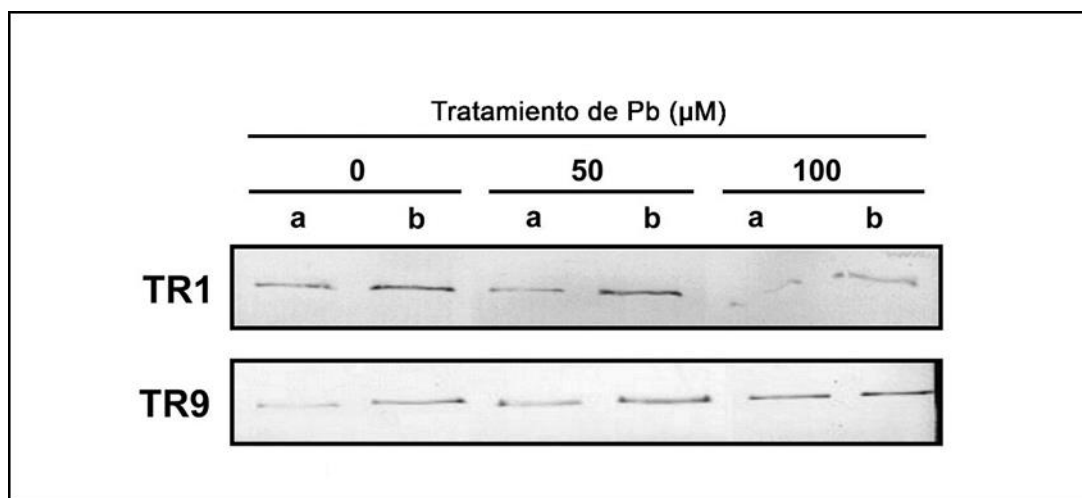


Figura 3.19. Inmunodetección de HSP70 por Western-blot en *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 tratadas con Pb. TR1 y TR9 fueron tratadas con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (0, 50 y 100 μM) durante una semana. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE, cargándose en cada carril 10 y 20 μg de proteínas solubles, a y b, respectivamente. Posteriormente, se realizó la inmunodetección de la proteína HSP70 con anticuerpos policlonales Anti-HSP70 que se encuentran disponibles comercialmente (SIGMA-Aldrich Co, USA).

3.2.2. Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio indican claramente que la habilidad del líquen *Ramalina farinacea* para comportarse como moderadamente tolerante a ambientes contaminados en general, y a la exposición a plomo en particular, puede ser explicada, al menos en parte, por la tolerancia a la presencia del metal pesado de sus dos ficobiontes. Sin embargo, cada especie de *Trebouxia* pareció haber desarrollado una estrategia específica, en la que la integración de diferentes características ultra-estructurales, bioquímicas y fisiológicas dieron lugar a la adquisición de niveles similares de tolerancia a plomo. La evidencia experimental que apoya esta conclusión ha sido la ausencia de síntomas deletéreos a nivel de una de las principales dianas de toxicidad por plomo, el cloroplasto. Los ficobiontes TR1 y TR9 fueron capaces de prevenir los efectos deletéreos causados por el estrés por Pb, tal como indican las ligeras alteraciones (en comparación con el efecto del CuHP, ver apartado 3.1.1.1.) que el metal produjo sobre componentes cloroplásticos clave como clorofilas, carotenoides y proteína D1 (**Figuras 3.14 y 3.15**).

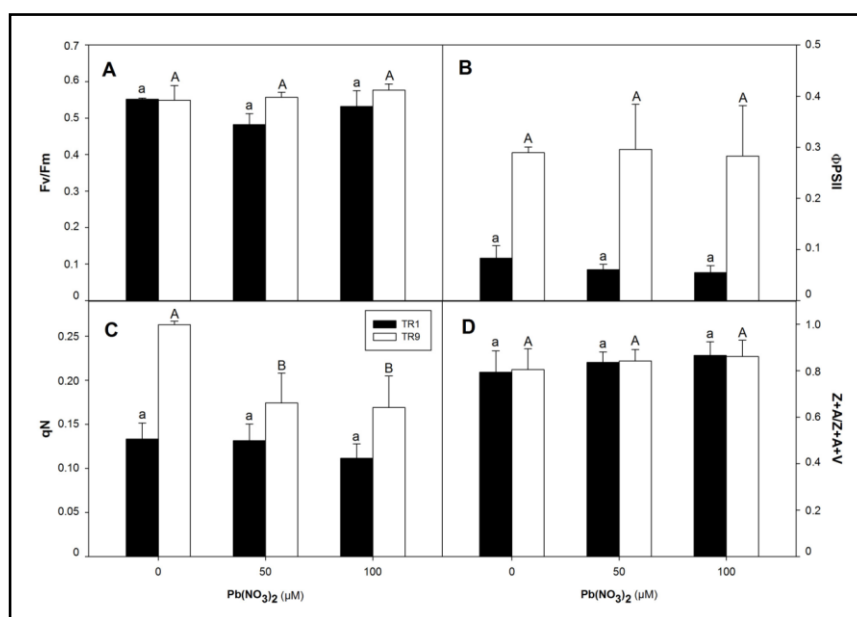


Figura 3.20. Efecto del Pb sobre el comportamiento fotosintético y el estado de de-epoxidación del ciclo de xantofilas en *Trebouxia* sp. TR1 y TR9. Los resultados representados muestran las medias de tres experimentos independientes así como los desvíos estándar asociados (S.D.). Los datos fueron analizados estadísticamente por un ANOVA unifactorial y la prueba t-Student. Las diferentes letras minúsculas o mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos de CuHP para TR1 y TR9, respectivamente.

Los resultados (obtenidos por miembros de nuestro grupo de investigación) sobre el efecto de la acumulación intracelular de Pb en el comportamiento fotosintético de TR1 y TR9 (**Figura 3.20**), corroboran esta afirmación. En general, podemos ver como los tratamientos con plomo no produjeron cambios significativos sobre la actividad fotosintética de ninguno de los dos ficobiontes.

Sanità di Toppi *et al.* (2008) analizaron las respuestas fisiológicas del ficobionte aislado *Trebouxia impressa*, durante exposiciones relativamente prolongadas a Cd (hasta un máximo de 48h). Los autores distinguieron diferentes tipos de mecanismos de detoxificación: de “primera” y de “segunda línea”, que se sucedían temporalmente. Los mecanismos de “primera línea” incluyen inmovilización extracelular de metales pesados en pared celular, compartimentalización vacuolar, y síntesis de glutatión y fitoquelatinas. Como cabe esperar, los mecanismos de “segunda línea” son aquellos que se activan cuando se sobrepasa la capacidad de los mecanismos de primera línea. Por tanto, los mecanismos de detoxificación de “segunda línea” engloban la inducción de enzimas antioxidantes y de proteínas relacionadas con el estrés. Los antioxidantes solubles, como ascorbato y glutatión, y las enzimas antioxidantes como SOD, GR, CAT y peroxidasas, se encuentran involucrados en el proceso completo de detoxificación de HM, puesto que participan en la quelación (“primera línea”) y en la protección antioxidante (“segunda línea”).

Nuestros experimentos se basaron en la exposición relativamente prolongada (7 días) de los ficobiontes, analizándose todos los parámetros estudiados al final del tratamiento con Pb, motivo por el cual no fue posible distinguir la sucesión temporal de

estos diferentes mecanismos de detoxificación. Sin embargo, el interés de nuestro planteamiento experimental reside en la comparación de los mecanismos de detoxificación frente a Pb que presentan a largo plazo estos dos ficobiontes diferentes que de forma permanente coexisten en un mismo líquen (del Campo *et al.*, 2013).

Una de las mayores diferencias encontradas entre TR1 y TR9 fue la diferente distribución de plomo a nivel extra- e intracelular. Los resultados indican que la pared de TR9 actúa como una barrera en la que el Pb queda unido a sitios de intercambio, previniendo su entrada al interior de la célula (**Figuras 3.12**, **3.13** y **Tabla 3.2**). Este hecho se apoya en diferencias ultraestructurales observadas en las paredes de ambos ficobiontes. En TR1 la pared celular está formada por cuatro capas distinguibles mediante TEM, mientras que la pared de TR9 es tres veces más gruesa y consiste en tres capas bien diferenciadas (Casano *et al.*, 2011). Queda por determinar posibles diferencias en la composición y estructura de polisacáridos y proteínas que forman la pared celular de TR1 y TR9. En otros estudios, el engrosamiento de la pared celular fue comúnmente observado en plantas vasculares y musgos expuestos a HMs (Krzeslowska *et al.*, 2009; Bouazizi *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011). Esta respuesta se relaciona con un incremento en la cantidad de polisacáridos presentes en las paredes celulares (Wierzbicka, 1998). Tanto para algas simbióticas como de vida libre se considera que la retención de HM en la pared celular es un mecanismo de protección de “primera línea”, puesto que evita que una fracción del metal tóxico penetre en el protoplasto (Sanita di Toppi *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2010 y referencias citadas en ese trabajo). Este bien puede ser el caso del ficobionte TR9, mientras que en TR1 la estrategia consistiría en retener el plomo formando importantes depósitos dentro de pequeñas vesículas intracelulares. La acumulación de HM en vacuolas y vesículas fue frecuentemente observada en tejidos vegetales y se considera como otro mecanismo de detoxificación de “primera línea”, puesto que restringe la citotoxicidad de los

metales aislándolos del citoplasma y del cloroplasto (Hall, 2002; Liu & Kottke, 2004a, 2004b; Jin *et al.*, 2008; Daud *et al.*, 2009; Glińska & Gapińska, 2013).

Sin embargo, una porción indeterminada de Pb intracelular, soluble y biológicamente activo, pareció estar presente en ambos ficobiontes, y especialmente en las células de TR9, en las que no se observó una formación significativa de depósitos de metal insoluble encerrado en microvesículas (**Figura 3.13**). Tal y como se describió en la Introducción, algunos de los principales efectos tóxicos del plomo derivan de su capacidad para estimular la producción de ROS (Sharma & Dietz, 2008), mientras que otros dependen de la interacción del metal con grupos -SH de macromoléculas esenciales (Liu *et al.*, 2009).

Enzimas antioxidantes como GR, SOD, APX y CAT, y también las proteínas reparadoras con función chaperona, son los principales componentes de los mecanismos de defensa frente al Pb. Los resultados obtenidos para cada una de estas actividades indican diferentes capacidades de los dos ficobiontes para modular sus enzimas antioxidantes en respuesta al estrés. Por ejemplo, al compararlos con los respectivos controles, la actividad GR permanece sin cambios en TR1, mientras que en las células de TR9 tratadas con Pb se produjo una fuerte inducción de la actividad de esta enzima. Los resultados obtenidos para los enzimas SOD y APX en los ficobiontes TR1 y TR9 tratados con Pb fueron similares a los de GR (**Figuras 3.16, 3.17 y 3.18**). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la actividad inicial de GR, SOD y APX fue mayor en TR1 que en TR9, pero como consecuencia de la diferente regulación por estrés que estos enzimas sufren en cada microalga, la actividad total de cada enzima en presencia de 100 μ M Pb fue muy similar en ambas especies. Cabe también destacar que en las células de TR9 tratadas con Pb se produjo el aumento paralelo de las actividades SOD y APX. Las actividades de estas enzimas se incrementaron en aproximadamente la misma proporción respecto de su valor inicial, indicando la activación coordinada de varios componentes del sistema antioxidante

celular, concretamente del ciclo ascorbato-glutation, para prevenir el daño oxidativo por acumulación de H₂O₂ y ROS derivadas.

Ante una exposición prolongada con plomo, la supervivencia celular también dependerá en buena medida de la acción de sistemas de reparación de daños celulares. En este sentido cobra especial importancia la síntesis y acumulación de chaperonas, una de las más estudiadas es la HSP70, con un papel fundamental en respuestas celulares frente a condiciones de estrés de diferente naturaleza (Tominaga *et al.*, 2010). En concreto, estudios previos demuestran la implicación de la chaperona HSP70 en la respuesta fisiológica de algas liquénicas frente a HM (Backor *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que la exposición a Pb causó importantes cambios sobre los niveles basales de HSP70 de los ficobiontes aislados de *Ramalina farinacea*. De forma similar a los cambios encontrados en las enzimas antioxidantes, los niveles iniciales de HSP70 fueron ligeramente menores en TR9 que en TR1. Sin embargo, en las células de TR9 se detectó el aumento en la cantidad de HSP70 al aumentar la concentración de Pb en los tratamientos. Por el contrario en TR1, los elevados niveles iniciales de la chaperona no lograron mantenerse en las células ante la exposición prolongada con la máxima concentración de Pb (**Figura 3.19**).

En general, los resultados obtenidos mediante este estudio concuerdan con los descritos en el punto anterior de Resultados (apartado 3.1.), en el que se estudió la respuesta fisiológica de los ficobiontes TR1 y TR9 frente al estrés oxidativo agudo. Este análisis comparativo permitió señalar a TR9 como el ficobionte con mayor capacidad para incrementar los mecanismos de reparación y los de defensa antioxidante frente a dichas condiciones drásticas. Sin embargo, aunque aparentemente los mecanismos de defensa de TR1 no se inducen en condiciones de estresantes, este ficobionte parece no quedar “desprotegido”, pues está dotado y es

capaz de mantener unos niveles basales de defensas antioxidantes relativamente altos.

Es posible que los ficobiontes *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 representen dos estrategias fisiológicas diferentes para hacer frente al estrés. Por un lado, las células de TR1 parecen estar relativamente menos “protegidas” del medio ambiente externo, posiblemente debido a que su pared celular es más fina, cualitativamente diferente y más permeable que la de TR9. Asimismo, este alga ha desarrollado mecanismos de disipación no fotoquímica de la energía luminosa absorbida aparentemente menos potentes que TR9 (**Figura 3.20 C**), lo cual incrementa su tendencia a la generación de ROS. Por lo tanto, TR1 tendría que invertir más energía metabólica para mantener las defensas intracelulares y mecanismos de reparación en unos niveles constitutivos relativamente altos. Por otro lado, la gruesa pared celular de TR9 posiblemente constituya una barrera eficaz que aísle parcialmente a este ficobionte de las circunstancias estresantes del medio externo. A ello se suma su mayor capacidad de disipación no dañina de energía luminosa absorbida, todo lo cual le permitiría mantener sus mecanismos de defensa intracelular en niveles relativamente bajos en condiciones basales. No obstante, TR9 ha demostrado ser capaz de inducir rápidamente dichos sistemas de protección cuando las condiciones estresantes rebasan las defensas de “primera línea” y los niveles de estrés superan cierto umbral.

3.3. Síntesis de biotioles en ficobiontes de los géneros *Trebouxia* y *Coccomyxa* como mecanismo de desintoxicación de metales pesados

Los resultados obtenidos en los apartados anteriores de Resultados y discusión (3.2. y 3.3.) indicaron claramente que los ficobiontes *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 del líquen *Ramalina farinacea* presentan diferentes respuestas fisiológicas para hacer frente al estrés por plomo, tolerando niveles intracelulares relativamente altos del metal.

Tal como se mencionaba en la Introducción de esta Tesis, las plantas en general y las microalgas en particular, sintetizan biotioles en respuesta al estrés por metales pesados. Dentro de estos, el glutatión reducido (GSH), por ejemplo, constituye uno de los antioxidantes no enzimáticos más importantes. Además, dependiendo del metal, se pueden sintetizar (PCs) empleando GSH como precursor. Teniendo en cuenta que TR1 tiene una menor tasa de retención de Pb en la pared celular, lo cual se traduce en un mayor nivel intracelular del metal que en TR9, y la diferente capacidad de cada ficobionte para modular la actividad de la enzima GR en presencia del metal, nos planteamos estudiar si los biotioles podrían jugar un papel relevante como mecanismos de desintoxicación de “primera línea” mediante la inmovilización y complejamiento intracelular de metales pesados. Para ello se realizaron tratamientos con Pb y Cd en diferentes especies de microalgas verdes (*Trebouxia* sp. TR1 y TR9; *Coccomyxa solorina saccatae* y *Coccomyxa subellipsoidea*), determinándose la captación de Cd en las células por ICP-MS, los niveles de biotioles (GSH y PCs) mediante cromatografía líquida de alta resolución y la dinámica de formación de ROS en presencia o ausencia de un inhibidor de la síntesis de biotioles.

Además de las dos especies del género *Trebouxia* (TR1 y TR9), que han sido objeto de estudio del presente trabajo de Tesis, en estos experimentos hemos incluido con fines comparativos otras dos microalgas del género *Coccomyxa*. Las algas de este

género perteneciente a la familia Coccomyxaceae, dentro la clase Trebouxiophyceae a la que también pertenece el género *Trebouxia*, presentan similitudes y diferencias con TR1 y TR9. Las cuatro forman asociaciones simbióticas con hongos, pero mientras las dos especies de *Trebouxia* son simbioses obligados de ascolíquenes, *Coccomyxa solorina saccatae* es el ficobionte del ascolíquen *Solorina saccata* y *Coccomyxa subellipsoidea* fue aislada a partir de basidiolíquen *Lichenomphalia umbellifera*, pero también se la encuentra en vida libre.

Las concentraciones de Pb y la duración de los tratamientos fueron idénticas a las empleadas en los estudios previos, con el fin de poder comparar los análisis realizados. La inclusión de un segundo metal pesado, Cd en este caso, se debe a que éste ha sido comparativamente más estudiado que el Pb en lo referido a algunos aspectos de sus efectos fisiológicos en microalgas. De hecho, para los tratamientos con Cd se adoptaron las mismas condiciones que las empleadas por otros autores (Sanita di Toppi *et al.*, 2008; Abboud & Wilkinson, 2013). En estos trabajos se observa que los mayores efectos tóxicos del Cd se producen durante las primeras 48 horas del tratamiento.

Con el fin de analizar la importancia que tiene el GSH en el mantenimiento de la homeostasis redox en TR1 y TR9 en condiciones de estrés por HM, se estudió la influencia de la inhibición de la síntesis de GSH sobre la cinética de formación de ROS células tratadas con Pb y Cd. Para ello, se adicionó BSO que es un inhibidor de la enzima γ -ECS, encargada de catalizar el primer paso de la síntesis de GSH y se utilizó una sonda fluorescente para medir los niveles de ROS.

3.3.1. Resultados

3.3.1.1. Medida de biotioles en microalgas tratadas con plomo

El GSH fue el único biotiol detectado en las cuatro especies de microalgas verdes tratadas con 50 y 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ durante una semana. La **Figura 3.21** muestra el contenido de GSH absoluto en cada especie, así como el porcentaje de GSH relativo al control y al nivel inicial, para cada especie y tratamiento. Las cantidades absolutas de GSH (nmol/g PF) en condiciones control (0 μM Pb) fueron diferentes en las cuatro especies de algas estudiadas, siendo *Trebouxia* sp. TR1 el alga con mayor nivel de GSH seguida de *C. subellipsoidea*, *Trebouxia* sp. TR9 y por último *C. solorina*. Estos resultados y los obtenidos por otros investigadores en diferentes microalgas [*Asterochloris erici* (300 nmol/g PF, Backor *et al.*, 2007); *Trebouxia impressa* (170 nmol/g PF, Sanita di Toppi *et al.*, 2008); *Stichococcus minor* y *Geminella terricola* (72 y 43 nmol/g PF, respectivamente, Kalinowska & Pawlik-Skowronska, 2010)] sugieren que el contenido de GSH en microalgas es un parámetro bastante heterogéneo, incluso entre especies del mismo género.

En general, los cambios en el contenido de GSH producidos por los tratamientos con Pb no son estadísticamente significativos en ninguna de las especies estudiadas en nuestro trabajo, probablemente como consecuencia de la variabilidad intraespecífica y la heterogeneidad de las poblaciones de ficobiontes dentro de los diferentes cultivos. Sin embargo, resulta interesante comprobar los cambios producidos por los tratamientos en los niveles de GSH respecto del control. En TR1, puede observarse una reducción del 15% en los tratamientos de 50 μM Pb, seguido de un incremento del 30% en los tratamientos de 100 μM . En el caso de TR9, se producen incrementos del 28% y del 38% en los tratamientos de 50 y 100 μM Pb, respectivamente. En cambio la proporción de GSH en las dos especies de *Coccomyxa* tratadas, apenas experimentó cambios respecto a los valores medidos en las

condiciones control. Por último, cabe señalar que la exposición a Pb no indujo la síntesis de PCs en ninguna de las cuatro especies de ficobiontes estudiadas.

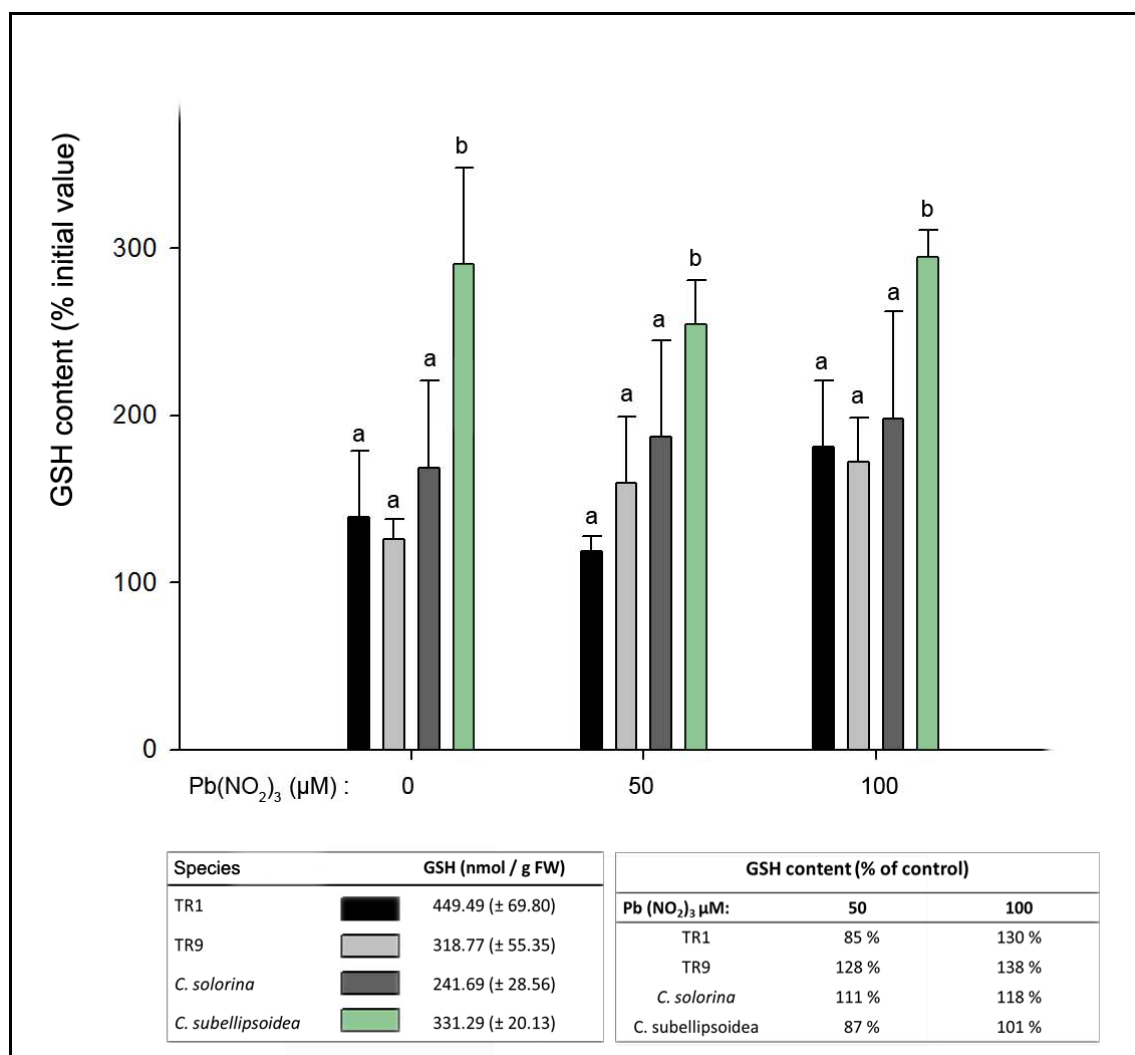


Figura 3.21. Contenido de GSH en cuatro especies de microalgas verdes (*Trebouxia* sp. TR1, TR9, *C. solarina saccatae* y *C. subellipsoidea*) tratadas con Pb durante una semana. Los datos representan el valor medio de seis experimentos independientes y sus errores estándar correspondientes (± ES). Las diferencias entre los tratamientos fueron analizadas mediante un ANOVA factorial, considerando como factores la especie de ficobionte y el tratamiento de plomo. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre especies para cada tratamiento de Pb de acuerdo con la prueba t-Student. Los valores absolutos de GSH (nmol/g PF) y los niveles de GSH relativos al control se detallan en las tablas insertadas en los lados izquierdo y derecho, respectivamente.

3.3.1.2. Análisis de las especies químicas de cadmio en el medio de cultivo

En primer lugar, se realizó un estudio de las especies químicas de Cd presentes en el medio de cultivo empleando el programa MINTEQ ver.3.0 (Ver apartado 2.2.16.1. de Materiales y Métodos) para estimar la distribución de las diferentes especies químicas de Cd disueltas en medio líquido Bold-3N, a partir de 50 y 100 μM CdSO_4 . Tal como se muestra en la **Tabla 3.5**, los resultados indican que en teoría las especies químicas de Cd formadas son compuestos solubles en agua, lo que hace que probablemente sean formas fácilmente bioasimilables.

Tabla 3.5. Especies químicas de Cd presentes en medio Bold 3-N con 50 y 100 μM CdSO_4 .

Espece química	%
Complejos con OH-	31,58
Complejos con PO_4	5,26
Complejos con SO_4	10,52
Complejos con EDTA	21,05
Complejos con Cl	10,52
Complejos con NO_3	10,52
Total formas solubles	100%

Las distribuciones cualitativas y semicuantitativas de las especies de Cd, incluyendo los criterios de solubilidad, fueron estimadas empleando el programa Visual MINTEQ (ver.3.0.), que se basa en el modelo de equilibrio químico para el cálculo de proporciones de especies químicas de metales.

3.3.1.3. Acumulación de cadmio en los diferentes compartimentos celulares y morfología de las paredes celulares

Las determinaciones de Cd fueron realizadas en la fracción intracelular y de pared en *Trebouxia* sp. TR1 y TR9, *C. solorina* y *C. subellipsoidea* tratadas con 100 μ M Cd durante 72 h, incluyendo un control para cada género (Control *Trebouxia*: TR1+TR9; Control *Coccomyxa*: *C. solorina* + *C. subellipsoidea*). La determinación de Cd en las diferentes fracciones se realizó mediante ICP-MS en la Unidad de Análisis Elemental de la Universidad Autónoma de Madrid, tal y como se describe en el apartado 2.2.16.2. de Materiales y Métodos.

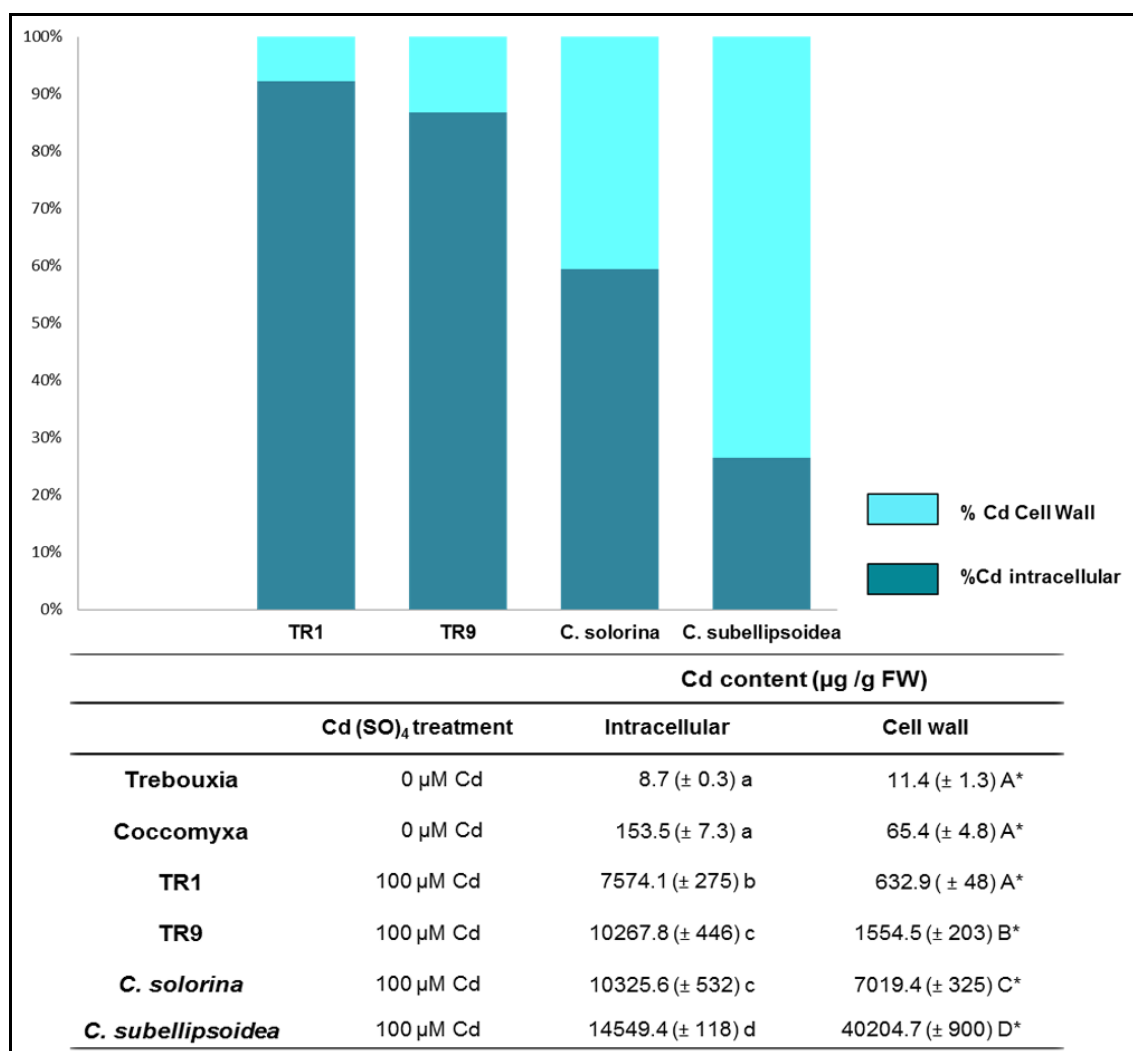


Figura 3.22. Concentración total ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PF) y proporción relativa (%) de Cd en diferentes compartimentos celulares de cuatro especies de ficobiontes (*Trebouxia* sp. TR1 y TR9, *C. solorina* y *C. subellipsoidea*) tratadas con 50 y 100 μM Cd durante 72 h. Las diferencias entre especies fueron analizadas mediante un ANOVA factorial, en el que la especie de ficobionte y el compartimento celular fueron considerados factores. Las diferentes letras minúsculas y mayúsculas señalan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre especies de ficobiontes para cada compartimento celular, intracelular y pared, respectivamente. Los asteriscos indican diferencias significativas entre compartimentos celulares para cada especie de ficobionte ($*p < 0.05$), de acuerdo a la prueba t-Student. Los controles de la tabla denominados *Trebouxia* y *Coccomyxa*, corresponden a mezclas de las dos especies de *Trebouxia* (TR1 y TR9, 1:1) y de *Coccomyxa* (*C. solorina* y *C. subellipsoidea*, 1:1).

En la **Figura 3.22** se observa que los niveles totales de Cd incorporados fueron muy diferentes en las diferentes especies, así como su distribución entre las diferentes fracciones celulares. En primer lugar, cabe destacar que células de las especies de *Coccomyxa* incorporaron significativamente más Cd ($\mu\text{g}/\text{g}$ PF) que las especies de *Trebouxia*, sobre todo a nivel de pared celular. La especie *C. subellipsoidea* fue el alga que retuvo mayor cantidad total en ambos compartimentos, aunque destaca el hecho de que el Cd presente en la pared celular representa más del 70% del total. Este reparto es completamente diferente en las otras tres especies. En *C. solorina* el Cd incorporado en la pared celular representa apenas un 40% del total. Esta proporción fue mucho más baja en las especies de *Trebouxia*, en las que la proporción de Cd intracelular fue mucho más elevada, más del 90% en el caso de TR1 y un 85% en TR9. Estas diferencias entre TR1 y TR9, aunque aparentemente pequeñas fueron estadísticamente significativas, reteniendo TR9 casi tres veces más cantidad total de Cd a nivel de pared celular.

Las imágenes obtenidas mediante TEM que se muestran en la **Figura 3.23**, revelan la existencia de importantes diferencias entre las paredes de las cuatro especies de ficobiontes, no solo por el grosor sino también en la alternancia de las capas que las componen. Las paredes celulares de TR1 (**Figura 3.23 A**) estaban constituidas por cuatro capas, mientras que las de TR9 fueron más gruesas que las de TR1 y se distinguieron solo tres (**Figura 3.23 B**). Por otra parte, las paredes de las dos

especies de *Coccomyxa* estudiadas también mostraron diferencias interesantes. La pared de *C. solorina* (**Figura 3.23 C**) presentó una estructura trilaminar, al igual que la de TR9, pero a diferencia de esta constaba de dos láminas muy electrodensas (externa e interna) y además tenía una pared con un espesor total de aproximadamente la mitad que TR9. Destaca la pared de *C. subellipsoidea* porque fue la que mostró una estructura más compleja, distinguiéndose hasta cinco capas de diferente electrodensidad con un tamaño intermedio muy similar al de la pared de TR1 (**Figura 3.23 D**).

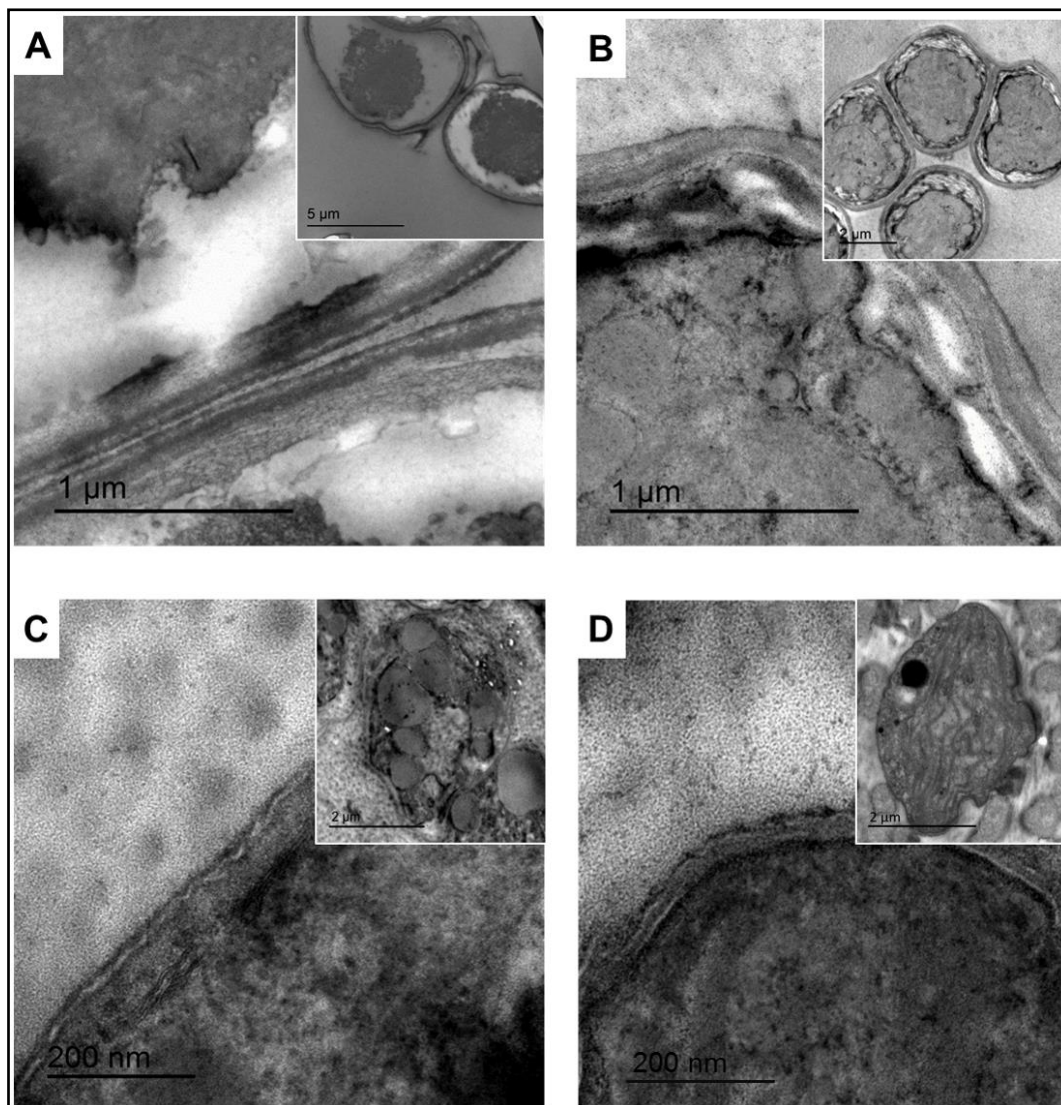


Figura 3.23. Fotografías obtenidas mediante TEM que muestran en detalle la estructura de las paredes celulares de: (A) *Trebouxia* sp. TR1, (B) TR9, (C) *C. solorina* y (D) *C. subellipsoidea*. Las fotografías en los insertos muestran la morfología celular general de cada especie de ficobionte.

3.3.1.4. Síntesis de biotioles en ficobiontes tratados con cadmio

La concentración de biotioles fue determinada mediante HPLC en las cuatro especies de ficobiontes en condiciones control y tras los tratamientos con 50 y 100 μM Cd durante 24 y 48 h. En las **Figuras 3.24** y **3.25**, observamos como el GSH apareció en todas las muestras, incluso en los controles, como era de esperar, mientras que las PCs se detectaron únicamente en los ficobiontes tratados con Cd. La concentración media de GSH en las cuatro especies fue diferente, incluso en condiciones control (0 μM Cd). En estas condiciones, podemos observar como los niveles medios de GSH total son significativamente más elevados en *C. subellipsoidea* (762-764 nmol GSH/g PF) y en TR1 (457-499 nmol/g PF) que en *C. solorina* y en TR9, las cuales contienen niveles de GSH por debajo de los 300 nmol /g PF.

Una tendencia común en las cuatro especies estudiadas fue la inducción de la síntesis de PCs en respuesta a la presencia de Cd, dependiente de la dosis y acompañada de un aumento de la concentración total de biotioles (**Figuras 3.24** y **3.25**). Este aumento es fácilmente observable si comparamos los valores de biotioles totales (GSH, GSH+PC2, o GSH+PC2+PC3+PC4, según cada caso) expresados como equivalentes de GSH (nmol/g PF) (valores indicados en rectángulos negros, **Figura 3.24**). La síntesis de PCs se produce a partir de 24 h de tratamiento con Cd, tanto a 50 como 100 μM , en todas las algas estudiadas. Sin embargo, resulta interesante comprobar como esta inducción es más intensa en las especies de *Trebouxia*, tanto a nivel cuantitativo y cualitativo. En TR1 y en TR9 se produjo la síntesis de varias clases de PCs: PC2 [(Cys- γ Glu) 2 -Gly], PC3 [(Cys- γ Glu) 3 -Gly]; e incluso de PC4 [(Cys- γ Glu) 4 -Gly] en TR1 tratadas con 100 μM Cd durante 72 h. Sin embargo, en *C. solorina* y en *C. subellipsoidea* pudo detectarse únicamente la síntesis de PC2.

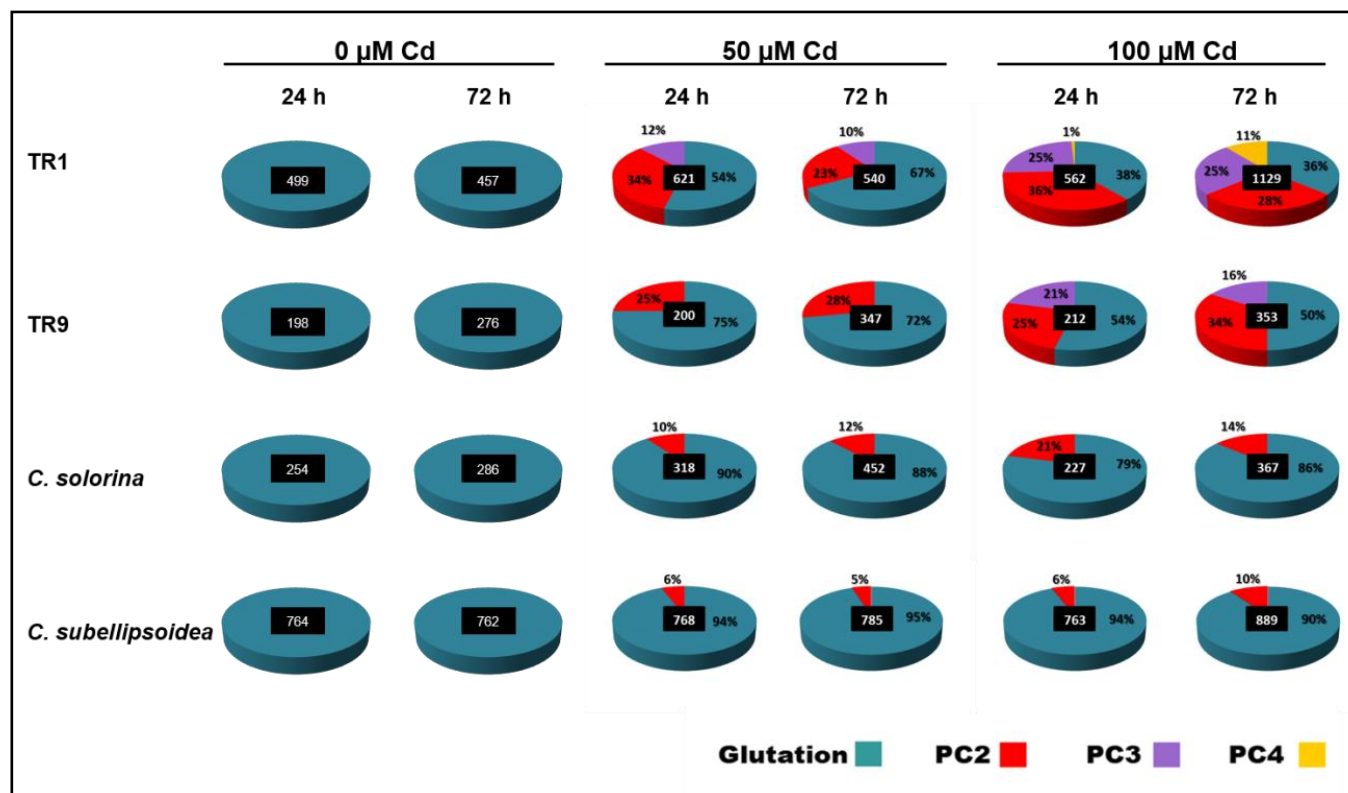


Figura 3.24. Concentración total ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PF) y proporción (%) de los diferentes biotioles sintetizados en cuatro especies de ficobiontes (*Trebouxia* sp. TR1, TR9, *C. solarina* y *C. subellipsoidea*) tratadas con 50 y 100 μM Cd durante 24 y 72 h. Los números en los rectángulos negros indican la concentración total de biotioles en nmol de equivalentes de GSH/g PF.

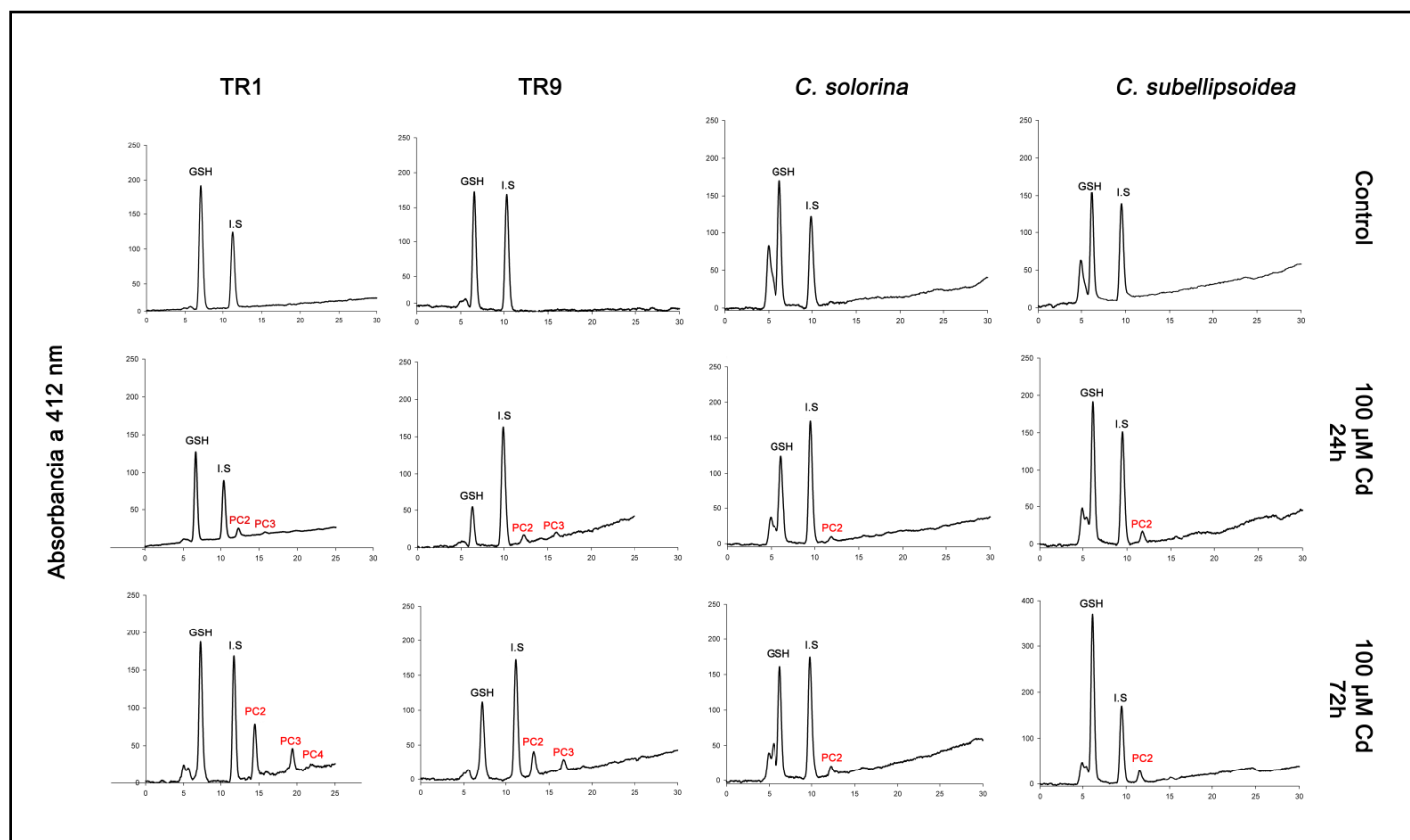


Figura 3.25. Cromatogramas obtenidos por HPLC de los biotios sintetizados en cuatro especies de ficobiontes (*Trebouxia* sp. TR1, TR9, *C. solorina* y *C. subellipsoidea*) tratadas con 50 y 100 µM Cd durante 24 y 72 h. Los biotios correspondientes a cada pico se identificaron mediante la elución de estándares comerciales. La cuantificación de los tiolos se realizó integrando el área de pico en base al área de pico del estándar interno (I.S), N-AcCys.

Además, se estudiaron mediante zimogramas los niveles de actividad GR en las diferentes especies de microalgas tratadas con Cd por tratarse de una enzima crítica en el mantenimiento del balance redox del glutation, e importante para regular la cantidad de sustrato (GSH) disponible para la síntesis de PCs.

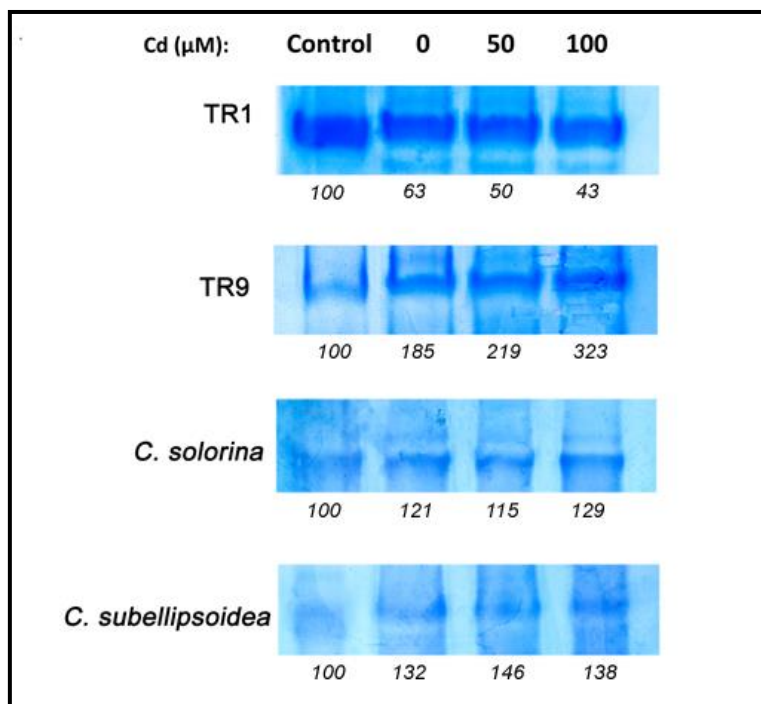


Figura 3.26. Zimograma de actividad GR de *Trebouxia* sp. TR1, TR9, *C. solorina* y *C. subellipsoidea*, tratadas con 0, 50 y 100 µM Cd durante 72 h. Los zimogramas muestran la única banda de actividad GR obtenida tras la separación de las isoenzimas putativas por electroforesis en ND-PAGE (se cargaron 10 µg de proteínas por carril) y la posterior tinción específica de actividad GR (Lascano *et al.*, 2001). La intensidad de las bandas fue calculada empleando un analizador de imágenes UVP Easy Digital Image Analyser. Las cifras que aparecen debajo de cada banda son valores semicuantitativos de actividad GR expresados como porcentajes respecto a cada control.

En la **Figura 3.26** podemos observar como en todos los casos, salvo en TR1, se induce la actividad GR como consecuencia de la exposición a Cd. En TR1 se observa una reducción en la actividad a pesar de partir de unos niveles muy elevados de actividad GR en condiciones control. Los incrementos de actividad en las dos especies de *Coccomyxa* son claramente significativos y con 100 µM suponen un

aumento de casi el 30% respecto a los niveles control en *C. solorina*, y de casi el 40% en *C. subellipsoidea*.

Cabe destacar que en el caso de TR9 estos aumentos son aún más drásticos, llegando a ser tres veces la actividad GR del control con la máxima concentración del metal. Además, en el zimograma de TR9 podemos ver con claridad que existe un aumento de la actividad GR si comparamos el control (0 μM Cd y 0 h cultivo) con la banda correspondiente a 0 μM Cd (72 h cultivo). Esta situación también se repite para las otras dos especies del género *Coccomyxa*. Se trata de una inducción de enzimas antioxidantes (GR, y también se ha visto con SOD) registrada en numerosos experimentos, que se produce durante los cinco días siguientes al pasar los ficobiontes de cultivos semisólidos a líquidos y también cuando reducimos la densidad celular en cultivos líquidos. Posiblemente este fenómeno se deba a que estos cambios de cultivo provocan que las células sufran un mayor grado estrés lumínico. En cualquier caso, se tuvo en cuenta esta alteración y que estos ficobiontes necesitan de un periodo de aclimatación previo a todos los experimentos.

3.3.1.5. Importancia de la síntesis de biotoles en TR1 y TR9 en la tolerancia al estrés oxidativo por metales pesados

Como se ha señalado anteriormente, la toxicidad de los metales pesados está vinculada a su capacidad para incrementar la formación de ROS y provocar estrés oxidativo, si los niveles estacionarios de ROS sobrepasan las defensas antioxidantes en las cuales los biotoles participan directa e indirectamente. Los resultados anteriores sugieren que la presencia de metales pesados, especialmente Cd, provocan importantes cambios en diversos aspectos del metabolismo de los biotoles de las cuatro especies de ficobiontes estudiadas. De éstas, TR1 y TR9 son las que experimentaron los cambios más notables. Por este motivo, y por ser TR1 y TR9 el principal objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral, nos propusimos estudiar en

estas especies el papel que juegan los biotioles en la tolerancia a metales pesados, en concreto Cd y Pb.

Para ello, se procedió a reducir el contenido de GSH utilizando butionina sulfoximina (BSO), potente inhibidor de la enzima γ -glutamyl-cisteína-sintetasa (γ -ECS), primer paso de la síntesis biotioles (Griffith & Meister, 1979). Esta molécula es capaz de unirse al sitio activo de γ -ECS y reducir su actividad y ha sido empleada en multitud de estudios para dilucidar el papel del GSH en la tolerancia al estrés oxidativo en plantas (May & Leaver, 1993; Ortega-Villasante *et al.*, 2005; Sobrino-Plata *et al.*, 2009) y también en algas (Hirata *et al.*, 2001; Mellado *et al.*, 2012).

El primer paso fue comparar los niveles de GSH en cultivos líquidos de TR1 y TR9 crecidos durante una semana en presencia de 5 mM BSO, con sus respectivos controles. Los resultados se muestran en la **Figura 3.27**, pudiéndose apreciar un descenso significativo de los niveles de GSH en los cultivos de TR1 y TR9 tratados con BSO. Esta reducción en el nivel de GSH indicó que el BSO inhibió eficazmente la síntesis de biotioles en ambas microalgas. Sin embargo, esta reducción fue más acusada en TR1, en la que el nivel de GSH disminuyó aproximadamente un 40% respecto del control, mientras que en TR9 la reducción fue solo del 15%.

Una vez comprobada la eficacia de los tratamientos con BSO sobre los ficobiontes TR1 y TR9, se estudió cuál era el efecto de la inhibición en la síntesis de biotioles sobre los ficobiontes tratados con Cd y Pb 100 μ M. Para ello se midió la formación intracelular de radicales libres del oxígeno en TR1 y TR9 empleando la sonda fluorescente DFCH₂-DA (siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2.11. de Materiales y Métodos). Para este estudio se emplearon cultivos líquidos de TR1 y TR9 incubados con 5 mM BSO durante una semana y también células control (cultivos líquidos de una semana con 0 mM BSO).

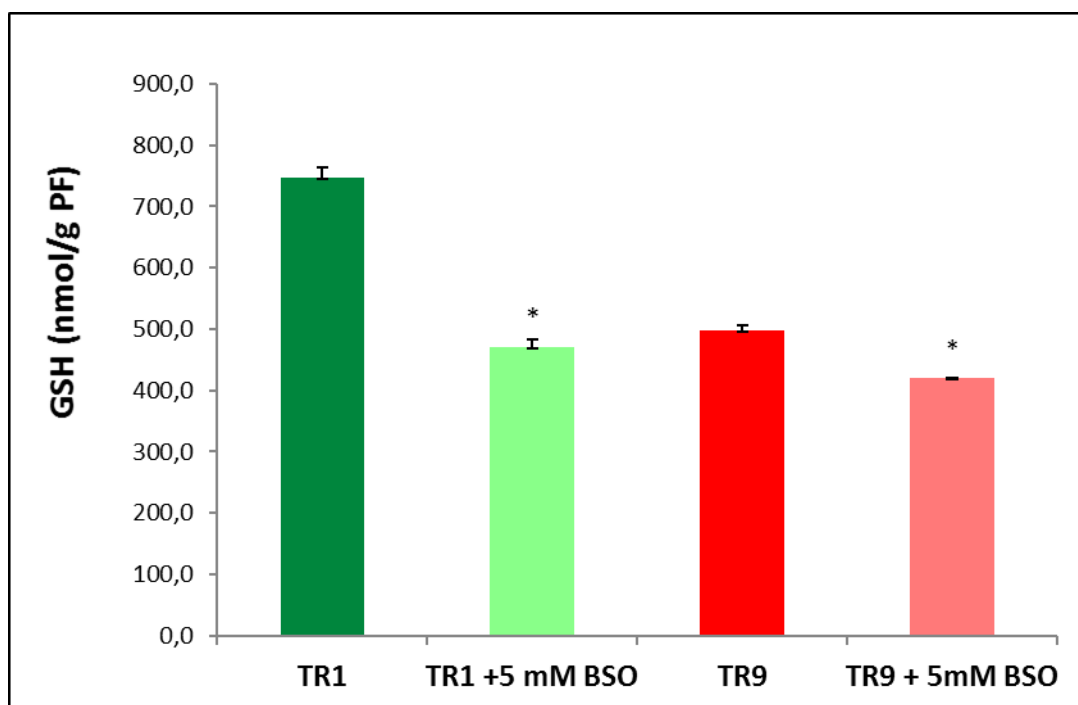


Figura 3.27. Contenido de GSH en *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 tratadas con BSO 5 mM durante una semana. Los datos fueron analizados estadísticamente por un ANOVA unifactorial, considerando como factor el tratamiento con BSO. Las diferencias entre medias fueron evaluadas mediante la prueba t-Student y los asteriscos indican que existen diferencias significativas entre TR1 y TR9 (* $P < 0,05$).

Los gráficos de la **Figura 3.28** muestran las diferentes cinéticas de producción de ROS intracelular obtenidas para TR1 (A) y TR9 (B) según los tratamientos de estrés con los diferentes metales y con el inhibidor de la síntesis de GSH y derivados. En ausencia de metales pesados, la inhibición parcial de la síntesis de GSH no tuvo un efecto significativo sobre la producción intracelular de ROS en ninguna de las dos algas. En estas condiciones los niveles relativos se mantuvieron en niveles cercanos al 25% durante todo el experimento. Sin embargo, las demás condiciones experimentales (presencia/ausencia de metales y/o de BSO) produjeron diferencias muy importantes en las cinéticas de producción de ROS, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo. En TR1 los niveles de fluorescencia relativa obtenidos en las muestras tratadas con metales fueron más altos que en TR9 en todos los casos (hasta cinco veces mayores) lo cual indica claramente la mayor tasa de formación de ROS y su potencialmente mayor tendencia a sufrir estrés oxidativo.

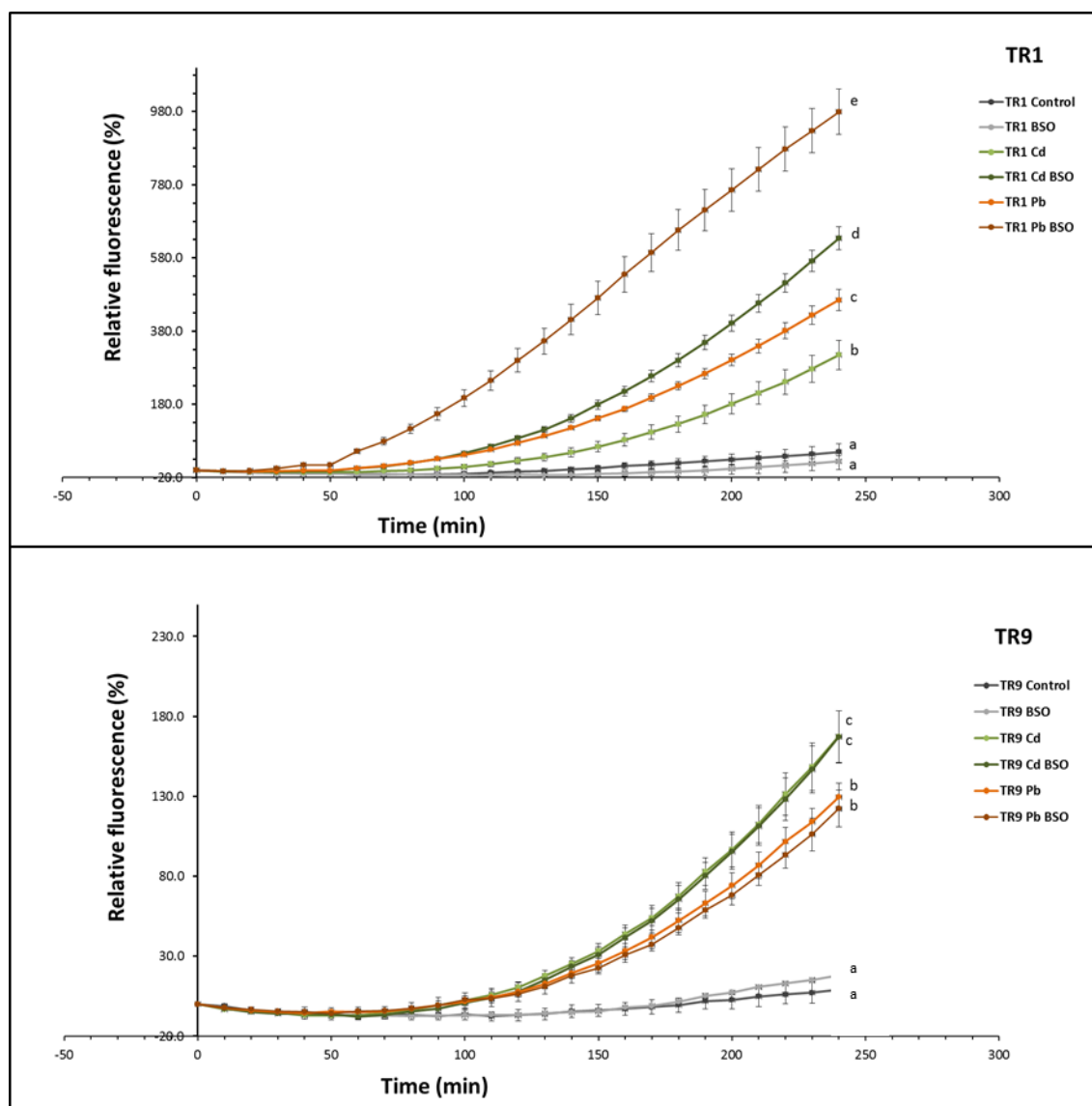


Figura 3.28. Efecto de la inhibición de la síntesis de biotioles en la formación intracelular de radicales libres en *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 tratadas con Cd y Pb (100 μ M) durante 4 horas. La figura muestra las cinéticas de producción intracelular de radicales libres en TR1 (A) y TR9 (B) en condiciones control y en respuesta al estrés producido por 100 μ M Cd y Pb, durante 4h. Se emplearon células tratadas con 5 mM BSO durante una semana y células control (0 mM BSO). Los símbolos representan valores medios de 12 réplicas, así como las barras de error asociadas (\pm ES). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto del control ($p^* < 0.05$). Los datos fueron analizados estadísticamente por un ANOVA factorial, en el que los tratamientos con Pb o con Cd, y/o en combinación con BSO fueron considerados factores independientes. Las diferencias entre medias fueron evaluadas mediante la prueba t-Student. Las diferentes letras minúsculas o mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los diferentes tratamientos para cada especie de alga.

En TR1 la producción de ROS intracelular fue significativamente mayor para el mismo tratamiento con Pb o Cd, cuando las células fueron pretratadas con BSO. Además, en TR1 el Pb indujo una mayor tasa de formación de radicales libres que el Cd. Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos quedó demostrado que en TR1 la síntesis de GSH es muy importante para hacer frente al estrés producido por la exposición a metales pesados.

Por otro lado, a diferencia de TR1, en TR9 fue el Cd el metal que mayores niveles de formación de ROS produjo. Probablemente, este hecho pueda explicarse porque TR9 es capaz de inmovilizar la mayor parte del Pb a nivel de pared celular (ver apartado 3.2.1.2.), previniendo en gran medida su entrada a la célula; mientras que su capacidad de fijación extracelular es mucho más limitada en el caso del Cd (apartado 3.3.1.3.). Otro aspecto contrastante del comportamiento de TR9, respecto de TR1, ha sido que en TR9 no se observaron diferencias significativas entre células pretratadas o no con BSO, posiblemente como consecuencia de que en este alga el efecto del inhibidor fue menor al 20% (**Figura 3.27**).

3.3.2. Discusión

Los resultados del capítulo 3.2. dedicado a los mecanismos fisiológicos de defensa frente al estrés producido por plomo en los ficobiontes TR1 y TR9, demostraron que la modulación de la enzima GR fue muy diferente en TR1 y en TR9 tratadas con Pb. Al contrario de lo que sucede con TR1, en TR9 se observa una enorme inducción de la actividad GR en respuesta a los tratamientos con Pb (**Figuras 3.16 A y 3.17**). Esta inducción en TR9 tiene como resultado que se alcancen unos niveles de actividad GR tan elevados como los de TR1. Los resultados de las medidas de biotioles en TR1 y en TR9 tratadas con Pb indican que el efecto final de esta diferente regulación de la enzima GR supone el mantenimiento de unos niveles de GSH comparables en ambas especies. Por lo tanto, estos resultados confirmaron que la diferente regulación de la enzima GR en ambas algas les permitió obtener rendimientos similares de GSH en condiciones estresantes.

En ninguna de las cuatro especies de ficobiontes estudiadas se produjeron cambios estadísticamente significativos en el contenido de GSH (**Figura 3.21**) ni se produjo la síntesis de PCs, como respuesta a los tratamientos con Pb. Posiblemente tal y como explicaron Foyer *et al.* (1991) para la ausencia de efecto de una alta actividad GR sobre el contenido de GSH en hojas de tabaco, en estos ficobiontes el contenido de GSH absoluto también esté determinado por los ratios relativos de síntesis y degradación de glutatión más que por el reciclaje de GSSG vía actividad GR. Al no existir síntesis de PCs, podría ser que el incremento de actividad GR fuese suficiente para mantener unos niveles de GSH estables y el equilibrio de los componentes celulares.

El hecho de no haber detectado la formación de PCs en estas especies fue imprevisto, puesto que existen multitud de estudios previos en los que el Pb ha sido descrito como un buen inductor de la síntesis de PCs en diversas especies de algas

marinas, dulceacuícolas y también en ficobiontes (Ahner & Morel, 1995; Pawlik-Skowronska, 2000, 2001; Morelli & Scarano, 2001; Le Faucheur *et al.*, 2006). Sin embargo no es un caso aislado, ya que en un estudio reciente tampoco se encontraron niveles detectables de PCs en cultivos de *Chlorella vulgaris* tratadas con Pb (Zhang *et al.* 2014). Asimismo, análisis de los complejos formados entre Pb y PCs en *Chlamydomonas reinhardtii* demostraron que solo una pequeña porción del metal (13%) estaba realmente asociado a PCs (Scheidergger *et al.* 2011). Estos nuevos resultados podrían indicar que el papel de las PCs en la detoxificación por Pb es menor en algunas especies de microalgas, que posiblemente posean mecanismos alternativos más importantes para la detoxificación del Pb, como la retención en la pared celular y la interacción con moléculas de GSH (Zhang *et al.*, 2014). A diferencia de lo que ocurre con el Pb, Howe y Merchant (1992) demostraron que en el caso del Cd, *C. reinhardtii* sintetiza PCs capaces de secuestrar aproximadamente un 70% del metal intracelular.

Las diferentes capacidades de las microalgas estudiadas para acumular Cd intracelularmente y en la pared, así como las diferencias cualitativas y cuantitativas en la síntesis de biontios, incluyendo PCs, en respuesta a la exposición con Cd, indican que estas especies han desarrollado diferentes mecanismos de protección “de primera línea” frente a metales pesados.

El Cd es el inductor de PCs por excelencia en organismos fotosintéticos, encontrándose descritas únicamente dos especies que no sintetizan PCs en respuesta al Cd, el alga diatomea *Achnanthes brevipes* y el dinoflagelado *Prorocentrum micans* (Pistocchi *et al.*, 2000).

En las especies de algas estudiadas puede observarse una potente inducción de la síntesis de PCs en respuesta a la exposición y captación del Cd. Además, para cada especie existe correlación entre el aumento concentración de Cd y tiempo de

exposición con el incremento de la producción de PCs y también con la producción de PCs de cadenas mayor longitud, por ejemplo PC3 y PC4 en TR1 (**Figura 3.24**).

La incorporación de Cd y su acumulación en los diferentes compartimentos celulares fue muy diferente en las cuatro especies (**Figura 3.22**). Existen diferentes estudios en los que se ha analizado el papel de la pared celular de *C. reinhardtii* como una barrera que limita la captación intracelular de diferentes metales, empleando células silvestres y mutantes carentes de pared celular (Macfie *et al.*, 1994; Piccapietra *et al.*, 2012). En el caso de los metales: cobalto, cadmio, cobre y plata; se observó una mayor toxicidad en los mutantes sin pared celular que en la variedad silvestre de *C. reinhardtii*. Por lo que se pudo concluir que la pared celular actuaba como una barrera adicional para el protoplasto uniendo iones metálicos a sitios cargados negativamente y por lo tanto alterando la cinética de captación de los metales (Macfie *et al.*, 1994). Sin embargo, en un estudio reciente Rohder *et al.* (2014) demostraron que en el caso del cerio la pared celular apenas posee función protectora, ya que tiene una reducida influencia sobre las cinéticas de captación del metal.

En este estudio destaca especialmente la elevada captación de Cd en *C. subellipsoidea* a nivel intracelular, pero sobre todo en la pared celular. A pesar de que hace varias décadas que se conoce que las microalgas son bioacumuladoras eficientes de metales pesados (Darnall *et al.*, 1986) y promisorios candidatos para la biorremediación, a día de hoy se siguen realizando multitud de estudios para identificar especies cada vez más idóneas para sobrevivir y acumular elevadas concentraciones de diferentes metales pesados (Matsunaga *et al.*, 1999; Monteiro *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2011). Los datos obtenidos indican que *C. subellipsoidea* es una especie con un considerable potencial para la retención de metales pesados, en concreto Cd, y que podría ser de interés para futuros estudios de búsqueda de nuevas especies de algas con propiedades útiles para biorremediación.

La acumulación total de Cd en TR1 y TR9 fue significativamente menor que en *C. subellipsoidea* pero la formación de PCs fue más intensa, sintetizándose cadenas de mayor tamaño (PC3 en TR9; PC3 y PC4 en TR1) y que representan una mayor proporción de equivalentes de GSH totales (**Figura 3.24**). Algunos autores proponen que la elevada tolerancia a los metales de algunas microalgas se debe no solo al aumento en la producción de PCs, sino también a la capacidad de sintetizar PCs más largas que son capaces de formar complejos más estables con los metales tóxicos (Torres *et al.*, 1997; Pérez-Rama *et al.*, 2001) y también a la presencia de macromoléculas extracelulares que actúan como una barrera reduciendo la incorporación de metales pesados (Pistocchi *et al.*, 2000). En cualquier caso, las cuatro especies de ficobiontes estudiadas parecen tener mecanismos de detoxificación diferentes que les permiten mantener unos niveles de GSH elevados en condiciones de estrés, incluso con tratamientos de 100 μM Cd.

El empleo del inhibidor de la síntesis de glutatión (BSO) permitió revelar diferencias muy interesantes sobre el papel del GSH en TR1 y TR9. El metabolismo de GSH fue más activo en TR1, mantenido unos niveles de GSH mayores que se deben a una elevada actividad GR y en buena medida a la síntesis de nuevo GSH vía γ -ECS (**Figuras 3.24** y **3.26**). Las diferentes cinéticas de producción de ROS intracelular (**Figura 3.28**) demostraron que a diferencia de TR9, la tolerancia de TR1 frente a metales pesados es muy dependiente de la síntesis de nuevo GSH para el mantenimiento del balance redox celular y, en el caso del Cd, la compensación del GSH empleado en la síntesis de PCs.

3.4. Contribución a la tolerancia al plomo de los polímeros extracelulares de los ficobiontes aislados de *Ramalina farinacea*

Los resultados de acumulación y distribución subcelular de Pb en *Trebouxia* sp. TR1 y TR9 (descritos en el apartado 3.2.1.2. de Resultados y Discusión), mostraron que TR9 fue capaz de retener buena parte del metal en la cara externa de la pared celular formando agregados, por lo que se redujo la entrada del mismo al interior celular, mientras que TR1 demostró una menor capacidad de retención de Pb a este nivel. Estos resultados parecían indicar que ambas especies cuentan con diferentes mecanismos de exclusión/incorporación celular de Pb.

Es conocido que las bacterias y las algas acuáticas son capaces de sintetizar y secretar una serie de exopolímeros o polímeros extracelulares (EPS), los cuales son mayoritariamente polisacáridos y proteínas extracelulares (PE) y de pared (Pereira *et al.*, 2009). En cianobacterias liquénicas, se sabe que los EPS son importantes en la tolerancia a la desecación y otros tipos de estrés ambiental (Knowles & Castenholz, 2008). Sin embargo, apenas se conoce la presencia de EPS en el grupo más importante de ficobiontes, las microalgas eucarióticas (*Trebouxiophyceae*) (Köning & Peveling 1986), y mucho menos su función hidroactiva y posiblemente quelante de partículas cargadas eléctricamente como los iones metálicos (p.e. Pb^{+2}).

Las imágenes de TR1 y TR9 obtenidas mediante TEM y SEM (**Figuras 3.13, 3.23 y 3.37**) sugieren la existencia de EPS, especialmente abundantes en TR9, excretados hacia fuera de la pared pero que se mantienen asociados a esta, formando una especie de vaina mucilaginosa. Con el propósito de realizar una primera aproximación al estudio de los EPS de TR1 y TR9 y conocer su posible implicación con la diferente capacidad de retención de Pb previamente descrita, se extrajeron los EPS y se analizaron sus polisacáridos, su proteoma y algunos de los efectos del Pb sobre estos exopolímeros.

3.4.1. Resultados

3.4.1.1. Polisacáridos extracelulares de TR1 y TR9

En principio, las estimaciones realizadas a partir de observaciones de ultramicroscopía fueron confirmadas por medio del análisis y cuantificación directos de los EPS de ambas microalgas, los cuales claramente señalan que las células de TR9, en condiciones control, están rodeadas por aproximadamente una doble cantidad de exopolímeros que TR1 (**Tabla 3.6**). Los EPS de ambos ficobiontes están compuestos principalmente por polisacáridos y proteínas (**Figura 3.29**). Mientras el contenido total de azúcares fue similar en los EPS de TR1 y TR9, los niveles de proteínas totales fueron significativamente menores en esta última, lo cual generó diferencias importantes en la relación azúcares/proteínas entre ambos ficobiontes (**Tabla 3.6**). A fin de encontrar posibles diferencias cualitativas, se determinó la composición glicosídica de los polisacáridos extracelulares de las algas *Trebouxia* sp. TR1 y TR9, los cuales fueron digeridos mediante hidrólisis ácida y posteriormente se analizó su composición mediante HPLC (ver apartado 2.2.15.5. de Materiales y Métodos).

Tanto en TR1 como en TR9, los polisacáridos de la capa extracelular contenían siete monosacáridos neutros (**Tabla 3.6**). Asimismo, cabe señalar que, excepto en el caso de la fucosa que solo fue encontrada en EPS de TR9, no se observaron diferencias cualitativas entre ambas especies, ya que se identificaron los mismos monosacáridos en las dos algas: las hexosas glucosa, galactosa y manosa, las pentosas xilosa y arabinosa, y la desoxihexosa ramnosa. La galactosa fue el monosacárido más abundante en los EPS de los dos ficobiontes, representando aproximadamente el 80% del total de monosacáridos en TR1 y el 50% en el caso de TR9. Además de galactosa, en TR9 se encontró una considerable proporción de glucosa (c.a. 30%). Si bien el resto de monosacáridos representaron un porcentaje menor, se observaron diferencias significativas entre la composición de los

exopolisacáridos de ambas algas, por ejemplo la proporción de ramnosa y de arabinosa fue mayor en TR9 respecto de TR1 (**Tabla 3.6**).

Tabla 3.6. Características generales de los exopolímeros (EPS) de *Trebouxia* sp. TR1 y TR9.

Espece de ficobionte	<i>Trebouxia</i> sp.TR1	<i>Trebouxia</i> sp.TR9
Rendimiento (mg EPS/g células PF)	12,5	22,5
Composición de monosacáridos neutros de los EPS (mol %)		
• Arabinosa	0,7	1,2
• Ramnosa	2,3	5,0
• Fucosa	--	0,4
• Xilosa	1,6	1,3
• Manosa	3,8	2,8
• Galactosa	81,3	50,1
• Glucosa	8,0	28,3
Contenido de ácidos urónicos (%)	2,4	10,9
Relación Carbohidrato/Proteína	1,0	2,2

Los EPS fueron extraídos a partir de los ficobiontes TR1 y TR9 cultivados en medio líquido, digeridos mediante hidrólisis ácida y analizados por HPLC.

3.4.1.2. Efecto del plomo sobre los EPS de TR1 y TR9

Se estudió el efecto de tratamientos con 0 y 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ sobre cultivos de TR1 y TR9 en medio líquido, durante siete días, después de los cuales se extrajeron los EPS adheridos a la pared de los ficobiontes. En dichos EPS se realizaron las siguientes determinaciones: a) azúcares totales; b) composición glicosídica, c) ácidos urónicos, d) n-acetil amino azúcares, e) proteínas y f) capacidad de quelación de cationes (apartado 2.2.15. de Materiales y Métodos).

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 3.29**. El Pb causó una disminución significativa en los niveles de azúcares y de proteínas totales en ambas especies de microalgas. Sin embargo, el efecto fue más acentuado a nivel de azúcares en el caso de TR1, y de proteínas en el caso de TR9, con reducciones del 37 y 23% sobre sus respectivos controles (**Figuras 3.29 A y D**).

La composición en monosacáridos de los polisacáridos extracelulares de TR9 tratadas con Pb fue esencialmente la misma que la observada en los cultivos control (**Figura 3.29 B**). Sin embargo, el Pb provocó un cambio significativo en la composición glicosídica de los EPS de TR1, disminuyendo el contenido relativo de galactosa e incrementando el de glucosa. En una etapa posterior, estudiamos la capacidad de ligación (quelación) de cationes de dichos EPS, es decir la propiedad reológica que indica el grado de afinidad por partículas cargadas positivamente (en este caso Pb^{+2}) de estas moléculas. Los resultados de la **Figura 3.29 E** muestran claramente que TR9 tenía una capacidad quelante significativamente mayor que TR1, tanto en ausencia como en presencia de Pb. Esta propiedad depende de la presencia de azúcares cargados electronegativamente como ácidos urónicos, n-acetil aminoazúcares y azúcares sulfatados. Estos últimos no pudieron ser analizados en el presente estudio. Sin embargo, hemos realizado varios ensayos para detectar y medir n-acetil aminoazúcares, con resultados negativos en todos los casos, por lo que se concluye que los EPS de TR1 y TR9 no contienen este tipo de azúcares o bien éstos se encuentran en niveles por debajo de los límites de detección de los métodos estándar.

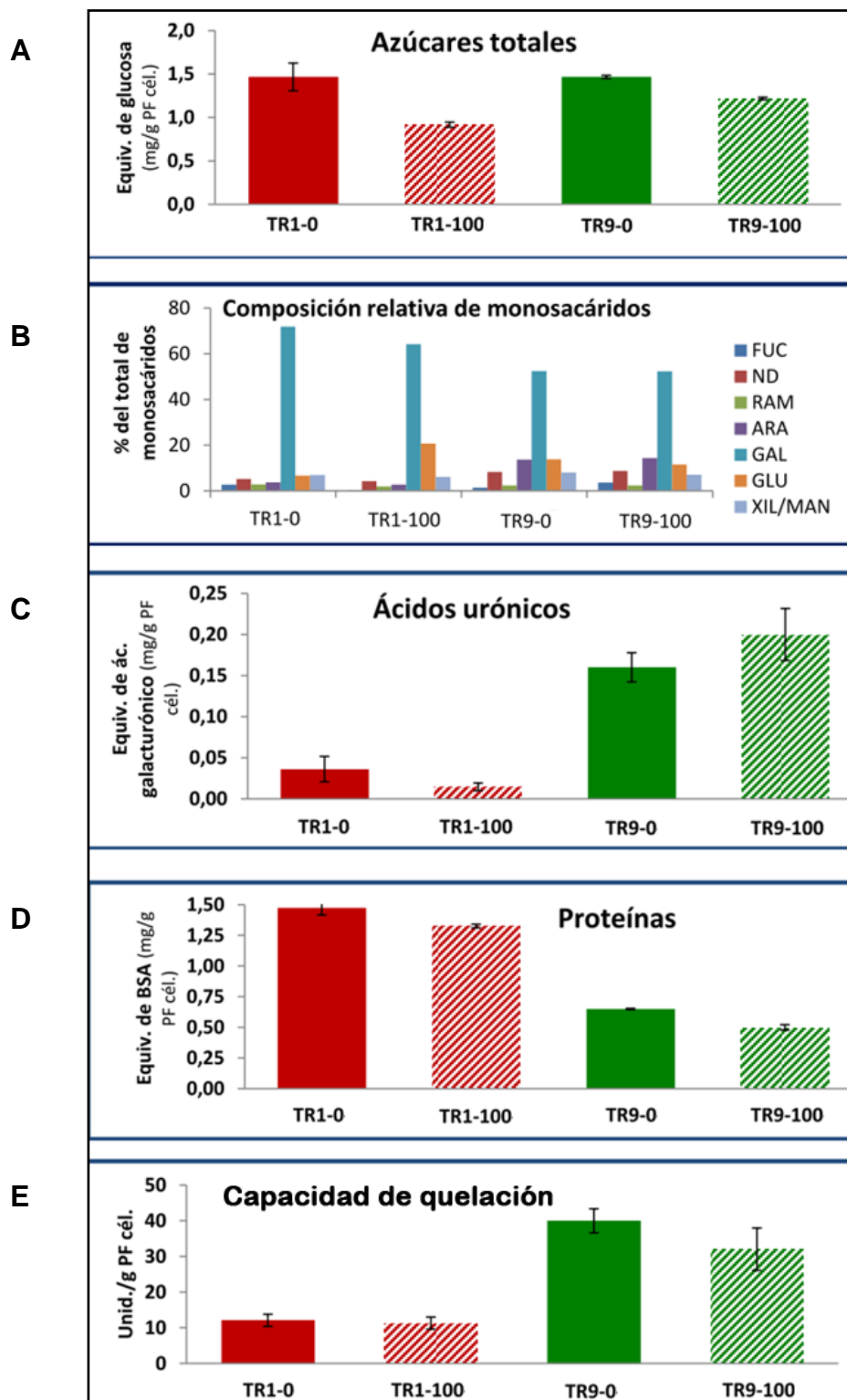


Figura 3.29. Efecto del Pb sobre los EPS de *Trebouxia* sp. TR1 y TR9. TR1 y TR9 fueron tratadas con Pb(NO₃)₂ (0 y 100 μM) durante una semana. (A) Azúcares totales. (B) Composición relativa de monosacáridos. (C) Ácidos urónicos. (D) Proteínas. (E) Capacidad de floculación.

En cuanto a ácidos urónicos, el análisis de monosacáridos no había permitido detectar su presencia, probablemente debido a que la hidrólisis con H_2SO_4 a la que fueron sometidos los polisacáridos como paso previo a la HPLC provoca la degradación de estos azúcares lábiles. Sin embargo, cuando ensayamos ácidos urónicos en los polímeros no hidrolizados pudimos observar su presencia en ambas algas.

Los resultados de la **Tabla 3.6** y la **Figura 3.29 C** indican que TR9 contenía entre 4 y 5 veces más de estos azúcares cargados que TR1, lo cual explicaría, al menos en parte, su mayor capacidad de inmovilización extracelular de Pb. Cabe señalar que el tratamiento con este metal pesado incrementó (+ 25%) el contenido de ácidos urónicos en TR9 mientras que lo redujo (- 50%) en TR1, acentuando las diferencias entre ambos ficobiontes aunque estas no tuvieron consecuencias observables sobre su capacidad de quelación en relación con la de sus respectivos controles (**Figura 3.29 E**).

3.4.1.3. Efecto del plomo sobre los exopolisacáridos de TR1 y TR9

Por medio de filtración en columna de Shepharose 4B estudiamos los perfiles de masas moleculares de los diferentes exopolisacáridos de TR1 y TR9 tratadas con 0 y 100 μM $Pb(NO_3)_2$ (**Figura 3.30**). Estos resultados indican que los azúcares extracelulares formaron un grupo heterogéneo de polímeros, con diferente masa molecular que iban desde más de 2000 kDa hasta menos de 9 kDa.

En ambas algas se pudieron distinguir tres grupos de polisacáridos: dos mayoritarios, de los cuales el primero tiene una masa media de alrededor de 2000 kDa y el segundo de más de 156 KDa. El tercer grupo, minoritario, incluye polímeros de 9,3 kDa o menos. El alga TR9 presenta polímeros de mayor peso molecular que TR1, sobre todo dentro del primer y tercer grupo. Cabe destacar que el Pb no alteró significativamente el perfil molecular de los polisacáridos totales en ambas algas.

Asimismo, no todos estos polisacáridos contenían ácidos urónicos. En condiciones control, TR1 concentró sus ácidos urónicos en los polímeros de masa intermedia y TR9 lo hizo en los de mayor masa. En ambas algas, el Pb provocó un cambio en la distribución de ácidos urónicos, hacia polímeros de menor tamaño.

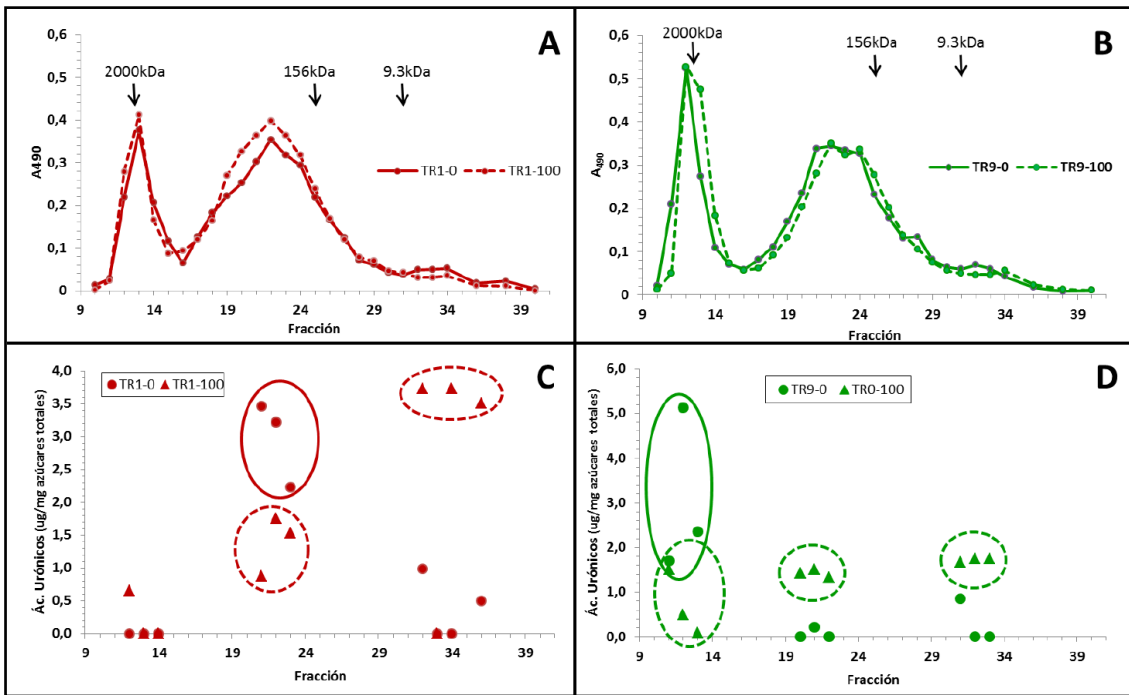


Figura 3.30. Efecto del Pb sobre el perfil molecular de los exopolisacáridos de *Trebouxia* sp. TR1 y *T. TR9*. Cromatografía de exclusión molecular en columna de Sepharose 4B mostrando la distribución en polímeros de diferente masa de los exopolisacáridos de TR1 (A) y TR9 (B) control y tratados con 100 μ M Pb durante una semana. En C y D se muestra la distribución de ácidos urónicos en TR1 (C) y TR9 (D) control y tratados con 100 μ M Pb dentro de los tres grupos de fracciones que concentran la mayor proporción de azúcares totales.

3.4.1.4. Estudio preliminar del efecto del plomo sobre el proteoma extracelular de TR1 y TR9

3.4.1.4.1. Validación del método de extracción de proteínas extracelulares

El procedimiento de extracción de PE (apartado 2.2.6.3. de Materiales y Métodos) fue sencillo, relativamente rápido y extremadamente poco agresivo con el objeto de evitar la solubilización de proteínas unidas fuertemente a la pared celular y la ruptura del plasmalema, con la consecuente contaminación con proteínas intracelulares. A fin de comprobar la ausencia de proteínas intracelulares en nuestras preparaciones de PE, se analizaron los patrones polipeptídicos monodimensionales de ambas fracciones, obtenidas a partir de TR9.

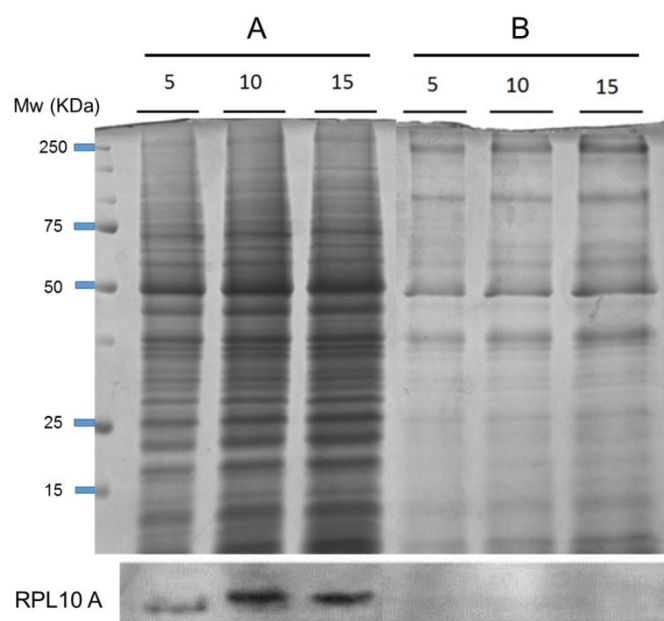


Figura 3.31. Análisis comparativo de las proteínas intracelulares (A) y extracelulares (B) de *Trebouxia* sp. TR9. Las proteínas extracelulares e intracelulares de TR9 fueron extraídas y posteriormente separadas por SDS-PAGE (12% acrilamida) En el panel superior se muestran los patrones polipeptídicos revelados por tinción con plata (el número sobre cada carril indica los μg de proteína que se cargaron en cada pocillo), y en el inferior se muestra la inmunodetección del polipéptido RPL10A con anticuerpos monoclonales (SIGMA Co) en los diferentes extractos proteicos.

Como se observa en el panel superior de la **Figura 3.31**, el conjunto de polipéptidos intracelulares (**Figura 3.31 A**) difiere significativamente de los extracelulares (**Figura 3.31 B**), si bien aparecen alguna(s) banda(s) con masas moleculares similares, las cuales sugerían una posible contaminación de proteínas intracelulares. Sin embargo, cuando los mismos polipéptidos fueron transferidos y analizados por Western-blot con anticuerpos contra las proteínas intracelulares β -tubulina (datos no presentados) y RPL10A (**Figura 3.31**, panel inferior), no se observó ninguna señal en la fracción de PE. A partir de estos resultados consideramos que nuestro procedimiento de extracción de PE no provocó ruptura significativa de la integridad celular y permite producir extractos básicamente libres de proteínas intracelulares.

3.4.1.4.2. Efecto del plomo sobre el proteoma extracelular (exoproteoma) de TR1 y TR9

A fin de estudiar las posibles diferencias entre los exoproteomas de TR1 y TR9 y si se producía algún cambio en dichos exoproteomas como consecuencia de la exposición de los ficobiontes a Pb, analizamos los cambios en los patrones polipeptídicos monodimensionales obtenidos a partir de PE de TR1 y de TR9 tratadas con 0 y 100 μ M Pb.

En la **Figura 3.32** podemos observar que los patrones electroforéticos de TR1 y TR9 son muy diferentes en condiciones control (0 μ M Pb). El de TR1 es más complejo, en concreto pueden distinguirse fácilmente nueve bandas características cuya movilidad electroforética no coincide con ninguna de las bandas de TR9. Además, en TR1 los tratamientos con Pb no producen la aparición de nuevas ni tampoco diferencias drásticas en la intensidad de las mismas. Por otro lado, TR9 a pesar de mostrar un exoproteoma en principio más sencillo que el de TR1, experimenta cambios cuanti y cualitativos más marcados como consecuencia de la

exposición al Pb. Por un lado destacan los polipéptidos TR9-2, TR9-3 y TR9-5, presentes tanto en los controles como en las muestras tratadas con Pb, pero que muestran un notable incremento en esta segunda condición. Por otro lado, se distinguen cuatro bandas de TR9 que aparecen *de novo* en las células tratadas con Pb (TR9-6, TR9-7, TR9-8 y TR9-9, y una banda propia de la condición control (TR9-4) pero que desaparece en presencia del metal pesado.

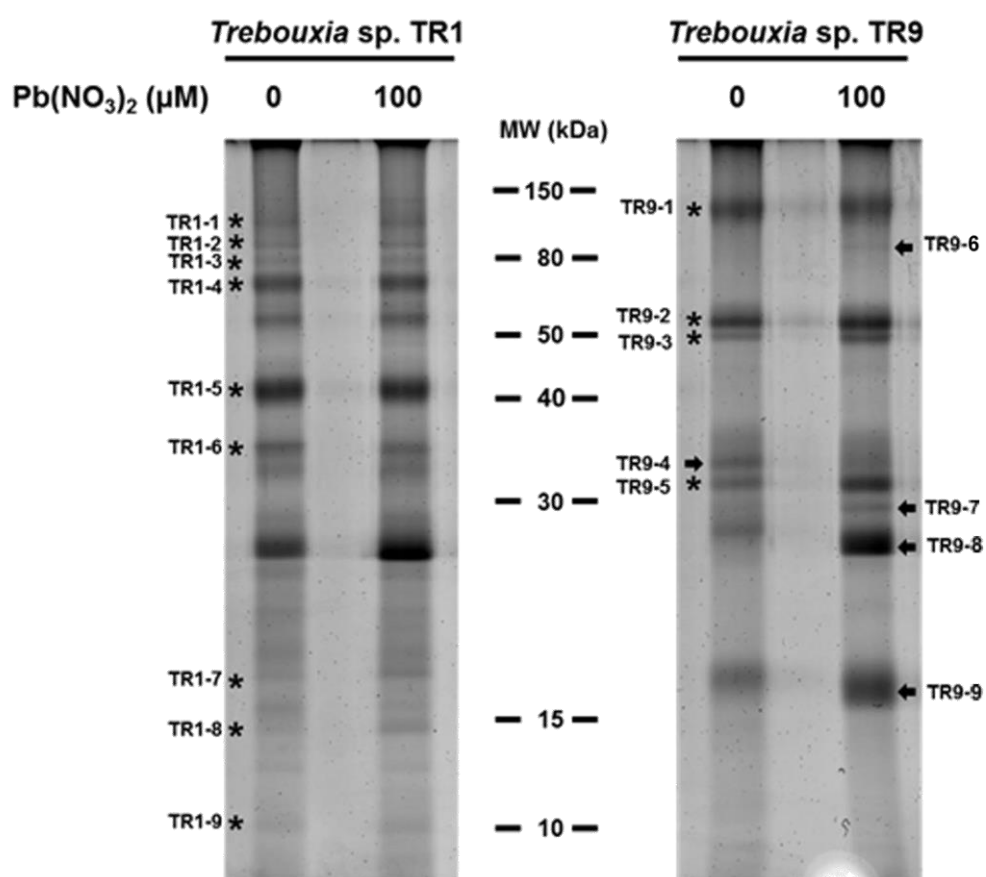


Figura 3.32. Electroforesis monodimensional del exoproteoma de *Trebouxia* sp. TR1 y TR9, tratadas con 0 y 100 μM Pb durante una semana. Las PE de los ficobiontes TR1 y TR9 tratados con 0 y 100 μM Pb fueron extraídas y posteriormente separadas mediante SDS-PAGE (10% acrilamida), cargándose en cada carril 10 μg de PE. El gel se tiñó con el agente SYPRO®Ruby, según se describe en el apartado 2.2.10. de Materiales y Métodos. Los asteriscos señalan las bandas que experimentan cambios cuantitativos entre las muestras control y tratadas con Pb, mientras que las flechas indican los polipéptidos que aparecen o desaparecen como consecuencia del tratamiento con el metal.

Una vez determinados estos cambios, proseguimos el estudio realizando, a partir de cada una de las muestras, una serie de electroforesis bidimensionales (2D-PAGE), tras las cuales los *spots* polipeptídicos fueron revelados con el agente SYPRO. La primera electroforesis consistió en un isoelectroenfoque dentro del rango 4-7 de pH, ya que en experimentos previos se había observado que a pH más elevados no se detectaba ningún spot. En las **Figuras 3.33 y 3.34** se presentan los patrones de 2D-PAGE característicos de TR1 y TR9, respectivamente, así como los patrones obtenidos en las mismas especies tratadas con 100 μM Pb. En principio, se observó que en todos los casos más del 75% de los polipéptidos son netamente “acidófilos”, con PI comprendidos entre 4 y 5,5.

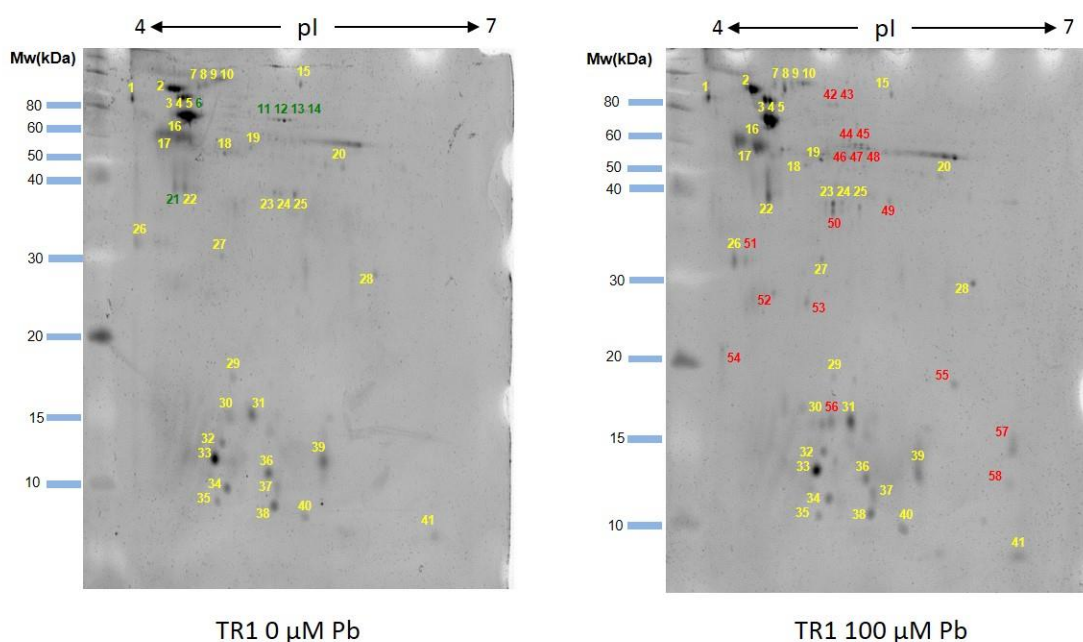


Figura 3.33. Electroforesis bidimensional del proteoma extracelular de *Trebouxia* sp. TR1, en condiciones control y tratada con 100 μM Pb durante una semana. Las PE fueron extraídas y separadas por isoelectroenfoque (cargándose 15 μg de PE) seguido de SDS-PAGE (10% acrilamida). Los patrones polipeptídicos fueron revelados por tinción con el agente SYPRO®Ruby, según se describe en el apartado 2.2.10. de Materiales y Métodos. Los números en amarillo muestran aquellos *spots* coincidentes en ambos tratamientos, mientras que en verde y en rojo se muestran los diferencialmente expresados en la condición control y 100 μM Pb, respectivamente. Se muestran resultados representativos de experimentos repetidos dos veces (réplicas independientes).

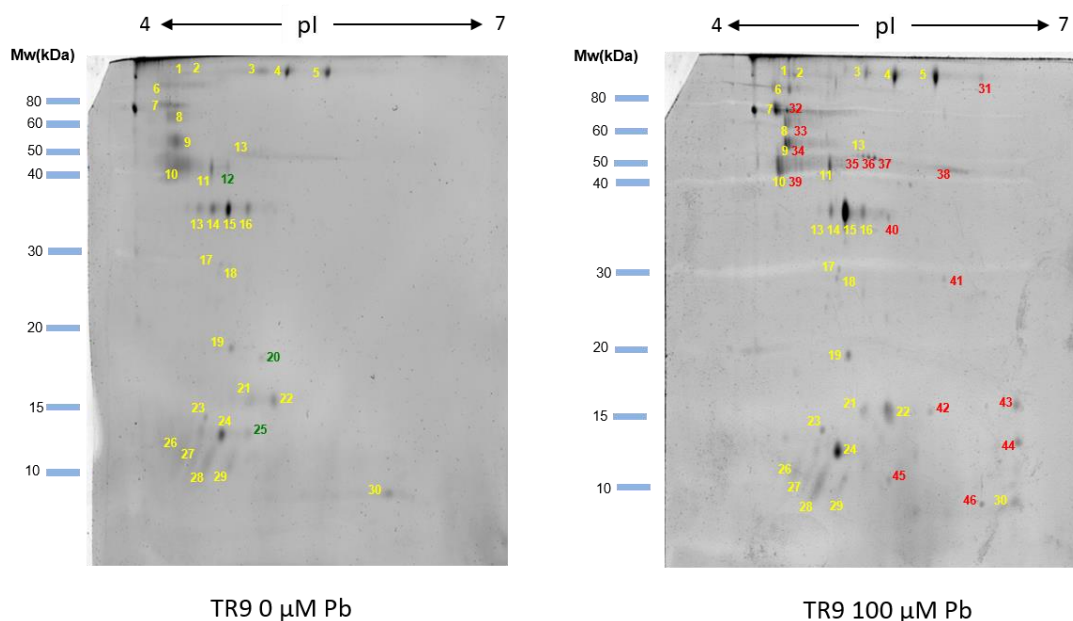


Figura 3.34. Electroforesis bidimensional del proteoma extracelular de *Trebouxia* sp. TR9, en condiciones control y tratada con 100 μ M Pb durante una semana. Las PE fueron extraídas y separadas por isoelectroenfoque (cargándose 15 μ g de PE) seguido de SDS-PAGE (10% acrilamida). Los patrones polipeptídicos fueron revelados por tinción con el agente SYPRO®Ruby, según se describe en el apartado 2.2.10. de Materiales y Métodos. Los números en amarillo muestran aquellos *spots* coincidentes en los ambos tratamientos, mientras que en verde y en rojo se muestran los diferencialmente expresados en la condición control y 100 μ M Pb, respectivamente. Se muestran resultados representativos de experimentos repetidos dos veces (réplicas independientes).

En general, tanto TR1 como TR9 poseen un proteoma extracelular amplio compuesto por, al menos, 60 y 46 polipéptidos totales, respectivamente. En general, estos conjuntos polipeptídicos configuran patrones electroforéticos claramente diferenciados, por Punto Isoeléctrico (PI) y Masa Molecular (MM), entre ambas especies de algas (**Figuras 3.33 y 3.34**). La mayor parte de los *spots* observados en los proteomas de las dos especies se concentran en rangos de masas moleculares medios (80-30 kDa) y bajos (20-10 kDa). Sin embargo, existe un relativamente alto número de *spots* de elevada masa molecular y proporcionalmente más abundantes en TR9 respecto de TR1.

Cabe destacar que a pesar de las diferencias señaladas, el proteoma extracelular constituyó un componente altamente dinámico de los EPS de ambas

algas, ya que en ambos casos se producen variaciones cualitativas con los tratamientos de Pb, como se muestra en las **Figuras 3.33** y **3.34**. Por una parte, TR1 presenta un número de polipéptidos “estables” ligeramente mayor, que permanecen inalterables en los diferentes tratamientos, respecto de TR9, los cuales representan 62% y un 58% del proteoma global del primer y segundo alga, respectivamente (**Figura 3.35**). Asimismo, ambos exoproteomas aumentan en complejidad con el tratamiento, observándose un aumento en número de polipéptidos específicos, que es más acusado en el caso de TR9 representando un 35% del exoproteoma global.

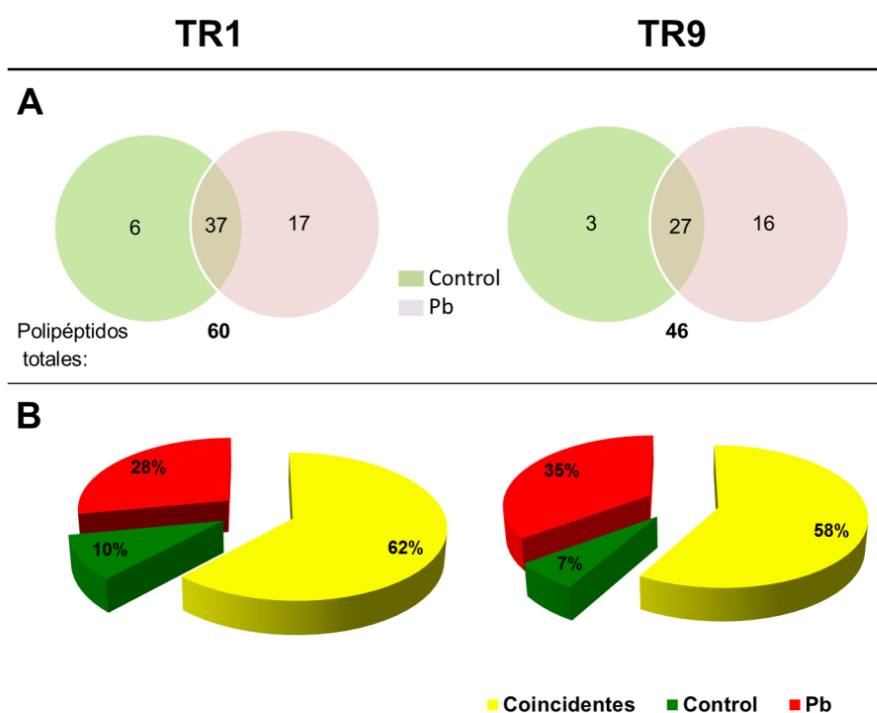


Figura 3.35. Análisis global de los polipéptidos estables y variables en el exoproteoma de *Trebouxia* sp. TR1 y TR9, tratadas con 0 y 100 μ M Pb durante una semana. (A) Bajo cada figura se muestra el total de polipéptidos identificados para cada especie. En las zonas de superposición se indican el número de polipéptidos coincidentes entre las células tratadas con Pb y el control. Los datos han sido obtenidos a partir de las electroforesis bidimensionales similares a las mostradas en las **Figuras 3.33** y **3.34**. **(B)** En amarillo se muestra la abundancia relativa (%) de los polipéptidos comunes a condiciones experimentales, en rojo la de aquellos encontrados solo en las células tratadas con Pb y en verde los que aparecen en las células control. Estos datos proceden del tratamiento porcentual de los datos recogidos en la **Figura 3.35 A**.

El ficobionte TR9 posee otra peculiaridad, además de los cambios cualitativos en el exoproteoma antes mencionados, se observan claras diferencias cuantitativas en la abundancia de polipéptidos comunes a las condiciones control y al tratamiento con Pb. En la **Figura 3.36** se aprecia un aumento en la intensidad de los *spots*, como por ejemplo los *spots* 4 y 5 de la parte superior, pero sobretodo llama la atención el gran incremento en la abundancia de los *spots* 15 y 24 en el exoproteoma de TR9 como consecuencia de la exposición a Pb.

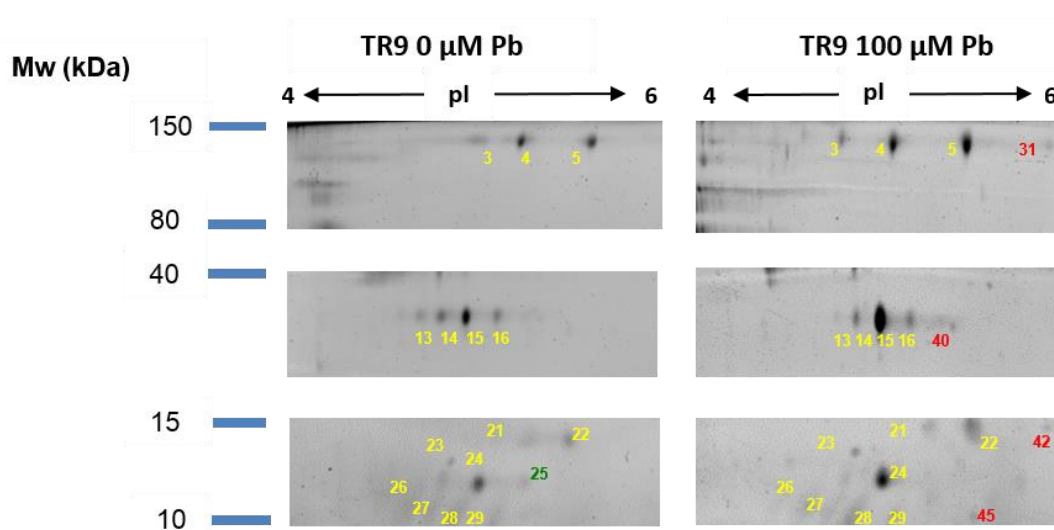


Figura 3.36. Cambios cuantitativos en el exoproteoma de *Trebouxia* TR9 Se muestran tres grupos de polipéptidos que experimentan cambios significativos en su abundancia en TR9 producidos por los tratamientos con 100 μM Pb durante una semana. Los números en amarillo muestran aquellos *spots* coincidentes en los diferentes tratamientos, mientras que en verde y en rojo se muestran los específicos de los tratamientos 0 y 100 μM Pb, respectivamente. Estos números identificativos de los *spots* se corresponden con los mostrados en la **Figura 3.34**.

3.4.2. Discusión

La imagen de la **Figura 3.37** muestra claramente que las algas TR1 y TR9 tienden a adherirse entre ellas, sugiriendo la participación de sustancias extracelulares secretadas por dichas algas en procesos de adhesión. Hace varias décadas, Ahmadjian *et al.* (1978) demostraron la existencia de material extracelular alrededor de las células del ficobionte del líquen *Huila albocaerulescens*, *Trebouxia glomerata*, y de las células de *Asterochloris erici*, el ficobionte de *Cladonia cristatella*. La existencia de esta matriz alrededor de los ficobiontes, era similar tanto en el “líquen natural” como en el “líquen sintético” o en el “estado presimbótico”, lo que sugiere que la producción de este material extracelular podría contribuir al reconocimiento y la unión de ambos simbiontes.

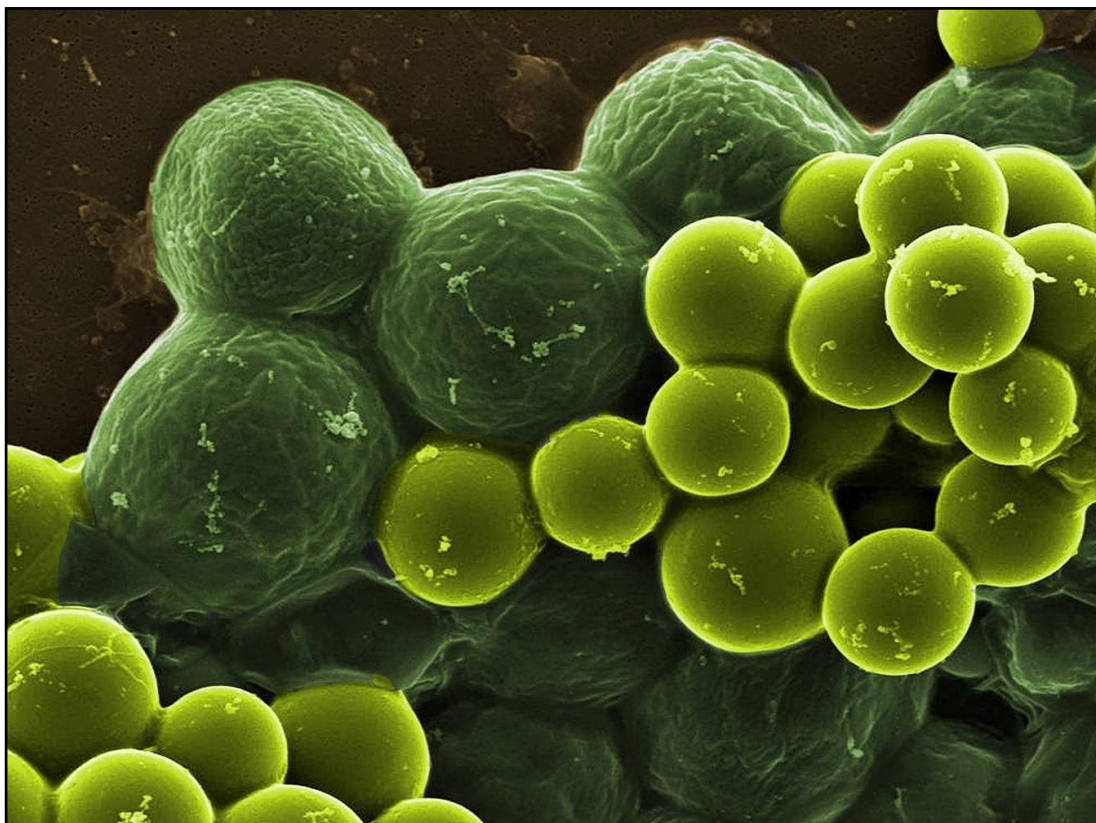


Figura 3.37. Imágenes de *Trebouxia* TR1 y TR9 obtenida por microscopía electrónica de barrido (SEM). La imagen fue tomada en la Universidad de Valencia por la Dra. Eva Barreno Rodríguez y el Dr. Francisco García Breijo Los colores falsos (TR1 coloreada en verde claro y TR9 en verde oscuro) resaltan la topografía y los distintos planos de la muestra.

Se ha estudiado con bastante detalle la composición de los EPS de algunas bacterias (Werning *et al.*, 2012), cianobacterias (Pereira *et al.*, 2009), algas acuáticas (Fang *et al.*, 2014) y algas terrestres de vida libre (Hokputsa *et al.*, 2003). Sin embargo, la bibliografía sobre los EPS de autótrofos unicelulares es muy escasa y prácticamente inexistente para las algas liquénicas que nos competen. Los resultados obtenidos sobre la composición de los EPS de TR1 y TR9 constituyen la primeras evidencias experimentales sobre la composición de esta cubierta extracelular en algas liquénicas, cuya existencia solo habíamos podido constatar por observaciones microscópicas (**Figuras 3.13, 3.23 y 3.37**).

Nuestros resultados indican que las dos microalgas estudiadas en la presente tesis efectivamente producen EPS, y que estos contienen principalmente tanto polisacáridos como proteínas. Ambos tipos de polímeros son característicos de cada especie, como lo indican las diferencias cuantitativas y cualitativas encontradas en la composición de los exopolisacáridos y exoproteínas. Las principales características de los exopolisacáridos vienen determinadas por los monosacáridos que los forman y por la abundancia relativa de cada uno de estos residuos de azúcares. En concordancia con lo observado en diferentes grupos de microorganismos, hemos encontrado claras diferencias en la composición glicosídica de los exopolímeros de *Trebouxia* sp. TR1 y TR9. Desde un punto de vista cualitativo, la mayoría de las cianobacterias (75%) presentan heteropolisacáridos muy complejos, formados por seis o más monosacáridos. Se ha sugerido que esta complejidad está relacionada con el bajo nivel de las cianobacterias en la escala evolutiva (De Philippis *et al.*, 1998).

Este panorama contrasta con la composición glicosídica de los exopolisacáridos en otras bacterias y en macroalgas, la cual es mucho más simple, consistiendo por lo general en polímeros de menos de cuatro monosacáridos (Pereira *et al.*, 2009). Tanto TR1 como TR9 presentan 6 o 7 monosacáridos, lo que las acerca más a las cianobacterias en cuanto a la composición glicosídica de su capa

extracelular (**Figura 3.29**), mostrando una clara heterogeneidad en la composición de sus polisacáridos. Asimismo, cabe señalar que no se observaron diferencias cualitativas importantes entre ambas especies, ya que se han identificado los mismos monosacáridos en las dos algas, con la excepción de la presencia de fucosa solo en los EPS de TR9. Todos estos azúcares están presentes también en cianobacterias, siendo la cantidad relativa de cada monosacárido específica para cada especie. En la mayor parte de las cianobacterias, la glucosa es el monosacárido mayoritario (De Philippis *et al.*, 1998), sin embargo para TR1 y TR9 lo es la galactosa. La arabinosa es un componente mayoritario en cianobacterias, alrededor del 40% en *Anabaena* sp. (Bhatnagar *et al.*, 2014), mientras que solo resultó relativamente abundante en los exopolisacáridos de *Trebouxia* sp. TR9. Esta es una diferencia interespecífica interesante, ya que se ha propuesto que los niveles de arabinosa estarían correlacionados con el grado de flexibilidad de los polisacáridos para absorber las deformaciones en la pared celular que generan los cambios bruscos en el contenido hídrico (Moore *et al.*, 2008). Asimismo, resulta relevante la ramnosa, desoxihexosa con carácter hidrofóbico, que contribuye significativamente a las propiedades emulgentes de los polisacáridos (Pereira *et al.*, 2009) y cuya presencia es también más elevada en TR9.

Por otra parte, el aspecto probablemente más notable que diferencia los EPS de TR1 y TR9 es su abundancia en ácidos urónicos, la cual es aproximadamente cuatro veces mayor en TR9 respecto de TR1 (**Tabla 3.6**). Asimismo, la presencia de Pb provocó un cambio en la distribución de ácidos urónicos, hacia exopolisacáridos de menor tamaño, en ambas algas (**Figura 3.30**). La capacidad de los polisacáridos para unir cationes metálicos divalentes y trivalentes depende principalmente de número de grupos carboxilo ($-\text{COOH}$) presentes en sus componentes (Davis *et al.*, 2003). Es posible que polisacáridos cargados de menor tamaño resulten más eficaces en la inmovilización del Pb. En cualquier caso, el significado fisiológico de este cambio

cualitativo en distribución de dichos polisacáridos queda para ser abordado en futuras investigaciones. Por otra parte, estudios recientes sobre la estructura de los carbohidratos presentes en la pared celular de *Trebouxia* sp., han demostrado la presencia de heteropolisacáridos ricos en galactofuranosa que tienen efectos biológicos sobre el sistema inmunológico de mamíferos y que además podrían jugar un papel fundamental en el establecimiento de la simbiosis líquénica (Cordeiro *et al.*, 2008; Rattmann *et al.*, 2013). Debido al interés que suscitan estos resultados y a la escasa información disponible sobre la composición polisacáridica de las cubiertas de los ficobiontes, nuestros trabajos próximos consistirán en volver a aislar exopolisacáridos para realizar un análisis de ligación glicosídica a fin de determinar la naturaleza de sus polisacáridos constitutivos.

Cabe señalar que mientras que los exopolisacáridos de TR1 y TR9 no experimentaron variaciones drásticas en su composición por efecto del tratamiento con Pb, los proteomas extracelulares sí que experimentaron variaciones importantes (**Figuras 3.32, 3.33 y 3.34**). Así pues los exoproteomas de ambas algas resultaron muy dinámicos y bastante complejos, identificándose en ambas especies más de una decena de proteínas que se expresaban diferencialmente en presencia de Pb. En otras especies de microalgas no se encuentran polipéptidos tan grandes en la fracción extracelular, como en el caso de *Coccomyxa geitleri*, donde la mayoría no sobrepasan los 30 kDa (Pivokonsky *et al.*, 2014) y tampoco para cianobacterias como *Nostoc commune*, que posee un grupo de exoproteínas ácidas de pesos menores a 40 kDa (Potts, 1999). Tradicionalmente, se le ha atribuido al exoproteoma de bacterias y cianobacterias un papel estructural, estabilizando la pared celular, aunque en estudios recientes se han hallado evidencias de una posible acción enzimática modificando los polisacáridos (Potts, 1999) o contribuyendo a la protección antioxidante celular (Shirkey *et al.*, 2000). En otros casos, como por ejemplo en *Nostoc calcicola* y *Schizothrix* sp., los polipéptidos extracelulares se encuentran formando complejos con

polisacáridos (proteoglicanos y/o glicoproteínas) con altas proporciones de aminoácidos ácidos, Asp y Glu, los cuales incrementan las cargas negativas de la superficie celular y contribuyen a la capacidad de quelación de partículas electropositivas (Flaibani *et al.*, 1989; Kawaguchi & Decho, 2001; 2002). Los patrones de 2D-PAGE obtenidos en nuestros experimentos muestran un mayor número de cambios cualitativos y cuantitativos en el exoproteoma de TR9 que en el de TR1 como consecuencia de la exposición a Pb (**Figuras 3.33, 3.34 y 3.35**). Estos cambios podrían estar relacionados, junto con los observados en la fracción polisacáridica, con la mayor capacidad de TR9 para quelar este metal pesado a nivel extracelular, evitando su incorporación intracelular.

En futuros estudios se empleará la tecnología DIGE (Electroforesis diferencial de proteínas en gel) con marcadores fluorescentes para poder realizar comparaciones sistemáticas de los patrones de *spots* obtenidos mediante 2D-PAGE que permitan extrapolar los resultados obtenidos de gel a gel, reduciendo así las diferencias producidas por variaciones de las condiciones experimentales. Además, mediante DIGE podrá realizarse un análisis cuantitativo exacto de las diferencias existentes entre los *spots* de las diferentes muestras. Según los datos obtenidos podrán conocerse la identidad de las proteínas que se expresan de forma diferencial en las diferentes muestras, analizando los *spots* mediante huella peptídica y fragmentación de péptidos mediante espectrometría de masas (MALDI-TOFF/TOF). La secuenciación del genoma de *Trebouxia* sp. TR9 y su anotación, que nuestro grupo de investigación está llevando a cabo en coordinación con el grupo de Liquenología del Dpto. de Botánica de la Universidad de Valencia, será un elemento clave en la identificación de dichos polipéptidos.

3.5. Efecto del plomo sobre el estado oxidativo de *Ramalina farinacea* y sus fotobiontes aislados durante la rehidratación

Diferentes estudios han demostrado la existencia de una comunicación efectiva entre micobiontes y fotobiontes, e incluso de la capacidad de un socio para regular el sistema antioxidante del otro, dotando a la asociación simbiótica de una importante ventaja adaptativa y éxito evolutivo (Kranner *et al.*, 2005; Catalá *et al.*, 2013). Puesto que los dos ficobiontes de *R. farinacea* parecen haber desarrollado estrategias específicas que les permiten tener niveles similares de tolerancia a Pb (apartados 3.1 y 3.2 de Resultados), nos propusimos comparar los efectos de la rehidratación en presencia de Pb sobre talos de *R. farinacea* y los de sus ficobiontes aislados.

Dado que los experimentos iban a realizarse a partir de talos de *R. farinacea* recolectados una población de El Escorial (Madrid) que no había sido caracterizada molecularmente en trabajos previos, comenzamos con la caracterización genética (tanto micobiontes como ficobiontes) de una muestra de dicha población. Posteriormente, tanto talos liquénicos como sus microalgas aisladas fueron sometidos a diferentes tratamientos de deshidratación y después rehidratación en presencia de Pb durante la cual se analizaron las cinéticas de producción intracelular de ROS, el daño oxidativo de membranas celulares y la autofluorescencia de clorofila. El principal objetivo de estos experimentos fue conocer posibles diferencias en la fisiología de la rehidratación en presencia/ausencia de Pb en los diferentes simbiontes, y poder así conocer cuál es la contribución de cada ficobionte en la tolerancia al estrés abiótico y daño celular en el comportamiento global del holobionte.

3.5.1. Resultados

3.5.1.1. Caracterización molecular de los talos de *R. farinacea*

Como queda detallado en el punto 1.4. de la Introducción, en trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación se analizó la estructura genética de diferentes poblaciones de *R. farinacea* procedentes de Península Ibérica, Islas Canarias y California (Casano *et al.*, 2011; del Campo *et al.*, 2013). Las evidencias morfológicas y moleculares indicaron que todos los talos analizados albergaban los dos ficobiontes: *Trebouxia* sp. TR1 y TR9. Sin embargo, TR1 parecía ser el fotobionte “predominante” o al menos el más abundante relativamente, mientras que TR9 fue el ficobionte “no predominante” en todas las muestras a excepción de los talos recolectados en las Islas Canarias. Por lo tanto los talos eran heterogéneos y la relativa abundancia de cada ficobionte no era constante si no que podía variar dependiendo de la población (debido a mecanismos subyacentes desconocidos).

Como se ha mencionado anteriormente, en el presente estudio empleamos talos procedentes de una nueva población, recolectada en El Escorial (Madrid) en la zona central de España, no estudiada previamente. Esta nueva población fue caracterizada empleando marcadores moleculares específicos con los siguientes propósitos:

1. Corroborar la identificación de los talos recolectados como *R. farinacea*.
2. Confirmar la probable coexistencia de TR1 y TR9 en cada talo y estimar la predominancia de una u otra.
3. Valorar posibles correlaciones entre la predominancia de uno de los ficobiontes, su respuesta fisiológica individual y la del talo liquénico completo.

Para ello, se realizaron extracciones de ADN total de una muestra aleatoria de doce talos recolectados. La identidad del micobionte como *R. farinacea* se confirmó mediante la secuenciación de los ITSnr del micobionte en seis de las muestras, tal y

como se describe del Campo *et al* (2013) (accesos: KJ413040, KJ413041, KJ413042, KJ413043, KJ413044 y KJ4130). Para comprobar la identidad de los ficobiontes se amplificó una porción del 23S ADNr con los cebadores 23Sps1 y 23Sps2 (apartado 2.2.5.2. de Materiales y Métodos) (**Figura 3.38 A**). Los ADNs de todos los talos produjeron una banda de aproximadamente 0,6 Knt (**Figura 3.38 B**).

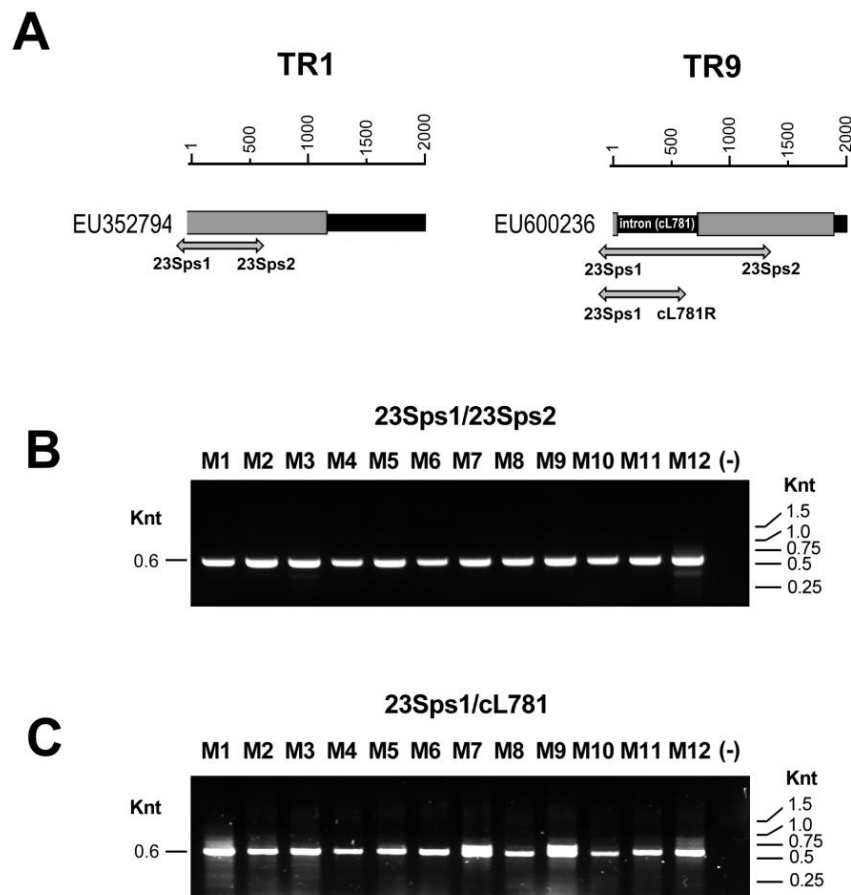


Figura 3.38. Caracterización molecular del micobionte y los ficobiontes presentes en los talos de *R. farinacea* procedentes del Escorial (Madrid, España). (A) Mapas genéticos de la región secuenciada del 23S ADNr en los ficobiontes *Trebouxia* sp. TR1 y TR9. Los rectángulos grises representan los exones. Los intrones se indican como rectángulos negros entre los exones. Solo se indica el nombre del intrón cL781. Los productos de amplificación esperados y los nombres de los cebadores empleados se indican debajo de cada mapa con flechas grises. Electroforesis en gel de agarosa (2%) de los productos amplificados con el par de cebadores 23Sps1/23Sps2 (**B**); y 23Sps1/cL781R (**C**). Las amplificaciones fueron realizadas con ADN extraído de los doce talos (M1-M12) recolectados en El Escorial (Madrid, España). Los controles negativos (-) corresponden a reacciones de PCR sin ADN. Los tamaños de los marcadores moleculares, y de los productos de amplificación obtenidos, se indican a la derecha y a la izquierda, respectivamente.

Las secuencias de seis muestras seleccionadas al azar resultaron ser idénticas, o similares a secuencias del ficobionte TR1 publicadas previamente por del Campo *et al.* (2013) (accesos: KJ413046, KJ413047, KJ413048, KJ413049, KJ413050, KJ413051). Para verificar que TR9 coexiste con TR1 en todos los talos, como se había demostrado previamente (Casano *et al.* 2011), empleamos el par de cebadores: 23Sps1 y cL781R (**Figura 3.38 A**). El cebador cL781R amplifica ADN del ficobionte TR9 (por albergar el intrón cL781) pero no de TR1 (que carece de dicho intrón). Tal y como muestra la **Figura 3.38 C**, todas las muestras produjeron amplificados del tamaño esperado (0,6 Kb). La secuenciación de estas bandas confirmó su pertenencia a ficobiontes tipo TR9.

Cabe destacar que cuando se empleó el par de “cebadores universales” para los ITSnr de algas del género *Trebouxia* (Kroken & Taylor, 2000), se obtuvo una única secuencia algal de ITSnr en cada talo que correspondía inequívocamente al ficobionte TR1. Por lo tanto, esta especie de ficobionte fue considerada como el ficobionte “predominante”. El ficobionte menos abundante solamente fue detectado usando el par de cebadores específicos (23Sps1/cL781R) y correspondió a TR9. En definitiva, estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos (del Campo *et al.*, 2010; Casano *et al.*, 2011), siendo los talos de *R. farinacea* recolectados en El Escorial una población del líquen de tipo mediterráneo en la que *Trebouxia* TR1 es el ficobionte “predominante”.

3.5.1.2. Efecto del plomo en el estado oxidativo de *R. farinacea* y en la autofluorescencia de clorofila durante la rehidratación

Para estudiar la respuesta fisiológica de *R. farinacea* durante la rehidratación en presencia de plomo, los talos líquénicos deshidratados fueron incubados con diferentes soluciones acuosas que contenían 0 y 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y se monitorizó la cinética de producción intracelular de ROS durante 165 min empleando la sonda

fluorescente DFCH₂-DA (siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2.11. de Materiales y Métodos). La presencia de Pb en la solución de rehidratación tuvo un fuerte impacto en la formación de radicales libres (**Figura 3.39 A**), especialmente durante los primeros 90 minutos de rehidratación. El metal pesado no solo disminuyó de forma significativa y progresiva el nivel de ROS con respecto a los valores control, sino que también produjo un cambio en la cinética de generación de ROS. A partir de los 90 min, el nivel de ROS en los talos rehidratados con Pb se mantuvo por debajo del 40% de los valores control.

Sin embargo, es destacable que la cantidad absoluta de ROS en los talos control incrementó de forma continuada durante la primera hora de rehidratación hasta 10 veces respecto del valor inicial, mientras que en los talos rehidratados con Pb este aumento fue solo cuatro veces superior. Los lípidos en general son las principales dianas de ROS (Schutzendubel & Polle, 2002) y particularmente los ácidos grasos experimentan un daño oxidativo de carácter autopropagativo denominado peroxidación lipídica, que puede ser valorada a través de la determinación de productos metaestables capaces de reaccionar con ácido barbitúrico (TBARS). Los resultados de la **Figura 3.39 B** muestran que la presencia de Pb durante la rehidratación no afectó significativamente al patrón de formación de TBARS con respecto al control. Es posible que el nivel de ROS en los talos de *R. farinacea* rehidratados con Pb fuera suficiente para causar el mismo grado de peroxidación que el observado en los talos rehidratados con agua.

La autofluorescencia de clorofila es otro parámetro fisiológico relacionado con el daño oxidativo de membranas y con la integridad y funcionalidad del aparato fotosintético. En la **Figura 3.39 C** se detallan los valores de autofluorescencia de clorofila registrados durante la rehidratación de los talos. Se produjo un aumento brusco de la autofluorescencia de clorofila durante la rehidratación con agua, mientras que la presencia de Pb disminuyó hasta un 80% del valor control durante los primeros

75 min y después hasta un 60% aproximadamente. Estos resultados indican una caída o ralentización en la reorganización de los sistemas de captación de energía lumínica. Puesto que la cadena fotosintética de transporte de electrones es uno de los principales sitios de generación de ROS (del Hoyo *et al.*, 2011), el descenso en la autofluorescencia de clorofila observada en los talos rehidratados con Pb, podría tener una relación causal con la baja tasa de producción de radicales libres observada en estos talos.

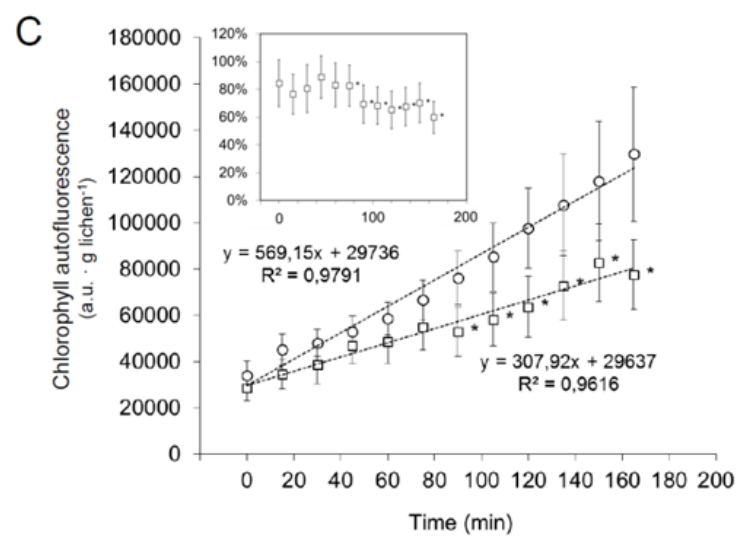
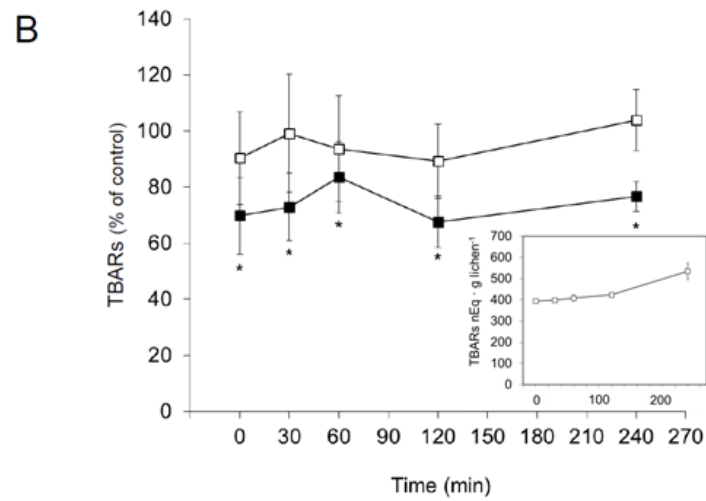
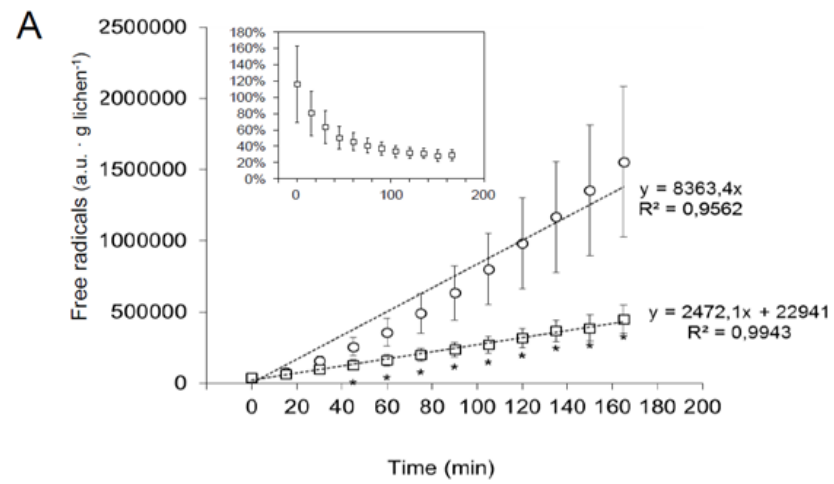


Figura 3.39. Efecto del Pb en el estado oxidativo de los talos de *R. farinacea* durante la rehidratación. La figura muestra las cinéticas de producción intracelular de radicales libres (**A**) y de autofluorescencia de clorofila (**C**) en talos rehidratados con agua ultrapura (\circ) o con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (\square). Las unidades de fluorescencia son arbitrarias por lo que la comparación de magnitudes relativas solo es posible dentro del mismo gráfico. Los insertos en las gráficas (**A**) y (**C**) muestran los niveles de producción intracelular de radicales libres y de autofluorescencia de clorofila, respectivamente, referidos al control. El contenido de TBARS respecto al control en talos rehidratados con 50 (\blacksquare) y 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (\square) se presenta en el apartado (**B**) de la figura, mostrándose en el inserto la cantidad de TBARS [$\text{nEq.g}(\text{FW})^{-1}$] presente en talos rehidratados con agua ultrapura. Los símbolos representan valores medios de 12, o al menos 6 réplicas, así como las barras de error asociadas ($\pm\text{ES}$). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto del control ($p^* < 0.05$).

3.5.1.3. Formación intracelular de ROS y parámetros oxidativos durante la rehidratación en ficobiontes aislados de *R. farinacea*

Los siguientes apartados, muestran la cinética de formación intracelular de radicales libres del oxígeno y otros parámetros relacionados con la oxidación (TBARS y autofluorescencia de clorofila) en TR1 y TR9 durante la rehidratación. Los ficobiontes previamente aislados y deshidratados, fueron rehidratados con agua ultrapura y con dos soluciones diferentes de Pb. Estas soluciones tenían unas concentraciones de 50 y 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, siendo esta última la misma que en los estudios de rehidratación en talos y la anterior una simulación del posible “efecto de biosorción” producido por el micobionte que podría ser una barrera que redujese la cantidad de metal disponible para las células de ficobionte. Por otra parte, son las mismas concentraciones empleadas en experimentos fisiológicos con los mismos ficobiontes aislados referidos en capítulos anteriores de esta Tesis (3.2. y 3.3.).

3.5.1.3.1. Efecto en TR1 y TR9 de la rehidratación con agua ultrapura

La **Figura 3.40** muestra las repuestas fisiológicas de TR1 y TR9 tras la rehidratación con agua ultrapura. TR1 y TR9 presentaron patrones de formación intracelular de ROS completamente diferentes, a nivel cuantitativo pero también cualitativo, tal como aparece en la **Figura 3.40 A**. De hecho, mientras que la cantidad de radicales libres aumentó linealmente durante la rehidratación en TR9, en TR1

observamos que estos niveles apenas experimentaron variaciones durante los primeros 105 min de rehidratación. Sin embargo a partir de ese momento y hasta los 165 min, se produjo en TR1 un aumento en los niveles de ROS que alcanzaron valores hasta un 40% más de los iniciales. Cabe señalar que los cultivos rehidratados de TR1 siempre produjeron una mayor cantidad de ROS que la producida por los de TR9. Las diferencias relativas en los niveles intracelulares de ROS entre TR1 y TR9 oscilan entre 6,5 y 4,5 veces, al principio y al final del periodo del estudio de rehidratación, respectivamente. Es interesante comprobar que en las medidas de autofluorescencia de clorofila se encontraron diferencias cuantitativas similares entre ambos ficobiontes (**Figura 3.40 C**). Este parámetro no experimentó cambios significativos durante la rehidratación en ninguna de las dos especies. Sin embargo, este valor se mantuvo unas 6,5 veces mayor en TR1 que en TR9. Por otro lado, las grandes diferencias en la producción de ROS observadas entre ambas algas no parecieron tener ningún impacto sobre la peroxidación lipídica, pues la cantidad de TBARS en TR1 y TR9 durante la rehidratación fue muy similar (**Figura 3.40 B**).

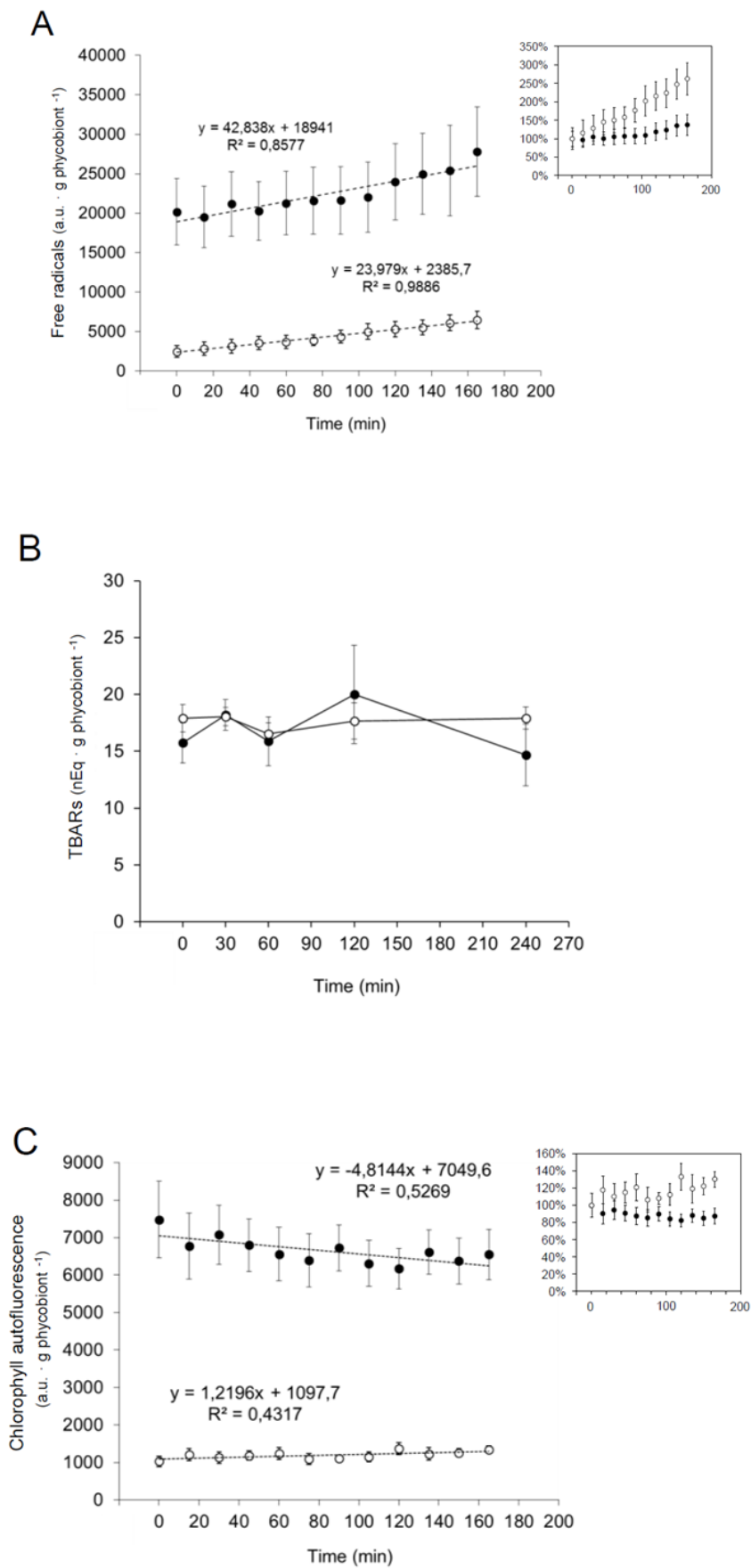


Figura 3.40. Efecto de la rehidratación en cultivos de *Trebouxia* sp. TR1 y TR9. La figura muestra las cinéticas de producción intracelular de radicales libres (A) y de autofluorescencia de clorofila (C) en TR1 (●) y TR9 (○) rehidratadas con agua ultrapura. Los insertos en (A) y (C) representan los porcentajes de radicales libres intracelulares y de autofluorescencia de clorofila referidos al control, respectivamente. En el apartado (B) de la figura, se presenta el contenido de TBARS [nEq.g(FW)^{-1}] en TR1 (●) y TR9 (○) rehidratadas con agua ultrapura. Los símbolos representan valores medios de 12, o al menos 6 réplicas, así como las barras de error asociadas (\pm ES).

3.5.1.3.2. Efecto en TR1 y TR9 de la rehidratación en presencia de plomo

Cuando la rehidratación fue realizada con soluciones acuosas que contenían 50 o 100 $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$, pudieron observarse respuestas fisiológicas significativamente diferentes en ambos fotobiontes (**Figuras 3.41 y 3.42**). En TR1 se observó una disminución en la formación intracelular de ROS que siguió diferentes patrones temporales según la concentración del metal (**Figura 3.41 A**). Cuando la rehidratación fue con la solución 50 $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$, los ficobiontes mostraron una lenta pero progresiva reducción del nivel de ROS intracelular hasta representar solo un 40% del valor control transcurridos 160 min de rehidratación. La rehidratación en presencia de 100 $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$ produjo en TR1 un descenso más pronunciado en el nivel de ROS hasta un 40-45% respecto del control a los 30 min de rehidratación (**Figura 3.41 A**).

Sin embargo, ambos tratamientos inducen un efecto bastante diferente en el caso de TR9 (**Figura 3.42 A**). Para el tratamiento de 50 $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$ este alga es capaz de reducir el nivel de radicales libres intracelulares hasta un 50% respecto a los valores control, prácticamente desde el comienzo de la rehidratación. En cambio para los tratamientos de mayor concentración (100 $\mu\text{M Pb}$) TR9 mantuvo unos niveles de producción de ROS similares a los del control hasta los 105 min desde el comienzo de la rehidratación. A partir de ese momento se observa un aumento constante de la producción de ROS hasta aproximadamente un 40% del control (**Figura 3.42 A**).

Los efectos del Pb y la rehidratación sobre la autofluorescencia de clorofila en los ficobiontes reflejaron claramente los resultados anteriores de formación de

radicales libres. En la **Figura 3.41 C** puede comprobarse como la autofluorescencia de clorofila en TR1 se redujo hasta un 50% y 40% con respecto al control cuando se rehidrataban en presencia de 50 y 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, respectivamente. Sin embargo, en TR9 se observó un descenso en este parámetro fotosintético cuando la concentración de Pb era 50 μM y por otro lado un aumento cuando la rehidratación tuvo lugar con 100 μM Pb (**Figura 3.42**), guardando estos cambios una proporción similar a la observada para la producción de radicales libres.

Tal como muestran las **Figuras 3.41 B** y **3.42 B**, la presencia de Pb provocó una significativa y a la vez transitoria disminución de la peroxidación lipídica en ambos fotobiontes a los 30 min del inicio de la rehidratación. Sin embargo, posteriormente se observaron diferencias entre ambas que fueron dependientes de la dosis y del tiempo. Cuando se hidrató con 50 μM Pb, TR1 no modificó sus niveles de TBARS con respecto al control, mientras que con 100 μM Pb se observó una disminución aproximada de la peroxidación lipídica respecto a los controles del 30% y 40% a los 60 y 120 min de rehidratación, respectivamente, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas. Al contrario ocurrió con TR9, que mantuvo unos niveles de TBARS más bajos respecto del control al rehidratarse con 50 μM Pb, especialmente a las dos horas de rehidratación. En las siguientes dos horas la peroxidación lipídica aumentó suavemente tanto en TR9 como en TR1 y para ambas concentraciones de Pb, mostrando unos niveles de TBARS todavía por debajo de los controles (80-90%) aunque sin ser estas diferencias con los controles estadísticamente significativas.

Por otro lado, parece existir una relación cualitativa, no estrictamente cuantitativa, entre las cinéticas de formación de ROS intracelular y las de TBARS (**Figuras 3.41 A** y **3.42 A**, y las **Figuras 3.41 B** y **3.42 B**, respectivamente). Por lo que dos combinaciones diferentes de especies y de concentraciones específicas de Pb

fueron las más efectivas para disminuir los niveles de radicales libres y de peroxidación lipídica: 100 μM Pb en TR1 y 50 μM en TR9.

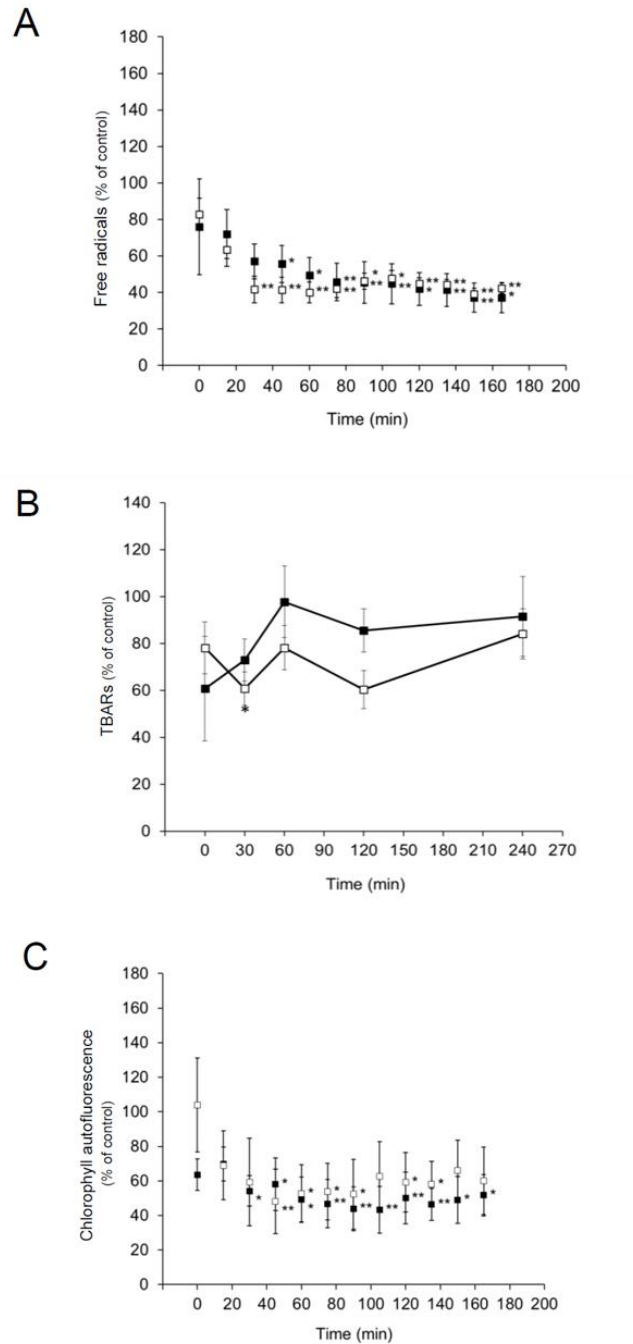


Figura 3.41. Rehidratación de cultivos del ficobionte *Trebouxia sp.* TR1 en presencia de Pb. Cinética de formación intracelular de radicales libres (**A**), peroxidación lipídica (TBARS) (**B**) y autofluorescencia de clorofila (**C**), referidos a los controles, en ficobiontes TR1 aislados y rehidratados con 50 μM y 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_2)_3$. Los símbolos representan valores medios de 12 réplicas, así como las barras de error asociadas ($\pm\text{ES}$). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto del control ($p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.005$).

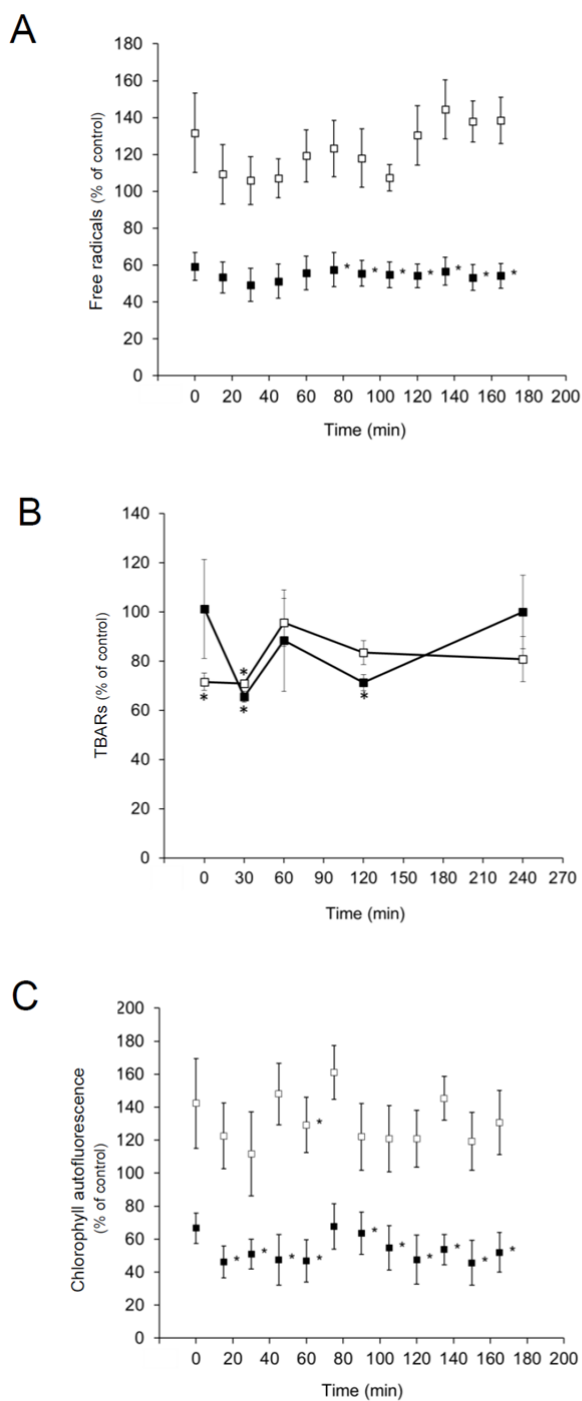


Figura 3.42. Rehidratación de cultivos del ficobionte *Trebouxia* sp. TR9 en presencia de Pb. Cinética de formación intracelular de radicales libres (A), peroxidación lipídica (TBARS) (B) y autofluorescencia de clorofila (C), referidos a los controles, en ficobiontes TR9 aislados y rehidratados con 50 μM y 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_2)_3$. Los símbolos representan valores medios de 12 réplicas, así como las barras de error asociadas ($\pm\text{ES}$). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto del control ($p^* < 0.05$).

3.5.2. Discusión

Estos resultados sugieren que el plomo estimula un mecanismo de defensa conocido como “repuesta hormética” que en este caso involucraría, al menos en parte, la activación del sistema de defensa antioxidante o de neutralizadores de radicales libres (Poschenrieder *et al.*, 2013).

En general el fotobionte representa entre un 5 y un 7% de la biomasa total del líquen, frente al más del 90% que corresponde al micobionte (Barreno, 2004). Sin embargo estas proporciones no parecen reflejar la contribución de relativa de cada simbiote a la formación de radicales libres intracelulares. Investigaciones previas (Catalá *et al.*, 2010; 2013) han demostrado que los ficobiontes son los socios simbióticos que más contribuyen cuantitativamente a la formación de ROS en líquenes. Puesto que en nuestros experimentos la producción de ROS no ha sido cuantificada usando estándares internos, la comparación entre el talo completo y fotobiontes aislados no fue posible. Sin embargo, la comparación de los patrones cinéticos y de la variación relativa de ROS proporcionó una información muy interesante. A los 165 min de rehidratación con agua, el talo de *R. farinacea* genera una cantidad de radicales libres equivalente a 15 veces su valor inicial. Este efecto podría deberse a las diferencias en la proporción de agua incorporada durante la rehidratación. Este proceso es muy rápido en algas deshidratadas (a los pocos minutos logran casi un 100% de rehidratación (Gasulla *et al.*, 2009)), mientras que en talo puede ser considerablemente más lento debido a la compleja estructura de multicapas formadas por las hifas del micobionte (Honegger, 2008).

La comparación de las cinéticas de producción de ROS, de autofluorescencia de clorofilas y de peroxidación lipídica entre el talo completo y ambos fotobiontes aislados, cuando se rehidrataron con agua ultrapura o en presencia de Pb, muestran un paralelismo entre el talo y TR1 (**Figuras 3.39-3.42**). Estos resultados concuerdan

con los obtenidos en la caracterización genética de los ficobiontes presentes en los talos de *R. farinacea* empleados en este estudio que indican que el ficobionte “predominante” es TR1 (**Figura 3.38**). Además, el paralelismo existente entre las dinámicas de formación intracelular de radicales libres en el talo y en TR1 nos llevan a pensar que presumiblemente el ficobionte pudiera ser la fuente inicial de fotoinducción de ROS durante la rehidratación. El estrecho contacto con las hifas del micobionte facilitaría la migración de ROS difusibles (como H₂O₂ y otros derivados metaestables de ROS) que podrían inducir y propagar la formación de más ROS en las células del micobionte. Se sabe que el Pb daña las membranas fotosintéticas debido a su afinidad por ligandos N- y S-, siendo la clorofila *b* y en consecuencia el fotosistema II especialmente sensibles a la toxicidad por Pb (Sharma & Dubey, 2008). Este efecto tóxico puede estar relacionado con la disminución de la autofluorescencia de clorofila observada en talos y en algas rehidratadas en presencia de Pb. Sin embargo, los resultados presentados en el apartado 3.2. indicaron que cuando TR1 y TR9 fueron expuestos a idénticas dosis de Pb durante una semana de duración, no se produjeron daños evidentes en clorofilas. Por lo tanto, es razonable especular que tanto en talo como en los ficobiontes (principalmente en TR1, en este caso) rehidratados en presencia de Pb podrían estar activándose mecanismos capaces de disipar de manera no dañina la energía absorbida, como sugiere la reducción de la autofluorescencia de clorofila observada en estos experimentos (**Figuras 3.39 y 3.41**). De ser así, dosis bajas de Pb durante la rehidratación podrían estar ejerciendo un efecto “hormético” capaz de inducir una respuesta defensiva rápida en los ficobiontes que prevendría la producción de radicales libres a nivel intracelular y reduciría por tanto el nivel de estrés oxidativo.

En conclusión, nuestros resultados permiten sostener que la presencia de relativamente bajas dosis de plomo (y posiblemente otros metales pesados) durante la entrada de agua a las células induce, tanto en *R. farinacea* como en sus ficobiontes

aislados, potentes mecanismos capaces de prevenir la explosión oxidativa provocada por el proceso de rehidratación. Estos mecanismos de protección parecen ser muy rápidos y podrían involucrar, al menos en parte, modulaciones de la autofluorescencia de la clorofila. La respuesta oxidativa del talo completo durante la rehidratación parece estar modulada principalmente por el ficobionte predominante, lo que podría tener importantes implicaciones ecofisiológicas y adaptativas ya que las proporciones de ficobiontes del talo pueden variar de población a población.

4. CONSIDERACIONES FINALES Y CONCLUSIONES

4.1. Consideraciones finales

Los estudios fisiológicos que llevados a cabo en las dos especies de ficobiontes aislados del liquen *Ramalina farinacea* (*Trebouxia* sp. TR1 y TR9) han demostrado un comportamiento diferente de cada uno de ellos frente al estrés oxidativo causado por incrementos en los niveles estacionarios de ROS como consecuencia de los diversos tratamientos: (i) incubación con CuHP; (ii) incubación con metales pesados Pb y Cd; (iii) rehidratación en presencia de Pb.

Los organismos poiquilohídricos están en equilibrio con la humedad atmosférica del ambiente, de la cual depende la hidratación de sus células. Dentro de los organismos poiquilohídricos se distinguen fundamentalmente dos estrategias de respuesta a desecación-rehidratación. Por una parte, están las llamadas “plantas reviviscentes”, vegetales vasculares que cuentan con cutícula cerosa, estomas, células altamente vacuolizadas y un sistema radical desarrollado. Todas estas características anatómicas permiten que en condiciones de sequía extrema, el proceso pérdida de agua sea relativamente lento (días-semanas) (Farrant *et al.*, 2010). La desecación lenta permitiría la expresión regulada de genes de defensa inducibles en las primeras etapas de la desecación que protegerían a la planta en las etapas siguientes y durante la rehidratación (Farrant *et al.*, 2010). Muchas de las plantas reviviscentes, dismantelan de manera ordenada sus membranas fotosintéticas durante el comienzo del período seco. De esta manera, previenen la explosión oxidativa que ocurriría por absorción de luz durante la rehidratación no disipable por mecanismos fotoquímicos y no fotoquímicos, que suelen reactivarse más tardíamente (Dinakar *et al.*, 2012).

La otra estrategia es propia de algas terrestres y líquenes. Estos organismos, a diferencia de las plantas reviviscentes, carecen de cutícula, estomas, grandes vacuolas y raíces que permitan controlar la velocidad del intercambio de agua, por lo

que la deshidratación ocurre mucho más rápidamente (en horas). Debido a estas características particulares, algunos investigadores han planteado que en estos organismos poiquilohídricos los mecanismos de tolerancia a estrés ambiental son caracteres constitutivos que preexisten a la situación de estrés (Gasulla *et al.*, 2013; Garces Cea *et al.*, 2014). Sin embargo, en esta Tesis Doctoral hemos demostrado que los ficobiontes aislados de *R. farinacea* TR1 y TR9 presentan mecanismos propios de protección que son constitutivos e inducibles, según la especie. Mientras que TR1 posee mecanismos metabólicos de defensa antioxidante constitutivamente altos, en TR9 los mecanismos constitutivos de defensa son más bien estructurales, como la presencia de una pared celular relativamente gruesa y de una capa de polímeros extracelulares cuantitativamente mucho más desarrollada y cualitativamente diferente respecto de TR1. Esta protección estructural se complementa con una menor tendencia a formar ROS, posiblemente por una mayor capacidad de disipación fotoquímica y no-fotoquímica de la energía luminosa absorbida. Todo ello permite a TR9 mantener constitutivamente poco activos sus sistemas clásicos de defensa antioxidante y de reparación celular; sin embargo estos son claramente inducibles ante condiciones de estrés.

Puesto que TR1 y TR9 presentan comportamientos ecofisiológicos claramente distintos y comparten el mismo microhábitat, el talo de *Ramalina farinacea*, es posible que ambos ficobiontes contribuyan a aumentar la capacidad del holobionte para adaptarse a las variaciones ambientales y colonizar nuevos nichos ecológicos. Evidencias anteriores de nuestro grupo indican que TR1 es el fotobionte predominante en las poblaciones de *Ramalina farinacea* procedentes de la Península Ibérica y California, mientras que TR9 es el más abundante en las poblaciones del líquen localizadas a altitudes elevadas en las Islas Canarias (Casano *et al.*, 2011; del Campo *et al.*, 2013). Si a estos resultados previos les sumamos los obtenidos en este estudio, cabe preguntarse si los cambios en la abundancia relativa de cada especie de

ficobionte en los talos se deben a las distintas condiciones ambientales de cada región, junto con las heterogéneas adaptaciones fisiológicas que poseen ambos fotobiontes para hacer frente al estrés oxidativo. Este fenómeno podría ser similar al llamado “*symbiont shuffling*” (en castellano, “barajado de simbioses”) descrito para otros organismos que también establecen simbiosis con algas unicelulares, los arrecifes de coral. Según el modelo de “*symbiont shuffling*”, dentro de los corales se producirían cambios cuantitativos en la abundancia relativa de las comunidades de algas y dinoflagelados simbioses, como resultado de cambios en la temperatura del medio (Backer, 2003; Goulet, 2006). Estudios recientes sugieren que la mayor tolerancia al incremento de temperatura en algunos clados de estos simbioses radica, al menos en parte, en la mayor estabilidad de sus membranas tilacoidales (Berkelmans & van Oppen, 2006).

En conclusión, *Ramalina farinacea* constituiría un modelo de simbiosis liquénica en el que es posible que la coexistencia de ambos ficobiontes en el mismo líquen se deba a que presentan comportamientos fisiológicos diferentes, y posiblemente complementarios, lo cual incrementaría la tolerancia del líquen a las cambiantes y a menudo estresantes condiciones ambientales.

4.2. Conclusiones

Las conclusiones principales de la presente Tesis Doctoral son las siguientes:

1. La comparación de la respuesta fisiológica de los ficobiontes de *R. farinacea*, *Trebouxia* sp. TR1 y TR9, frente al estrés oxidativo agudo producido por CuHP, indica que el ficobionte con mayor capacidad para preservar los componentes clave de su aparato fotosintético es TR9. Esta mayor tolerancia al estrés agudo podría ser consecuencia de una mayor capacidad de TR9 para acometer ajustes metabólicos clave, así como para inducir sus sistemas de protección antioxidante y de reparación celular.
2. Los ficobiontes TR1 y TR9 alcanzaron niveles semejantes de tolerancia a Pb mediante la integración de diferentes características anatómicas y fisiológicas. Mientras que TR9 retiene gran parte del metal como acúmulos en la cara externa de su pared celular, en TR1 la captación intracelular de Pb es tres veces mayor que en TR9. La inducción de la actividad de las enzimas antioxidantes GR, SOD y APX en TR9 da como resultado que en presencia de Pb se alcancen niveles de actividad total de cada enzima muy similares a los que posee constitutivamente TR1.
3. El metabolismo de biotioles es más activo en TR1 que en TR9, mantenido por unos niveles de GSH mayores que se deben a una elevada actividad GR y en buena medida a la síntesis de nuevo GSH vía γ -ECS.
4. Los ensayos con un inhibidor de la síntesis de GSH demuestran que a diferencia de TR9, la tolerancia de TR1 frente a metales pesados es muy dependiente de la síntesis de nuevo GSH para el mantenimiento del balance redox celular y, en el caso del Cd, la reposición del GSH empleado en la síntesis de PCs.

5. Las diferencias encontradas entre TR1 y TR9 en la ultraestructura de la pared celular y en la composición de los polímeros extracelulares (EPS) podrían explicar las diferentes capacidades de retención de Pb observadas en estos ficobiontes. Además, los exopolímeros de ambas algas resultaron muy dinámicos y bastante complejos, detectándose en ambas especies más de una decena de proteínas que se expresaron diferencialmente en presencia de Pb.
6. La presencia de Pb durante la rehidratación induce, tanto en *Ramalina farinacea* como en sus ficobiontes aislados, potentes mecanismos capaces de prevenir la explosión oxidativa provocada por la entrada de agua y por el propio metal. Estos mecanismos de protección (hormesis) parecen ser muy rápidos y podrían involucrar, al menos en parte, modulaciones de la autofluorescencia de la clorofila.
7. En *Ramalina farinacea* la respuesta oxidativa del talo completo durante la rehidratación parece estar modulada principalmente por el ficobionte predominante, lo que podría tener importantes implicaciones ecofisiológicas y adaptativas ya que las proporciones de ficobiontes del talo pueden variar de población a población.
8. Los ficobiontes TR1 y TR9 representan dos modelos diferentes de respuesta frente a condiciones ambientales fluctuantes/estresantes. (i) TR1 responde al esquema clásico de organismo poiquilohídrico, que se deshidrata/rehidrata muy rápidamente, por lo que es muy propenso a sufrir estrés oxidativo y su supervivencia parece depender del mantenimiento de un sistema de defensa constitutivamente muy activo. (ii) TR9, en cambio, está protegida por una barrera exterior más potente que le permite mantener un sistema defensivo constitutivamente menos activo y que puede ser inducido bajo condiciones de estrés.

BIBLIOGRAFÍA

- Abboud P, Wilkinson KJ. 2013.** Role of metal mixtures (Ca, Cu and Pb) on Cd bioaccumulation and phytochelatin production by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Pollution* **179**:33-8.
- Ahmadjian V. 1973.** Methods of isolating and culturing lichen symbionts and thalli. In: Ahmadjian, V. & Hale, M. E., ed. *The Lichens*, New York edn. Academic Press: New York, 653-659.
- Ahmadjian V. 1987.** Coevolution in Lichens. *Annals of the New York Academy of Sciences* **503 (Endocytobiology)**: 307-315.
- Ahmadjian V, Jacobs JB, Russell LA. 1978.** Scanning electron microscope study of early lichen synthesis. *Science* **200**: 1062-1064.
- Ahmadjian V. 1993.** The Lichen Symbiosis. John Willey & Sons, Inc., New York, 250 pp. ISBN 0-471-57885-1.
- Ahner BA, Morel FMM. 1995.** Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals. *Limnol. Oceanogr. Limnology and Oceanography* **40**: 658-665.
- Alpert P. 2006.** Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? *The journal of experimental biology* **209**: 1575-1584.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS. 2002.** Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany* **53**: 1331-1341.
- Álvarez R, del Hoyo A, Garcia-Breijo F, et al. 2012.** Different strategies to achieve Pb-tolerance by the two *Trebouxia* algae coexisting in the lichen *Ramalina farinacea*. *Journal of Plant Physiology* **169**: 1797-1806.
- Andrade LR, Leal RN, Nosedá M, et al. 2010.** Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity. *Marine pollution bulletin* **60**: 1482-1488.
- Aptroot A, van Herk CM. 2007.** Further evidence of the effects of global warming on lichens, particularly those with Trentepohlia phycobionts. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **146**: 293-298.
- Aro EM, McCaffery S, Anderson JM. 1993.** Photoinhibition and D1 Protein Degradation in Peas Acclimated to Different Growth Irradiances. *Plant Physiology* **103**: 835-843.
- Asada K. 1999.** The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 601-639.
- Ayala A, Parrado J, Bougria M, Machado A. 1996.** Effect of oxidative stress, produced by cumene hydroperoxide, on the various steps of protein synthesis. Modifications of elongation factor-2. *The Journal of biological chemistry* **271**: 23105-23110.
- Backer AC. 2003.** Flexibility and Specificity in coral-algal symbiosis: Diversity, Ecology, and Biogeography of Symbiodinium. *Annual Review of Ecology and Systematics* **34**: 661-689.

- Bačkor M, Pawlik-Skowronska B, Tomko J, Budova J, Sanita di Toppi L. 2006.** Response to copper stress in aposymbiotically grown lichen mycobiont *Cladonia cristatella*: uptake, viability, ergosterol and production of non-protein thiols. *Mycological Research* **110**: 994-999
- Barreno E. 2004.** Hongos simbioses: Líquenes, micoficobiosis y micorrizas. In: J Izco, ed. *Botánica*. MacGraw-Hill Interamericana: Madrid, 309-340.
- Beck A, Friedl T, Rambold G. 1998.** Selectivity of photobiont choice in a defined lichen community: inferences from cultural and molecular studies. *New Phytologist* **139**: 709-720.
- Beckett RP, Kranner I, Minibayeva FV. 2008.** Stress physiology and the symbiosis, in Nash, T. Cambridge University Press, NY, pp. 134-151.
- Berkelmans R, van Oppen MJ. 2006.** The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a 'nugget of hope' for coral reefs in an era of climate change. *Proceedings.Biological sciences / The Royal Society* **273**: 2305-2312.
- Bewley JD. 1979.** Physiological Aspects of Desiccation Tolerance. *Annual Review of Plant Physiology* **30**: 195-238.
- Berkelmans R, van Oppen MJ. 2006.** The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a 'nugget of hope' for coral reefs in an era of climate change. *Proceedings.Biological sciences / The Royal Society* **273**: 2305-2312.
- Bhatnagar M, Parwani L, Sharma V, Ganguly J, Bhatnagar A. 2014.** Exopolymers from *Tolypothrix tenuis* and three *Anabaena* sp. (Cyanobacteriaceae) as novel blood clotting agents for wound management. *Carbohydrate Polymers* **99**: 692-699.
- Blacksmith Institute, Green Cross Switzerland. 2013.** Top Ten Toxic Threats in 2013: Cleanup, Progress and Ongoing Challenges. **8**.
- Bold HC, Parker BC. 1962.** Some supplementary attributes in the classification of *Chlorococcum* species. *Archives of Microbiology* **42**: 267-288.
- Bouazizi H, Jouili H, Geitmann A, El Ferjani E. 2010.** Structural changes of cell wall and lignifying enzymes modulations in bean roots in response to copper stress. *Biological trace element research* **136**: 232-240.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-54.
- Branquinho C, Brown DH. 1994.** A method for studying the cellular location of lead in lichens. *Lichenologist* **26**: 83-90.
- Branquinho C, Brown DH, Maguas C, Catarino F. 1997.** Lead (Pb) uptake and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence in different lichen species. *Environmental and Experimental Botany (EEB)* **37**: 95-105.
- Boustie J, Grube M. 2005.** Lichens a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources* **3**: 273-287.

- Branquinho C, Brown DH, Maguas C, Catarino F. 1997.** Lead (Pb) uptake and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence in different lichen species. *Environmental and Experimental Botany (EEB)* **37**: 95-105.
- del Campo EM, Casano LM, Gasulla F, Barreno E. 2010.** Suitability of chloroplast LSU rDNA and its diverse group I introns for species recognition and phylogenetic analyses of lichen-forming *Trebouxia* algae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**: 437-444.
- del Campo EM, Catalá S, Gimeno J, et al. 2013.** The genetic structure of the cosmopolitan three-partner lichen *Ramalina farinacea* evidences the concerted diversification of symbionts. *FEMS Microbiology Ecology* **83**: 310-323.
- Carreras HA, Wannaz ED, Pignata ML. 2009.** Assessment of human health risk related to metals by the use of biomonitors in the province of Cordoba, Argentina. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **157**: 117-122.
- Casano LM, del Campo EM, Garcia-Breijo FJ, et al. 2011.** Two *Trebouxia* algae with different physiological performances are ever-present in lichen thalli of *Ramalina farinacea*. Coexistence versus competition? *Environmental Microbiology* **13**: 806-818.
- Casano LM, Gomez LD, Lascano HR, Gonzalez CA, Trippi VS. 1997.** Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant Cell Physiology* **38**: 433-440.
- Casano LM, Martin M, Sabater B. 1994.** Sensitivity of Superoxide Dismutase Transcript Levels and Activities to Oxidative Stress Is Lower in Mature-Senescent Than in Young Barley Leaves. *Plant Physiology* **106**: 1033-1039.
- Catalá M, Gasulla F, Pradas Del Real AE, Garcia-Breijo F, Reig-Arminana J, Barreno E. 2013.** The organic air pollutant cumene hydroperoxide interferes with NO antioxidant role in rehydrating lichen. *Environmental pollution* **179**: 277-284.
- Cenis JL. 1992.** Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research* **20**: 2380.
- Chang WC, Soon-Ae Y, In-Hye O, Sang HP. 1998.** Characterization of an extracellular flocculating substance produced by a planktonic cyanobacterium, *Anabaena* sp.. *Biotechnology Letters* **20**: 643-646.
- Chapman MJ, Margulis L. 1998.** Morphogenesis by symbiogenesis. *International Microbiology* **1**: 319-326.
- Chen J, Blume VHP, Beyer L. 2000.** Weathering of rocks induced by lichen colonization – a review. *Catena* **39**: 121-146.
- Cobbett C, Goldsbrough P. 2002.** Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual review of plant biology* **53**: 159-182.
- Cordeiro LM, de Oliveira SM, Buchi DF, Iacomini M. 2008.** Galactofuranose-rich heteropolysaccharide from *Trebouxia* sp., photobiont of the lichen *Ramalina gracilis* and its effect on macrophage activation. *International journal of biological macromolecules* **42**: 436-440.

Cristofolini F, Giordani P, Gottardini E, Modenesi P. 2008. The response of epiphytic lichens to air pollution and subsets of ecological predictors: A case study from the Italian Prealps. *Environmental Pollution* **151**: 308-317.

Darnall DW, Greene B, Henzl MT, Hosea JM, McPherson RA, Sneddon J. 1986. Selective recovery of gold and other metal ions from an algal biomass. *Environmental Science & Technology* **20(2)**: 206-208.

Daud MK, Sun Y, Dawood M, et al. 2009. Cadmium-induced functional and ultrastructural alterations in roots of two transgenic cotton cultivars. *Journal of hazardous materials* **161**: 463-473.

Davis TA, Volesky B, Mucci A. 2003. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water research* **37**: 4311-4330.

De Bary HA. 1879. *The Phenomenon of Symbiosis*. Karl J Tübner: Strassburg.

De Philippis R, Margheri MC, Materassi R, Vincenzini M. 1998. Potential of unicellular cyanobacteria from saline environments as exopolysaccharide producers. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 1130-1132.

DePriest PT. 2004. Early molecular investigations of lichen-forming symbionts: 1986-2001. *Annual Review of Microbiology* **58**: 273-301.

Deltoro VI, Calatayud A, Gimeno C, Abadía A, Barreno E. 1998. Changes in chlorophyll *a* fluorescent, photosynthetic CO₂ assimilation and xanthophyll cycle interconversions during dehydration in desiccation-tolerant and intolerant liverworts. *Planta* **207**: 224-228.

Dinakar C, Djilianov D, Bartels D. 2012. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* **182**: 29-41.

Du ZJ, Bramlage WJ. 1992. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid-peroxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **40**: 1566-1570.

Duan YH, Guo J, Ding K, et al. 2011. Characterization of a wheat HSP70 gene and its expression in response to stripe rust infection and abiotic stresses. *Molecular biology reports* **38**: 301-307.

Dzubaj A, Backor M, Tomko J, Peli E, Tuba Z. 2008. Tolerance of the lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. to metal stress. *Ecotoxicology and environmental safety* **70**: 319-326.

Epstein AL, Gussman CD, Blaylock MJ, Yermiyahu U, Huang JW, et al. 1999. EDTA and Pb-EDTA accumulation in *Brassica juncea* grown in Pb-amended soil. *Plant Soil* **208**: 87-94.

Fadila K, Houria D, Rachid R, Reda DM. 2009. Cellular response of pollution bioindicator model (*Ramalina farinacea*) following treatment with fertilizer (NPKs). *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences* **1**: 69-73.

Fang F, Lu WT, Shan Q, Cao JS. 2014. Characteristics of extracellular polymeric substances of phototrophic biofilms at different aquatic habitats. *Carbohydrate Polymers* **106**: 1-6.

- Filisetti-Cozzi TM, Carpita NC. 1991.** Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* **197**: 157-162.
- Flaibani A, Olsen Y, Painter TJ. 1989.** Polysaccharides in desert reclamation: composition of exocellular proteoglycan complexes produced by filamentous blue-green and unicellular green edaphic algae. *Carbohydrate Research* **190**: 235-248.
- Fink RC, Scandalios JG. 2002.** Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **399**: 19-36.
- Foyer CH, Lelandais M, Galap C, Kunert KJ. 1991.** Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiology* **97**: 863-872.
- Fridovich I. 1986.** Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* **58**: 61-97.
- Fuga A, Saiki M, Marcelli MP, Saldiva PH. 2008.** Atmospheric pollutants monitoring by analysis of epiphytic lichens. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **151**: 334-340.
- Garces Cea M, Claverol S, Alvear Castillo C, Rabert Pinilla C, Bravo Ramirez L. 2014.** Desiccation tolerance of Hymenophyllaceae filmy ferns is mediated by constitutive and non-inducible cellular mechanisms. *Comptes rendus biologiques* **337**: 235-243.
- Gardes M, Bruns TD. 1993.** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology* **2**: 113-118.
- Gargas A, DePriest PT, Grube M, Tehler A. 1995.** Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. *Science (New York, N.Y.)* **268**: 1492-1495.
- Garty J, Weissman L, Cohen Y, Karnieli A, Orlovsky L. 2001.** Transplanted lichens in and around the Mount Carmel National Park and the Haifa Bay industrial region in Israel: physiological and chemical responses. *Environmental Research* **85(2)**: 159-176.
- Gasulla F, Guéra A, Barreno E. 2010.** A simple and rapid method for isolating lichen photobionts. *Symbiosis* **51**: 175-179.
- Gasulla F, de Nova PG, Esteban-Carrasco A, Zapata JM, Barreno E, Guera A. 2009.** Dehydration rate and time of desiccation affect recovery of the lichen alga *Trebouxia erici*: alternative and classical protective mechanisms. *Planta* **231**: 195-208.
- Gehrig H, Schussler A, Kluge M. 1996.** Geosiphon pyriforme, a fungus forming endocytobiosis with Nostoc (cyanobacteria), is an ancestral member of the Glomales: evidence by SSU rRNA analysis. *Journal of Molecular Evolution* **43**: 71-81.
- Gray AP, Lucas IAN, Seed R, Richardson CA. 1999.** *Mytilus edulis chilensis* infested with *Coccomyxa parasitica* (Chlorococcales, Coccomyxaceae). *Journal of Molluscan Studies* **65(3)**: 289-294.
- Griffiths HB, Greenwood AD. 1972.** The concentric bodies of lichenized fungi *Archives of Microbiology* **87(4)**: 285-302..

Guzow-Krzeminska B. 2006. Photobiont flexibility in the lichen *Protoparmeliopsis muralis* as revealed by ITS rDNA analyses. *The Lichenologist* **38(5)**: 469-476.

Gasulla F, Jain R, Barreno E, et al. 2013. The response of *Asterochloris erici* (Ahmadjian) Skaloud et Peksa to desiccation: a proteomic approach. *Plant, Cell & Environment*.

Gasulla F, de Nova PG, Esteban-Carrasco A, Zapata JM, Barreno E, Guera A. 2009. Dehydration rate and time of desiccation affect recovery of the lichen alga *Trebouxia erici*: alternative and classical protective mechanisms. *Planta* **231**: 195-208.

Glińska S, Gapińska M. 2013. The effect of pre-incubation of *Allium cepa* L. roots in the ATH-rich extract on Pb uptake and localization. *Protoplasma* **250**: 601-611.

Goulet TM. 2006. Most corals may not change their symbionts. *Marine Ecology Progress Series* **321**: 1-7.

Hall JL. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of experimental botany* **53**: 1-11.

Hauck M, Helms G, Friedl T. 2007. Photobiont selectivity in the epiphytic lichens *Hypogymnia physodes* and *Lecanora conizaeoides*. *The Lichenologist* **39(2)**: 195-204.

Hawksworth DL. 1989. Interacciones hongo-alga en simbiosis liquénicas y liquenoides. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* **46(1)**: 235-247.

Hawksworth DL, Iturriaga T, Crespo A. 2005. Lichens as rapid bioindicators of pollution and habitat disturbances in the tropics. *Revista Iberoamericana De Micología* **22**: 71-82.

Hirata K, Tsujimoto Y, Namba T, et al. 2001. Strong induction of phytochelatin synthesis by zinc in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **92**: 24-29.

Hodge & Hofreiter. 1962. Methods in Carbohydrate Chemistry. *Acad. Press Inc.* vol. 1: 380

Hokputsa, S., Hu, C., Paulsen, B.S. & Harding, S.E. 2003. A physico-chemical comparative study on extracellular carbohydrate polymers from five desert algae. *Carbohydrate Polymers* **54**: 27-32.

Honegger R. 2001. The Symbiotic Phenotype of Lichen-Forming Ascomycetes. In: B Hock, ed. *Fungal Associations, Vol. IX: The Mycota*. Springer: Berlin, 165-188.

Honegger R. 1993. Developmental biology of lichens. *New Phytologist* **125**: 659-677.

Honegger R. 1991. Functional Aspects of the Lichen Symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 553-578.

Honegger R, Bartnicki-Garcia S. 1991. Cell wall structure and composition of cultured mycobionts from the lichens *Cladonia macrophylla*, *Cladonia caespiticia*, and *Physcia stellaris* (Lecanorales, Ascomycetes). *Mycological Research* **95(8)**: 905-914.

Honegger R. 1998. The lichen symbiosis: what is so spectacular about it? *Lichenologist* **30**: 193-212.

- Honegger R. 2008.** Morphogenesis. In Lichen biology. 2nd. ed., T. H. Nash III (ed.). Cambridge University Press, Cambridge y Nueva York. p. 69-93. .
- Hoshina R, Imamura N. 2008.** Multiple origins of the symbioses in *Paramecium bursaria*. *Protist* **159**: 53-63.
- Howe G, Merchant S. 1992.** Heavy Metal-Activated Synthesis of Peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **98**: 127-136.
- del Hoyo A, Alvarez R, del Campo EM, Gasulla F, Barreno E, Casano LM. 2011.** Oxidative stress induces distinct physiological responses in the two *Trebouxia* phycobionts of the lichen *Ramalina farinacea*. *Annals of Botany* **107**: 109-118.
- Jin XF, Yang XE, Islam E, et al. 2008.** Ultrastructural changes, zinc hyperaccumulation and its relation with antioxidants in two ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* **46**: 997-1006.
- Jones AM, Berkelmans R, van Oppen MJ, Mieog JC, Sinclair W. 2008.** A community change in the algal endosymbionts of a scleractinian coral following a natural bleaching event: field evidence of acclimatization. *Proceedings.Biological sciences / The Royal Society* **275**: 1359-1365.
- Jubany-Mari T, Munné-Bosch S, Alegre L. 2010.** Redox regulation of water stress responses in field-grown plants. Role of hydrogen peroxide and ascorbate. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 351-358.
- Kang JM, Ju HL, Sohn WM, Na BK. 2013.** Characterization of biochemical properties of a selenium-independent glutathione peroxidase of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*: 1-9.
- Kappen L. 2000.** Some aspects of the great success of lichens in Antarctica. *Antarctic Science* **12(3)**: 314-324.
- Karatygin IV, Snigirevskaya NS, Vikulin SV. 2009.** The most ancient terrestrial lichen *Winfrenatia reticulata*: A new find and a new interpretation. *Paleontological Journal* **43**: 107-114.
- Kawaguchi T, Decho AW. 2001.** Polysaccharides in desert reclamation: composition of exocellular proteoglycan complexes produced by filamentous blue-green and unicellular green edaphic algae. *Carbohydrate Research* **190**: 235-248.
- Kawaguchi T, Decho AW. 2002.** Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric secretions (EPS) from modern soft marine stromatolites (Bahamas) and its inhibitory effect on CaCO₃ precipitation. *Preparative biochemistry & biotechnology* **32**: 51-63.
- Kershaw KA. 1985.** *Physiological Ecology of Lichens*. Cambridge University Press: Cambridge.
- Kitayama K, Kitayama M, Osafune T, Togasaki RK. 1999.** Subcellular localization of iron and manganese superoxide dismutase in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology* **35**: 136-142.

Kliebenstein DJ, Monde RA, Last RL. 1998. Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology* **118**: 637-650.

Knowles EJ, Castenholz RW. 2008. Effect of exogenous extracellular polysaccharides on the desiccation and freezing tolerance of rock-inhabiting phototrophic microorganisms. *FEMS microbiology ecology* **66**: 261-270.

Kong F, Deng Y, Zhou B, Wang G, Wang Y, Meng Q. 2014. A chloroplast-targeted DnaJ protein contributes to maintenance of photosystem II under chilling stress. *Journal of experimental botany* **65**: 143-158.

Kosugi M, Arita M, Shizuma R, et al. 2009. Responses to desiccation stress in lichens are different from those in their photobionts. *Plant & Cell Physiology* **50**: 879-888.

Kranner I. 2002. Glutathione status correlates with different degrees of desiccation tolerance in three lichens. *New Phytologist* **154**: 451-460.

Kranner I, Cram WJ, Zorn M, et al. 2005. Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 3141-3146.

Kroken S, Taylor WJ. 2000. Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. *The Bryologist* **103**: 645-660.

Krzeslowska M, Lenartowska M, Mellerowicz EJ, Samardakiewicz S, Wozny A. 2009. Pectinous cell wall thickenings formation a response of moss protonemata cells to lead. *Environmental and Experimental Botany* **65**: 119-131.

Lascano HR, Antonicelli GE, Luna CM, et al. 2001. Antioxidative system response of different wheat cultivars under drought: Field and in vitro studies. *Functional Plant Biology* **28**: 1095-1102.

Le Faucheur S, Schildknecht F, Behra R, Sigg L. 2006. Thiols in *Scenedesmus vacuolatus* upon exposure to metals and metalloids. *Aquatic Toxicology* **80**: 355-361.

Li QB, Haskell DW, Guy CL. 1999. Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato. *Plant Molecular Biology* **39**: 21-34.

Liu DH, Kottke I. 2004a. Subcellular location of copper in the root cells of *Allium sativum* by electron energy loss spectroscopy (EELS). *Bioresources and Technology* **94**: 153-158.

Liu D, Kottke I. 2004b. Subcellular localization of cadmium in the root cells of *Allium cepa* by electron energy loss spectroscopy and cytochemistry. *Journal of Biosciences* **29**: 329-335.

Liu D, Li TQ, Jin XF, Yang XE, Islam E, Mahmood Q. 2008. Lead induced changes in the growth and antioxidant metabolism of the lead accumulating and non-accumulating ecotypes of *Sedum alfredii*. *Journal of integrative plant biology* **50**: 129-140.

- Liu T, Liu S, Guan H, Ma L, Chen Z, Gu H. 2009.** Transcriptional profiling of *Arabidopsis* seedlings in response to heavy metal lead (Pb). *Environmental and Experimental Botany* **67**: 377-386.
- Longton RE. 1988.** *Biology of Polar Bryophytes and Lichens*. Cambridge University Press: Cambridge.
- Loppi S, Frati L. 2006.** Lichen diversity and lichen transplants as monitors of air pollution in a rural area of central Italy. - *Environmental monitoring and assessment* **114(1-3)**: 361-375.
- Lutzoni FM, Vilgalys R. 1995.** *Omphalina* (Basidiomycota, Agaricales) as a model system for the study of coevolution in lichenized fungi. *Cryptogamic Botany* **5**: 82-97.
- Macfie SM, Tarmohamed Y, Welbourn PM. 1994.** Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influences of the cell wall and pH. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **27**: 454-458.
- Malaspina P, Tixi S, Brunialti G, et al. 2014.** Biomonitoring urban air pollution using transplanted lichens: element concentrations across seasons. *Environmental science and pollution research international* **21**: 12836-12842.
- Margulis L, Barreno E. 2003.** Looking at lichens. *Bioscience* **53**: 776-778.
- Matsunaga T, Takeyama H, Nakao T, Yamazawa A. 1999.** Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. *Progress in Industrial Microbiology* **70**: 33-38.
- Mellado M, Contreras RA, Gonzalez A, Dennett G, Moenne A. 2012.** Copper-induced synthesis of ascorbate, glutathione and phytochelatins in the marine alga *Ulva compressa* (Chlorophyta). *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* **51**: 102-108.
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. 2010.** Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment* **33**: 453-467.
- Mittler R. 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science* **7**: 405-410.
- Molins A, García-Breijo FJ, Reig-Armiñana J, Del Campo EM, Casano L, Barreno E. 2013.** Coexistence of different intrathalline symbiotic algae and bacterial biofilms in the foliose Canarian lichen *Parmotrema pseudotinctorum*. *VIERAEA* **41**: 349-370.
- Monteiro CM, Marques AP, Castro PM, Xavier Malcata F. 2009.** Characterization of *Desmodesmus pleiomorphus* isolated from a heavy metal-contaminated site: biosorption of zinc. *Biodegradation* **20**: 629-641.
- Moore JP, Farrant JM, Driouich A. 2008.** A role for pectin-associated arabinans in maintaining the flexibility of the plant cell wall during water deficit stress. *Plant signaling & behavior* **3**: 102-104.

Morelli E, Scarano G. 2001. Synthesis and stability of phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Environmental Research* **52**: 383-395.

Nash TH. 2008. Lichen Biology. Cambridge University, 496 pp. ISBN 978-0-521-69216-8.

Nikolopoulos D, Korgiopoulou C, Mavropoulos K, Liakopoulos G, Karabourniotis G. 2008. Leaf anatomy affects the extraction of photosynthetic pigments by DMSO. *Talanta* **76**: 1265-1268.

Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Murata N. 2006. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et biophysica acta* **1757**: 742-749.

Noctor G, Foyer CH. 1998. ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249-279.

Okamoto OK, Robertson DL, Fagan TF, Hastings JW, Colepicolo P. 2001. Different regulatory mechanisms modulate the expression of a dinoflagellate iron-superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry* **276**: 19989-19993.

Oksanen I. 2006. Ecological and biotechnological aspects of lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**: 723-734.

Paoli L, Corsini A, Bigagli V, Vannini J, Bruscoli C, Loppi S. 2012. Long-term biological monitoring of environmental quality around a solid waste landfill assessed with lichens. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **161**: 70-75.

Pawlik-Skowronska B. 2000. Relationships between acid-soluble thiol peptides and accumulated Pb in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Aquatic Toxicology* **50**: 221-230.

Pawlik-Skowronska B. 2001. Phytochelatin production in freshwater algae *Stigeoclonium* in response to heavy metals contained in mining water; effects of some environmental factors. *Aquatic Toxicology* **52**: 241-249.

Pereira S, Zille A, Micheletti E, Moradas-Ferreira P, De Philippis R, Tamagnini P. 2009. Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS microbiology reviews* **33**: 917-941.

Pérez-Rama M, Herrero Lopez C, Abalde Alonso J, Torres Vaamonde E. 2001. Class III metallothioneins in response to cadmium toxicity in the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. *Environ. Toxicology.Chem.* **20**: 2061-2066.

Peveling E, Galum M. 1976. Electron-microscopical studies on the phycobiont *Coccomyxa* Schmidle. *New Phytologist* **77**: 713-718.

Phang IC, Leung DW, Taylor HH, Burritt DJ. 2011. The protective effect of sodium nitroprusside (SNP) treatment on *Arabidopsis thaliana* seedlings exposed to toxic level of lead is not linked to avoidance of Pb uptake. *Ecotoxicology and environmental safety* **74**: 1310-1315.

- Piccapietra F, Allue CG, Sigg L, Behra R. 2012.** Intracellular silver accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* upon exposure to carbonate coated silver nanoparticles and silver nitrate. *Environmental science & technology* **46**: 7390-7397.
- Piercey-Normore MD. 2006.** The lichen-forming ascomycete *Evernia mesomorpha* associates with multiple genotypes of *Trebouxia jamesii*. *The New phytologist* **169**: 331-344.
- Pistocchi R, Mormile MA, Guerrini F, Isani G, Boni L. 2000.** Increased production of extra- and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. *Journal of Applied Phycology* **12**: 469-477.
- Pivokonsky M, Safarikova J, Baresova M, Pivokonska L, Kopecka I. 2014.** A comparison of the character of algal extracellular versus cellular organic matter produced by cyanobacterium, diatom and green alga. *Water research* **51**: 37-46.
- Poschenrieder C, Cabot C, Martos S, Gallego B, Barcelo J. 2013.** Do toxic ions induce hormesis in plants? *Plant science: an international journal of experimental plant biology* **212**: 15-25.
- Potts M. 1999.** Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *European Journal of Phycology* vol.34, no. 04: 319-328.
- Raggio J, Pintado A, Ascaso C, et al. 2011.** Whole lichen thalli survive exposure to space conditions: results of Lithopanspermia experiment with *Aspicilia fruticulosa*. *Astrobiology* **11**: 281-292.
- Rattmann YD, Malquevicz-Paiva SM, Iacomini M, Cordeiro LM. 2013.** Galactofuranose-rich polysaccharides from *Trebouxia* sp. induce inflammation and exacerbate lethality by sepsis in mice. *Phytochemistry* **94**: 206-210.
- Reilly CA, Aust SD.** Measurement of lipid peroxidation. *Current Protocols in Toxicology*. New York. J. Willey, ed.: 2.4.1-2.4.13.
- Reissig JL, Storminger JL, Leloir LF. 1955.** A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *The Journal of biological chemistry* **217**: 959-966.
- Rodríguez F, Feist SW, Guillou L, et al. 2008.** Phylogenetic and morphological characterisation of the green algae infesting blue mussel *Mytilus edulis* in the North and South Atlantic oceans. *Diseases Of Aquatic ORGANISMS* **81**: 231-240.
- Rohder LA, Brandt T, Sigg L, Behra R. 2014.** Influence of agglomeration of cerium oxide nanoparticles and speciation of cerium (III) on short term effects to the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* **152**: 121-130.
- Sancho LG, Allan Green TG, Pintado A. 2007.** Slowest to fastest: Extreme range in lichen growth rates supports their use as an indicator of climate change in Antarctica. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **202(8)**: 667-673.
- Sanita di Toppi L, Pawlik-Skowronska B, Vurro E, et al. 2008.** First and second line mechanisms of cadmium detoxification in the lichen photobiont *Trebouxia impressa* (Chlorophyta). *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **151**: 280-286.

Scheidegger C, Sigg L, Behra R. 2011. Characterization of lead induced metal-phytochelatin complexes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* **30**: 2546-2552.

Schroeter B, Green TGA, Pannewitz S, Schlenzog M, Sancho LG. 2011. Summer variability, winter dormancy: lichen activity over 3 years at Botany Bay, 77°S latitude, continental Antarctica. *Polar Biology* **34(1)**: 13-22.

Schutzendubel A, Polle A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of experimental botany* **53**: 1351-1365.

Sharma SS, Dietz K. 2008. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science* **14**: 43-50.

Sharma P, Dubey RS. 2008. Lead toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol* **17**: 35-52.

Shi LX, Hall M, Funk C, Schroder WP. 2012. Photosystem II, a growing complex: updates on newly discovered components and low molecular mass proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1817**: 13-25.

Shirkey B, Kovarcik DP, Wright DJ, et al. 2000. Active Fe-containing superoxide dismutase and abundant sodF mRNA in *Nostoc commune* (Cyanobacteria) after years of desiccation. *Journal of Bacteriology* **182**: 189-197.

Silberstein L, Siegel BZ, Siegel SM, Mukhtar A, Galun M. 1996. Comparative studies on *Xanthoria parietina* a pollution-resistant lichen, and *Ramalina duriaei*, a sensitive species. 1. Effects of air pollution on physiological processes. *Lichenologist* **28**: 355-365.

Slomka A, Libik-Konieczny M, Kuta E, Miszalski Z. 2008. Metalliferous and non-metalliferous populations of *Viola tricolor* represent similar mode of antioxidative response. *Journal of Plant Physiology* **165**: 1610-1619.

Smith DC, Douglas AE. 1987. *The biology of Symbiosis*. Cambridge University Press: London.

Song YG, Liu B, Wang LF, Li MH, Liu Y. 2006. Damage to the oxygen-evolving complex by superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical in photoinhibition of photosystem II. *Photosynthesis Research* **90**: 67-78.

Starr MB. 1975. A generalized scheme for classifying organismic associations. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **29**: 1-20.

Sung DY, Vierling E, Guy CL. 2001. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family. *Plant Physiology* **126**: 789-800.

Taffe BG, Takahashi N, Kensler TW, Mason RP. 1987. Generation of free radicals from organic hydroperoxide tumor promoters in isolated mouse keratinocytes. Formation of alkyl and alkoxy radicals from tert-butyl hydroperoxide and cumene hydroperoxide. *The Journal of biological chemistry* **262**: 12143-12149.

Takahagi T, Endo T, Yamamoto Y, Sato F. 2008. Lichen photobionts show tolerance against lichen acids produced by lichen mycobionts. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **72**: 3122-3127.

- Taylor TN, Hass H, Kerp H. 1997.** A cyanolichen from the Lower Devonian Rhynie Chert. *American Journal of Botany* **84**: 992-1004.
- Tremouillaux-Guiller J, Huss VA. 2007.** A cryptic intracellular green alga in *Ginkgo biloba*: ribosomal DNA markers reveal worldwide distribution. *Planta* **226**: 553-557.
- Tremouillaux-Guiller J, Rohr T, Rohr R, Huss VA. 2002.** Discovery of an endophytic alga in *Ginkgo biloba*. *American Journal of Botany* **89**: 727-733.
- Tominaga H, Coury DA, Amano H, Kakinuma M. 2010.** Isolation and characterization of a cDNA encoding a heat shock protein 70 from a sterile mutant of *Ulva pertusa* (Ulvales, Chlorophyta). *Ecotoxicology (London, England)* **19**: 577-588.
- Torres E, Cid A, Fidalgo P, Herrero C, Abalde J. 1997.** Long-chain class III metallothioneins as a mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin. *Aquatic Toxicology* **39**: 231-246.
- Verma S, Dubey RS. 2003.** Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant science* **164**: 645-655.
- Wegley L, Edwards R, Rodriguez-Brito B, Liu H, Rohwer F. 2007.** Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. *Environmental microbiology* **9**: 2707-2719.
- Weissman L, Garty J, Hochman A. 2005.** Characterization of enzymatic antioxidants in the lichen *Ramalina lacera* and their response to rehydration. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 6508-6514.
- Wellburn A. 1994.** The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers on different resolutions. *Journal of Plant Physiology* **144**: 307-313.
- Werning ML, Notararigo S, Nacher M, Fernández de Palencia P, Aznar R, López P. 2012.** Biosynthesis, Purification and Biotechnological Use of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. Chapter 5: 83-114. In: Food Additive. Ed. Prof. Dr. Yehia El-Samragy ISBN: 978-953-51-0067-6. InTech - Open Access Publisher.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White, eds. *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc, New York, 315-322.
- Wierzbicka M. 1998.** Lead in the apoplast of *Allium cepa* L. root tips-ultrastructural studies. *Plant Science* **133**: 105-119.
- Wu G, Wilen RW, Robertson AJ, Gusta LV. 1999.** Isolation, chromosomal localization, and differential expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase and chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase genes in wheat. *Plant Physiology* **120**: 513-520.
- Yahr R, Vilgalys R, DePriest PT. 2006.** Geographic variation in algal partners of *Cladonia subtenuis* (Cladoniaceae) highlights the dynamic nature of a lichen symbiosis. *New Phytologist* **171**: 847-60.

Yu HN, Liu P, Wang ZY, Chen WR, Xu GD. 2011. The effect of aluminum treatments on the root growth and cell ultrastructure of two soybean genotypes. *Crop Protect* **30**: 323-328.

Yuan X, Xiao S, Taylor TN. 2005. Lichen-like symbiosis 600 million years ago. *Science* **308**: 1017-1020.

Zhang W, Tan NG, Li SF. 2014. NMR-based metabolomics and LC-MS/MS quantification reveal metal-specific tolerance and redox homeostasis in *Chlorella vulgaris*. *Molecular bioSystems* **10**: 149-160.

Zhou GJ, Peng FQ, Zhang LJ, Ying GG. 2011. Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. *Environmental science and pollution research international* **19**: 2918-2929.

PUBLICACIONES

del Hoyo A, Álvarez R, del Campo EM, Gasulla F, Barreno E, Casano LM. 2011. Oxidative stress induces distinct physiological responses in the two *Trebouxia* phycobionts of the lichen *Ramalina farinacea*. *Annals of Botany* **107**: 109-118.

Álvarez R, del Hoyo A, García-Breijo F, Reig-Armiñana J, del Campo EM, Guéra A, Barreno E, Casano LM. 2012. Different strategies to achieve Pb-tolerance by the two *Trebouxia* algae coexisting in the lichen *Ramalina farinacea*. *Journal of Plant Physiology* **169**: 1797-1806.

Álvarez R, del Hoyo A, Díaz-Rodríguez C, Coello AJ, del Campo EM, Barreno E, Catalá M, Casano LM. 2014. Lichen rehydration in heavy metal polluted environments: Pb modulates the oxidative response of both *Ramalina farinacea* thalli and its isolated microalgae. DOI: 10.1007/s00248-014-0524-0.

Oxidative stress induces distinct physiological responses in the two *Trebouxia* phycobionts of the lichen *Ramalina farinacea*

Alicia del Hoyo¹, Raquel Álvarez¹, Eva M. del Campo¹, Francisco Gasulla², Eva Barreno²
and Leonardo M. Casano^{1,*}

¹Department of Plant Biology, University of Alcalá, 28871-Alcalá de Henares, Madrid, Spain and ²Universitat de València, Botánica, ICBIBE, Fac. C. Biológicas, C/ Dr. Moliner 50. 46100-Burjassot, Valencia, Spain

*For correspondence. E-mail leonardo.casano@uah.es

Received: 29 July 2010 Returned for revision: 27 August 2010 Accepted: 17 September 2010 Published electronically: 4 November 2010

- **Background and Aims** Most lichens form associations with *Trebouxia* phycobionts and some of them simultaneously include genetically different algal lineages. In other symbiotic systems involving algae (e.g. reef corals), the relative abundances of different endosymbiotic algal clades may change over time. This process seems to provide a mechanism allowing the organism to respond to environmental stress. A similar mechanism may operate in lichens with more than one algal lineage, likewise protecting them against environmental stresses. Here, the physiological responses to oxidative stress of two distinct *Trebouxia* phycobionts (provisionally named TR1 and TR9) that coexist within the lichen *Ramalina farinacea* were analysed.
- **Methods** Isolated phycobionts were exposed to oxidative stress through the reactive oxygen species propagator cumene hydroperoxide (CuHP). Photosynthetic pigments and proteins, photosynthesis (through modulated chlorophyll *a*, carotenoids and D1 protein. Additionally, differences were observed in the capacities of the two phycobionts to modulate antioxidant activities and HSP70 levels when exposed to oxidative stress. In TR1, CuHP significantly diminished HSP70 and GR but did not change SOD activities. In contrast, in TR9 the levels of both antioxidant enzymes and those of HSP70 increased in response to CuHP.
- **Key Results** Photosynthetic performance was severely impaired by CuHP in phycobionts, as indicated by decreases in the maximal PSII photochemical efficiency (F_v/F_m), the quantum efficiency of PSII (Φ_{PSII}) and the non-photochemical dissipation of energy (NPQ). However, the CuHP-dependent decay in photosynthesis was significantly more severe in TR1, which also showed a lower NPQ and a reduced ability to preserve chlorophyll *a*, carotenoids and D1 protein. Additionally, differences were observed in the capacities of the two phycobionts to modulate antioxidant activities and HSP70 levels when exposed to oxidative stress. In TR1, CuHP significantly diminished HSP70 and GR but did not change SOD activities. In contrast, in TR9 the levels of both antioxidant enzymes and those of HSP70 increased in response to CuHP.
- **Conclusions** The better physiological performance of TR9 under oxidative conditions may reflect its greater capacity to undertake key metabolic adjustments, including increased non-photochemical quenching, higher antioxidant protection and the induction of repair mechanisms.

Key words: Oxidative stress, phycobiont, lichen, *Ramalina farinacea*, stress response, *Trebouxia*.

INTRODUCTION

Approximately 20% of fungal species develop obligate mutualistic associations with green algae and/or cyanobacteria. Lichens are the result of such associations; they consist of a nutritionally specialized fungus (mycobiont) that acquires fixed carbon from its photosynthetic partner(s) (photobiont). During development of the lichen thallus, both partners undergo a complex series of morphological, biochemical and physiological changes, resulting in a new organism with novel features (Chapman and Margullis, 1998; Barreno, 2004). Lichenization is a clearly successful symbiosis as evidenced by the fact that lichens are found in almost all terrestrial habitats, allowing both the photobiont and the mycobiont to expand into many geographical regions where separately they would be rare or non-existent.

Ramalina farinacea is an epiphytic fruticose, pendulose lichen that propagates via vegetative propagules (soredia). It is commonly present in Mediterranean areas on different shrubs and trees, especially in sclerophyllous oak forests. In

these natural habitats it is subjected to long summer days of desiccation and rehydration by dew during the night or, during the rainy periods of the spring and autumn seasons, by rain. However, this lichen is also found in other, less restrictive and humid ecosystems as well as in more stressful environments such as high mountains. The diversity of ecological contexts in which *R. farinacea* proliferates suggests a wide ecophysiological plasticity of the lichen association to cope with changing and often stressful environmental conditions.

Water deficit, suboptimal temperatures, air pollution and other types of stress disrupt the metabolic balance of cells, resulting in the enhanced production of reactive oxygen species (ROS) (Miller *et al.*, 2010) such as ¹O₂ (singlet oxygen), O₂⁻ (superoxide anion radical), H₂O₂ and .OH (hydroxyl radical). In chloroplasts, water stress, excessive light intensity, suboptimal temperatures, xenobiotics and heavy metals interfere with photosynthesis and induce a higher electron transfer from photosynthetic electron carriers to O₂, increasing the generation of ROS (Galvez-Valdivieso

and Mullineaux, 2010). These ROS trigger deleterious reactions, including degradative processes that involve key chloroplastic components, for example thylakoid proteins (Casano *et al.*, 1994; Song *et al.*, 2006), Calvin cycle enzymes (Asada, 1999), and pigments and membrane lipids (Asada, 1999; Calatayud *et al.*, 1999). To prevent oxidative damage, plants have evolved a complex antioxidant defence system made up of non-enzymatic and enzymatic constituents. Among the former, reduced glutathione (GSH) and ascorbic acid are the most important soluble antioxidants (Noctor and Foyer, 1998). The enzymatic constituents include superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) (SOD), ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) (APX) and glutathione reductase (EC 1.6.4.2) (GR) as key antioxidant enzymes that scavenge O_2^- and H_2O_2 , thus preventing formation of the highly toxic $\cdot OH$ (Foyer *et al.*, 1994; Scandalios, 2001). Several studies have examined the possible causal relationships in lichens between stress tolerance and the ability to remove and/or prevent ROS formation (Deltoro *et al.*, 1998; Kranner *et al.*, 2003, 2005; Weissman *et al.*, 2005 and references therein). In general, it was observed that, under stress, tolerant lichens modulate the status and activity of their antioxidant system(s) in response to increased levels of ROS. According to Kranner *et al.* (2006), failure of the antioxidant system during stressful conditions could trigger programmed cell death, i.e. ageing and eventual death of the organism. This suggests a potent antioxidant machinery as one of the underlying mechanisms of desiccation tolerance. NPQ (non-photochemical dissipation of energy) is another important process operating under stress conditions, as it transforms into heat the excess light energy that cannot be used in photosynthesis and which could lead to ROS formation. In vascular plants, this dissipation of excess light energy is associated with acidification of the thylakoidal luminal space, the xanthophyll cycle and the activity of the pSBS protein associated with photosystem II (Niyogi *et al.*, 2004). Lichens, however, exhibit different response and defence mechanisms under adverse conditions but as yet they have been rarely characterized. Evidence for this difference between lichens and vascular plants comes from a recent report in which non-photochemical dissipation processes in lichen photobionts were shown to differ from those of vascular plants (Kopecky *et al.*, 2005). Thus, in homeohydric vascular plants dissipation processes are dependent on the incident light and quickly disappear in response to darkness (Müller *et al.*, 2001; Szabó *et al.*, 2005). In contrast, we found that energy dissipation in *Trebouxia erici* continues after the organism has been subjected to 24 h of darkness and is independent of the xanthophyll cycle (Gasulla *et al.*, 2009). Additional elements involved in the protection of cells from the deleterious effects of different stress conditions are heat shock proteins (HSPs). Among them, the chaperone HSP70 participates in protein folding and in maintaining the correct conformation and function of a number of proteins. Moreover, there is abundant experimental evidence demonstrating the induction of HSP70 under several types of stress (Duan *et al.*, 2010, and references therein).

Previous morphological and molecular analyses indicated a highly specific pattern of association between the lichen-forming fungus *R. farinacea* and the same two phycobionts

[provisionally named TR1 and TR9 phycobionts in del Campo *et al.* (2010) and L. M. Casano *et al.*, unpubl. res.] in all studied lichen thalli, independent of their geographical location. These findings and the diversity of ecological contexts in which *R. farinacea* proliferates suggest a wide eco-physiological plasticity of lichen associations, acquired without major changes in phycobiont composition but probably by modulating the relative abundance of each phycobiont (del Campo *et al.*, 2010). An initial physiological characterization of isolated TR1 and TR9 algae based on their growth and photosynthetic response to light and temperature regimes suggested a better physiological performance of TR9 under relatively high temperature and irradiances than TR1. It can thus be hypothesized that the constant presence of both *Trebouxia* phycobionts in *R. farinacea* thalli is favoured by the different and probably complementary physiological behaviour of each alga, thus improving the ecological fitness of the holobiont. To test this hypothesis, the aim of the present study was to search for physiological differences between TR1 and TR9 by studying their response to stress conditions. We therefore focused our attention on the effects of oxidative stress as it is a common internal response to externally generated abiotic and biotic stresses. In the experiments described herein, oxidative stress was imposed by treating the phycobionts with the ROS propagator cumene hydroperoxide (CuHP). CuHP has been used as an intracellular source of reactive oxygen intermediates in studies assessing the effect of oxidative stress on various biological systems, especially animal and human cells (Ayala *et al.*, 1996, and references therein). Previous confocal microscopy analysis employing specific fluorochromes demonstrated that CuHP induces ROS formation in isolated *Trebouxia* cells, with the chloroplast as the main target (Catalá *et al.*, 2010). After CuHP treatments, photosynthesis, photosynthetic pigments and proteins were analysed in isolated phycobionts. In addition, the defence response to CuHP was determined with respect to the levels of several important antioxidant enzymes, such as SOD and GR, as well as the stress-related protein HSP70.

MATERIALS AND METHODS

Phycobiont isolation and culture

TR1 and TR9 were isolated in our laboratories from a population of the lichen *Ramalina farinacea* (L.) Ach. according to Gasulla *et al.* (2010). Thalli were collected in the air-dried state on *Quercus rotundifolia* Lam. at S^a El Toro (Castellón, Spain; 39°54'16"N, 0°48'22"W). Samples were frozen at -20 °C for 3 months, at which time they were cultured in either liquid or semisolid Bold 3N medium (Bold and Parker, 1962) in a growth chamber at 15 °C, under a 14-h/10-h light/dark cycle (lighting conditions: 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

CuHP treatments

Unless stated otherwise, 3-week-old liquid cultures of TR1 and TR9 phycobionts were diluted to 2×10^6 cells mL^{-1} and incubated for up to 24 h with concentrations of CuHP (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) ranging from 0 to 1 mM. At the indicated times, the algae were centrifuged and

then rinsed twice with ultrapure cold water. These water-rinsed phycobiont cells were used in subsequent analyses. Typically, 50 mL of treated cultures rendered approx. 250–300 mg of phycobiont cells.

Photosynthetic pigment determination

Treated and control phycobiont cells in amounts of approx. 20 mg were resuspended in 100 % dimethyl sulfoxide and incubated for 15 min at 65 °C. This treatment solubilized at least 98 % of the photosynthetic pigments (data not shown). After centrifugation at 5000g for 5 min, chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids were measured spectrophotometrically according to Lichtenthaler (1987).

Soluble and membrane protein extracts

Treated and control phycobiont cells (approx. 200–250 mg) were homogenized using a mortar and pestle with a minimal amount of siliceous particles and 0.5 mL of the following grinding medium: 50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 1 mM ascorbic acid, 10 % (v/v) glycerol and 1 % (w/v) insoluble polyvinyl pyrrolidone (PVPP). The homogenates were centrifuged for 2 min at 200g to remove the siliceous particles, PVPP, unbroken cells and cell-wall debris. Supernatants were fractionated by centrifugation at 20 000g for 20 min, resulting in 'soluble proteins' and 'membrane proteins'. Pellets (membrane proteins) were rinsed twice with 50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 2 mM EDTA and 100 mM NaCl, and then resuspended in 0.1 mL of grinding medium without PVPP. All of the steps were carried out at 4 °C.

Measurements of chlorophyll *a* fluorescence

Chlorophyll *a* fluorescence was measured at room temperature using a pulse modulation fluorometer (PAM-2000; Walz, Effeltrich, Germany). Isolated algae that had been allowed to grow for 3 weeks on cellulose acetate discs placed on semisolid culture medium were incubated for 1 h with concentrations of CuHP of up to 10 mM, after which the discs were returned to control conditions for 24 h. Thereafter, the cells were maintained in a fully hydrated state by layering the discs on filter paper wetted with distilled water and kept in the dark for 15 min prior to chlorophyll *a* fluorescence measurements. The minimal fluorescence yield (F_0) was obtained by excitation of the phycobionts with a weak measuring beam from a light-emitting diode. A saturating pulse (600 ms) of white light (at a photosynthetic photon fluence rate of 4000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ over the waveband 400–700 nm), closing all reaction centres, was applied to obtain the maximal fluorescence (F_m). Variable fluorescence in dark-adapted samples (F_v) was calculated as $F_m - F_0$. Following 2 min of dark readaptation, actinic white light (260 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was switched on, and 600-ms saturating pulses were applied at 60-s intervals to determine the maximum fluorescence yield during actinic illumination (F'_m), the level of modulated fluorescence during a brief interruption of actinic illumination in the presence of far-red light (F'_0) and the chlorophyll fluorescence yield during actinic illumination (F_s). Quenching as a result of non-photochemical dissipation of absorbed light energy (NPQ)

was determined at each saturating pulse according to the equation $\text{NPQ} = (F_m - F'_m) / F'_m$ (Bilger and Björkman, 1991). The coefficient for photochemical quenching, q_p , was calculated as $(F'_m - F_s) / (F'_m - F'_0)$ (Schreiber et al., 1986). The quantum efficiency of PSII photochemistry, Φ_{PSII} , closely associated with the quantum yield of non-cyclic electron transport, was estimated from $(F'_m - F_s) / F'_m$ (Genty et al., 1989).

Activity of antioxidant enzymes

Antioxidant enzyme activities were assayed in the soluble protein fraction by spectrophotometric and zymogram analyses. SOD activity was determined spectrophotometrically at 560 nm as described by Casano et al. (1999). GR activity was assayed at 25 °C according to Casano et al. (1999), following the decrease in A_{340} due to NADPH oxidation.

For zymograms, soluble proteins (usually 20 μg) were separated by electrophoresis in native PAGE (ND-PAGE). GR and SOD activities were developed as described previously (Lascano et al., 2001). Different SOD isoforms were distinguished based on their sensitivity to inhibition by 2 mM KCN and 5 mM H_2O_2 . Mn-SOD is resistant to CN- and H_2O_2 , Fe-SOD is resistant to CN- but inhibited by H_2O_2 and both inhibitors inactivate CuZn-SOD (Fridovich, 1986).

Immunoblot analysis of photosynthetic proteins, HSP70 and GR

PSI (PsaC) and PSII (D1) proteins were assayed in the 'membrane protein' fraction, and HSP70 and GR were assayed in the 'soluble protein' fraction. After SDS-PAGE, the separated proteins (usually 10 μg) were transferred to PVDF membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). Immunocomplexes with commercially available antibodies against PsaC, D1 and HSP70 (Agrisera, Vännäs, Sweden) or prepared previously against wheat chloroplastic GR (Lascano et al., 2001) were detected with an alkaline phosphatase Western blotting system (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA).

RESULTS

Effects of CuHP on photosynthetic pigments and proteins, and fluorescence parameters

The physiological response to oxidative stress of *R. farinacea* phycobionts was studied by analysing the changes in photosynthetic pigments and proteins in liquid cultures of isolated TR1 and TR9 subjected to different concentrations of CuHP. In a first approach we determined the time course of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoid levels in CuHP-treated TR1 cells over a period of 24 h (Fig. 1). Carotenoid content was the most sensitive to oxidative stress, decreasing by approx. 70 % after a 24-h incubation with 1 mM CuHP, while chlorophyll *b* was not significantly affected by CuHP treatments and chlorophyll *a* showed an intermediate degradation rate. Pigment changes were more intense in the first hour of incubation, especially in carotenoids (Fig. 1). Accordingly, we decided to measure the changes in chlorophyll *a* and carotenoid content in TR1 and TR9 cells incubated with CuHP for 6 h. As shown in Fig. 2, pigment levels decreased as CuHP and

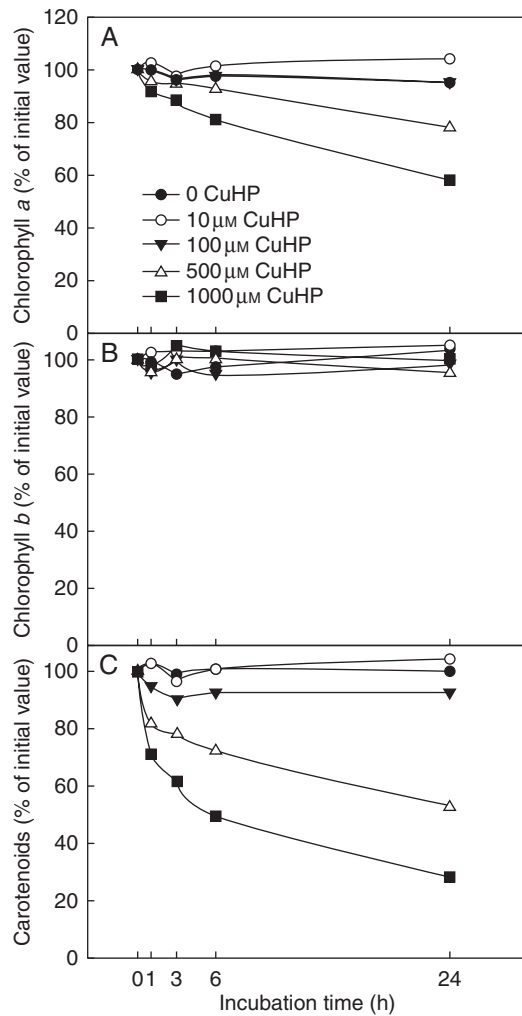


FIG. 1. Effect of oxidative stress on photosynthetic pigments in TR1 *R. farinacea* phycobiont. Liquid cultures of isolated TR1 algae were subjected to oxidative stress through incubations with the ROS propagator CuHP at the indicated concentrations. At the indicated times, carotenoids and chlorophylls *a* and *b* were determined spectrophotometrically as described in Materials and Methods. Initial (incubation time = 0) values of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids were $1.98 (\pm 0.10)$, $0.35 (\pm 0.013)$ and $0.86 (\pm 0.039)$ μg per 10^6 cells, respectively. Values represent mean results of 4–5 independent experiments; s.d. < 5% in all cases.

incubation time increased. However, CuHP-induced oxidative stress had a markedly higher impact on TR1 than on TR9. Indeed, no significant chlorophyll *a* decay was observed in TR9 even following incubation with 1 mM CuHP for 6 h, as this phycobiont maintained carotenoid at higher levels than TR1 under all assayed conditions. The effects of CuHP on the steady-state levels of the proteins PsaC and D1 were analysed by Western blot in isolated TR1 and TR9 cells (Fig. 3). Whereas there was no apparent change in PsaC, D1 decayed progressively in both phycobionts as oxidative stress increased; however, the decrease was markedly more intense in TR1 than in TR9.

In order to study whether the observed differences in the photosynthetic pigments and proteins of TR1 and TR9 accounted for the differences in photosynthetic behaviour under oxidative stress, chlorophyll fluorescence parameters

were analysed in isolated phycobionts exposed to CuHP. Treatments were carried out in solid (cellulose acetate discs) cultures incubated for 1 h with CuHP concentrations of up to 10 mM, after which the discs were returned to control conditions for 24 h and fluorescence parameters were subsequently measured. In general, photosynthesis was negatively affected by the presence of CuHP. Both TR1 and TR9 tolerated 2.5 mM CuHP, but photosynthetic activity decreased linearly as the CuHP concentration rose to 10 mM, at which virtually no photosynthesis was detected using the chlorophyll fluorescence technique. Figure 4A shows the effect of CuHP on the maximum efficiency of PSII photochemistry after dark adaptation (F_v/F_m). Exposure of TR1 and TR9 to CuHP concentrations higher than 2.5 mM produced a decrease in F_v/F_m , demonstrating that the oxidative stress generated by CuHP caused PSII photoinhibition. However, whereas at 5 mM CuHP the F_v/F_m ratio decreased by approx. 52% in TR1, in TR9 it diminished by only 25% with respect to the corresponding control values. At 7.5 mM CuHP, TR1 completely lost photosynthetic activity whereas TR9 retained 27% of the initial activity. PSII photochemical efficiency during actinic light exposure (Φ_{PSII} , Fig. 4B) declined in the presence of 2.5 mM CuHP in the two algal species, albeit to differing extents. Specifically, Φ_{PSII} was less affected in TR9 than in TR1, with significant decreases of 54.4 and 74.7%, respectively. At 7.5 mM CuHP, Φ_{PSII} was completely suppressed in TR1 whereas in TR9 13.5% of the initial level was maintained. Figure 4C depicts the effect of CuHP treatment on the proportion of 'open' PSII centres, estimated as q_p . At 5 mM CuHP, q_p decreased to similar extents in TR1 and TR9 (43.3 and 35.2%, respectively). However, at 7.5 mM CuHP, all TR1 reaction centres were closed whereas TR9 retained 40.9% of its initially open centres. The degree of NPQ (Fig. 4D) was adversely affected by exposure to CuHP in both species. Although the differences were not statistically significant due to the high variability of the data, NPQ values were consistently higher in TR9 than in TR1.

Antioxidant enzymes and HSP70 protein under CuHP treatment

To elucidate the possible cause(s) of the observed differences in photosynthetic behaviour of TR1 and TR9 phycobionts under oxidative stress, we looked for differences in their capacity to modulate the activity of antioxidant enzymes in response to increased levels of ROS. Accordingly, the effects of different CuHP concentrations on the activity and protein levels of GR and the activity of SOD were investigated in liquid cultures of isolated TR1 and TR9 phycobionts through spectrophotometric assays, zymograms and Western blotting. In general, GR and SOD were differentially modulated by oxidative stress in each phycobiont (Fig. 5). Total activity in spectrophotometric assays (Fig. 5A) as well as zymograms (Fig. 5B) showed that initial GR activity was lower in TR9 than in TR1 (50 and 21 nmol NADPH $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, respectively). However, GR activity in TR1 significantly decreased with incubation time and CuHP concentration whereas in TR9 this antioxidant enzyme was dramatically induced by oxidative treatments. As expected, zymograms confirmed the results of total activity spectrophotometric assays, as both phycobionts contain only one GR isoform (as determined by one-dimensional

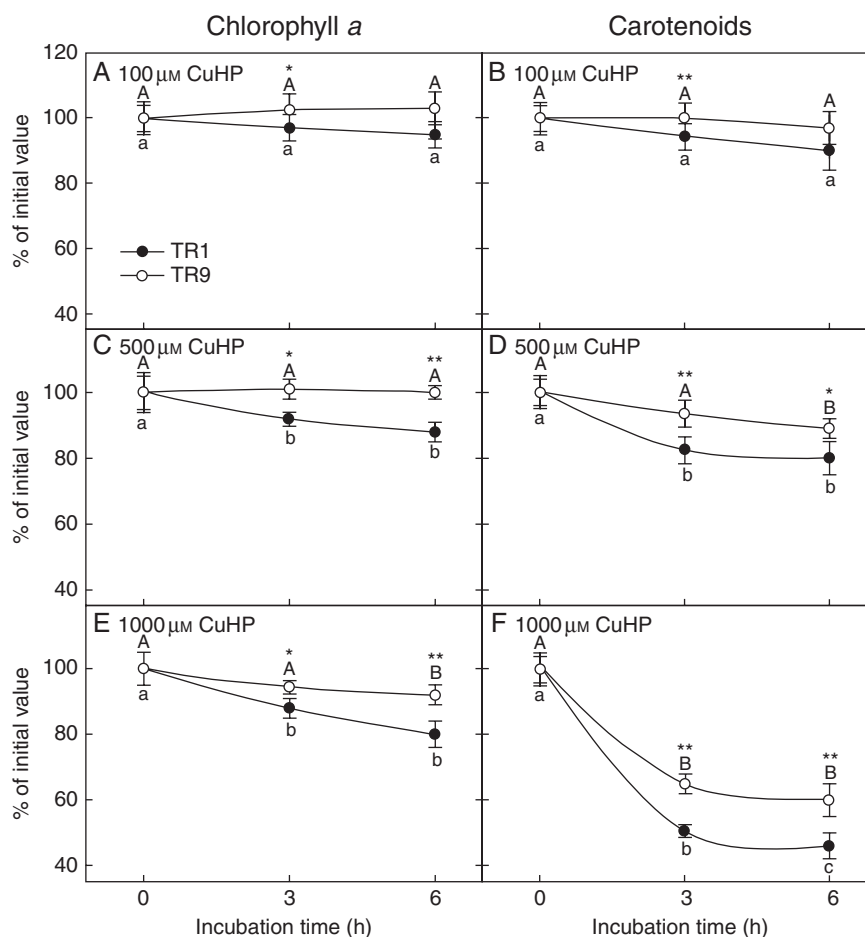


FIG. 2. Changes in chlorophyll *a* and carotenoids in TR1 and TR9 *R. farinacea* phycobionts exposed to oxidative stress. Liquid cultures of isolated TR1 or TR9 algae were subjected to oxidative stress through incubation with (A, B) 100 μM , (C, D) 500 μM or (E, F) 1000 μM CuHP. At the indicated times, chlorophyll *a* (A, C, E) and carotenoids (B, D, F) were determined spectrophotometrically as described in Materials and methods. Initial (incubation time = 0) values of chlorophyll *a* were $2.05 (\pm 0.09)$ and $2.23 (\pm 0.11)$ μg per 10^6 cells for TR1 and TR9, respectively. Initial values of carotenoids were $0.80 (\pm 0.092)$ and $0.94 (\pm 0.086)$ μg per 10^6 cells for TR1 and TR9, respectively. Control cultures incubated without CuHP for 3 and 6 h did not show significant changes with respect to the initial values for all the analysed pigments. Depicted values represent mean results (\pm s.d.) from four independent experiments (only s.d. values larger than the symbol size are represented). Data were statistically analysed by a two-way ANOVA, in which the phycobiont species and incubation time with the indicated CuHP concentration were considered as factors. Differences among phycobiont and treatment means were evaluated using Student's *t*-test. Different lower-case or upper-case letters indicate significant differences ($P > 0.05$) among 0, 3 and 6 h incubation with CuHP for each TR1 and TR9, respectively, and asterisks indicate significant differences between TR1 and TR9 at each CuHP treatment at $*P > 0.05$ or $**P > 0.01$.

ND-PAGE). Moreover, the results of Western blots probed with anti-wheat GR polyclonal antibodies (Lascano *et al.*, 2001) suggested that changes in GR activity were due, at least in part, to parallel variations in the amount of GR protein (Fig. 5B). Based on the extent of total SOD activity (Fig. 5A), this enzyme does not appear to play a particularly relevant role in the different behaviours demonstrated by the TR1 and TR9 phycobionts. However, a more complex picture emerges by analysing SOD isoform patterns (Fig. 5C). The two phycobionts showed the same three main groups of SOD bands, seen as slow, intermediate and high migration rates. However, whereas SOD activity in TR9 was approximately equally distributed among the three groups, in TR1 the contribution of the intermediate bands to global activity was less (compare TR1 and TR9 T_0 lines in Fig. 5C). In addition, in TR1 cells the relatively slight increase (10–45 %) in total SOD activity induced by CuHP treatment (Fig. 5A) was almost completely due to the slowly and highly mobile bands, but in TR9 cells

the increases were mainly accounted for by the intermediate bands. Interestingly, the intermediate band group corresponds to Cu–Zn-SOD isoform(s), probably located within the chloroplast (Supplementary Data, available online). Possible changes in the steady-state level of HSP70 were analysed in TR1 and TR9 cells exposed to oxidative stress through CuHP exposure. As shown in Fig. 3, the initial level of HSP70 was slightly lower in TR9 than in TR1. However, in TR1, HSP70 significantly decreased with incubation time and CuHP concentration while in TR9 oxidative treatment caused a strong increase in the amounts of this defence protein.

DISCUSSION

The present study shows that isolated TR1 and TR9 *R. farinacea* phycobionts respond differently to oxidative stress generated by the ROS propagator CuHP. Compared with TR1, TR9 (Figs 2 and 3) seemed to possess an increased ability to preserve key

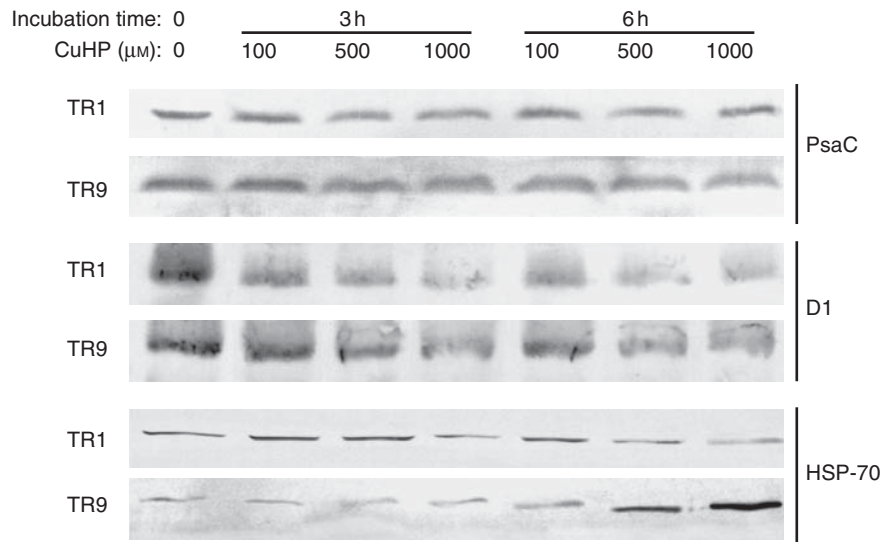


FIG. 3. Changes in PSI, PSII and HSP70 proteins in TR1 and TR9 *R. farinacea* phycobionts exposed to oxidative stress. Liquid cultures of isolated TR1 or TR9 algae were subjected to oxidative stress through incubations with the ROS propagator CuHP at the indicated concentrations. At the indicated times, soluble and membrane proteins were extracted and separated by differential centrifugation as described in Materials and methods. PSI (PsaC) and PSII (D1) proteins encoded by *psaC* and *psbA* genes, respectively, were immunodetected by Western blotting of the membrane protein fraction and HSP70 by Western blotting of the soluble protein fraction.

chloroplast components, such as chlorophyll *a*, carotenoids and D1 protein (a component of the PSII core complex). The effect of CuHP on the algae was also analysed by modulated chlorophyll *a* fluorescence. This technique has been broadly used to monitor lichen health and the effects of a broad range of stresses, such as heavy metals (Branquinho *et al.*, 1997), SO₂ (Deltoro *et al.*, 1998), dehydration (Beckett *et al.*, 2005; Gasulla *et al.*, 2009) and ozone (Calatayud *et al.*, 2000), as it is non-invasive and allows changes in photosynthetic activity to be detected before the onset of other signs of injury. In general, photosynthetic performance was severely impaired by oxidative stress in TR1 and TR9, as indicated especially in the former by decreases in maximal PSII photochemical efficiency (F_v/F_m) and the quantum efficiency of PSII (Φ_{PSII}), along with a higher proportion of closed PSII centres (Fig. 4). The decline in F_v/F_m could have been due to an increase in protective NPQ, to photo-damage of the PSII centres or to both (Osmond, 1994). Our results suggest that the lower F_v/F_m in CuHP-treated algae was the result of severe stress at the PSII level, because NPQ was likewise adversely affected. Furthermore, the decrease of q_P in the CuHP-treated algae indicated that oxidative stress decreased their capacity for reoxidizing Q_A during actinic illumination. Consequently, CuHP may have increased the excitation pressure on PSII, thus contributing to the closure of PSII reaction centres. Closed PSII centres have fully reduced Q_A, eliminating the possibility of electron transport to PSI and beyond (Seaton and Walker, 1990). In agreement with this finding, Φ_{PSII} , which closely correlates with the quantum yield of non-cyclic electron transport (Genty *et al.*, 1989), was clearly reduced by CuHP. However, it should be noted that the impact of oxidative treatments was consistently and significantly more severe in TR1 than in TR9. This probably reflects the greater capacity of TR9 to preserve key chloroplast components, which in turn enables it to maintain a better photosynthetic performance under relatively strong oxidative stress.

Under natural conditions, the chloroplast is a potent source of ROS, levels of which may increase dramatically in response to stresses involving temperature, irradiance and hydration state (Weissman *et al.*, 2005; Catalá *et al.*, 2010). Therefore, survival of the chloroplast and of the entire phycobiont will depend, at least in part, on their capacity to modulate steady-state levels of ROS. This regulation is complex and still poorly understood in lichen algae, but probably involves at least two important strategies: the prevention of excess ROS formation by increasing mechanisms of light dissipation, and ROS degradation and/or scavenging through the antioxidant defence system. Accordingly, and with the aim of identifying major metabolic distinctions that explain the differences in the oxidative stress tolerance observed in the photosynthetic machinery of TR1 and TR9, we determined the non-photochemical energy dissipation associated with photosynthetic electron transfer (NPQ) and the activity of the two main antioxidant enzymes, SOD and GR. NPQ, as calculated by a Stern–Volmer approach, is a useful measure of the allocation of absorbed light to thermal energy dissipation (Logan *et al.*, 2007). In vascular plants it is assumed that NPQ affords a protection system for the photosynthetic mechanism, through the light-dependent formation of a proton gradient across the thylakoid membrane activating the xanthophyll cycle (Adams and Demmig-Adams, 2004). However, it is currently assumed that the non-photochemical dissipation processes in lichen photobionts differ from those in vascular plants (Kopecky *et al.*, 2005). Indeed, in homeohydric vascular plants NPQ is dependent on light and quickly disappears when it is dark (Müller *et al.*, 2001; Szabó *et al.*, 2005), whereas energy dissipation in the lichen phycobiont *Trebouxia erici* can continue after spending 24 h in darkness and is independent of the xanthophylls cycle (Gasulla *et al.*, 2009). Whatever the metabolic basis of NPQ in lichen algae, oxidative stress diminished NPQ in both phycobionts. TR1

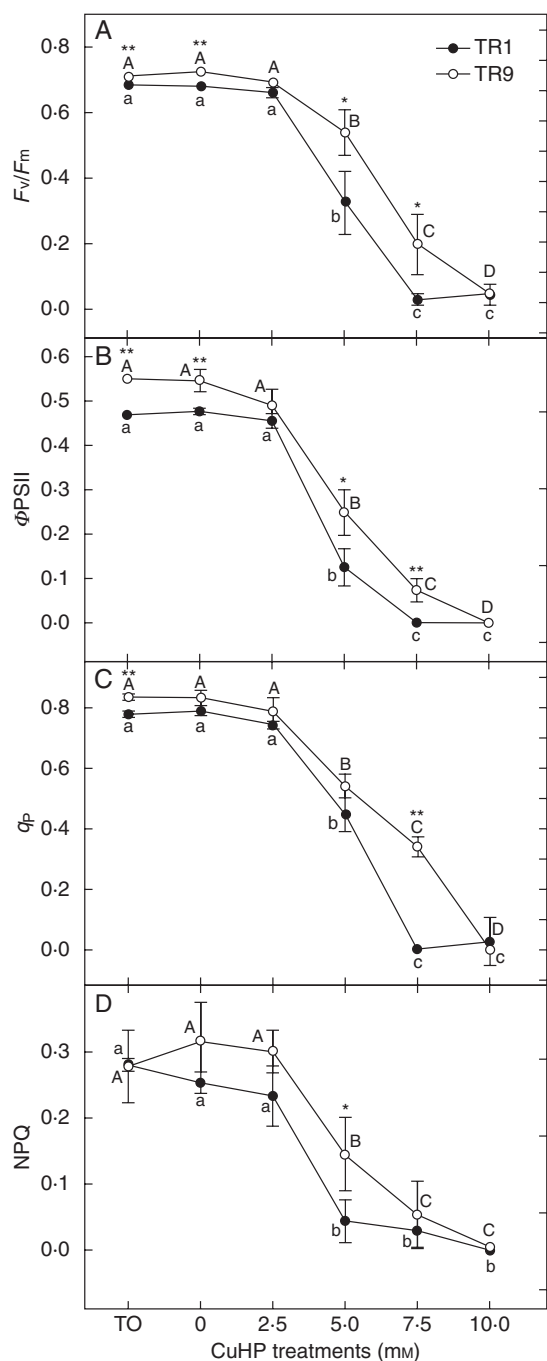


FIG. 4. Effect of oxidative stress on photosynthetic performance of TR1 and TR9 *R. farinacea* phycobionts. Chlorophyll *a* fluorescence was measured at room temperature using a pulse modulation fluorometer. Isolated algae on cellulose acetate discs were incubated for 1 h with CuHP at the indicated concentrations and then returned to control conditions for 24 h. F_v/F_m provides an estimate of the maximal quantum efficiency; Φ_{PSII} , the effective quantum yield of photochemical conversion in PSII; q_p , the photochemical quenching; and NPQ, the quantum yield of regulated energy dissipation in PSII. Depicted values represent mean results (\pm s.d.) from five independent experiments (only s.d. values larger than the symbol size are represented). Data were analysed by a two-way ANOVA, in which the phycobiont species and CuHP treatment were considered as factors. Differences among phycobiont and treatment means were evaluated using Student's *t*-test. Different lower-case or upper-case letters indicate significant differences ($P > 0.05$) among CuHP treatments for each TR1 and TR9, respectively, and asterisks indicate significant differences between TR1 and TR9 at each CuHP treatment at $*P > 0.05$ or $**P > 0.01$.

seemed to be more sensitive than TR9 to CuHP treatments, as evidenced by a greater decrease in NPQ. In addition to non-photochemical energy dissipation, enzymatic and non-enzymatic antioxidants offer protection against the oxidative stress resulting from the increases in ROS that occur in response to diverse environmental stresses (Minibayeva and Beckett, 2001; Weissman *et al.*, 2005; Kosugi *et al.*, 2009). Antioxidant mechanisms common in vascular plants have been analysed in lichens, such as SOD (Weissman *et al.*, 2005), peroxidases (Silberstein *et al.*, 1996; Kranner *et al.*, 2005), enzymes of the ascorbate–glutathione cycle (Kranner, 2002; Kranner *et al.*, 2005) and low-molecular-weight antioxidants (Deltoro *et al.*, 1998; Kranner, 2002; Kranner *et al.*, 2005). In a study of atmospheric pollutants on photosynthetic performance of *Parmelia quercina*, Calatayud *et al.* (1999) reported that ascorbate feeding decreased photon excess in thalli from polluted sites owing to the stimulation of linear electron flow and non-radiative energy dissipation. However, it has not yet been possible to establish a clear relationship between the different levels of stress tolerance exhibited by most lichens and antioxidant mechanisms. Some of the conflicting results reported in the literature could be due to the fact that spectrophotometric assays of most antioxidant enzymes in crude extracts only yield an approximate ‘average’ cellular activity as most of these enzymes are expressed as different isoforms associated with different cellular compartments. Therefore, in our study SOD and GR activities were determined by spectrophotometric assay of crude extracts as well as by zymogram analysis. This approach confirmed the different abilities of the two phycobionts to modulate their antioxidant enzymes in response to oxidative stress (Fig. 5). In TR1, CuHP treatments significantly diminished GR protein levels and enzymatic activity and only slightly increased overall SOD activity without detectable changes in the activity of its different isozymes. Contrastingly, in TR9 the levels of GR and the activity of the putative chloroplast SOD isozyme increased in response to CuHP treatment.

As noted in the Introduction, *R. farinacea* has a highly specific and selective pattern of symbiotic association in which a single mycobiont associates with the same two *Trebouxia* phycobionts (TR1 and TR9) in all analysed populations, independent of this lichen's geographical location (del Campo *et al.*, 2010; L. M. Casano *et al.*, unpubl. res.). Additionally, an initial physiological characterization of TR1 and TR9 algae suggested a better physiological performance of TR9 under relatively high temperature and irradiances while TR1 seems to prefer more temperate and shaded conditions. Interestingly, TR1 predominates in *R. farinacea* populations from the Iberian Peninsula and California, whereas TR9 is more abundant in Canary Islands populations located at high altitudes (L. M. Casano *et al.*, unpubl. res.), which are exposed to relatively harsher environmental conditions. Based on the results of the present study, we propose that the relative abundance of each phycobiont in each thallus might vary among different populations as a consequence of different environmental conditions along with different physiological capacities of the two algal species, similar to the ‘symbiont shuffling’ described in reef corals (Goulet, 2006). Studies on the latter suggested that the thermal tolerance of

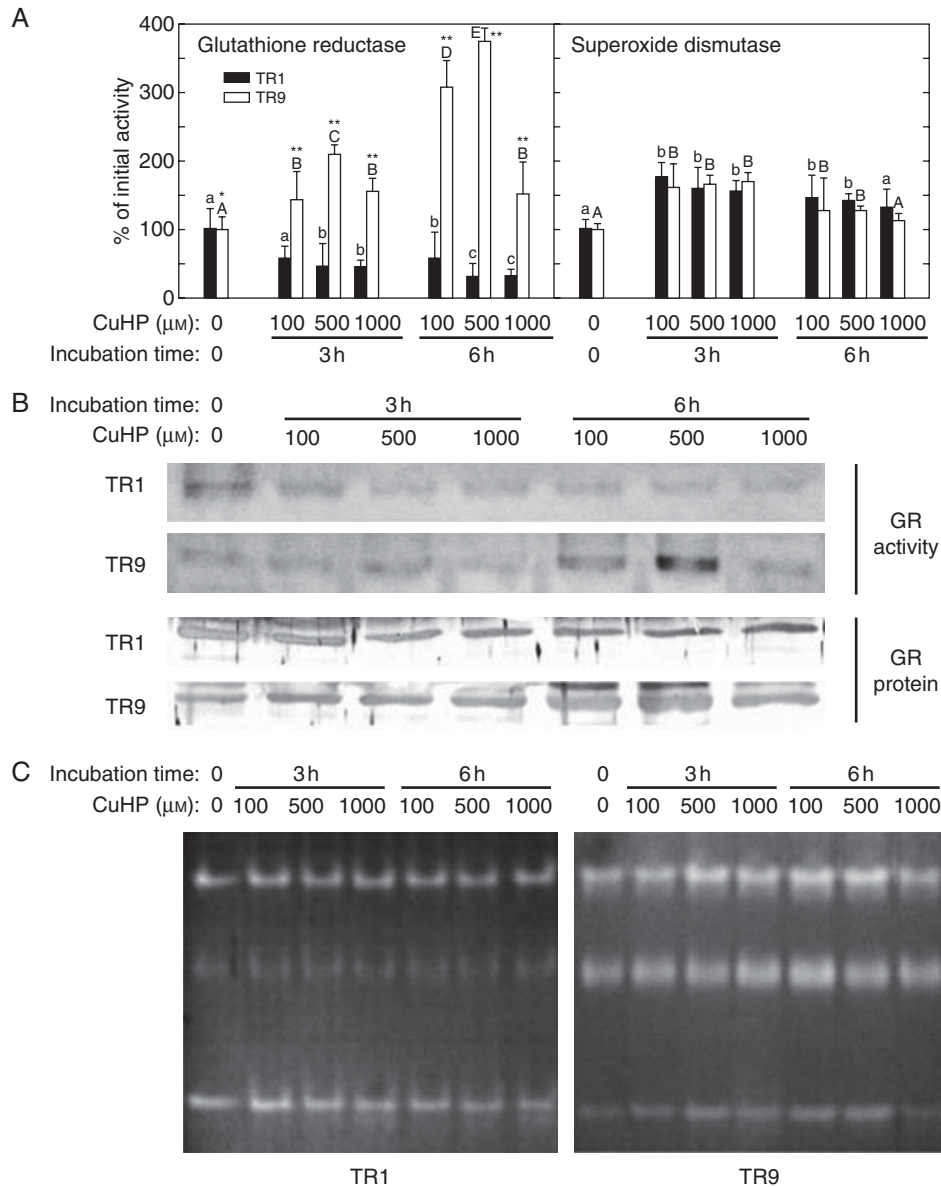


FIG. 5. Changes in glutathione reductase and superoxide dismutase in TR1 and TR9 *R. farinacea* phycobionts exposed to oxidative stress. Liquid cultures of isolated TR1 or TR9 algae were subjected to oxidative stress through incubations with the ROS propagator CuHP at the indicated concentrations. At the indicated times, soluble proteins were extracted by homogenization and separated by differential centrifugation. Total GR and SOD activities (A) were determined in soluble protein extracts by spectrophotometric assays as described in Materials and methods. Initial (incubation time = 0) values of GR activity were $50 (\pm 3.61)$ and $21 (\pm 1.85)$ nmol NADPH min⁻¹ mg⁻¹ for TR1 and TR9, respectively. Initial values of SOD activity were $31.95 (\pm 17.55)$ and $30.30 (\pm 12.08)$ U mg⁻¹ for TR1 and TR9, respectively. Enzyme activities in control cultures incubated without CuHP for 3 and 6 h did not show significant changes with respect to the values at 0 h. Values depicted represent the means of 3–4 independent experiments \pm s.d. Data were statistically analysed by a two-way ANOVA, in which the phycobiont species and CuHP treatment (CuHP concentration and incubation time) were considered as factors. Differences among phycobiont and treatment means were evaluated using Student's *t*-test. Different lower-case or upper-case letters indicate significant differences ($P > 0.05$) among CuHP treatments for each TR1 and TR9, respectively, and asterisks indicate significant differences between TR1 and TR9 at each CuHP treatment at * $P > 0.05$ or ** $P > 0.01$, respectively. (B) Zymograms of GR (GR activity) after separation of the putative isozymes by ND-PAGE and activity staining (only one GR band was observed), and steady-state levels of GR protein (GR protein) as revealed by immunoblotting after SDS-PAGE. (C) Zymograms of SOD after isozyme separation by ND-PAGE and activity staining.

zooxanthellae relies on the stability of thylakoid membranes. The more stable the thylakoid membranes, the less vulnerable host tissues are to attack by ROS (Berkelmans and van Oppen, 2006). In the present study, comparative analysis of the responses of TR1 and TR9 phycobionts to CuHP with respect to key chloroplast constituents and photosynthetic

traits suggests a better physiological performance of TR9 under oxidative conditions. This higher stress tolerance could be the consequence of a higher capacity to undertake key metabolic adjustments, including increased non-photochemical quenching, higher antioxidant protection and induced repair mechanisms.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at www.aob.oxfordjournals.org and show blots of Cu–Zn- and Fe-SOD isoforms in phycobionts of *R. farinacea*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (CGL2009-13429-C02-01/02) and the Generalitat Valenciana (PROMETEO 174/2008 GVA).

LITERATURE CITED

- Adams WWIII, Demmig-Adams B. 2004. Chlorophyll fluorescence as a tool to monitor plant response to the environment. In: Papageorgiou C, Govindjee J. eds. *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration*, 19. Dordrecht: Springer, 583–604.
- Asada K. 1999. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 601–639.
- Ayala A, Parrado J, Bougria M, Machado A. 1996. Effect of oxidative stress produced by cumene hydroperoxide on the various steps of protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 38: 23105–23110.
- Barreno E. 2004. Hongos simbiotes: Líquenes, micoficobiosis y micorrizas. In: Izco J. ed. *Botánica*. Madrid: MacGraw-Hill Interamericana, 309–340.
- Beckett RP, Mayaba N, Minibayeva FV, Alyabyev AJ. 2005. Hardening by partial dehydration and ABA increase desiccation tolerance in the cyanobacterial lichen *Peltigera polydactylon*. *Annals of Botany* 96: 109–115.
- Berkelmans R, van Oppen MJH. 2006. The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a ‘nugget of hope’ for coral reefs in an era of climate change. *Proceedings of the Royal Society B* 273: 2305–2312.
- Bilger W, Björkman O. 1991. Temperature dependence of violaxanthin deoxidation and non-photochemical fluorescence quenching in intact leaves of *Gossypium hirsutum* L. and *Malva parviflora* L. *Planta* 184: 226–234.
- Bold HC, Parker BC. 1962. Some supplementary attributes in the classification of *Chlorococcum* species. *Archives of Microbiology* 42: 267–288.
- Branquinho C, Brown DH, Máguas C, Catarino F. 1997. Pb uptake and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence in different lichen species. *Environmental and Experimental Botany* 37: 95–105.
- Calatayud A, Deltoro VI, Abadía A, Abadía J, Barreno E. 1999. Effects of ascorbate feeding on chlorophyll fluorescence and xanthophyll cycle components in the lichen *Parmelia quercina* (Willd.) Vainio exposed to atmospheric pollutants. *Physiologia Plantarum* 105: 679–684.
- Calatayud A, Temple P, Barreno E. 2000. Chlorophyll a fluorescence emission, xanthophylls cycle activity and net photosynthesis responses to ozone in some foliose and fruticose lichen species. *Photosynthetica* 38: 281–286.
- Casano LM, Lascano HR, Trippi VS. 1994. Hydroxyl radicals and a thylakoid-bound endopeptidase are involved in the light- and oxygen-induced proteolysis in oat chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 35: 145–152.
- Casano LM, Martín M, Zapata JM, Sabater B. 1999. Leaf age- and paraquat-dependent effects on the levels of enzymes protecting against photooxidative stress. *Plant Science* 149: 13–22.
- Catalá M, Gasulla F, Pradas del Real A, García-Breijo F, Reig-Armiñana J, Barreno E. 2010. Nitric oxide is involved in oxidative stress during rehydration of *Ramalina farinacea* (L.) Ach. in the presence of the oxidative air pollutant cumene hydroperoxide. In: Nash T. ed. *Bibliotheca Lichenologica*, 105. Stuttgart: Schweizerbart science publishers, 87–92.
- Chapman MJ, Margulis L. 1998. Morphogenesis by symbiogenesis. *International Microbiology* 1: 319–326.
- del Campo EM, Gimeno J, Casano LM, et al. 2010. South European populations of *Ramalina farinacea* (L.) Ach. share different *Trebouxia* algae. In: Nash T. ed. *Bibliotheca Lichenologica*, 105. Stuttgart: Schweizerbart science publishers, 247–256.
- Deltoro VI, Calatayud A, Gimeno C, Abadía A, Barreno E. 1998. Changes in chlorophyll a fluorescent, photosynthetic CO₂ assimilation and xanthophyll cycle interconversions during dehydration in desiccation-tolerant and intolerant liverworts. *Planta* 207: 224–228.
- Duan YH, Guo J, Ding K, et al. 2010. Characterization of a wheat HSP70 gene and its expression in response to stripe rust infection and abiotic stresses. *Molecular Biology Reports*, in press. doi:10.1007/s11033-010-0108-0.
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* 92: 696–717.
- Fridovich I. 1986. Superoxide dismutases. In: Mekter A. ed. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 58. New York: John Wiley & Sons, 61–97.
- Galvez-Valdivieso G, Mullineaux PM. 2010. The role of reactive oxygen species in signalling from chloroplasts to the nucleus. *Physiologia Plantarum* 138: 430–439.
- Gasulla F, de Nova PG, Esteban-Carrasco A, Zapata JM, Barreno E, Guera A. 2009. Dehydration rate and time of desiccation affect recovery of the lichen alga *Trebouxia erici*: alternative and classical protective mechanisms. *Planta* 231: 195–208.
- Gasulla F, Guera A, Barreno E. 2010. A simple micromethod for isolating lichen photobionts. *Symbiosis* 51: 175–179.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87–92.
- Goulet TL. 2006. Most corals may not change their symbionts. *Marine Ecology Progress Series* 321: 1–7.
- Kopecky J, Azarkovich M, Pfundel EE, Shuvalov VA, Heber U. 2005. Thermal dissipation of light energy is regulated differently and by different mechanisms in lichens and higher plants. *Plant Biology (Stuttgart)* 7: 156–167.
- Kosugi M, Arita M, Shizuma R, et al. 2009. Responses to desiccation stress in lichens are different from those in their symbionts. *Plant Cell Physiology* 50: 879–888.
- Kraner I. 2002. Glutathione status correlates with different degrees of desiccation tolerance in three lichens. *New Phytologist* 154: 451–460.
- Kraner I, Zorn M, Turk B, Wornik S, Beckett RR, Batić F. 2003. Biochemical traits of lichens differing in relative desiccation tolerance. *New Phytologist* 160: 167–176.
- Kraner I, Cram WJ, Zorn M, et al. 2005. Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 102: 3141–3146.
- Kraner I, Birtic S, Anderson KM, Pritchard HW. 2006. Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death? *Free Radicals in Biology and Medicine* 40: 2155–2165.
- Lascano HR, Antonicelli GE, Luna CM, et al. 2001. Antioxidative system response of different wheat cultivars under drought: field and *in vitro* studies. *Functional Plant Biology* 28: 1095–1102.
- Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids, pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350–382.
- Logan BA, Adams WWIII, Demmig-Adams B. 2007. Avoiding common pitfalls of chlorophyll fluorescence analysis under field conditions. *Functional Plant Biology* 34: 853–859.
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment* 33: 453–67.
- Minibayeva F, Beckett RP. 2001. High rates of extracellular superoxide production in bryophytes and lichens, and an oxidative burst in response to rehydration following desiccation. *New Phytologist* 152: 333–341.
- Müller P, Li X-P, Niyogi KK. 2001. Non-photochemical quenching: a response to excess light energy. *Plant Physiology* 125: 1558–1566.
- Niyogi KK, Li XP, Rosenberg V, Jung HS. 2004. Is psbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *Journal of Experimental Botany* 56: 375–382.
- Noctor G, Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249–279.
- Osmond CB. 1994. What is photoinhibition? Some insights from comparison of shade and sun plants. In: Baker RR, Bowyer JR. eds. *Photoinhibition of photosynthesis*. Oxford: Bios Scientific Publishers Ltd, 1–24.

- Scandalios JG. 2001.** Molecular responses to oxidative stress. In: Hawkesford MJ, Buchner P. eds. *Molecular analysis of plant adaptation to the environment*. Dordrecht: Kluwer, 181–208.
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W. 1986.** Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* **10**: 51–62.
- Seaton GGR, Walker DA. 1990.** Chlorophyll fluorescence as a measure of photosynthetic carbon assimilation. *Proceedings of the Royal Society of London B* **242**: 29–35.
- Szabó I, Bergantino E, Giacometti GM. 2005.** Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photooxidation. *EMBO Reports* **6**: 629–634.
- Silberstein L, Siegel BZ, Siegel SM, Mukhtar A, Galun M. 1996.** Comparative studies on *Xanthoria parietina*, a pollution-resistant lichen, and *Ramalina duriaei*, a sensitive species. 1. Effects of air pollution on physiological processes. *Lichenologist* **28**: 355–365.
- Song YG, Liu B, Wang LF, Li MH, Liu Y. 2006.** Damage to the oxygen-evolving complex by superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical in photoinhibition of photosystem II. *Photosynthesis Research* **90**: 67–78.
- Weissman L, Garty J, Hochman A. 2005.** Characterization of enzymatic antioxidants in the lichen *Ramalina lacera* and their response to rehydration. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 6508–6514.



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://SciVerse.ScienceDirect.com)

Journal of Plant Physiology

journal homepage: www.elsevier.de/jplph



Different strategies to achieve Pb-tolerance by the two *Trebouxia* algae coexisting in the lichen *Ramalina farinacea*

Raquel Álvarez^a, Alicia del Hoyo^a, Francisco García-Breijo^{b,c}, José Reig-Armiñana^b,
Eva M. del Campo^a, Alfredo Guéra^a, Eva Barreno^b, Leonardo M. Casano^{a,*}

^a Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Alcalá, 28871-Alcalá de Henares, Madrid, Spain

^b Departamento de Botánica, Universitat de València, ICBI, Fac. C. Biológicas, c/Dr. Moliner 50, 46100-Burjassot, Valencia, Spain

^c Departamento de Ecosistemas Agroforestales, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46020 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 April 2012

Received in revised form 6 July 2012

Accepted 7 July 2012

Keywords:

Heavy metal tolerance

Lead

Lichen microalgae

Stress response

Trebouxia algae

ABSTRACT

Lichen thalli are permeable to airborne substances, including heavy metals, which are harmful to cell metabolism. *Ramalina farinacea* shows a moderate tolerance to Pb. This lichen comprises two *Trebouxia* phycobionts, provisionally referred to as TR1 and TR9, with distinct physiological responses to acute oxidative stress. Thus, there is a more severe decay in photosynthesis and photosynthetic pigments in TR1 than in TR9. Similarly, under oxidative stress, antioxidant enzymes and HSP70 protein decrease in TR1 but increase in TR9. Since Pb toxicity is associated with increased ROS formation, we hypothesized greater Pb tolerance in this phycobiont. Accordingly, the aim of the present study was to characterize the physiological differences in the responses of TR1 and TR9 to Pb exposure. Liquid cultures of isolated phycobionts were incubated for 7 days in the presence of Pb(NO₃)₂. Thereafter, extracellular and intracellular Pb accumulation, photosynthetic pigments, and photosynthesis (as modulated chlorophyll fluorescence) were analyzed along with the antioxidant enzymes glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APx), and catalase (CAT), and the stress-related protein HSP70. Pb uptake increased with the amount of supplied Pb in both algae. However, while significantly more metal was immobilized extracellularly by TR9, the amount of intracellular Pb accumulation was three times higher in TR1. In neither of the phycobionts were significant effects on photosynthetic pigments or photosynthetic electron transport observed. While under control conditions GR, SOD, and APx levels were significantly higher in TR1 than in TR9, only in the latter were these enzymes induced by Pb. This resulted in quantitatively similar antioxidant activities in the two algae when exposed to Pb. In conclusion, the phycobionts of *R. farinacea* make use of two different strategies against stress, in which the integration of distinct anatomical and physiological features affords similar levels of Pb tolerance.

© 2012 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Lichen thalli can be considered as self-contained minibiomes resulting from the close, symbiotic, morphological and physiological integration of a nutritionally specialized fungus (mycobiont) and at least a green alga and/or cyanobacteria (photobionts) (Margulis and Barreno, 2003; Casano et al., 2011). In many cases, lichenization allows both the photobiont and the mycobiont to thrive under extremely harsh environmental conditions, such as in the presence of high concentrations of heavy metals (HMs) and other environmental pollutants, where individually they would be

rare or non-viable (Garty, 2001; De Vera et al., 2008; Grube, 2010). Lichens do not develop either root-like structures or a waxy impermeable cuticle; consequently airborne substances, including HMs, accumulate within thalli in amounts that depend on the atmospheric concentration (Garty, 2001; Loppi and Frati, 2006). To cope with the potential metabolic disturbances caused by intracellular HM accumulation, lichen thalli have developed an armamentarium of biological responses. Indeed, there is vast diversity in HM-tolerance among lichens, ranging from moderately tolerant species, e.g., *Lecanora conizaeioides* (Hauck et al., 2007) and *Ramalina farinacea* (Branquinho et al., 1997), to sensitive ones, e.g., *Hypogymnia physodes* and *Pseudoevernina* spp. (Hauck et al., 2007). Based on all of these features, lichens can be viewed as extremely valuable biomonitors of environmental pollution (Garty, 2001; Barreno, 2002; Nimis et al., 2002 and references therein).

The HM tolerance of lichens is an expanding area of research, as recently pointed out by several authors (Sanità di Toppi et al., 2008; Bačkor and Loppi, 2009; Pawlik-Skowronska and Bačkor,

Abbreviations: APx, ascorbate peroxidase; CAT, catalase; EDXS, energy dispersive X-ray spectroscopy; GR, glutathione reductase; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; TEM, transmission electron microscopy.

* Corresponding author. Tel.: +34 91 8856432; fax: +34 91 8855066.

E-mail addresses: leonardo.casano@uah.es, leocasano@gmail.com (L.M. Casano).

0176-1617/\$ – see front matter © 2012 Elsevier GmbH. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2012.07.005>

Please cite this article in press as: Álvarez R, et al. Different strategies to achieve Pb-tolerance by the two *Trebouxia* algae coexisting in the lichen *Ramalina farinacea*. J Plant Physiol (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2012.07.005>

2011). However, the physiological basis of such tolerance, and especially whether the mycobiont and photobiont differ in their sensitivity to HMs, is still poorly understood and somewhat controversial. *Trebouxia* spp. algae were reported to be more sensitive to HMs and other pollutants than the corresponding mycobionts (Ahmadjian, 1993), thus conditioning the HM-sensitivity of the holobiont. However, Hauck and co-workers (2007), in their analysis of photobiont selectivity in epiphytic lichens with different HM sensitivities, found that the same trebouxoid microalgae may be present in HM-tolerant and HM-sensitive lichens. For instance, these authors noted that *Trebouxia hypogymniae* was the phycobiont of the HM-sensitive lichen *H. physodes* and of the HM-tolerant *Lecidea silacea*, suggesting that photobionts are not the key determinant of pollution sensitivity in the most common lichens (Hauck et al., 2007). Conversely, Branquinho et al. (1997), Beck (1999), Branquinho (2001), Bačkor and Vaczi (2002), and Bačkor et al. (2007) provided evidence from both field and “*in vitro*” studies indicating the involvement of photobionts in the HM-tolerance of lichen thalli. For instance, Branquinho et al. (1997) observed that the effects of Pb on four lichen species comprising different photobionts were dependent on the nature of the photobiont. As determined in measurements of PSII photochemical reactions, the cyanobiont lichen *Peltigera canina* was the most Pb-sensitive, consistent with its previously documented responses to other HMs (Brown and Beckett, 1985). Within chlorobiont lichens, those containing *Trebouxia* spp. as primary algae (*Parmelia caperata* or *R. farinacea*) were shown to be moderately Pb-tolerant, while the HM-sensitivity of *Lobaria pulmonaria*, in which *Dictyochochloropsis* is the primary phycobiont, is intermediate (Branquinho et al., 1997). The authors of these studies concluded that the observed effects of Pb on lichens are dependent only on the physiological response of the photobionts.

Exposure to HMs in general, and to Pb in particular, increases the production of reactive oxygen species (ROS), including superoxide radicals, hydroxyl radicals, and hydrogen peroxide, thereby unbalancing the cellular redox status (Verma and Dubey, 2003; Liu et al., 2008; Stomka et al., 2008; Phang et al., 2011). At high levels, or following acute increases of metal pollutants, algal cells are injured because the resulting ROS levels exceed the capacities of cellular antioxidant protection systems. ROS can react with cellular components (lipids, proteins, pigments, nucleic acids) to cause lipid peroxidation, membrane damage, and enzyme inactivation, thus affecting many physiological processes as well as cell viability (Pinto et al., 2003; del Hoyo et al., 2011 and references therein). One process highly sensitive to Pb is photosynthesis, probably due to the strong detrimental effects of ROS on critical components of the photosynthetic machinery (Calatayud et al., 1999). Sharma and Dubey (2005) reviewed the multiple impacts of Pb on the chloroplasts of vascular plants, including structural disorders of thylakoids, quantitative and qualitative alterations in the pigment composition, changes in lipid composition with consequent disruption of membrane permeability, and alterations of the photochemical activities of PSI, PSII, and the photosynthetic electron transport chain. In addition, Pb blocks photosynthesis by inhibiting the carboxylase activity of RuBisCO, and probably other enzymes of the Calvin cycle as well. Irreversible binding of Pb with the RuBisCO enzyme dissociates the latter into its component subunits, leading to a loss of activity. In other cases, Pb affects enzyme activities, often towards inhibitory effects, either directly, by interacting with –SH groups, or indirectly, via Pb-induced ROS, which in turn oxidizes the –SH groups of proteins (Liu et al., 2009).

The lichen *R. farinacea* has a world-wide distribution and is encountered in polluted and unpolluted areas (Riga-Karandinos and Karandinos, 1998; Arhoun et al., 2000; Loppi and Frati, 2006; Fadila et al., 2009), indicating a moderate tolerance to Pb, as has

also been suggested by laboratory experiments (Branquinho et al., 1997). In addition, in previous studies we determined that, regardless of the geographic location of this lichen, two genetically and morphologically different *Trebouxia* algae (provisionally named TR1 and TR9) coexist within every thallus (del Campo et al., 2010; Casano et al., 2011; del Hoyo et al., 2011). TR1 and TR9 show distinct physiological responses to the oxidative stress caused by the ROS propagator cumene hydroperoxide (del Hoyo et al., 2011). Thus, in TR1, there is a more severe decay in photosynthesis, a reduction in the non-photochemical dissipation of absorbed energy, and diminished amounts of photosynthetic pigments and proteins. Oxidative stress causes a decrease in antioxidant enzymes and HSP70 protein in TR1, but an increase in TR9. Based on these observations, we hypothesized that TR9 microalgae would be relatively more Pb-tolerant than TR1, thus conditioning the Pb-tolerance of the holobiont. It should be noted that, to the best of our knowledge, the physiological response to HMs of different phycobionts coexisting within the same lichen thallus has yet to be analyzed.

Therefore, the aim of the present study was to determine the basis for the physiological differences between cultured TR1 and TR9 phycobionts in their response to Pb exposure. Isolated axenic cultures of TR1 and TR9 microalgae were exposed to nutrient solutions containing different concentrations of lead, and the subsequent effects on extracellular and intracellular Pb accumulation, photosynthetic pigment content, chlorophyll fluorescence, and quenching parameters were examined. In addition, the detoxification response to Pb was determined with respect to the levels of several important antioxidant enzymes, i.e., glutathione reductase (EC 1.6.4.2) (GR), superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) (SOD), ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.1) (APx), and catalase (EC 1.11.1.6) (CAT), and to the amount of the cellular stress-related protein HSP70.

Materials and methods

Phycobiont isolation and culture. Lead treatments. Intracellular lead uptake in Trebouxia TR1 and T. TR9 cells

Trebouxia TR1 and *T. TR9* were isolated in our laboratories from a population of the lichen *Ramalina farinacea* (L.) Ach. following the method of Gasulla et al. (2010). Thalli were collected in the air-dried state on *Quercus rotundifolia* Lam. at S³ El Toro (Castellón, Spain; 39°54'16"N, 0°48'22"W). Samples were frozen at –20 °C for 3 months, at which time they were cultured in liquid or semisolid Bold 3N medium (Bold and Parker, 1962) in a growth chamber at 15 °C, under a 14-h/10-h light/dark cycle (lighting conditions: 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Three-week-old liquid cultures of TR1 and TR9 phycobionts (exponential growth phase) were diluted to 2×10^6 cells/ml and incubated with 0, 50, or 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ dissolved in Bold 3N culture medium. Typically, 50 ml of treated cultures rendered ca. 250–300 mg of microalgae cells. After 7 days in a growth chamber at 15 °C, the algal suspensions were centrifuged and then rinsed once with 200 ml of ultrapure cold water, after which extracellular Pb was eluted with 20 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, pH 4.5, following the procedure described by Branquinho and Brown (1994) and Branquinho et al. (1997). Lead speciation of the 50 or 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ culture media was estimated by employing the computer program MINTeq ver. 3.0 (<http://www2.lwr.kth.se/English/OurSoftware/vminteq/>) (Table 1). It should be noted that all chemical species formed by Pb in both treatments were aqueous soluble, and the sum of free active and EDTA-complexed Pb accounted for >60% of such species. In vascular plants, EDTA maintains the solubility of Pb, thus facilitating its absorption and translocation as Pb–EDTA complexes (Epstein et al., 1999).

Table 1

Lead speciation in liquid Bold 3-N culture media containing $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ at the indicated concentrations. The qualitative and quantitative distributions of the chemical species of Pb, including solubility criteria, were estimated through the Visual MINTEQ chemical equilibrium model (MINTEQ ver. 3.0).

$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ treatment	Free Pb^{2+} concentration	Free Pb^{2+} activity	Total soluble forms (%)	Complexed with EDTA	Complexed with OH^-	Complexed with PO_4	Complexed with SO_4
50 μM	$3.15 \text{ E}^{-5} \text{ M}$	$2.13 \text{ E}^{-5} \text{ M}$	100	$1.11 \text{ E}^{-5} \text{ M}$	$1.88 \text{ E}^{-7} \text{ M}$	$1.81 \text{ E}^{-6} \text{ M}$	$2.21 \text{ E}^{-6} \text{ M}$
100 μM	$7.10 \text{ E}^{-5} \text{ M}$	$4.79 \text{ E}^{-5} \text{ M}$	100	$1.22 \text{ E}^{-5} \text{ M}$	$4.23 \text{ E}^{-7} \text{ M}$	$4.01 \text{ E}^{-6} \text{ M}$	$4.94 \text{ E}^{-6} \text{ M}$

Intracellular Pb uptake was assayed in cellular pellets after EDTA washings. Briefly, ca. 50 mg of TR1 and TR9 cells were digested-mineralized by the addition of 4 ml of 60% HNO_3 , 2 ml of 30% H_2O_2 , and 4 ml of H_2O followed by incubation at 200 °C for 10 min. Digested samples were filtered (cellulose, 47 μm) and diluted to 25 ml with H_2O . Pb content was analyzed by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). The lead content of the algal cells was determined in triplicate in two independent experiments.

X-ray microanalysis of Pb uptake

The extracellular and intracellular distributions of Pb in TR1 and TR9 phycobionts were determined using transmission electron microscopy (TEM) coupled with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDXS). The intensity of the lead signal was not enough to perform accurate absolute determinations of the metal in all trials. Therefore, we compared the intensity of the detected lead peaks with that of osmium, as a reference element, since all cells were post-fixed with osmium tetroxide (OsO_4). Osmium is tightly bound to lipids such that it is present in all biological membranes of post-fixed samples. Therefore, the relative abundance of Pb in each subcellular compartment was expressed as the ratio: $(\text{Pb}/\text{Pb} + \text{Os})100$ (Table 3). Accordingly, liquid cultures of TR1 and TR9 were treated with 0 or 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ as described above. After 7 days of treatment, the algal suspensions were centrifuged and then rinsed twice with 50 mM K-Pi, pH 7.0, 100 mM NaCl, and 2.5 mM EDTA, and twice with ultrapure cold water. This washing step removed loosely bound Pb while maintaining tightly bound Pb to the cell wall. Thereafter, the cells were equilibrated in liquid Bold 3N medium and fixed with 4% glutaraldehyde in the same medium. After 2 h at 4 °C, the samples were washed in 0.01 M PBS buffer, pH 7.4, post-fixed with 1% OsO_4 in 0.01 M PBS, pH 7.4 (2 h at 4 °C), gently centrifuged, and washed again. They were then dehydrated at room temperature in a graded series of ethanol, starting at 50% and increasing to 70%, 95%, and 100% for no less than 20–30 min for each step. The fixed and dehydrated samples were embedded in Spurr's resin according to the manufacturer's instructions (EMS, Electron Microscopy Sciences). For TEM-EDXS analysis, 90-nm sections were cut with a diamond knife (DIATOME Ultra 45°) using an Ultramicrotome (Ultratome Nova LKB Bromma), and mounted on 100 mesh carbon-coated copper grids. The prepared sections were observed with a Tecnai G² F20 field emission gun transmission electron microscope coupled to EDXS, under an acceleration voltage of 200 kV. The system was equipped with a CCD GATAN digital camera and the software acquisition and image processing package "Digital Micrograph™". Imaging was carried out at the SCSIE service of the University of Valencia.

Analysis of antioxidant enzymes activities and HSP70

Cells of TR1 and TR9 microalgae (ca. 200–250 mg) were homogenized using a mortar and pestle in the presence of a minimal amount of siliceous particles and 0.5 ml of grinding medium, containing 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 1 mM ascorbic acid, 10% (v/v) glycerol, and 1% (w/v) insoluble polyvinyl pyrrolidone

(PVPP). The homogenates were centrifuged for 2 min at 200 × g to remove the siliceous particles, PVPP, unbroken cells and cell-wall debris. Supernatants were centrifuged at 20,000 × g for 20 min. All of these steps were performed at 4 °C. Antioxidant enzyme activity assays and the immunodetection of HSP70 were carried out using the 20,000 × g-supernatant in spectrophotometric and zymogram analyses. SOD activity was determined spectrophotometrically at 560 nm; GR activity was assayed at 25 °C based on the decrease in A_{340} due to NADPH oxidation, as previously reported (del Hoyo et al., 2011). CAT and APx activities were measured according to the procedures described by Aebi (1984) and Amako et al. (1994), respectively. All determinations were in triplicate.

For zymograms, soluble proteins (usually 10 or 20 μg) were separated electrophoretically by native PAGE (ND-PAGE). GR and SOD activities were developed as described (del Hoyo et al., 2011). HSP70 protein was immunoassayed by protein blot. Briefly, after SDS-PAGE, the separated proteins were transferred to PVDF membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). Immunocomplexes with commercially available antibodies against HSP70 (Agrisera, Vännäs, Sweden) were detected with an alkaline phosphatase protein blotting system (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA).

Determination of photosynthetic pigments

TR1 and TR9 phycobiont cells (ca. 10 mg) were re-suspended in 1 ml of 100% dimethyl sulfoxide and incubated for 15 min at 65 °C. This treatment solubilized at least 98% of the photosynthetic pigments (data not shown). The samples were centrifuged at 5000 × g for 5 min, after which chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and total carotenoids were measured spectrophotometrically according to Wellburn (1994). In other experiments, the components of the xanthophyll cycle, i.e., violaxanthin, antheraxanthin, and zeaxanthin, were measured in DMSO extracts by HPLC, as described in Gasulla et al. (2009). All determinations were made in duplicate.

Measurements of chlorophyll *a* fluorescence

Chlorophyll *a* fluorescence was measured at room temperature using a pulse modulation fluorometer (PAM-2000, Walz, Effeltrich, Germany). After the washings, control and treated TR1 and TR9 suspensions (approximately 100 mg cell) were filtered through cellulose acetate discs under slight vacuum in order to collect cells on a solid support, facilitating fluorescence measurements. Thereafter, the cells were maintained in a fully hydrated state by layering the discs on filter paper moistened with distilled water, and kept in the dark for 15 min prior to chlorophyll *a* fluorescence measurements. The minimal fluorescence yield (F_0) was obtained by illumination of the phycobionts with a weak measuring beam from a light-emitting diode. A saturating pulse (600 ms) of white light (at a photosynthetic photon fluence rate of 4000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ over the waveband 400–700 nm), closing all reaction centers, was applied to obtain the maximal fluorescence (F_m). Variable fluorescence in dark-adapted samples (F_v) was calculated as $F_m - F_0$. Following 2 min of dark re-adaptation, actinic white light (40 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was switched on, and

Table 2

Intracellular lead content in *Trebouxia* TR1 and *T. TR9* phycobionts exposed to $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

Phycobiont	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ treatment (μM)	Pb content ($\mu\text{g/g DW}$)
TR1	0	0.35 (± 0.06)a
TR1	50	10.6 (± 0.50)b**
TR1	100	68.3 (± 8.02)c**
TR9	0	nd (A)
TR9	50	3.21 (± 0.02)B**
TR9	100	21.05 (± 0.20)C**

The results are expressed as means (\pm standard deviation, $n=3$); nd: not detected. The values denoted by different lower-case or capital letters indicate significant differences among $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ treatments for TR1 and TR9, respectively, when subjected to a one-way ANOVA (in which the lead concentration served as the factor) and Student's *t* test ($P < 0.05$). ** indicates highly statistically significant difference ($P < 0.01$) between TR1 and TR9 for each $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ treatment.

600-ms saturating pulses were applied at 60-s intervals to determine: the maximum fluorescence yield during actinic illumination (F'_m); the level of modulated fluorescence during a brief interruption of actinic illumination in the presence of far-red light (F'_0); and the chlorophyll fluorescence yield during actinic illumination (F_s). Quenching as a result of non-photochemical dissipation of absorbed light energy (q_N) was determined at each saturating pulse according to the equation $q_N = 1 - (F'_m - F'_0)/(F_m - F_0)$ (Bilger and Björkman, 1991). The quantum efficiency of PSII photochemistry, Φ_{PSII} , which is closely associated with the quantum yield of non-cyclic electron transport, was estimated from $(F'_m - F_s)/F'_m$ (Genty et al., 1989).

Statistics

Every experiment was repeated between two and nine times, starting from new stock material and freshly prepared, new cultures. The data were statistically analyzed using a one-way analysis of variance, in which either the $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ concentration or the algal species served as the factor. When appropriate, differences among treatment means were evaluated using Student's *t* test.

Results

Quantitative and microscopic analyses of extra- and intracellular Pb accumulation

After 7 days of Pb treatment, metal bound to cell walls (extra-cellular Pb) was eluted through washings with 20 mM EDTA (pH 4.5), and the intracellular Pb accumulation was then determined. As expected, Pb uptake by both *Trebouxia* taxa (TR1 and TR9) increased with increasing amounts of supplied Pb (Table 2). However, despite the same Pb treatment, metal concentrations in TR1 cells were approximately three times higher than those in TR9 cells. Compartmentalization and complexation of HMs at a sub-cellular level play important roles in HM detoxification by plant tissues. Accordingly, we searched for possible differences in the extra- and intracellular distribution of Pb between TR1 and TR9 algae, subjecting the cells to TEM-coupled EDXS. In these experiments, the washings, described in materials and methods, were less stringent than those employed in quantitative intracellular lead determinations, in order to avoid losses of cell wall-bound metal. The semi-quantitative data provided by TEM-EDXS microanalysis confirmed the quantitative determinations of Pb uptake, since the sum of the accumulated Pb in the two intracellular fractions (cytosol–chloroplast + vesicles) was significantly higher in TR1 than in TR9 (Table 3). Interestingly, the ultrastructural analysis showed different patterns of electro-dense deposits of Pb in the cell walls, cytoplasm, and vesicles of TR1 and TR9 algae (Fig. 1 and Table 3). TR9 tended to retain a high proportion of lead at the cell wall,

Table 3

Subcellular distribution of lead in TR1 and TR9 phycobionts treated with 100 μM PbNO_3 .

	TR1			TR9		
	Mean (%)	SD	<i>n</i>	Mean (%)	SD	<i>n</i>
Cytosol–chloroplast	8.61***	3.44	30	4.95	3.15	30
Vesicles	11.11***	4.07	30	3.90	3.35	30
Cell wall	0.50***	0.75	30	12.20	3.60	30

Lead accumulation is expressed as a percentage of the osmium levels (reference element). For details, see materials and methods. *** indicates $P < 0.0001$, i.e., the difference considered to be extremely statistically significant. Control cells (treated with 0 μM PbNO_3) showed no detectable lead signal.

thus preventing its increased intracellular uptake. After Pb exposure, small electron-dense metal deposits were more frequently observed in the walls of TR9 cells than in the walls of TR1 cells (Fig. 1). Conversely, a higher accumulation and relatively large deposits of lead, forming small vesicles, were seen almost exclusively in TR1 (PbV in Fig. 1). In TR9, large intracellular deposits of Pb were conspicuously absent, especially in the electro-dense vesicles characteristic of these cells (Fig. 1 and Table 3).

Antioxidant enzymes and HSP70 protein under prolonged Pb exposition

In order to further characterize the defensive response of TR1 and TR9 microalgae, we studied the activities of several key antioxidant enzymes in response to increased levels of the HM. Accordingly, the effects of different Pb concentrations on the activity of GR, SOD, APx, and CAT were investigated in liquid cultures of isolated TR1 and TR9 phycobionts through spectrophotometric assays (for all enzymes) and zymograms (for GR and SOD). An induction of at least some of the antioxidant enzymes following the presumable increase in intracellular-Pb-induced ROS was expected, such that antioxidant induction should have been stronger in TR1 than in TR9, since the former accumulated significantly more Pb. However, the results clearly indicated a completely different scenario. In general, it should be noted that initial (time = 0) and control (Pb = 0) antioxidant activities were always higher in TR1 than in TR9 phycobionts, with a smaller difference for SOD (20% higher in TR1 than in TR9) and a much larger one for GR (160% higher in TR1 than in TR9, Fig. 2 inset). In addition, while CAT activity remained unchanged in both TR1 and TR9 even under Pb stress (Fig. 2D), the metal increased GR, SOD, and APx activities in TR9, but not in TR1, where APx activity was even depressed. Indeed, both the total activity determined in spectrophotometric assays (Fig. 2A) and the zymogram results (Fig. 3B) showed that in TR1 GR activity did not significantly change under Pb treatment, while in TR9 it was dramatically induced, reaching values similar to those of TR1 cells (ca. 48–51 $\text{nmol NADPH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ in 100 μM Pb). As expected, the zymogram findings supported the total activity measurements of the spectrophotometric assays, since both phycobionts contain only one GR isoform (as determined by 1D-ND-PAGE). Similarly to the GR results, total SOD activity was not significantly modified by Pb exposure in TR1, while it increased by >55% in TR9 cells treated with 100 μM Pb (Fig. 2B). SOD isoform analyses by ND-PAGE and activity staining distinguished two different patterns, with at least 6 discrete bands in TR1 and 7 in TR9. These bands were distributed in three main groups, corresponding to slow, intermediate, and high migration rates (Fig. 3A). In some cases, the lack of an effect of a certain treatment on total SOD activity, assayed spectrophotometrically in crude extracts, could probably be due to the redistribution of enzymatic activity among the different isoforms, such that the increase of some of them compensated for the decrease of others.

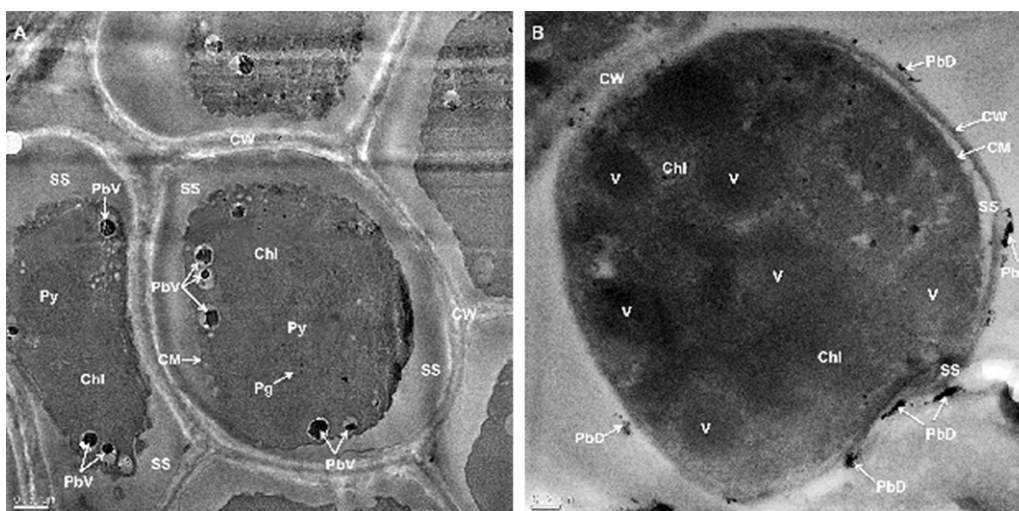


Fig. 1. Cellular distribution of lead (Pb) and the ultrastructure of *Trebouxia* TR1 (A) and *T. TR9* (B) phycobionts treated with 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, as shown by TEM-coupled EDXS of ultrathin sections. *Abbreviations:* Chl, chloroplast; CM, cellular membrane; CW, cell wall; PbD, deposits of Pb; PbV, vesicles with deposits of Pb; Pg, pyrenoglobules; Py, pyrenoid; SS, secretion space; V, vesicle. Bars: (A) 0.5 μm and (B) 0.2 μm .

This was not the case for the effects of Pb on SOD activity in TR1, since activity staining of the SOD isoforms of treated cells did not significantly differ from that of control cells (Fig. 3A). Conversely, the relatively slight increase in total SOD activity induced by Pb in TR9 was almost exclusively accounted for by the intermediate

bands, without any activity loss in the other bands (Fig. 3A). APx, a key enzyme in the removal of H_2O_2 generated by SOD and other cellular reactions, was modulated by Pb treatment, following opposite trends depending on phycobiont taxa (Fig. 2C). In TR1 cells, APx decreased significantly ($P < 0.05$) to ca. 20% and 30% of

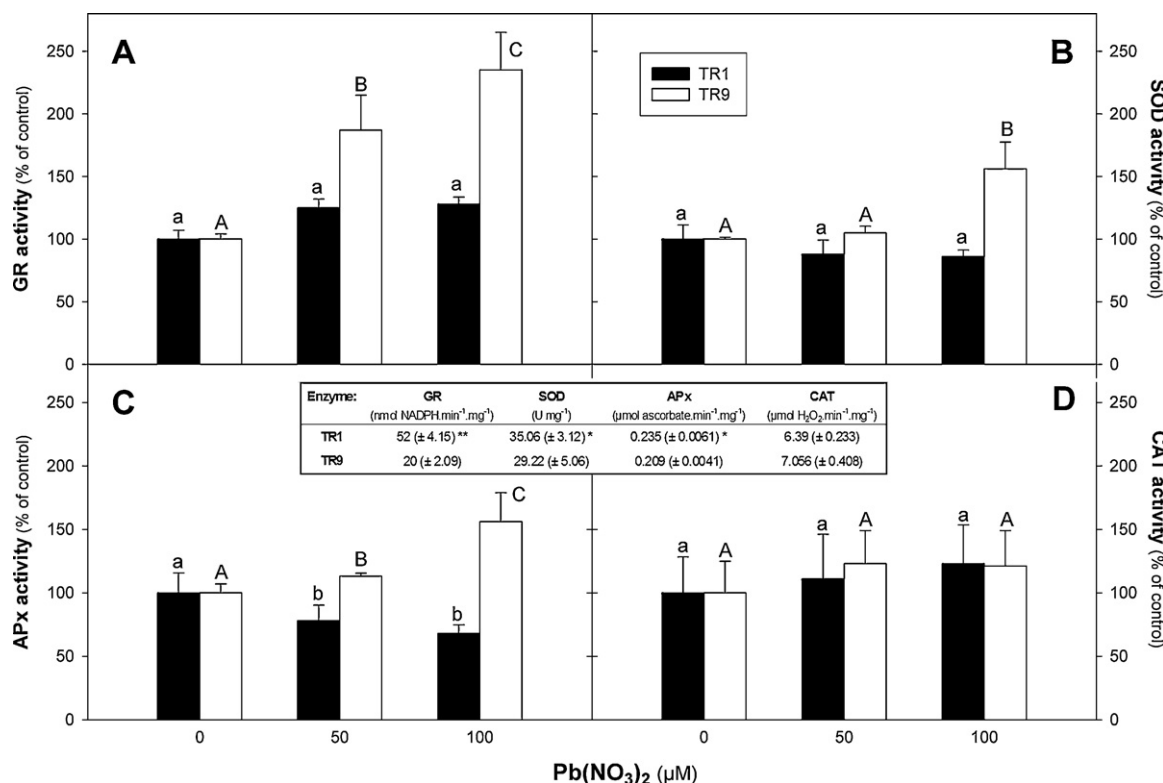


Fig. 2. Effects of Pb on antioxidant enzymes in *Trebouxia* TR1 and *T. TR9* phycobionts of the lichen *Ramalina farinacea*. Liquid cultures of isolated TR1 or TR9 algae were incubated with the indicated concentrations of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ dissolved in Bold 3N culture medium. After the cells had been cultured for 7 days in a growth chamber at 15 °C, under a 14-h/10-h light/dark cycle, soluble proteins were extracted by homogenization and then separated by differential centrifugation. Total glutathione reductase (GR, A), superoxide dismutase (SOD, B), ascorbate peroxidase (APx, C), and catalase (CAT, D) activities were determined in soluble protein extracts by spectrophotometric assays, as described in materials and methods. The data shown represent the means of 5 independent experiments (\pm SD). Different lower-case or capital letters indicate significant differences ($P < 0.05$) for TR1 and TR9, respectively, following treatment with 0, 50 μM , and 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, as determined by a one-way ANOVA and Student's *t* test ($P < 0.05$) of the data. Control cultures incubated without $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ for 7 days did not show significant changes with respect to the initial (incubation time = 0) values for all the analysed enzymes. Results in the inset represent the initial activity values of antioxidant enzymes. * and ** indicate statistical differences (at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively) between TR1 and TR9, when subjected to a one-way ANOVA.

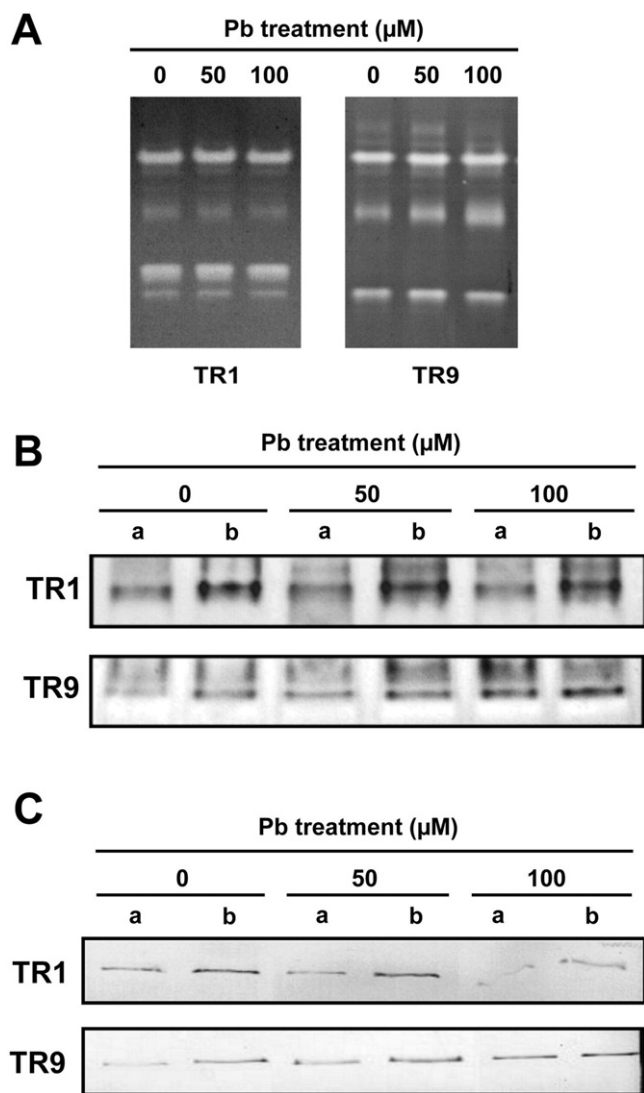


Fig. 3. Changes in superoxide dismutase (A), glutathione reductase isozymes (B), and in the HSP70 protein (C) in the lead-exposed *Trebouxia* TR1 and *T. TR9* phycobionts of the lichen *Ramalina farinacea*. Liquid cultures of isolated TR1 or TR9 algae were incubated with the indicated concentrations of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ dissolved in Bold 3N culture medium. After the cells had been cultured for 7 days in a growth chamber at 15 °C, under a 14-h/10-h light/dark cycle, soluble proteins were extracted by homogenization and separated by differential centrifugation. Putative isozymes of SOD and GR were analyzed by ND-PAGE and activity staining, as described in materials and methods. In the case of GR, only one true GR band was observed (as judged by comparing activity staining in presence vs. absence of oxidized glutathione). The HSP70 protein was separated by SDS-PAGE and immunodetected by protein blotting of the soluble protein fraction employing commercially available anti-Hsp70 polyclonal antibodies (AgriSera, Sweden). (a) and (b) indicate 10 or 20 μg soluble protein of each extract loaded per lane, respectively.

the control value in response to 50 and 100 μM Pb, respectively. However, in TR9 cells APx progressively increased with rising Pb concentrations, such that activity values very close to those of TR1 under the same conditions were reached (e.g., average AP values in 100 μM Pb-treated cells were 0.201 μmol ascorbate $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ and 0.196 μmol ascorbate $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ for TR1 and TR9, respectively).

To estimate the effects of Pb on another important group of “stress-related proteins” involved in the repair mechanisms of damaged cellular components, we looked for changes in the steady-state level of HSP70 in HM-exposed TR1 and TR9 cells. As shown in Fig. 3C, the initial level of HSP70 was slightly lower in the latter. In

accordance with the response of these same phycobionts to oxidative stress (del Hoyo et al., 2011), exposure to 50 and 100 μM Pb caused a strong increase in the amount of HSP70 in TR9, but there was either no significant change or a slight decrease, respectively, in TR1 cells.

Effects of Pb on photosynthetic pigments and fluorescence parameters

The possible impact on the physiological performance of the intracellular lead accumulation and the observed Pb-dependent modulation of the antioxidant defences were studied by analyzing several key components of the photosynthetic apparatus and parameters of photosynthesis. Specifically, the concentrations of the photosynthetic pigments chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and carotenoid (Fig. 4) along with the de-epoxidation state of xanthophylls (DPS, Fig. 5D) and the fluorescence parameters F_v/F_m , Φ_{PSII} , and q_N (Fig. 5A–C) were measured in Pb-treated TR1 and TR9 cells over a period of 7 days. The results depicted in Fig. 4 clearly indicate that, in general, photosynthetic pigments were not strongly affected by the presence of intracellular Pb in either the TR1 or the TR9 phycobiont. Similar to oxidative stress (del Hoyo et al., 2011), Pb did not cause a decrease in chlorophyll *b* content. In the presence of Pb, chlorophyll *a* and carotenoids were significantly ($P < 0.05$) diminished in TR1, while only the carotenoid content was affected in TR9. Nonetheless, pigment decay $>10\%$ with respect to the control levels was not observed.

We further characterized the influence (or lack thereof) of intracellular Pb accumulation on the photosynthetic behaviour of TR1 and TR9 in terms of the response of key chlorophyll fluorescence parameters. Overall, photosynthetic electron transport was not affected by the presence of Pb, as up to ca. 70 and 21 μg Pb/mg (dry weight) was tolerated within TR1 and TR9 cells, respectively. Fig. 5A shows the effect of Pb on the maximum efficiency of PSII photochemistry after dark adaptation (F_v/F_m). No significant differences were found between treated and control cells of both TR1 and TR9, reflecting the resistance of PSII to Pb treatments. PSII photochemical efficiency under actinic light similar to growing light (Φ_{PSII} , Fig. 5B) was also unchanged by Pb in both TR1 and TR9 phycobionts. The non-photochemical dissipation of absorbed light (q_N , Fig. 5C) was always lower in TR1. However, it was significantly ($P < 0.05$) decreased in Pb-treated TR9 cells, but relatively insensitive to the metal in TR1 cells. Interestingly, the levels of DPS were similar and constant for both phycobionts and both treatments.

Discussion

The results obtained in the present study clearly indicate that the ability of the lichen *R. farinacea* to moderately tolerate polluted environmental conditions in general, and Pb exposure in particular, can be explained, at least in part, by the tolerance of its two phycobionts, TR1 and TR9. However, each algal species seem to have developed a specific strategy, in which the integration of distinct ultrastructural, biochemical, and physiological features gives rise to the acquisition of similar levels of Pb tolerance. Support for this conclusion comes from the absence of any deleterious symptoms at the level of one of the main targets of lead toxicity, the chloroplast. Under the conditions of our experiments, i.e., a low irradiation of ca. 40 μmol photon $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ as actinic light, Pb caused little alteration of the phycobionts’ pigment content (Fig. 4) and F_v/F_m values (Fig. 5), thus confirming that only direct Pb effects were registered, rather than effects produced by the addition of light stress to Pb treatment. As our results failed to show a correlation between DPS and q_N values in these chlorobionts, it is likely that alternative mechanisms to the xanthophyll cycle are responsible for the

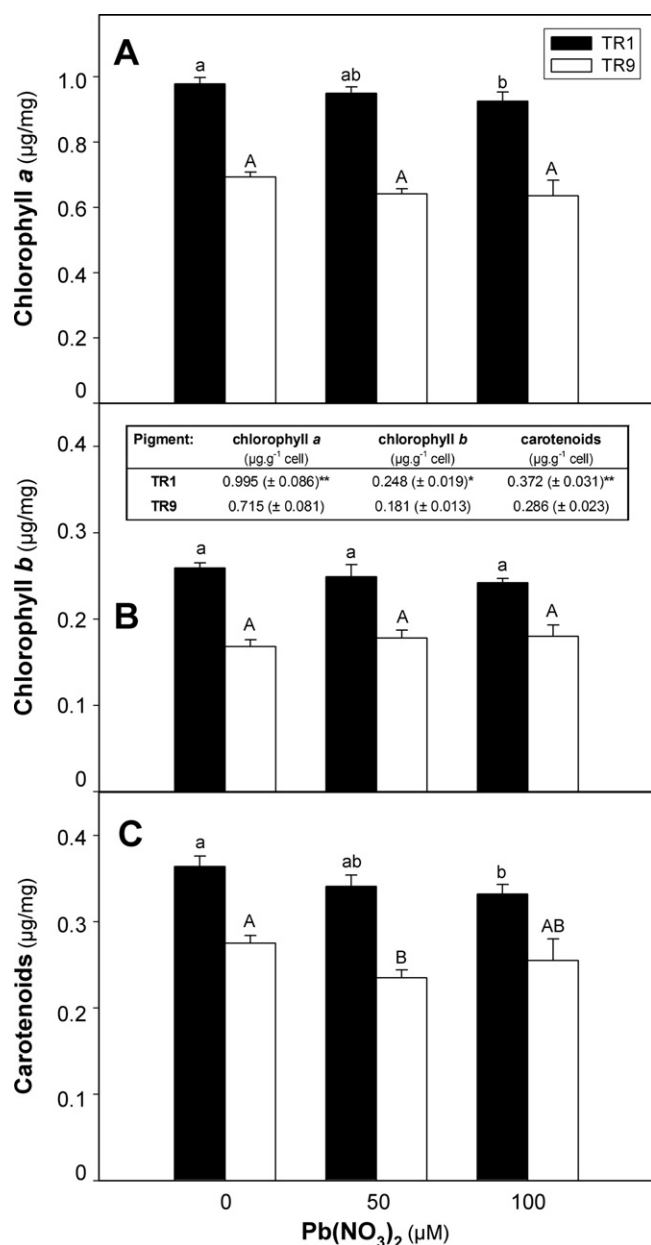


Fig. 4. Chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and carotenoids in *Trebouxia* TR1 and *T. TR9* phycobionts of the lichen *Ramalina farinacea* exposed to Pb. Liquid cultures of isolated TR1 or TR9 algae were incubated with the indicated concentrations of Pb(NO₃)₂ dissolved in Bold 3N culture medium. After the cells had been cultured for 7 days in a growth chamber at 15 °C, under a 14-h/10-h light/dark cycle, chlorophylls and carotenoids were determined spectrophotometrically as described in materials and methods. Depicted values represent mean results (±SD) from 9 independent experiments. Different lower-case or capital letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among 0, 50 µM, and 100 µM Pb(NO₃)₂ treatment for TR1 and TR9, respectively, when the data were subjected to a one-way ANOVA and Student's *t* test ($P < 0.05$). Results in the inset represent the initial (incubation time = 0) values of photosynthetic pigments. * and ** indicate statistical differences (at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively) between TR1 and TR9, when subjected to a one-way ANOVA.

dissipation of light energy in one or both *Trebouxia* phycobionts, as proposed for *Asterochloris erici* (Ahmadjian) Skaloud & Peksa by Gasulla et al. (2009). Interestingly, the Pb-related decline of q_N in TR9 was not trivial (Fig. 5), indicating that some mechanisms in TR9 are Pb sensitive and different than those present in TR1. In addition, q_N was higher in TR9 than in TR1 cells, even at 100 µM Pb.

Sanità di Toppi et al. (2008) dissected the physiological response of cultured *Trebouxia impressa* phycobionts to relatively prolonged Cd exposure into temporally distinguished “first line” and “second

line” detoxification mechanisms. “First line” mechanisms include extracellular cell-wall HM immobilization, vacuolar compartmentalization, and the synthesis of glutathione and phytochelatin. “Second line” mechanisms, activated when HM detoxification by “first line” mechanisms is overwhelmed, involve the induction of “stress proteins” and antioxidant enzymes. Soluble antioxidants, such as glutathione and ascorbate, and antioxidant enzymes, such as SODs, GR, CAT, and peroxidases, are involved during the entire process of HM detoxification, since they participate in HM-chelation (“first line”) and antioxidant protection (“second line”). Our experiments were based on a relatively prolonged exposure of the phycobionts to Pb (7 days), with all of the analyses performed at the end of the treatments, hence we could not temporally dissect “first line” from “second line” detoxification mechanisms. However, the markedly different distribution of extra- and intracellular levels of Pb between TR1 and TR9 strongly indicates that in the latter HM is prevented from entering the cell interior by binding to exchange sites in the cell wall in much greater amounts than is the case in TR1 (Fig. 1, and Tables 2 and 3). This observation is supported by the ultrastructural differences between TR1 and TR9 cell walls. In TR1 algae, the cell wall is made up of four TEM-distinguishable layers, which account for a total thickness of ca. 150 nm (in axenic culture), while in TR9 the cell wall is nearly three times thicker (ca. 410 nm, in culture), and consists of only three well-differentiated layers (Casano et al., 2011). In other studies, cell-wall thickening was commonly observed in vascular plants and mosses exposed to HMs (Krzeslowska et al., 2009; Bouazizi et al., 2010; Yu et al., 2011). This response was associated with increased amounts of polysaccharides in the cell walls (Wierzbička, 1998). In both symbiotic and free-living algae, the retention of HMs at the cell wall is considered to be one of the main “first line” protective mechanisms, since it excludes an important fraction of the toxic element from the protoplast (Sanità di Toppi et al., 2008; Andrade et al., 2010 and references therein). This may well have been the case for the TR9 phycobiont, while TR1 tended to immobilize Pb as significant deposits in small intracellular vesicles (Fig. 1 and Table 3). Vacuolar/vesicular compartmentalization of HMs has been frequently observed in plant tissues and is considered to be another “first line” mechanism of detoxification since it restricts the phytotoxicity of metals by isolating them from the cytoplasm/chloroplast (Hall, 2002; Liu and Kottke, 2004a,b; Jin et al., 2008; Daud et al., 2009; Jabeen et al., 2009).

However, an undetermined proportion of intracellular soluble and bioactive Pb also seemed to be present in both phycobionts, and especially within TR9 cells, in which significant deposits of insoluble metal were not observed (Fig. 1). This result suggests an important role for a third type of “first line” defence mechanism: the complexation/immobilization of HMs with organic compounds such as thiol peptides. It is well established that in response to HM stress photobionts (but not mycobionts) are able to rapidly increase the production of a class of thiol peptides called phytochelatin (Sanità di Toppi et al., 2008; Pawlik-Skowronska and Bačkor, 2011 and references therein). Phytochelatin forms binary complexes with Cd, Pb, and Zn that can then be transported and accumulated intracellularly, bypassing the toxic effects of these HMs (Pal and Rai, 2010). Determinations of non-protein thiols, as well as their main substrate, reduced glutathione, was beyond the scope of the present investigation; but it is known that the enzyme GR plays a critical role in the redox balance of glutathione and hence in the availability of substrate for phytochelatin synthesis. Our results strongly support the differential modulation of this antioxidant enzyme by Pb in TR1 and TR9 (Figs. 2 and 3); that is, while GR remained unchanged in TR1, it was highly induced by Pb treatments in TR9 compared to the respective controls. Moreover, control-level expression of GR was significantly higher in TR1 than in TR9. Interestingly, the final effect of this differential GR

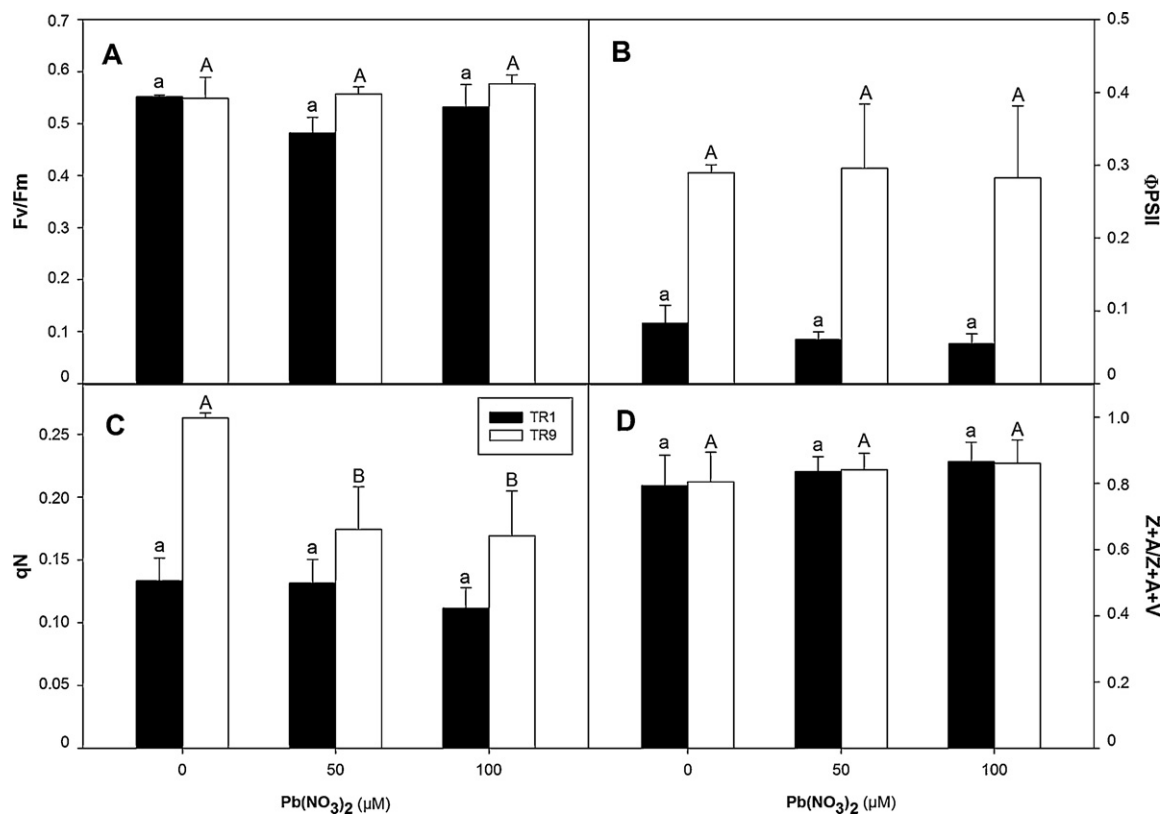


Fig. 5. Effect of Pb treatments on the photosynthetic performance and de-epoxidation state of the xanthophyll cycle in *Trebouxia* TR1 and *T. TR9* phycobionts of the lichen *Ramalina farinacea*. Liquid cultures of isolated TR1 or TR9 algae were incubated with the indicated concentrations of $Pb(NO_3)_2$ dissolved in Bold 3N culture medium. After 7 days in a growth chamber at 15 °C, under a 14-h/10-h light/dark cycle, the algal suspensions were washed and filtered through cellulose acetate discs under slight vacuum in order to recover cells on a solid support, as described in materials and methods. Chlorophyll *a* fluorescence of PSII was measured at room temperature using a pulse modulation fluorometer (PAM-2000, Walz, Effeltrich, Germany). Depicted values represent mean results (+SD) from three independent experiments with two repetitions each. Components of the xanthophylls cycle were examined by extracting the algal pigments with DMSO and subjecting them to HPLC analysis, as described by Gasulla et al., 2009. Different lower-case or capital letters indicate significant differences ($P > 0.05$) among TR1 and TR9, respectively, treated with 0, 50 μM , and 100 μM $Pb(NO_3)_2$, as determined by a one-way ANOVA and Student's *t* test of the data ($P > 0.05$).

regulation rendered very similar final results, as the differences in the activities of this enzyme in TR1 and TR9 cells treated with 100 μM Pb were not significant. Therefore, it is possible to speculate that at least the reduction state of the glutathione pool and possibly also substrate availability for phytochelatin synthesis may be comparable in TR1 and TR9 microalgae.

As stated in detail in the Introduction, some of the main toxic effects of Pb are derived from its capacity to stimulate ROS production (Sharma and Dietz, 2008), while others depend on interaction of the metal with the –SH groups of essential macromolecules (Liu et al., 2009). Accordingly, antioxidant enzymes such as GR, SOD, APx, and CAT, as well as repair proteins with chaperone functions are the main components of “second line” defence mechanisms against Pb. SODs convert superoxide anion radicals into hydrogen peroxide, which in plants and algae is then reduced to water through the combined actions of the ascorbate–glutathione cycle (Mittler et al., 2004), CAT, and peroxidases. In our study, the results obtained for SOD and APx enzymes in TR1 and TR9 algae exposed to Pb were similar to those obtained for GR (Figs. 2 and 3). Thus, compared to the respective controls, while in TR1 cells SOD was not significantly modified and APx was diminished in the presence of Pb, in TR9 cells the levels of both enzymes were significantly higher. As in GR, the control values of SOD and APx were higher in TR1 than in TR9, but the activities of each enzyme in the presence of 100 μM Pb were very similar in the two species. Also noteworthy was the parallel increase of SOD and APx in TR9 cells treated with 100 μM Pb (Fig. 3); both enzymes were stimulated by approximately 55% over control values, indicating a coordinated activation of the various

components of the cellular antioxidant system in order to prevent oxidative damage.

HSP70, one of the most well-studied chaperone proteins, has been implicated in the physiological response to HM in lichen algae (Bačkor et al., 2006). We found that Pb exposure caused important changes in the steady-state levels of HSP70 in isolated *R. farinacea* phycobionts. Similar to the findings for the antioxidant enzymes, the initial levels of HSP70 were slightly lower in TR9 than in TR1. However, in TR9 exposed to increasing amounts of Pb, the levels of the protein increased. This was in contrast to TR1 cells, in which the initially high levels of the chaperone were not maintained in response to high Pb exposure (Fig. 3C).

In general, our results accord with recent findings regarding the effects of oxidative stress on *R. farinacea* phycobionts (del Hoyo et al., 2011). That comparative analysis of TR1 and TR9 responses to oxidative treatments suggested a higher capacity of the latter phycobiont to increase both antioxidant protection and repair mechanisms. However, even though the defence mechanisms of TR1 are apparently not induced under oxidative and other types of environmental stress, such as Pb exposure, this lichenic alga does not seem to remain completely “unprotected,” since its relatively high basal level of defence responses are maintained under stress. We speculate that TR1 and TR9 algae represent two different biological strategies against stress: TR1 seems to be relatively poorly “protected” from the external environment due to its thinner and qualitatively different cell wall (compared to that of TR9); hence it is obligated to invest a relatively large amount of metabolic energy in order to maintain its intracellular defence and repair

mechanisms at a high level of activity. By contrast, TR9 seems to be relatively better “isolated” from the external medium by a thicker cell wall; at the same time, the non-photochemical dissipation of excess energy (q_N), which prevents ROS formation, is more active in this phycobiont (Fig. 3 and del Hoyo et al., 2011). Consequently, it may be that under “normal” conditions, the intracellular defence mechanisms of TR9 operate at minimum levels. This low metabolic investment in defence would allow TR9 algae to sustain high rates of photosynthesis (as evidenced by higher Φ_{PSII} values) and biomass accumulation under relatively high irradiances and temperatures (Casano et al., 2011). When external conditions surpass certain thresholds and extracellular barriers are no longer effective, the intracellular defence mechanisms of TR9 phycobionts can be rapidly induced.

In previous studies, *R. farinacea* was proposed as a good example of symbiotic adaptation, in which habitat alterations can flexibly be addressed by modifying the number or proportion of coexisting TR1 and TR9 phycobionts (del Campo et al., 2010; Casano et al., 2011). Recent studies from our laboratory have revealed the presence of TR1 with other *Trebouxia* phycobionts in other lichen species, suggesting that the coexistence of two or perhaps more physiologically different *Trebouxia* microalgae within the same thallus is more common than previously thought (del Campo et al., 2012, unpubl. res.). The results presented herein provide insight – while posing new questions – into the ultrastructural and physiological basis of two different strategies to cope with HMs (Pb), and probably other types of environmental stress. Since these strategies evolved in two symbiotic microalgae that share the same microhabitat, it is possible that *R. farinacea* and other lichenized fungi utilize two or even more functionally distinct phycobionts, both to improve their ability to adapt to variations in ecological conditions and to colonize new ecological niches.

Acknowledgements

This study was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (CGL2009-13429-C02-01/02) and the Generalitat Valenciana (PROMETEO 174/2008 and GVACOMP2011-205). We are grateful to the Central Support Service in Experimental Research (SCSIE), University of Valencia (Spain), for the TEM studies. We acknowledge Dr. Said Agouram (SCSIE, University of Valencia, Spain) for TEM-EDXS characterizations and for helpful discussions during the TEM investigations. We thank Wendy Ran and Daniel Sheerin for the English revision of the manuscript.

References

- Aebi H. Catalase in vitro. *Method Enzymol* 1984;105:121–6.
- Ahmadjian V. The lichen symbiosis. New York: John Wiley & Sons, Inc; 1993.
- Amako K, Chen GX, Asada K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant Cell Physiol* 1994;35:497–504.
- Andrade LR, Leal RN, Noseda M, Duarte MER, Pereira MS, Mourão PAS, et al. Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity. *Mar Pollut Bull* 2010;60:1482–8.
- Arhoun M, Barreno E, Torres JR, Ramis-Ramos G. Releasing rates of inorganic ions from the lichen *Ramalina farinacea* by capillary zone electrophoresis (CZE) as an indicator of atmospheric pollution. *Crypt Bryol Lichenol* 2000;21:275–89.
- Bačkor M, Vaczi P. Copper tolerance in the lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta). *Environ Exp Bot* 2002;48:11–20.
- Bačkor M, Gíbalová A, Budová J, Mikeš J, Solár P. Cadmium-induced stimulation of stress-protein hsp70 in lichen photobiont *Trebouxia erici*. *Plant Growth Regul* 2006;50:159–64.
- Bačkor M, Pawlik-Skowrońska B, Budová J, Skowronski T. Response to copper and cadmium stress in wild-type and copper tolerant strains of the lichen alga *Trebouxia erici*: metal accumulation, toxicity and non-protein thiols. *Plant Growth Regul* 2007;52:17–27.
- Bačkor M, Loppi S. Interactions of lichens with heavy metals. *Biol Plant* 2009;53:214–22.
- Barreno E. «Expression of Interest» FP6 2002–2006, UE. MOEBIOS. “Monitoring the effects of global environmental change on the biodiversity of sensitive organisms”. Towards a network of excellence for Europe of biomonitoring global environmental change. TP 1.6. Sustainable development, global change and ecosystems. http://eoi.cordis.lu/search_form.cfm; 2002.
- Beck A. Photobiont inventory of a lichen community growing on heavy-metal-rich rock. *Lichenologist* 1999;31:501–10.
- Bilger W, Björkman O. Temperature dependence of violaxanthin deepoxidation and non-photochemical fluorescence quenching in intact leaves of *Gossypium hirsutum* L. and *Malva parviflora* L. *Planta* 1991;184:226–34.
- Bold HC, Parker BC. Some supplementary attributes in the classification of *Chlorococcum* species. *Arch Microbiol* 1962;42:267–88.
- Bouazizi H, Jouil H, Geitmann A, Elferjani E. Structural changes of cell wall and lignifying enzymes modulations in bean roots in response to copper stress. *Biol Trace Elem Res* 2010;136:232–40.
- Branquinho C, Brown DH. A method for studying the cellular location of lead in lichens. *Lichenologist* 1994;26:83–90.
- Branquinho C, Brown DH, Maguas C, Catarino F. Lead (Pb) uptake and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence in different lichen species. *Environ Exp Bot* 1997;37:95–105.
- Branquinho C. Lichens. In: Prasad MNV, editor. Metals in the environment: analysis by biodiversity. New York: Marcel Dekker; 2001. p. 117–57.
- Brown DH, Beckett RP. Minerals and lichens: acquisition, localization and effect. In: Vicente C, Brown DH, Legaz ME, editors. Surface physiology of lichens. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 1985. p. 127–49.
- Calatayud A, Deltoro VI, Abadía A, Abadía J, Barreno E. Effects of ascorbate feeding on chlorophyll fluorescence and xanthophyll cycle components in the lichen *Parmelia quercina* exposed to atmospheric pollutants. *Physiol Plant* 1999;105:679–84.
- Casano LM, del Campo EM, García-Breijo FJ, Reig-Armiñana J, Gasulla F, del Hoyo A, et al. Two *Trebouxia* algae with different physiological performances are ever-present in lichen thalli of *Ramalina farinacea*. Coexistence vs. competition? *Environ Microbiol* 2011;13:806–18.
- Daud MK, Sun YQ, Dawood M, Hayat Y, Variath MT, Wu YX, et al. Cadmium-induced functional and ultrastructural alterations in roots of two transgenic cotton cultivars. *J Hazard Mater* 2009;161:463–73.
- del Campo EM, Gimeno J, Casano LM, Gasulla F, García-Breijo F, Reig-Armiñana J, et al. South European populations of *Ramalina farinacea* (L.) Ach. share different *Trebouxia* algae. *Bibl Lichenol* 2010;105:247–56.
- del Hoyo A, Álvarez R, del Campo EM, Gasulla F, Barreno E, Casano LM. Oxidative stress induces distinct physiological responses in the two *Trebouxia* phycobionts of the lichen *Ramalina farinacea*. *Ann Bot* 2011;107:109–18.
- De Vera JP, Rettberg P, Ott S. Life at the limits: capacities of isolated and cultured lichen symbionts to resist extreme environmental stresses. *Origins Life Evol Biosph* 2008;38:457–68.
- Epstein AL, Gussman CD, Blaylock MJ, Yermiyahu U, Huang JW, Kapulnik Y, et al. EDTA and Pb-EDTA accumulation in *Brassica juncea* grown in Pb-amended soil. *Plant Soil* 1999;208:87–94.
- Fadila K, Houria D, Rachid R, Reda DM. Cellular response of a pollution bioindicator model (*Ramalina farinacea*) following treatment with fertilizer (NPKs). *Am-Euras J Toxicol Sci* 2009;1:69–73.
- Garty J. Biomonitoring atmospheric heavy metals with lichens: theory and application. *Crit Rev Plant Sci* 2001;20:309–71.
- Gasulla F, de Nova PG, Esteban-Carrasco A, Zapata JM, Barreno E, Guéa A. Dehydration rate and time of desiccation affect recovery of the lichen alga *Trebouxia erici*: alternative and classical protective mechanisms. *Planta* 2009;231:195–208.
- Gasulla F, Guéa A, Barreno E. A simple micromethod for isolating lichen photobionts. *Symbiosis* 2010;51:175–9.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 1989;990:87–92.
- Grube M. Die hard: lichens. In: Seckbach J, Grube M, editors. Symbioses and stress: joint ventures in biology. Heidelberg: Springer; 2010. p. 209–23.
- Hall JL. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 2002;53:1–11.
- Hauck M, Helms G, Friedl T. Photobiont selectivity in the epiphytic lichens *Hypogymnia physodes* and *Lecanora conizaeoides*. *Lichenologist* 2007;39:195–204.
- Jabeen R, Ahmad A, Iqbal M. Phytoremediation of heavy metals: physiological and molecular mechanisms. *Bot Ver* 2009;75:339–64.
- Jin XF, Yang XE, Islam E, Liu D, Mahmood Q, Li H, Li JY. Ultrastructural changes, zinc hyperaccumulation and its relation with antioxidants in two ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. *Plant Physiol Biochem* 2008;46:997–1006.
- Krzyszowska M, Lenartowska M, Mellerowicz EJ, Samardakiewicz S, Wozny A. Pectin-cell wall thickenings formation – a response of moss protonemata cells to lead. *Environ Exp Bot* 2009;65:119–31.
- Liu DH, Kottke I. Subcellular localization of copper in the root cells of *Allium sativum* by electron energy loss spectroscopy (EELS). *Bioresour Technol* 2004a;94:153–8.
- Liu DH, Kottke I. Subcellular localization of cadmium in the root cells of *Allium cepa* by electron energy loss spectroscopy and cytochemistry. *J Biosci* 2004b;29:329–35.
- Liu D, Li T-Q, Jin X-F, Yang X-E, Islam E, Mahmood Q. Lead induced changes in the growth and antioxidant metabolism of the lead accumulating and non-accumulating ecotypes of *Sedum alfredii*. *J Int Plant Biol* 2008;50:129–40.
- Liu T, Liu S, Guan H, Ma L, Chen Z, Gu H, et al. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* seedlings in response to heavy metal lead (Pb). *Environ Exp Bot* 2009;67:377–86.
- Loppi S, Frati L. Lichen diversity and lichen transplants as monitors of air pollution in a rural area of central Italy. *Environ Monit Assess* 2006;114:361–75.

- Margulis L, Barreno E. Looking at lichens. *Bioscience* 2003;53:776–8.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 2004;9:490–8.
- Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley P. Monitoring with lichens – monitoring lichens. Dordrecht: Kluwer; 2002.
- Pal R, Rai JP. Phytochelatin: peptides involved in heavy metal detoxification. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;160:945–63.
- Pawlik-Skowronska B, Bačkor M. Zn/Pb-tolerant lichens with higher content of secondary metabolites produce less phytochelatin than specimens living in unpolluted habitats. *Environ Exp Bot* 2011;72:64–70.
- Phang IC, Leung DW, Taylor HH, Burritt DJ. The protective effect of sodium nitroprusside (SNP) treatment on *Arabidopsis thaliana* seedlings exposed to toxic level of Pb is not linked to avoidance of Pb uptake. *Ecotoxicol Environ Saf* 2011;74:1310–5.
- Pinto E, Sigaud-kutner TCS, Leitão MAS, Okamoto OK, Morse D, Colepicolo P. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J Phycol* 2003;39:1008–18.
- Riga-Karandinos AN, Karandinos MG. Assessment of air pollution from a lignite power plant in the plain of Megalopolis (Greece) using as biomonitors three species of lichens; impacts on some biochemical parameters of lichens. *Sci Total Environ* 1998;215:167–83.
- Sanità di Toppi L, Pawlik-Skowronska B, Vurro E, Vattuone Z, Kalinowska R, Restivo FM, et al. First and second line mechanisms of cadmium detoxification in the lichen photobiont *Trebouxia impressa* (Chlorophyta). *Environ Pollut* 2008;151:280–6.
- Sharma P, Dubey RS. Lead toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol* 2005;17:35–52.
- Sharma SS, Dietz K-J. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci* 2008;14:43–50.
- Słomka A, Libik-Konieczny M, Kuta E, Miszalski Z. Metalliferous and non-metalliferous populations of *Viola tricolor* represent similar mode of antioxidative response. *J Plant Physiol* 2008;165:1610–9.
- Verma S, Dubey RS. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* 2003;164:645–55.
- Wellburn AR. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* 1994;144:307–13.
- Wierzbicka M. Lead in the apoplast of *Allium cepa* L. root tips – ultrastructural studies. *Plant Sci* 1998;133:105–19.
- Yu HN, Liu P, Wang ZY, Chen WR, Xu GD. The effect of aluminum treatments on the root growth and cell ultrastructure of two soybean genotypes. *Crop Protec* 2011;30:323–8.

Lichen Rehydration in Heavy Metal-Polluted Environments: Pb Modulates the Oxidative Response of Both *Ramalina farinacea* Thalli and Its Isolated Microalgae

R. Álvarez · A. del Hoyo · C. Díaz-Rodríguez ·
A. J. Coello · E. M. del Campo · E. Barreno ·
M. Catalá · L. M. Casano

Received: 1 July 2014 / Accepted: 20 October 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Lichens are adapted to desiccation/rehydration and accumulate heavy metals, which induce ROS especially from the photobiont photosynthetic pigments. Although their mechanisms of abiotic stress tolerance are still to be unravelled, they seem related to symbionts' reciprocal up-regulation of antioxidant systems. With the aim to study the effect of Pb on oxidative status during rehydration, the kinetics of intracellular ROS, lipid peroxidation and chlorophyll autofluorescence of whole *Ramalina farinacea* thalli and its isolated microalgae (*Trebouxia* TR1 and *T. TR9*) was recorded. A genetic characterization of the microalgae present in the thalli used was also carried out in order to assess possible correlations among the relative abundance of each phycobiont, their individual physiological responses and that of the entire thallus. Unexpectedly, Pb decreased ROS and lipid peroxidation in thalli and its phycobionts, associated with a lower chlorophyll autofluorescence. Each phycobiont showed a particular pattern, but the oxidative response of the thallus paralleled the TR1's, agreeing with the genetic identification of this strain as the predominant

phycobiont. We conclude that: (1) the lichen oxidative behaviour seems to be modulated by the predominant phycobiont and (2) Pb evokes in *R. farinacea* and its phycobionts strong mechanisms to neutralize its own oxidant effects along with those of rehydration.

Keywords Heavy metal · Lichen · Microalga · Rehydration · ROS · *Trebouxia*

Introduction

Lichens are symbiotic associations that involve at least two very different organisms, a heterotrophic fungus (mycobiont) and a photosynthetic partner or photobiont, which can be either cyanobacteria or unicellular green algae. The lichen symbiosis involves close morphological and physiological integration between mycobiont and photobionts giving rise to the lichen thallus, which is a unique entity or holobiont [30]. Despite this, we ignore how they recognize each other, organize within the thallus, contribute to biological functions or communicate to respond to the environment. Lichens are poikilohydric organisms, such that their water content is mainly determined by the availability of water in the environment. In the desiccated state, water accounts for only 10–20 % of the fresh weight of thalli [6]. While this level of dehydration would be lethal for most organisms, most lichens are desiccation tolerant, surviving in a state of suspended animation until water again becomes available, which allows them to resume their normal metabolism [17, 23, 40].

Desiccation/rehydration processes result in increased levels of reactive oxygen species (ROS) such as: superoxide radicals, hydroxyl radicals, singlet oxygen, hydrogen peroxide and free organic radicals derived from them, especially in

M. Catalá and L.M. Casano have contributed to the same extent in this work.

R. Álvarez · A. del Hoyo · E. M. del Campo · L. M. Casano (✉)
Departamento Ciencias de la Vida, Campus Universitario,
Universidad de Alcalá, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain
e-mail: leonardo.casano@uah.es

C. Díaz-Rodríguez · A. J. Coello · M. Catalá
Biología Celular, Departamento Biología y Geología, Física y
Química Inorgánica y Analítica, (ESCET), Universidad Rey Juan
Carlos, C/Tulipán s/n, 28933 Móstoles, Madrid, Spain

E. Barreno
Botánica, ICBIBE, Fac.C.Biológicas, Universitat de València,
C/ Dr.Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

photosynthetic organisms [15]. ROS are normal by-products of several metabolic pathways such as photosynthesis and respiration. In general, it is considered that at low concentrations, ROS play a role in cell signalling and defence responses, but at relatively high rates of ROS formation, oxidative damage arises since ROS and ROS-derivative levels exceed the capacity of the antioxidant protection system [24]. ROS can provoke widespread cellular damage by causing pigment and protein degradation, lipid peroxidation and DNA alterations ([41] and cites therein). In lichens, both desiccation and rehydration occur rapidly due to the absence of a waxy cuticular barrier to water exchanges, making both processes potentially more harmful than in plants. For example, some desiccation-tolerant vascular plants (“resurrection plants”) degrade their chlorophyll during dehydration and re-synthesize it after rehydration [31], thus preventing unbalanced ROS production. However, lichen photobionts do not significantly alter their content of photosynthetic pigments during their rapid and cyclic changes in water content. Therefore, the ROS formation rate is potentially enhanced in these organisms during desiccation and/or rehydration because CO₂ fixation is impaired, whereas light continues to be absorbed by chlorophyll and electrons transported through redox intermediates to O₂ [6]. Another important metabolic source of ROS is the respiratory chain, thus potentially involving both symbiotic partners. In mitochondria, rapid changes in water content can disrupt normal function and increase ROS formation, especially of superoxide anion radicals [21]. According to Beckett et al. [6] lichens would have evolved different ways of uncoupling the respiration electron flow from phosphorylation to dissipate energy as heat thus preventing an unbalanced formation of ROS. This contention tends to minimize the contribution of the mycobiont to the overall increase in ROS levels during lichen desiccation-rehydration. Accordingly, we have observed that the main sources of intracellular ROS are the phycobiont cells in rehydrating thalli of *Ramalina farinacea* [10].

In addition, the absence of surface protection barriers means that the lichen thalli are highly permeable to airborne substances, including both essential mineral elements and highly toxic pollutants such as heavy metals (HMs). They are among the most valuable biomonitors of environmental pollution both for inorganic and organic compounds, being able to accumulate mineral elements far above their needs [2, 3, 32, 41]. As considered in more detail in a previous study [1], there is a vast variability in HM-tolerance among lichens. However, the physiological basis of such tolerance and especially the relative contribution of the mycobiont and photobionts to the HM-tolerance of the holobiont is still a matter of debate [1]. Anyway, the intracellular accumulation of HMs is a potential metabolic risk for lichens. Heavy metals—and Pb in particular—increase the production of ROS [27, 33, 38]. One of the physiological processes which

is highly sensitive to Pb is photosynthesis, probably due to the strong detrimental effects of ROS on some critical components of the photosynthetic machinery. According to Sharma and Dubey [39] Pb inhibits photosynthesis by causing multiple disorders at both structural and biochemical levels, compromising the thylakoid ultrastructure, the pigment and lipid composition and photochemical activities in plants. In addition, Pb inhibits the carboxylase activity of RuBisCO and probably other enzymes of the Calvin cycle due to its direct interaction with –SH groups, or indirectly via Pb-induced ROS which oxidize protein –SH groups [33]. In lichens, these detrimental effects on photosynthesis lead to a progressive increase in oxidative membrane damage [8], at least in the short term, while in the long term, algal survival, and that of the entire holobiont, could be affected.

The lichen *R. farinacea* (L.) Ach. is a worldwide-distributed fruticose, epiphytic lichen with large environmental tolerance. In the Iberian Peninsula, it occurs at all altitudes, more frequently in areas with regular foggy weather, showing preference for places with high atmospheric humidity. This lichen can be found in polluted and unpolluted areas [16, 28, 29] indicating, at least, a moderate-high tolerance to Pb, as suggested by previous experiments in the laboratory [8]. Recently, we have demonstrated that each thallus of *R. farinacea* contains not just one, but two *Trebouxia* phycobionts (provisionally named TR1 and TR9). Furthermore, they show distinct ultrastructural features and physiological responses to acute oxidative stress [9, 14]. In addition, when these phycobionts were incubated in a liquid medium containing Pb, the TR9 algae were able to limit the entry of the toxic metal into the cell, by holding it in the form of aggregates on the outer layer of the cell wall. Under the same conditions, TR1 had a lower level of wall Pb retention capability [1]. Conversely, the intracellular Pb uptake was approximately three times higher in TR1 than in TR9. However, neither the photosynthetic pigment content nor the main photosynthetic electron transport parameters were strongly affected by the presence of Pb within cells in either TR1 or TR9. Control levels of important antioxidant enzymes such as glutathione reductase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase were significantly higher in TR1 than in TR9. However, Pb induced the three enzymes in TR9 while it had no effect on TR1, so that antioxidant activities were quantitatively similar in both phycobionts under Pb treatments. It seemed that each algal species may have developed a specific strategy for the acquisition of similar levels of Pb tolerance [1].

The mechanisms allowing lichens to survive extreme abiotic stress, including the relative contribution of each symbiotic partner, are still unknown. The physiological free-radical burst observed during lichen rehydration [10] could be seriously aggravated by the presence of HM, and the oxidative balance overcome, the photobiont’s photosynthetic pigments being the critical targets. Therefore, we hypothesized that

R. farinacea subjected to desiccation/rehydration processes in the presence of Pb would synergistically increase ROS production, especially during rehydration, when algal chlorophyll recovery takes place more rapidly than the CO₂ fixation cycle. Nevertheless, lichens seem to be able to cope with both high Pb levels and desiccation/rehydration cyclic stress. There is evidence of effective communication between mycobionts and photobionts, in which one partner upregulates the antioxidant system of the other, endowing the symbiotic association with an important adaptive advantage and evolutionary success [11, 25] and, as stated above, different photobionts within the same thallus could provide different mechanisms of tolerance to Pb. In consequence, the objective of the present study was to analyse the effects of rehydration in the presence of lead on the kinetics of intracellular ROS production, oxidative damage of membranes and chlorophyll autofluorescence in thalli of *R. farinacea* as compared with its isolated *Trebouxia* phycobionts. The clarification of the individual role of each symbiont in abiotic stress tolerance and damage could help both prevent pollution-led lichen biodiversity loss and the identification of potential biotechnological tools.

Material and Methods

Chemicals

The chemicals 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol trichloroacetic acid (BHT), 2-thiobarbituric acid (TBA) and 1,1,3,3-tetraethoxypropane were provided by Sigma-Aldrich Química S.A (Tres Cantos, Spain); 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH₂-DA), hydrochloric acid (HCl) and ethanol (EtOH) were purchased from Panreac Química S.A.U (Barcelona, Spain) and lead nitrate Pb(NO₃)₂ was provided by Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

Lichen Material

R. farinacea (L.) Ach. was collected in the air-dried state from *Quercus rotundifolia* Lam. at El Escorial (Madrid, Spain; 40°34'54.3"N 4°07'35.1"W) or at S^a El Toro (Castellón, Spain; 39°54'16"N, 0°48'22"W). Samples were completely desiccated in a silica gel atmosphere for 24 h and fragmented into small pieces (ca. 30 mg FW) and frozen at -20 °C until the experiments took place, 1 month after collection.

DNA Isolation, Amplification and Sequencing

Thalli from El Escorial population were surface-washed by immersion for 10 min in aqueous sodium hypochlorite (final concentration 3 % w/v) and then with sterile distilled water prior to DNA isolation. Total DNA was extracted from 5 mg

of dried material using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, D-40724 Hilden Germany) following the manufacturer's instructions. Fungal nrITS were amplified using the primers ITS1F [18] and ITS4 [43]. Algal nrITS were PCR-amplified using the primers of [26]. A portion of the plastid 23SrDNA was PCR-amplified using the primers 23Sps1 5'-CAT GAC CAG GAT GAA GCT TG -3', 23Sps2 5'-TAC TCA AGC CGA CAT TCT C -3' and cL781R [9]. Amplification products were sequenced as previously described [13].

Phycobiont Isolation and Culture

Trebouxia TR1 and TR9 were isolated in our laboratories from specimens of the populations mentioned above, according to the method of Gasulla et al. [20]. TR1 and TR9 phycobionts were grown on small nylon discs (5-mm diameter) on semisolid Bold 3N medium [7] containing 10 g casein and 20 g glucose per litre [4] at 15 °C, under a 14-h/10-h light/dark cycle (lighting conditions 25 μmol m⁻² s⁻¹) in a growth chamber.

Rehydration Treatments in Presence of Lead

After 21 days, the discs (20–30 mg cell fresh weight/disc) were removed from the culture medium and subjected to slow desiccation in a closed container with a saturated solution of K₂SO₄ (80 % relative humidity) for 24 h. Other environmental conditions were 20 °C, a 14 h/10-h light/dark cycle (2–5 μmol m⁻² s⁻¹).

Both the desiccated phycobiont cultures and fragments of lichen thalli were placed in black flat bottom 96-multiwell plates and rehydrated with (100–150 μL) of either 0, 50 or 100 μM Pb(NO₃)₂ in water. After 5 min, the excess solution was discarded.

Fluorometric Kinetics of Free Radical Production and Chlorophyll Autofluorescence

2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate was used as a probe in the detection of free radicals [42] (DCF, λ_{exc}=504 nm, λ_{em}=524 nm, green) during the rehydration of both desiccated lichen thalli and isolated phycobionts in the presence of lead. DCFH₂-DA is not appreciably oxidized to the fluorescent state without prior hydrolysis inside the cell. At the same time, we followed the physiological state of the chlorophylls by analysing the autofluorescence of these pigments in the same samples.

For this purposes, 10 μM DCFH₂-DA was added to the lead solutions employed for rehydration of both lichen thalli and isolated TR1 and TR9, and the kinetics of DCF and chlorophyll-emitted fluorescence were simultaneously measured in a SPECTRAFluor Plus microplate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). Excitation of both

substances was performed at λ_{exc} 485 nm, emission of DCF fluorescence was recorded at λ_{em} 535 nm and chlorophyll autofluorescence at λ_{em} 635 nm, for 3 h. Twelve replicates were analysed by treatment and all values are referred to the weight of sample.

Lipid Peroxidation

Lipid peroxidation was evaluated as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) using Reilly and Aust's method [35], modified as described [10]. Briefly, both fragments of lichen thalli and isolated phycobionts were rehydrated in the presence of lead as described. At indicated times, thalli were weighed and homogenized on ice with deionized water and centrifuged and the pellets re-suspended in 500 μ L ethanol containing 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT). Algae were weighed and homogenized directly in 500 μ L of ethanol-BHT. Subsequently, 900 μ L of 257 mM TBA, 0.918 M tri-chloroacetic acid and 3.20 M HCl were added to each sample and to the standard (1,1,3,3-tetraethoxypropane), which were incubated at 70 °C for 30 min and centrifuged. The absorbance of supernatants was measured at 532 nm (A_{532}) and 600 nm (A_{600}). This last value was subtracted from the A_{532} to eliminate interferences.

Statistics

At least six independent lichen samples and 12 isolated phycobiont cultures for each treatment were prepared. Four assays were carried out on four different days for the lichens and on three different days for the algae. Data were analysed for significance with Student's *t* test or by ANOVA.

Results and Discussion

Molecular Characterization of *R. farinacea* Population from El Escorial (Madrid, Spain)

In previous studies, we analysed the genetic structure of diverse populations of *R. farinacea* from the Iberian Peninsula, the Canary Islands and California [9, 13]. Morphological and genetic evidence indicated that all the analysed thalli contained both *Trebouxia* TR1 and *T. TR9* phycobionts at the same time. However, TR1 seemed to be "predominant" or relatively more abundant, while TR9 were the "non-predominant" phycobionts in all samples except in thalli collected from the Canary Islands. Therefore, thalli are heterogeneous and the relative abundance of each symbiont is not constant but may vary depending on the population used (the underlying mechanisms being unknown). In the present study, we employed thalli from a new *R. farinacea* population,

collected at El Escorial (Madrid) in the central region of Spain. This new lichen population was characterized with the aid of mycobiont- and phycobiont-specific molecular markers with the following purposes: (1) to corroborate the morphological identification of collected thalli, (2) to determine the probable coexistence of TR1 and TR9 phycobionts in each thallus and estimate their relative abundance and (3) to assess possible correlations among the relative abundance of each phycobiont, their individual physiological responses and that of the entire thallus.

Total DNA was extracted from a randomized sample of 12 thalli. The correct classification of the sample as *R. farinacea* was confirmed for six randomly selected thalli on the basis of the nrITS as described in [13] (accessions: KJ413040, KJ413041, KJ413042, KJ413043, KJ413044, KJ413045). BLAST searches against nucleotide sequences from the NCBI showed that the fungal partner effectively corresponded to *R. farinacea*. To test the identity of phycobionts, a portion of the chloroplast 23S rDNA was amplified with primers 23Sps1 and 23Sps2 (Fig. 1a). DNAs from all thalli rendered a band of ca. 0.6 Knt (Fig. 1b), which is in agreement with the expected size of 23Sps1/23Sps2 amplicons from TR1 algae (Fig. 1a). The sequence of six randomly selected bands was shown to be

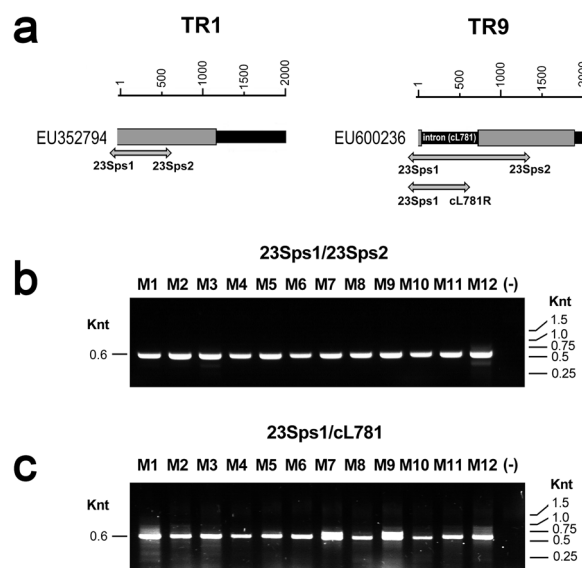


Fig. 1 Molecular characterization of mycobiont and microalgae of *Ramalina farinacea* thalli from El Escorial (Madrid, Spain). **a** Genetic maps of the sequenced portion of plastid LSU rDNA in *Trebouxia* TR1 and *T. TR9* phycobionts. The grey boxes represent exons. Introns are depicted as black lines between exons. Only the name of the cL781 intron [24] is indicated. The expected amplification products and primer names are indicated below each map with light-grey arrows. **b** Gel electrophoresis of PCR amplification products obtained with the 23Sps1/23Sps2 primer pair. **c** Gel electrophoresis of PCR amplification products obtained with the 23Sps1/cL781R primer pair. Amplifications were performed with DNA extracted from 12 thalli (M1 to M12) collected at El Escorial (Madrid, Spain). Electrophoreses were performed in 2 % agarose gels. Negative controls (-) correspond to PCR reactions without DNA. The sizes of molecular markers, and the expected products, are indicated on the right and the left, respectively

identical, or similar to previously published sequences for TR1 phycobionts [13, 12]. To test the co-existence of TR9 in all thalli as previously demonstrated in [9], we used the 23Sps1 and cL781R primer pair (Fig. 1a). Primer cL781 amplifies DNA from TR9 algae (harbouring the cL781 intron) but not from TR1 algae (lacking the cL781 intron). As shown in Fig. 1c, all samples rendered amplification products of the expected size (0.6 kb). Sequencing of these bands confirmed their correspondence to TR9 phycobionts.

It is noteworthy that when “universal primers” for the nrITS of *Trebouxia* algae were used, a single algal nrITS sequence per thallus was obtained for each of them, which clearly corresponded to TR1 phycobionts (accessions: KJ413046, KJ413047, KJ413048, KJ413049, KJ413050, KJ413051). Accordingly, this algal species was taken to be the “predominant phycobiont.” The less abundant was detected only by using specific primers (23Sps1/cL781R) and corresponded to TR9. These results agree with previous studies [9, 12]. In summary, the identity of symbionts of *R. farinacea* from the El Escorial corresponds to that of other Mediterranean-type populations of this lichen in which *Trebouxia* sp. TR1 is the “predominant” phycobiont.

Effect of Pb on Oxidative Status of *R. farinacea* and Chlorophyll Autofluorescence During Rehydration

Previously, we have demonstrated, by employing the fluorescent probe DFCH₂-DA, that *R. farinacea* thalli significantly increased intracellular ROS production during the first 45 min of rehydration [10, 11]. In those studies, the fluorometric kinetics of intracellular ROS production in rehydrating lichen thalli showed that the rate of intracellular free radical production continuously increased, reaching values 10-fold higher at 45 min with respect to those at the beginning of rehydration (see Fig. 3A and 3b in [10]). In the present experiments, we have subjected *R. farinacea* thalli to rehydration with water containing 0 (control) and 100 μM PbNO₃ and the kinetics of intracellular ROS production was followed up to 165 min employing the fluorescent probe DFCH₂-DA, with the same methodology as used in the studies referred to above. The presence of lead in the rehydration solution had a strong impact on the intracellular free-radical formation (Fig. 2a), especially during the first 90 min of rehydration when the HM not only significantly and progressively decreased the level of ROS with respect to control values but also changed ROS release kinetics. From 90 min on, the intracellular ROS level was maintained in less than 40 % of control values in Pb-rehydrated thalli. It seems that Pb elicited a defensive mechanism known as “hormetic response,” which in this case would involve, at least in part, the activation of free-radical scavenging or an antioxidant defence system [34]. However, it should be noted that the absolute amount of ROS continuously increased by 10-fold in the first hour of rehydration,

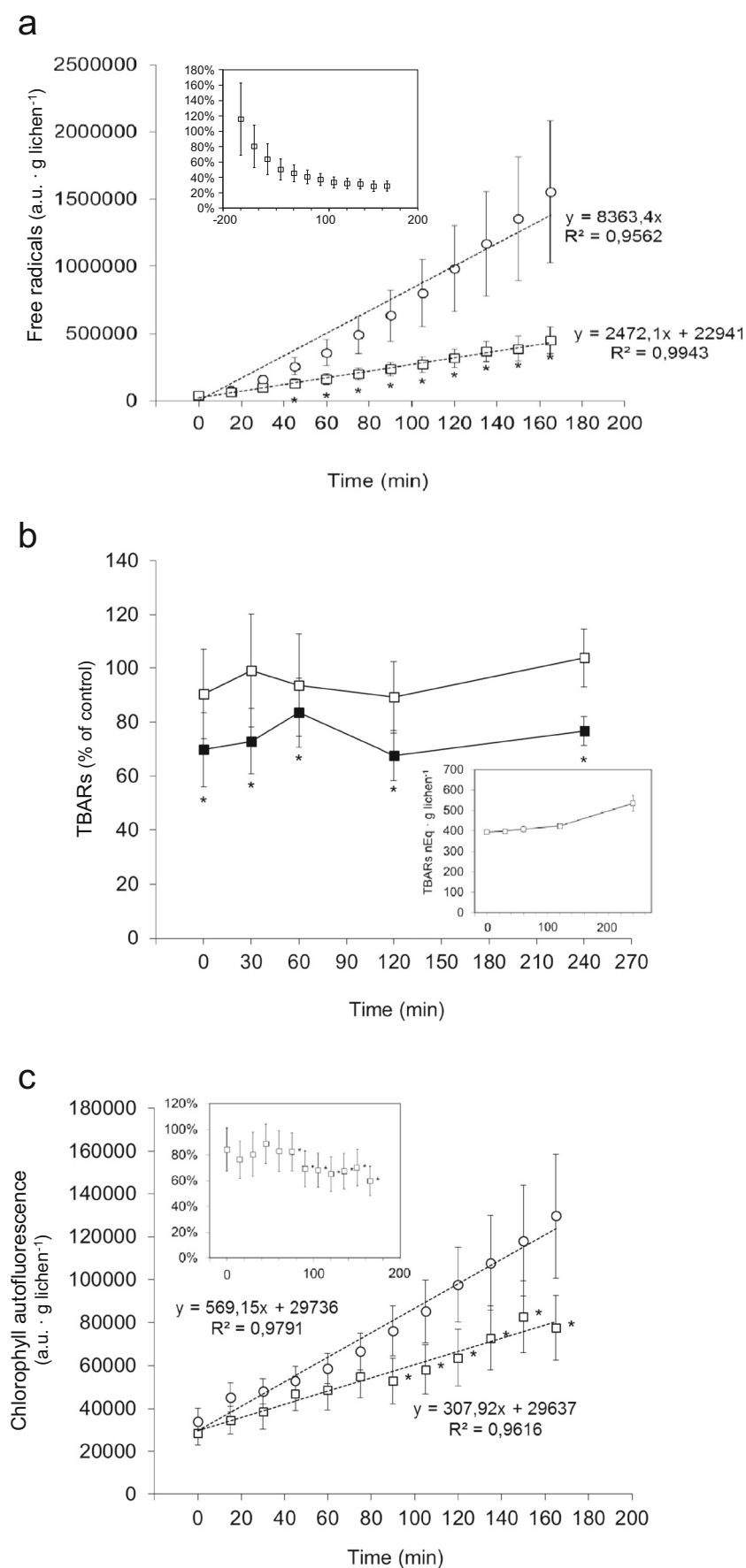
reaching a 15-fold increase after 165 min of rehydration (Fig. 2a). Therefore, absolute ROS levels in Pb-rehydrating thalli were kept ca. 4-fold higher with respect to their own initial values (Fig. 2a).

Lipids in general are within the main targets of ROS [37], and particularly, their fatty acids undergo a self-propagating oxidative damage called lipid peroxidation, which can be assessed through some metastable products capable of reacting with thiobarbituric acid (TBARS). According to the results shown in Fig. 2b, the presence of lead during rehydration did not significantly affect the pattern of TBARS formation with respect to that of the control. It is possible that the remnant ROS level in Pb-rehydrated thalli of *R. farinacea* could be sufficiently high to cause the same extent of lipid peroxidation as that observed in water-rehydrated ones. Another physiological parameter related with the oxidative damage of membranes and the integrity and functionality of the photosynthetic apparatus is chlorophyll autofluorescence, which was simultaneously recorded during the rehydration of the thalli. As can be observed in Fig. 2c, chlorophyll autofluorescence in water-rehydrated thalli sharply increased during the course of rehydration. The presence of 100 μM PbNO₃ diminished chlorophyll autofluorescence to ca. 80 % with respect to the control values for the first 75 min of rehydration and to ca. 60 % afterwards, indicating a delay in the reorganization of the light-capturing system. Since the photosynthetic electron chain is one the main sites of ROS generation [14 and cites therein], the observed decrease in chlorophyll autofluorescence in Pb-rehydrated thalli could be causally linked to the lower rate of intracellular free radical production.

Intracellular ROS Formation and Oxidative Parameters During Rehydration in Isolated Phycobionts of *R. farinacea*

The *Trebouxia* phycobionts (provisionally TR1 and TR9) coexisting in *R. farinacea* thalli showed distinct physiological responses to light intensity, temperature and oxidative stress generated by the ROS propagator cumene hydroperoxide [9, 14]. In addition, liquid cultures of TR1 and TR9 were similarly tolerant to lead exposure, but employed different morpho-physiological strategies against the heavy metal [1]. In the present study, we characterized the kinetics of intracellular oxygen free-radical formation and two related oxidative parameters (TBARS and chlorophyll autofluorescence) during rehydration, initially with water and then in the presence of two concentrations of PbNO₃, in isolated and previously desiccated TR1 and TR9 phycobionts. We employed 50 and 100 μM PbNO₃ treatments, the latter is the same as that used in studies of thalli rehydration, and the former simulates a possible “biosorption effect” effect of the mycobiont which might limit the amount of HM which accesses the phycobiont cells. The objectives of these experiments were to search for

Fig. 2 Effects of Pb on the oxidative parameters of *Ramalina farinacea* thalli during rehydration. Kinetics of intracellular free-radical production (a) and chlorophyll autofluorescence (c) in thalli rehydrated with deionized water (white circle) or 100 μM PbNO_3 (white square). Fluorescence units are arbitrary and comparisons of relative magnitudes can only be made within the same graph. Insets in (a) and (c) show the intracellular free radical and chlorophyll autofluorescence levels referred to controls, respectively. (b) TBARS content referred to controls in thalli rehydrated with either 50 μM (black square) or 100 μM PbNO_3 (white square). Statistical test (referred to control): * $p < 0.05$. The inset shows the TBARS content [$\text{nEq} \cdot \text{g}(\text{FW})^{-1}$] of thalli rehydrated with deionized water. Symbols represent means and standard error bars (SE) of 12 or at least 6 replicates, for (a) and (c) or (b), respectively



possible differences in the physiology of rehydration in the absence/presence of Pb between the two phycobionts and to assess the influence of each alga on the overall behaviour of the entire holobiont.

As shown in Fig. 3a, TR1 and TR9 showed distinct patterns of intracellular ROS formation from both a quantitative and a qualitative perspective. Indeed, while free radicals linearly increased during the course of rehydration in isolated TR9 cells, in TR1, the level of these compounds remained almost unchanged for the first 105 min; thereafter, it evidently increased by ca. 40 % with respect to the initial values at 165 min of rehydration. Moreover, it is noteworthy that rehydrating cultures of TR1 always produced remarkably more free radicals than TR9. The relative differences in intracellular ROS levels between TR1 and TR9 ranged from ca. 6.5- to 4.5-fold at the beginning and the end of the studied period of rehydration, respectively. Interestingly, similar quantitative differences in chlorophyll autofluorescence between the two phycobionts of *R. farinacea* were observed (Fig. 3c). This parameter did not significantly change during rehydration in both algae, but it was always ca. 6.5-fold higher in TR1 than in TR9. On the other hand, the great differences in free-radical production between the two algae seemed not to have any correlative impact on lipid peroxidation, since the amount of TBARS was similar in both TR1 and TR9 and during the course of rehydration (Fig. 3c). These quantitative discrepancies could be explained, at a first glance, by putative differences in ROS-scavenging differences between TR1 and TR9 algae. However, in previous studies [1, 14], we have observed that even though basal levels of antioxidant enzymes glutathione reductase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase were significantly higher TR1 than in TR9 (liquid cultures), Pb treatments induced the three enzymes in TR9 while it had no significant effect on those of TR1. In consequence, antioxidant activities were quantitatively similar in both phycobionts under Pb treatments [1]. Perhaps, other still-undetermined antioxidant agents could be responsible, at least in part, for the observed discrepancies between quantitative levels of ROS formation and lipid peroxidation. On the other hand, one have to keep in mind that results are expressed on cell mass basis and thylakoid membrane lipids are one of the main sources of lipid peroxides in algal and plant cells. Previous ultrastructural analysis by TEM of TR1 and TR9 algae indicated great differences in thylakoid density within their chloroplast [9]. In that article, we described: “In TR1 cells, thylakoids were often closely associated in stacks of three at the most ...In TR9 cells, ...thylakoids were grouped in stacks shaped by numerous membranes, similar to the grana in vascular plants.”

In addition, “large spherical vesicles with an electron-dense content made up of lipids were seen throughout the cytoplasm (of TR9 but not of TR1) and were especially abundant at the periphery and near the mitochondria”. It is thus possible that morphological and biochemical differences could lead to differences in the total amount of lipids/cell between TR1 and TR9, being relatively lower in the former than in the latter. This fact could be of crucial importance in determining the amount of lipid peroxides/cell, since lipid peroxidation is a self-propagating process and only needs the direct participation of ROS at the starting reaction(s) [36].

When rehydration was performed in the presence of aqueous solutions containing either 50 or 100 μM PbNO_3 , significantly different physiological responses could be observed in each phycobiont (Figs. 4 and 5). TR1 algae diminished the intracellular ROS formation, but followed different time-dependent patterns depending on the concentration of the HM (Fig. 4a). At 50 μM PbNO_3 , this phycobiont showed a slow but progressive reduction of free radicals reaching ca. 40 % with respect to control values at the end of rehydration. When rehydrated in the presence of 100 μM Pb, TR1 sharply lowered ROS levels to 40–45 % with respect to control values at 30 min of rehydration. However, either 50 or 100 μM PbNO_3 induced quite the opposite effect on intracellular ROS production during rehydration in TR9 (Fig. 5a). Under a lower level Pb treatment, this alga was able to decrease the intracellular free radicals to ca. 50 % with respect to control values almost from the beginning to the end of rehydration. In contrast, under 100 μM Pb, TR9 could only maintain ROS production at similar levels, or slightly higher (but not significantly) than those of controls during the initial 105 min, thereafter free radicals augmented by ca. 40 %. The effects of lead during rehydration on the kinetics of chlorophyll autofluorescence of isolated TR1 and TR9 clearly resembled those observed on intracellular ROS formation (Figs. 4c and 5c, and Figs. 4a and 5a, respectively). TR1 cells diminished chlorophyll autofluorescence by ca. 50 and 40 % with respect to controls when rehydrating in the presence of 50 and 100 μM Pb, respectively. However, TR9 either decreased or increased this photosynthetic pigment parameter if the concentration of lead during rehydration was either 50 or 100 μM PbNO_3 , respectively, in proportions similar to those observed for free-radical production. As shown in Figs. 4b and 5b, the presence of lead provoked a significant and transient diminishing of lipid peroxidation in both phycobionts at 30 min of rehydration. However, later on, dose- and time-dependent differences between the two algae were observed. When rehydrated with 50 μM Pb, TR1 did

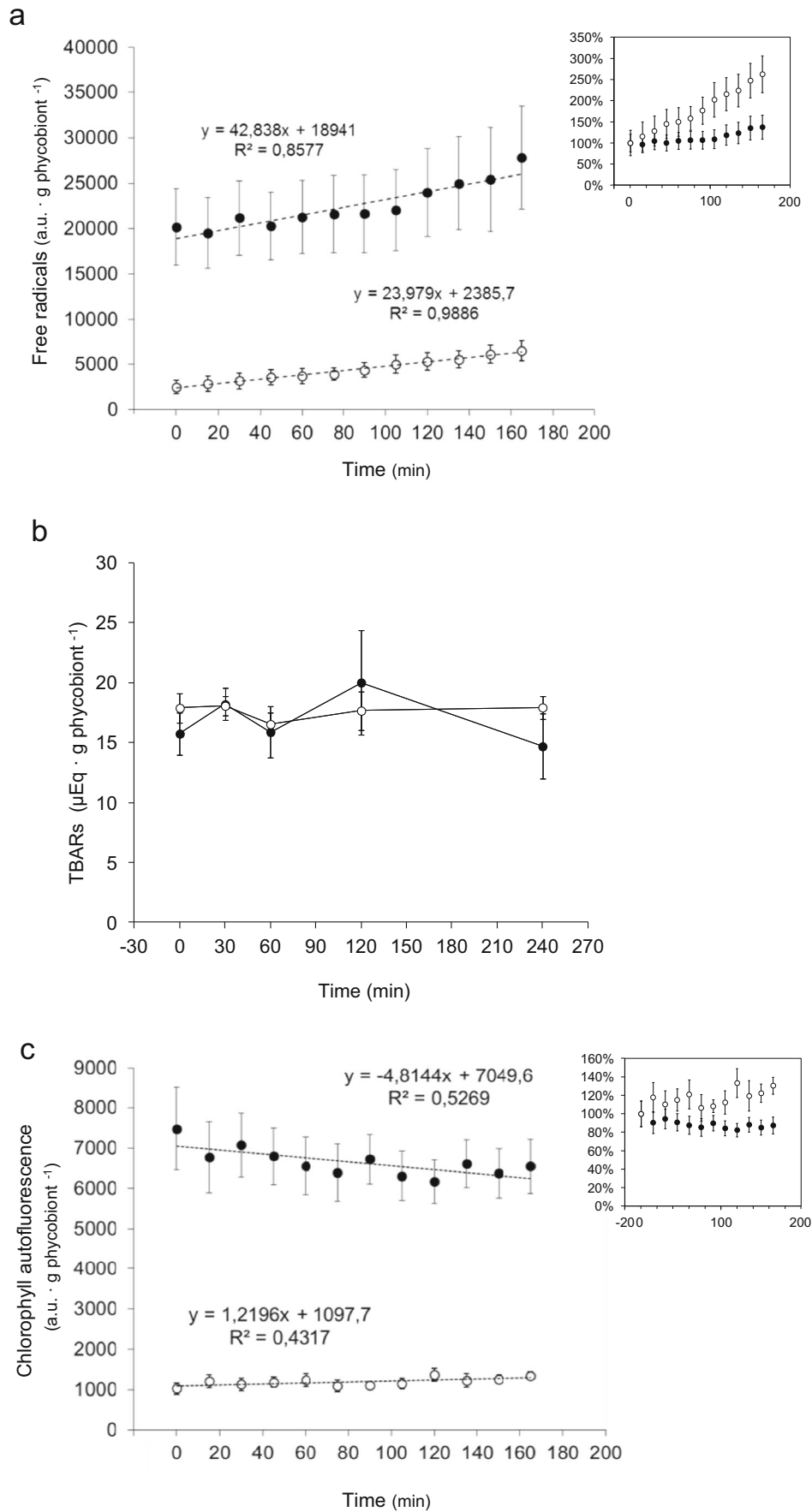


Fig. 3 Rehydration of desiccated cultures of *Trebouxia* TR1 and *T.* TR9 microalgae isolated from the lichen *Ramalina farinacea*. Kinetics of intracellular free radical production (a) and chlorophyll autofluorescence (c) [a.u.·g(FW)⁻¹] in either TR1 (black circle) or TR9 (white circle) rehydrated with deionized water. Insets in (a) and (c) represent the intracellular free radical and chlorophyll autofluorescence levels referred to their corresponding initial values, respectively. (b) TBARS content [nEq.g(FW)⁻¹] in either TR1 (black circle) or TR9 (white circle) rehydrated with deionized water. Symbols represent means and standard error bars of 12 replicates

not modify its levels of TBARS with respect to controls, while under 100 μM Pb, it diminished lipid peroxidation by ca. 30 and 40 % with respect to controls, at 60 and 120 min of rehydration, respectively, even though there was no statistical significance probably due to intraspecific variability (Fig. 4b). Conversely, for TR9, 50 μM Pb seemed to be more effective than 100 μM in maintaining TBARS at lower levels with respect to controls, especially at 2 h of rehydration (Fig. 5b). In the next 2 h, lipid peroxidation tended to smoothly increase in TR1 and TR9 phycobionts exposed to both lead concentrations, which still showed slightly lower levels of TBARS (80–90 %) than controls, but the differences were not statistically significant. On the other hand, there seemed to be a qualitative, or not-strictly quantitative, relationship between the kinetics of intracellular ROS formation and those of TBARS (Figs. 4a and 5a, and Figs. 4b and 5b, respectively). A distinct species-specific lead concentration (100 μM in TR1 and 50 μM in TR9) was the most effective in diminishing both free radicals and lipid peroxidation.

The Effect of Lead During Rehydration of Lichen Thallus in Comparison with Its Isolated Phycobionts. Hormesis

In general, the bulk of phycobiont biomass accounts for ca. 5–7 % of total lichen biomass. More than 90 % corresponds to the mycobiont [5]. However, these proportions do not seem to reflect the relative contribution of each symbiotic partner to the formation of intracellular free radicals. According to previous results from Catalá et al. [10, 11], phycobionts are the major source, and cortical tissue is the second producer of intracellular ROS, from a quantitative perspective. Since, in our experiments, the ROS produced have not been quantified using an external standard, quantitative comparisons of whole thallus and isolated phycobionts' ROS production are not possible. However, the comparison of kinetic patterns and relative ROS variations provide very interesting information. At 165 min of rehydration with water, *R. farinacea* thalli generated an amount of free radicals equivalent to 15-fold from its initial levels,

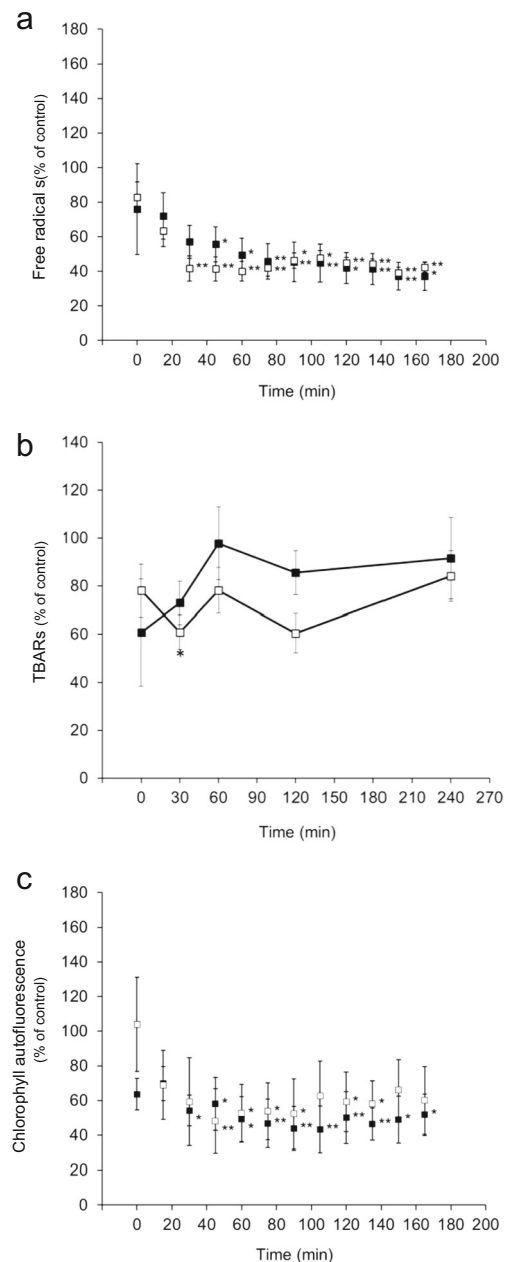


Fig. 4 Rehydration of desiccated cultures of *Trebouxia* TR1 phycobiont in the presence of Pb. Kinetics of intracellular free radical production (a), lipid peroxidation (TBARS content, b) and chlorophyll autofluorescence (c) referred to controls (see Fig. 3) in isolated TR1 phycobionts rehydrated with either 50 μM (black square) or 100 μM PbNO₃ (white square). Statistical test (referred to control): * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$. Symbols represent means and standard error bars of 12 replicates

while at the same time isolated TR1 phycobionts produced an equivalent of a 40 % increase with respect to the initial value. This effect could be a consequence of differences in the rate of water acquisition during rehydration. This is very fast in desiccated algae (within a few minutes they reach nearly 100 % rehydration [19]), while in thalli, this process can be considerably slower

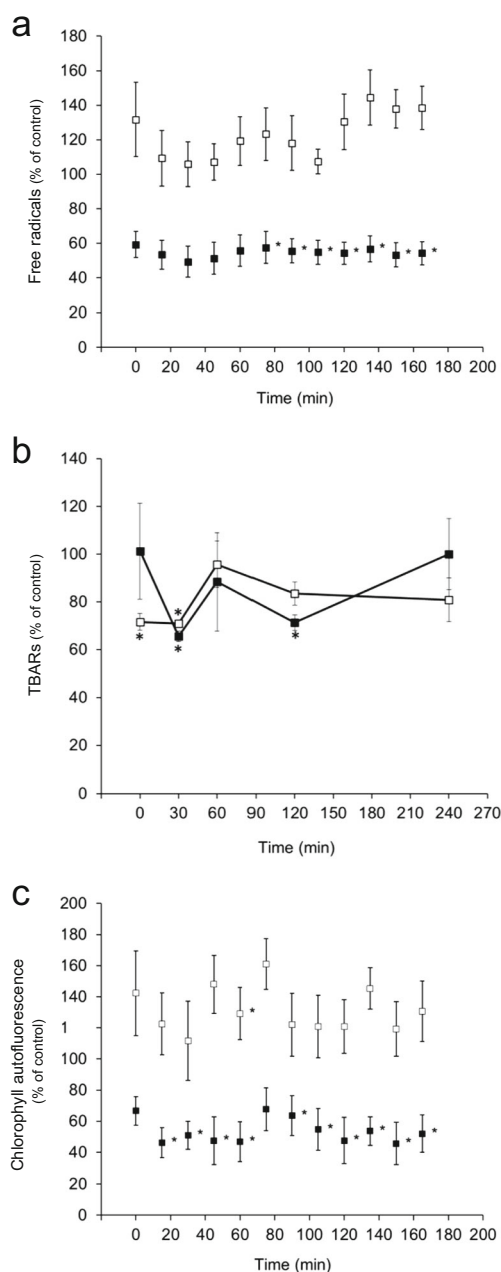


Fig. 5 Rehydration of desiccated cultures of *Trebouxia* TR9 phycobiont in the presence of Pb. Kinetics of intracellular free radical production (a), lipid peroxidation (TBARs content, b) and chlorophyll autofluorescence (c) referred to controls (see Fig. 3) in isolated TR9 phycobionts rehydrated with either 50 μM (black square) or 100 μM PbNO₃ (white square). Statistical tests (referred to control): * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$. Symbols represent means and standard error bars of 12 replicates

as a consequence of the complex multilayered structure formed by mycobiont hyphae with special water conductance features ([22] and cites therein).

From a qualitative point of view, the comparison of kinetics of intracellular ROS, chlorophyll autofluorescence and lipid peroxidation among the entire thallus and both TR1 and TR9, rehydrated with water alone or in the presence of lead, showed

a parallelism between thallus and TR1 (Figs. 2, 3, 4 and 5). This contention agrees with the evidence presented here, indicating that in *R. farinacea* thalli belonging to the El Escorial population, TR1 algae are by far the most abundant, or “predominant” phycobionts, while TR9 algae are the “non-predominant” phycobionts. Moreover, the parallelism between the dynamics of intracellular free-radical formation in the thallus and the predominant phycobiont prompt us to hypothesize that the photosynthetic partner could be an initial source or “starting point” of photoinducible ROS during rehydration. The close contact with mycobiont hyphae would facilitate the migration of diffusible ROS (such as H₂O₂ or other ROS-metastable derivatives) which could induce and propagate new ROS formation within fungal cells. Related to this, it is known that lead damages the photosynthetic membranes due to its affinity for N- and S-ligands: chlorophyll b and thus photosystem II being especially sensitive to Pb toxicity [39]. This toxic effect might be related with the observed diminishing of chlorophyll autofluorescence in both thallus and isolated algae rehydrated in the presence of lead. However, in previous experiments with liquid cultures of TR1 and TR9 exposed to chronic treatments of the same doses of Pb, no evident chlorophyll damage was observed [1]. In consequence, it is reasonable to speculate that when both thallus and isolated phycobionts (TR1 in this case) rehydrate in the presence of Pb, they activate some dissipative mechanism(s) of absorbed energy [19], evidenced as a reduction of chlorophyll autofluorescence, and thus prevent the formation of intracellular free radicals and oxidative stress. In other words, low doses of lead during lichen rehydration could exert a “hormetic” effect [34] by inducing a very fast defensive response of the photosynthetic partners. Interestingly, when desiccated thalli of *R. farinacea* were rehydrated in the presence of 50 μM Pb, they were able to preserve membranes from oxidative damage as indicated by lower lipid peroxidation (Fig. 2b).

Conclusions

The presence of lead during water gain seems to induce, in both *R. farinacea* and its phycobionts, strong mechanisms to prevent the oxidative burst provoked by rehydration and probably strengthened by Pb. These protective mechanisms appear to be very fast and could involve, at least in part, chlorophyll autofluorescence modulations. Our results indicate that the oxidative response of the entire thallus during rehydration seems to be mainly modulated by that of the predominant phycobiont, which can have important ecophysiological and adaptive implications since thalli components proportion may vary from population to population.

Acknowledgments This study was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitividad (MINECO CGL2012-40058-C02-01/02), FEDER and the Generalitat Valenciana (PROMETEOII 021/2013 GVA). Daniel Sheering revised the manuscript in English.

References

- Álvarez R, del Hoyo A, García-Breijo F, Reig-Arminana J, del Campo EM, Guéra A, Barreno E, Casano LM (2012) Different strategies to achieve Pb-tolerance by the two *Trebouxia* algae coexisting in the lichen *Ramalina farinacea*. *J Plant Physiol* 169: 1797–1806
- Arhoun M, Barreno E, Torres JR, Ramis-Ramos G (2000) Releasing rates of inorganic ions from the lichen *Ramalina farinacea* by capillary zone electrophoresis (CZE) as an indicator of atmospheric pollution. *Crypt Bryol Lichenol* 21:275–289
- Augusto S, Maguas C, Matos J, Pereira MJ, Branquinho C (2010) Lichens as an integrating tool for monitoring PAH atmospheric deposition: a comparison with soil, air and pine needles. *Environ Pollut* 158:483–489
- Bačkor M, Váczi P (2002) Copper tolerance in the lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta). *Environ Exp Bot* 48:11–20
- Barreno E (2004) Hongos simbiotes: Líquenes, micoficobiosis y micorrizas. In: Izco J (ed) *Botánica*. MacGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp 309–340
- Beckett RP, Kranner I, Minibayeva FV (2008) Stress physiology and the symbiosis. In: Nash T (ed) *Lichen biology*. Cambridge University Press, NY, pp 134–151
- Bold HC, Parker BC (1962) Some supplementary attributes in the classification of *Chlorococcum* species. *Arch Microbiol* 42:267–288
- Branquinho C, Brown DH, Maguas C, Catarino F (1997) Lead (Pb) uptake and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence in different lichen species. *Environ Exp Bot* 37:95–105
- Casano LM, del Campo EM, García-Breijo FJ, Reig-Armiñana J, Gasulla F, del Hoyo A, Guéra A, Barreno E (2011) Two *Trebouxia* algae with different physiological performances are ever-present in lichen thalli of *Ramalina farinacea*. Coexistence versus competition? *Environ Microbiol* 13:806–818
- Catalá M, Gasulla F, Pradas del Real AE, García-Breijo F, Reig-Armiñana J, Barreno E (2010) Fungal-associated NO is involved in the regulation of oxidative stress during rehydration in lichen symbiosis. *BMC Microbiol* 10:297
- Catalá M, Gasulla F, Pradas del Real AE, García-Breijo F, Reig-Armiñana J, Barreno E (2013) The organic air pollutant cumene hydroperoxide interferes with NO antioxidant role in rehydrating lichen. *Environ Pollut* 179:277–284
- del Campo EM, Casano LM, Gasulla F, Barreno E (2010) Suitability of chloroplast LSU rDNA and its diverse group I introns for species recognition and phylogenetic analyses of lichen-forming *Trebouxia* algae. *Mol Phylogenet Evol* 54:437–444
- del Campo EM, Catalá S, Gimeno J, del Hoyo A, Martínez-Alberola F, Casano LM, Grube M, Barreno E (2013) The genetic structure of the cosmopolitan three-partner lichen *Ramalina farinacea* evidences the concerted diversification of symbionts. *FEMS Microbiol Ecol* 83: 310–323
- del Hoyo A, Álvarez R, del Campo EM, Gasulla F, Barreno E, Casano LM (2011) Oxidative stress induces distinct physiological responses in the two *Trebouxia* photobionts of the lichen *Ramalina farinacea*. *Ann Bot* 107:109–118
- Demmig-Adams B, Adams WW (2000) Harvesting sunlight safely. *Nat* 403:371–374
- Fadila K, Houria D, Rachid R, Reda DM (2009) Cellular response of pollution biondicator model (*Ramalina farinacea*) following treatment with fertilizer (NPKs). *Am-Eurasian J Toxicol Sci* 1:69–73
- Fos S, Deltoro VI, Calatayud A, Barreno E (1999) Changes in water economy in relation to anatomical and morphological characteristics during thallus development in *Parmelia acetabulum*. *Lichenologist* 31:375–387
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2:113–118
- Gasulla F, de Nova PG, Esteban-Carrasco A, Zapata JM, Barreno E, Guéra A (2009) Dehydration rate and time of desiccation affect recovery of the lichen alga *Trebouxia erici*: alternative and classical protective mechanisms. *Planta* 231:195–208
- Gasulla F, Guéra A, Barreno E (2010) A simple and rapid method for isolating lichen photobionts. *Symbiosis* 51:175–179
- Halliwel B, Cross CE (1994) Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 102(Suppl 10):5–12
- Honegger R (2008) Morphogenesis. In: Nash T (ed) *Lichen biology*. Cambridge University Press, NY, pp 69–93
- Jensen M, Chakir S, Feige GB (1999) Osmotic and atmospheric dehydration effects in lichens *Hypogymnia physodes*, *Lobaria pulmonaria*, and *Peltigera aphthosa*: an *in vivo* study of the chlorophyll fluorescence induction. *Photosynthetica* 37: 393–404
- Jubany-Mari T, Munne-Bosch S, Alegre L (2010) Redox regulation of water stress responses in field-grown plants. Role of hydrogen peroxide and ascorbate. *Plant Physiol Biochem* 48:351–358
- Kranner I, Cram WJ, Zorn M, Wornik S, Yoshimura I, Stabentheiner E, Pfeifhofer HW (2005) Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3141–3146
- Kroken S, Taylor WJ (2000) Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. *Bryologist* 103:645–660
- Liu D, Li TQ, Jin XF, Yang XE, Islam E, Mahmood Q (2008) Lead induced changes in the growth and antioxidant metabolism of the lead accumulating and non-accumulating ecotypes of *Sedum alfredii*. *J Integr Plant Biol* 50:129–140
- Liu T, Liu S, Guan H, Ma L, Chen Z, Gu H, Qu LJ (2009) Transcriptional profiling of *Arabidopsis* seedlings in response to heavy metal lead (Pb). *Environ Exp Bot* 67:377–386
- Loppi S, Frati L (2006) Lichen diversity and lichen transplants as monitors of air pollution in a rural area of central Italy. *Environ Monit Assess* 114:361–375
- Margulis L, Barreno E (2003) Looking at lichens. *Bioscience* 53: 776–778
- Moore JP, Le NT, Brandt WF, Driouich A, Farrant JM (2009) Towards a systems-based understanding of plant desiccation tolerance. *Trends Plants Sci* 14:110–116
- Nash TH, Gries C (2002) Lichens as bioindicators of sulfur dioxide. *Symbiosis* 33:1–21
- Phang IC, Leung DW, Taylor HH, Burritt DJ (2011) The protective effect of sodium nitroprusside (SNP) treatment on *Arabidopsis thaliana* seedlings exposed to toxic level of Pb is not linked to avoidance of Pb uptake. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:1310–1315
- Poschenrieder C, Cabot C, Martos S, Gallego B, Barceló J (2013) Do toxic ions induce hormesis in plants? *Plant Sci* 212:15–25
- Reilly CA, Aust SD (1999) Measurement of lipid peroxidation. *Curr Protoc Toxicol* 2(4):1–2.4.13
- Repetto M, Semprine J, Boveris A (2012) Lipid peroxidation: Chemical mechanism, biological implications and analytical determination. In: Catalá A (ed) *Lipid peroxidation*, InTech, doi:10.5772/

45943. <http://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation>, pp 3–30
37. Schützendübel A, Polle A (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* 53:1351–1365
 38. Sharma P, Dietz KJ (2008) The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci* 41:43–50
 39. Sharma P, Dubey RS (2005) Lead toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol* 17:35–52
 40. Tuba Z, Cintalan Z, Proctor M (1996) Photosynthetic responses of a moss, *Tortula ruralis* ssp. *ruralis*, and the lichens *Cladonia convoluta* and *C. furcata* to water deficit and short periods of desiccation, and their ecophysiological significance: a baseline study at present-day CO₂ concentration. *New Phytol* 133:353–361
 41. Wannaz ED, Carreras HA, Rodríguez JH, Pignata ML (2012) Use of biomonitors for the identification of heavy metals emission sources. *Ecol Indic* 20:163–169
 42. Wardman P (2007) Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med* 43:995–1022
 43. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) Academic Press Inc, NY, pp 315–322