

JCH-FC
4AB-B
C-442
E.L

**CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN DE ISOFORMAS DE
PEROXIDASAS DE PARED CELULAR EN PLANTAS
DE *Hordeum vulgare* L. INFESTADAS CON ÁFIDOS**

Tesis

entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar el grado de

Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Botánica

Facultad de Ciencias

por



MERCEDES ELIZABETH CHAMAN MEDINA

Enero, 1998

Directores de Tesis : Dr. Luis Corcuera Pérez

Dra. Liliana Cardemil Oliva

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

Se informa a la comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Magíster presentada por la candidato :

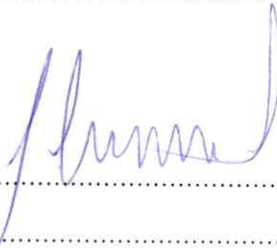
MERCEDES ELIZABETH CHAMAN MEDINA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar el grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Botánica, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el Día 31 de Diciembre de 1997.

Directores de Tesis:

Dr. Luis Corcuera P.

Dra. Liliana Cardemil O.



.....
.....

Comisión de Evaluación de la Tesis :

Prof. Víctor Hugo Argandoña

Dra. Cecilia Rojas

Dr. Francisco Pérez

Prof. Gloria Montenegro



.....
.....
.....
.....

A mi hijo

A mi esposo

A mi madre y hermanos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los directores de mi tesis, Dr. Luis Corcuera y Dra. Liliana Cardemil por haberme brindado orientación y apoyo en la realización de este trabajo, así como durante el período de mis estudios de posgrado.

A los académicos de Botánica, por los conocimientos impartidos en el transcurso de mis estudios.

A la profesora Gloria Montenegro de la Universidad Católica de Chile, por sus consejos y sugerencias durante mi permanencia en su laboratorio. A todas las personas que trabajan con ella, especialmente a Miguel Gómez por su generosa y permanente ayuda.

A los académicos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, Dr. Manuel Fernández H., Dr. Pedro Castillo B., Blgo. Eloy López M. y Blgo. Julio Chico R., quienes me apoyaron y asumieron mi trabajo en la Sección de Botánica durante el tiempo de mis estudios de posgrado.

A todos mis compañeros de estudios y personal del laboratorio de Fisiología Vegetal, quienes en algún momento me ayudaron y compartieron sus conocimientos de la Botánica. Mi especial agradecimiento a Luis González López por la siempre disponibilidad de compartir sus conocimientos y experiencias del trabajo de laboratorio.

A las instituciones que permitieron la realización de mis estudios en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y ejecución de la presente tesis: Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú y Fondecyt (Proyecto 1950302), Chile.

INDICE

Título	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Indice	iv
Lista de tablas	vi
Lista de figuras	vii
Lista de símbolos y abreviaturas	viii
RESUMEN	1
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Composición de la pared celular	9
1.2. Proteínas de la pared celular	10
1.3. Características generales de las peroxidasas	10
1.4. Localización de las peroxidasas	13
1.5. Importancia de las peroxidasas	14
1.6. Peroxidasas en el crecimiento	16
1.7. Peroxidasas en la defensa de las plantas	17
1.8. Peroxidasas en la resistencia adquirida	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo	27
2.2. Infestación de las plantas con áfidos	27
2.3. Obtención de paredes celulares	28
2.4. Extracción de proteínas unidas iónica y covalentemente a la pared celular	29
2.5. Medición de la actividad peroxidasa	29
2.6. Isoelectroenfoque	30
2.6.1. Caracterización mediante IEF de las peroxidasas unidas a la pared celular	30
2.6.2. Determinación del pI de las isoformas reveladas en geles del IEF	31
2.6.3. Análisis densitométrico de las bandas reveladas en geles del IEF	32
2.7. Ensayos con etileno	32
2.7.1. Medición de etileno en plantas de cebada	32
2.7.2. Aplicación de etileno y medición de la actividad de las peroxidasas unidas a la pared celular	33

3. RESULTADOS	34
3.1. Actividad de las peroxidasas iónicas en plantas sin infestar e infestadas con áfidos	34
3.2. Actividad de las peroxidasas covalentes en plantas sin infestar e infestadas con áfidos	36
3.3. Porcentaje de acumulación de la actividad peroxidasa de pared celular por infestación con áfidos	38
3.4. Actividad de las peroxidasas iónicas y covalentes de plantas sin infestar e infestadas con sustratos artificiales y naturales	38
3.5. Análisis de las isoformas de peroxidasas unidas iónicamente a la pared celular mediante isoelectroenfoque	41
3.6. Análisis de las isoformas de peroxidasas unidas covalentemente a la pared celular mediante isoelectroenfoque	48
3.7. Acumulación sistémica de peroxidasas unidas a la pared celular en plantas de cebada infestadas con áfidos	51
3.8. Acumulación de etileno en plantas de cebada sin infestar e infestadas	51
3.9. Actividad de las peroxidasas unidas a la pared celular en plantas tratadas con etileno	53
4. DISCUSION	56
4.1. Aumento de la actividad de peroxidasas unidas iónicamente a la pared celular	56
4.2. Aumento de la actividad de peroxidasas unidas covalentemente a la pared celular	57
4.3. Comportamiento de las peroxidasas de pared celular acumuladas por infestación	59
4.4. Efecto de la infestación con áfidos y de la edad de la planta en expresión de isoformas de peroxidasas unidas a la pared celular	61
4.5. Acumulación sistémica de peroxidasas unidas a la pared celular	62
4.6. Acumulación de etileno por infestación con áfidos y acumulación de peroxidasas unidas a la pared en plantas de cebada tratadas con etileno	64
5. CONCLUSIONES	66
6. BIBLIOGRAFÍA	68

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Aumento de la actividad peroxidasa unida iónicamente a la pared celular por infestación con áfidos, con diferentes sustratos en plantas de *H. vulgare*. 40
- Tabla 2.** Aumento de la actividad peroxidasa unida covalentemente a la pared celular por infestación con áfidos, con diferentes sustratos en plantas de *H. vulgare*. 42
- Tabla 3.** Acumulación sistémica de la actividad peroxidasa de pared celular, en *H. vulgare* cv. Frontera por infestación con *S. graminum*. 52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Participación del etileno y de las peroxidasas en la rigidización de la pared celular en respuesta a estímulos físicos y químicos.	22
Figura 2. Participación del etileno en la resistencia sistémica adquirida.	24
Figura 3. Variación de la actividad de las peroxidasas unidas iónicamente a la pared celular del tejido foliar de plantas de cebada.	35
Figura 4. Variación de la actividad de las peroxidasas unidas covalentemente a la pared celular del tejido foliar de plantas de cebada.	37
Figura 5. Porcentajes de inducción de la actividad de peroxidasas iónicas y covalentes de pared celular por infestación con áfidos.	39
Figura 6. Efecto de la infestación con áfidos en el patrón de IEF de peroxidasas iónicas de pared celular de hojas de cebada.	43
Figura 7. Densitogramas de las isoformas iónicas en plantas de 7 días de edad.	44
Figura 8. Densitogramas de las isoformas iónicas en plantas de 10 días de edad. ...	45
Figura 9. Densitogramas de las isoformas iónicas en plantas de 13 días de edad. ...	46
Figura 10. Densitogramas de las isoformas iónicas en plantas de 16 días de edad...	47
Figura 11. Efecto de la infestación con áfidos en el patrón de IEF de peroxidasas covalentes de pared celular de hojas de cebada.	49
Figura 12. Densitogramas de las isoformas covalentes en plantas de 16 días de edad	50
Figura 13. Efecto de la infestación con áfidos en la producción de etileno a través del tiempo en plantas de cebada.	54
Figura 14. Efecto del etileno en la actividad de peroxidasas iónicas y covalentes de pared celular en plantas de cebada.	55

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AOA : ácido aminoxiacético

AVG : aminoetoxivinilglicina

BTH: benzotiadazol

DAB: diaminobencidina

DCINA: ácido 2,6-dicloroisonicotínico

IEF: isoelectroenfoque

MFT: meta-fluoro-tirosina

O-D: orto dianisidina

O-PDA: orto fenilendiamina

PPD-PC: parafenilendiamina-pirocatecol

PROTEINAS PR: proteínas relacionadas a patogenicidad

SYR: siringaldacina

TMB: tetrametilbencidina

TMV: virus del mosaico del tabaco

RESUMEN

Las plantas al enfrentar diferentes tipos de estrés responden con aumento de la actividad de peroxidasas, el cual se puede focalizar en tejidos o estructuras subcelulares específicas. La actividad de peroxidasas unidas a la pared celular aumenta ante heridas causadas por agentes patógenos, plagas o daño mecánico. Las peroxidasas de la pared celular están involucradas en procesos de síntesis y establecimiento de enlaces entre compuestos no celulósicos de la pared. Por ello, estas enzimas han sido implicadas en procesos de reparación de paredes dañadas. Este trabajo se realizó con el propósito de evaluar el efecto de la infestación con áfidos en la expresión de peroxidasas unidas iónica y covalentemente a la pared celular en plantas de *Hordeum vulgare* L. cv. Frontera.

La actividad de las peroxidasas unidas iónica y covalentemente a la pared celular, fue medida en extractos obtenidos de plantas de 7, 10, 13 y 16 días de edad infestadas con *Schizaphis graminum* R. por 48 y 72 horas; así como en sus controles respectivos (sin infestar). También se midió la actividad de ambas peroxidasas en extractos obtenidos de la primera hoja de plantas de 13 días de edad, cuando fueron infestadas solamente la vaina o lámina por 72 horas.

La actividad de peroxidasas unidas iónicamente a la pared determinada con o-PDA aumentó, tanto en plantas sin infestar como infestadas de todas las edades. El mayor aumento de la actividad por infestación (104 %) en relación a las plantas sin infestar, se observó en plantas de 13 días de edad infestadas por 72 horas. La actividad de las

peroxidasas unidas covalentemente a la pared celular también aumentó en las plantas sin infestar e infestadas, pero el aumento de esta actividad por infestación fué en menor grado que las iónicas. El mayor porcentaje de incremento de esta actividad (76 %) se observó en plantas de 7 días infestadas por 72 horas, y fué disminuyendo con la edad de la planta.

El isoelectroenfoque realizado con extractos conteniendo peroxidasas unidas iónicamente a la pared, mostró que hay 7 isoformas de peroxidasas (básicas en su mayoría) y que la infestación indujo una nueva isoforma con pI 6,76 en las plantas de 7 días de edad, la cual se mantuvo en plantas de 10 días. La actividad de las peroxidasas iónicas aumentó después de la infestación por aumento en la actividad de isoformas constitutivas de la pared celular, siendo la isoforma con pI 8,54 la que mostró un mayor aumento de actividad. En plantas de 10 días de edad sin infestar e infestadas se observó la aparición de una isoforma con pI 7,75, la cual se mantuvo en plantas de 13 y 16 días. El IEF de peroxidasas unidas covalentemente a la pared de plantas de 7 días de edad mostró mayor número de isoformas distribuidas en un rango más amplio de pH que las peroxidasas iónicas (ácidas en su mayoría). El aumento de la actividad de las peroxidasas covalentes por infestación se debió a isoformas ya presentes, principalmente de las isoformas con pI 7,60 y 5,95.

La actividad de las peroxidasas unidas iónicamente a la pared celular en la primera hoja de plantas de 13 días de edad infestadas en las vainas, aumentó con respecto al control (de 14,7 a 27,8 U/gPS), pero esta actividad fué aún mayor en las vainas de hojas que fueron infestadas solamente en las láminas (38,9 U/gPS); en cambio no se observó

variaciones en las láminas. La actividad unida covalentemente a la pared celular de vainas infestadas mostró un ligero aumento en relación al control y se mantuvo constante cuando fueron infestadas las láminas. Esta actividad en las láminas no experimentó cambios.

Los resultados demuestran que la infestación por áfidos produce aumento de la actividad unida iónica y covalentemente a la pared celular. Las variaciones de ambas actividades depende de la edad de la planta y las peroxidasas iónicas son más inducibles que las covalentes. El IEF reveló la aparición de una nueva isoforma en las peroxidasas iónicas por infestación, como también de una isoforma inducida por edad de la planta. También demostró que el aumento de la actividad de peroxidasas unidas tanto iónica como covalentemente a la pared se debió principalmente a isoformas constitutivas de la pared celular.

La actividad de las peroxidasas iónica y covalentemente unidas a la pared celular se midió en zonas infestadas y alejadas de la infestación para determinar si en cebada había una respuesta sistémica. Se encontró que al infestar la lámina de la hoja la actividad iónica aumentó localmente y en la vaina de la hoja; sin embargo cuando se infestó la vaina, esta actividad aumentó sólo en esta estructura foliar. La actividad covalente aumentó en la vaina infestada y no en la lámina. Estos resultados indican que el daño producido por los áfidos puede ser reconocido en tejidos distantes de la infestación aumentando la actividad de las peroxidasas iónicas posiblemente como un mecanismo de protección a tejidos aún no infestados.

Para establecer si el etileno está involucrado en el aumento de la actividad de peroxidasas de pared celular en plantas infestadas con *S graminum*, se cuantificó durante 9 horas la cantidad de etileno producido por plantas infestadas y sin infestar. Se encontró un aumento en la producción de etileno de un 52% más en plantas infestadas que en plantas control al término de las 9 horas. Pulsos de etileno dados en dosis de 40 ppm por 6 horas a plantas sanas indujo una mayor actividad de peroxidasas iónicas pero no de covalentes. Las peroxidasas iónicas aumentaron su actividad al doble de la actividad inicial y respecto al control sin etileno. Estos resultados sugieren que el etileno estaría participando como una señal en el sistema de activación de los mecanismos de resistencia de la pared celular en zonas infestadas de la cebada.

ABSTRACT

Responses of plants coping with different kinds of stress is represented by peroxidase activity induction, which is localized in tissues or specific subcellular structures. The cell wall-bound peroxidase activity increases in response to pathogen injury, pests or mechanical damage. The peroxidases in the cell wall are involved in synthetic processes and cross-links formation between non-cellulosic wall polymers. Thus, this enzyme have been related to repair events of cell walls. This work was carried out to study the effect of aphid infestation on the expression of ionically and covalently wall-bound peroxidases in plants of *H. vulgare* L. cv Frontera.

The peroxidase activity of both ionically and covalently bound to cell walls were measured in plants of 7, 10, 13 and 16 days old infested with *S. graminum* for 48 and 72 h. The peroxidase activity was also measured from the first leaf of 13 day old plants infested for 72 hours at the sheath or at the lamina for 72 h.

The ionically wall-bound peroxidase activity, mesasured with o-PDA, increased in the control and infested plants. The highest increase of peroxidase activity (104%) by aphid infestation was observed in plants of 13 days old infested for 72 h. Meanwhile, the covalently-bound wall peroxidase activity increased in the infested plants but less than in ionic peroxidases; the highest increase of peroxidase activity (76%) was observed in plants of 7 days old infested for 72 h and decreasing with the age of the plant.

The isoelectrofocusing carried out with extracts containing ionically wall-bound peroxidases evidenced 7 peroxidases isoforms (mostly basic forms). A new isoform of pI 6.76 was induced in infested plants of 7 days old. This induced isoform was still present in infested plants of 10 days old. The ionically-bound wall peroxidase activity increased after infestation due to an increase of constitutive peroxidases of the cell wall, with the isoform of pI 8.54 showing the highest increase of activity. In plants of 10 days old, a new isoform of pI 7.75 was expressed in both infested and control plants of 13 and 16 days old. The IEF pattern of covalently-bound peroxidases from 7 days old plants, showed more isoforms distributed in a wide pH range than the ionically-bound peroxidases. The increase of activity of covalently-bound peroxidases after infestation was mainly due to an increase of the activity of isoforms pI 7.60 and 5.95.

The ionically-bound peroxidase activity in the sheath of the first leaf of 13 days old plants when infested at the sheath, increased from 14.7 to 27.8 U/g dry wt, but in plants infested at the lamina the activity in the sheath raised to 38.9 U/g dry wt with no changes at the lamina. The covalently wall-bound activity from infested sheath, showed a light increasing over the control, which was kept constant when the lamina was infested.

No changes of this activity was evidenced in the lamina.

The results demonstrate that the aphid infestation increase the activity of both ionically and covalently-bound cell walls peroxidases. The alterations in both activities depend on the age of the plant and the ionically-bound activity shows a higher level of induction than the covalently-bound peroxidases. The IEF showed a new isoform in the ionic peroxidase under infestation, and a new isoform induced by the aging of the plant.

the wall-bound peroxidase activity was due to an increase in the constitutive isoforms of the cell wall.

To explore a possible systemic response in infested barley, peroxidase activity of ionically and covalently-bound wall were measured in locally infested zones and distant zones from the infestation. In the infested lamina the ionically-bound peroxidases increased locally and in the leaf sheath; but when sheath was infested, this peroxidase activity increased only locally. The covalently-bound activity increased in the infested sheath only. This results indicate that the damage by aphids can be recognized in distant tissues from the infestation, functioning like a protection mechanism of non infested tissues.

To determinate if the ethylene is involved in the increase of the activity of cell wall peroxidases in infested plants with *S. graminum*, ethylene released was measured in infested and non infested plants for 9 h. Ethylene increased 52 % in infested plants after 9 h of treatment. Ethylene pulses of 40 ppm for 6 h in healthy plants induced high ionically-bound activity but not the covalently-bound peroxidases. The ionically-bound activity increased twice respect to non treated control plants. These results suggest that ethylene could participate as signal in the activation of resistant mechanisms in the cell wall of infested barley plants.

1. INTRODUCCION

El cultivo de la cebada (*Hordeum vulgare* L.) se encuentra muy difundido a nivel mundial, ocupando aproximadamente el 12 % de la superficie sembrada (Corcuera, 1993), especialmente en zonas donde las condiciones climáticas resultan desfavorables para otros cultivos, por ser una especie de gran rusticidad y amplia adaptación. La cebada constituye fuente importante como alimento forrajero, sin embargo en muchos países, una proporción importante de su producción es utilizada en la alimentación humana directa y sobre todo en la industria.

Al igual que otros cereales cultivados de importancia económica, la cebada es atacada por diversos agentes patógenos y plagas. Los áfidos, insectos fitófagos de distribución cosmopolita, debido a sus hábitos alimentarios, le ocasionan daños a nivel anatómico (ruptura de células), alteraciones fisiológicas, como por ejemplo pérdida de clorofila y del potencial hídrico (Cabrera y col.1994, 1995), y se constituyen en el principal vector en la transmisión de virus (Cortázar,1980). Esto último puede conducir a graves pérdidas en su rendimiento (dependiendo de la resistencia ó tolerancia del cultivar a estos insectos), si no se lleva a cabo un control fitosanitario adecuado y oportuno.

Diversos trabajos demuestran que las plantas poseen mecanismos de defensa que son activados cuando se enfrentan a condiciones medioambientales estresantes ó al ser atacadas por patógenos ó plagas. Estos mecanismos incluyen respuestas estructurales y bioquímicas. Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, callosa, compuestos fenólicos y lignina han sido involucradas en el reforzamiento de paredes celulares (Benhamou, 1996). Las peroxidasas, enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en los diferentes tejidos vegetales, son inducidas tanto por virus, bacterias, hongos, insectos, como por

daño mecánico (Kerby y col. 1992 ; Riquelme y Cardemil, 1993 ; Kogel y col. 1994 ; Belefant y col. 1994). Una variedad de isoenzimas han sido aisladas de los tejidos vegetales. Estas isoenzimas difieren en sus puntos isoeléctricos, propiedades cinéticas, especificidad de sustrato, masa molecular, composición de aminoácidos y carbohidratos. A algunas de ellas, se les ha asignado una función específica dentro del metabolismo celular ó en la defensa de la planta (Kerby y Somerville, 1992; Polle y col. 1994 ; van Huystee y Zheng, 1995 ; Alcázar y col. 1995).

Se ha postulado que las peroxidasas de pared celular podrían estar implicadas en la reparación de paredes dañadas, por el papel que cumplen en esta estructura celular y porque son inducidas por heridas (Birecka y Miller, 1974 ; Li y Mc Clure, 1990).

1.1. Composición de la pared celular.

La composición de la pared celular varía en los distintos tipos de células, de acuerdo al tejido al cual pertenecen, estado de desarrollo y tipo de la planta, así por ejemplo en los pastos, la pared primaria se diferencia de las demás angiospermas, en los glicanos que entrelazan las microfibrillas de celulosa, en los tipos de sustancias aromáticas y proteínas estructurales que se unen covalentemente a la pared primaria y secundaria (Carpita, 1996) ; pero en general, las paredes celulares están constituidas por una red de microfibrillas de celulosa, a las que se unen hemicelulosas, compuestos pécticos, lignina, suberina, proteínas y agua , siendo éste último, uno de los componentes más importantes y variables de las distintas paredes celulares (Cassab y Varner, 1988).

1.2. Proteínas de la pared celular.

Las proteínas de la pared celular se encuentran formando parte de la estructura de la pared o como enzimas. Entre las enzimas de pared celular, se encuentran glicosidasas y peroxidadasas las que presumiblemente juegan un rol en la modificación de macromoléculas en la pared (Cassab y Varner, 1988). Otro tipo de enzimas que también han sido localizadas en la pared celular, son las hidrolasas que participan en funciones de defensa; entre las cuales se encuentran: la β -1,3-glucanasa, celulasa, arabinosidasas, β -fructofuranosidasas, alfa-galactosidasas, β -galactosidasas, alfa-manosidasas, β -manosidasas, β -glucosidasas, β -glucuronidasas, β -xilosidasas y fosfatasas ácidas. La hidrolasa β -1,3-glucanasa tiene como un sustrato a la callosa que está presente en las paredes celulares primarias, en los tubos cribosos y en aposiciones celulares formadas en respuesta a heridas (Cassab y Varner, 1988) y es inducida en respuesta a infección al mismo tiempo que la quitinasa (Mauch, 1984).

1.3. Características generales de las peroxidadasas.

Las peroxidadasas son enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en plantas, mamíferos, hongos y procariontes, donde catalizan la oxidación de componentes celulares con la participación de peróxido de hidrógeno o hidroperóxidos orgánicos (Asada, 1992). Las peroxidadasas (donor: H_2O_2 oxidorreductasa, EC 1.11.1.7), son glicoenzimas y están formadas por una apoenzima que contiene hidratos de carbono y proteínas, unida a un residuo hemo como grupo prostético. Los grupos prostéticos de la peroxidasa de rábano (HRP), citocromo c peroxidasa (CCP) y cloroperoxidasa han sido identificados como ferriprotoporfirin IX (Gaspar y col. 1982). La primera secuencia

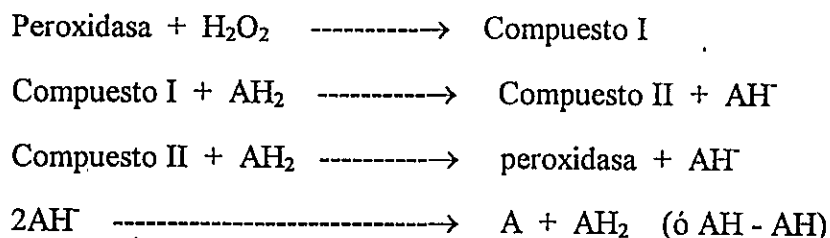
completa de aminoácidos de una peroxidasa vegetal fué la de la peroxidasa c de rábano. Ella está formada de un grupo prostético hemin, 2 Ca^{++} y 308 residuos de aminoácidos, incluyendo 4 uniones disulfito, en una cadena simple polipeptídica que sostiene 8 cadenas laterales de carbohidratos neutros (Welinder, 1979). La masa molecular de la cadena polipeptídica es de 33,890 Da. y de la HRPc nativa 44,000 Da.. También se ha establecido que el calcio contribuye al mantenimiento de la conformación estructural de la proteína, la isoenzima c de rábano libre de calcio puede ser reconstituída por adición de calcio y recobrar su actividad enzimática (Gaspar y col. 1982).

Las isoenzimas difieren en la composición de aminoácidos y carbohidratos (Mazza y Welinder, 1980). Así por ejemplo, la composición aminoacídica de una isoperoxidasa aislada de plántulas de *Triticum aestivum* L cv. Jubilar mostró un contenido relativamente alto de Asp, Thr, Ser, Glu, Ala y Leu. y el contenido de azúcares fué cerca del 40%, constituido por arabinosa (17.2%), galactosa (15.3%), glucosa (5%) y trazas de manosa (Zmrhal y Machácková, 1978). La composición aminoacídica de dos peroxidosas de pared celular obtenidas del embrión y megagametofito de semillas de *Araucaria araucana*, demostró que éstas eran muy ricas en glicina (30%) y la composición de azúcares fué establecida en: galactosa, glucosa, xilosa y manosa, de los cuales la galactosa representó más del 60% de la composición de azúcares en ambas peroxidosas (Riquelme y Cardemil, 1993). De 16 aminoácidos encontrados al realizar el análisis de las peroxidosas totales de hojas de *Hordeum vulgare* L. var. nudum, Hook, los contenidos de: Ala, Asp, Leu y Gly fueron los más altos y el contenido de azúcares fué de 15-26% (Saeki y col. 1986).

Las peroxidosas reaccionan con numerosas sustancias con las que forman complejos estables, detectables por espectrofotometría (Gaspar y col. 1982). La variedad de sustratos que pueden ser oxidados por estas enzimas han mostrado una marcada

diversificación en las tasas de peroxidación y cambios en la selectividad del sustrato. Este comportamiento ha sido observado claramente durante el desarrollo de *Pinus silvestris* desde semilla hasta arbolillo de 2-4 años (Markkola y col. 1991). Se ha indicado por ejemplo que las enzimas de tipo peroxidasa-guaiacol están generalmente ubicadas en la vacuola (Mehlhorn y col. 1996), o que las isoperoxidasas de las paredes celulares de *Lupinus albus* muestran alta afinidad hacia sustratos tipo guaiacol mientras los sustratos tipo siringol no fueron oxidados (Ros Barceló y col. 1987) y las peroxididasas asociadas a la pared celular de tallos durante la lignificación de *Linum usitatissimum* var. Belinka, tuvieron actividad contra o-dianisidina (o-D), guaiacol y tetrametilbenzidina (TMB), mientras que hacia siringaldazina (SYR) fué extremadamente baja o no detectada (McDougall, 1991).

En el mecanismo catalítico general de las peroxididasas donde se llevan a cabo reacciones de oxidación de sustancias donadoras de electrones, la peroxidasa reacciona con el peróxido de hidrógeno y forma un compuesto oxidado (compuesto I), este compuesto es reducido por un electrón aportado por un dador de electrones (AH), y da lugar a la formación de otro compuesto menos oxidado (compuesto II) más radicales AH. Una segunda reducción regenera la peroxidasa y produce otros radicales AH. Los radicales formados pueden reaccionar para formar polímeros (polimerización oxidativa de fenoles), (Gaspar y col. 1982).



1.4. Localización de las peroxidasas.

Las peroxidasas se encuentran ampliamente distribuidas en los diversos órganos vegetales: raíces (Lee y col. 1994), tallos (Goldberg y col. 1986; Jackson y Ricardo, 1994), hojas (Saeki y col. 1986; Li y col. 1989), flores (Tadeo y Primo-Millo, 1990), frutos (Valpuesta y col. 1991) y semillas (Gillikin y Graham, 1991; Gijzen y col. 1993; Rasmussen y col. 1997) y a nivel subcelular, han sido localizadas en vacuolas (Takahama y col. 1991), cloroplastos (Torsethaugen y col. 1997), mitocondrias (Schloss y col. 1987; Prasad y col. 1995) y en las paredes celulares (Kim y col. 1988; McDougall, 1992; Ros Barceló y col. 1988), de donde en muchos casos se les ha aislado y caracterizado.

Las peroxidasas en la pared celular se encuentran libres, unidas por interacciones iónicas a polímeros de la pared celular, o más estrechamente unidas a la pared (Penel y Greppin, 1994), siendo estas últimas liberadas de la pared celular solamente mediante digestión enzimática y son consideradas como unidas covalentemente a la pared (Birecka y Miller, 1974). Se ha propuesto que las isoperoxidasas ácidas extracelulares encontradas en hipocótilos de *Lupinus albus* L. pueden ser clasificadas sobre la base de su interacción con la pared celular, como unida a la pared celular o libremente soluble en los espacios intercelulares. Esta localización como consecuencia de un equilibrio entre estos dos tipos de peroxidasas, equilibrio que puede ser regulado por concentraciones de H^+ y Ca^{2+} en la pared celular (Ros Barceló y col. 1988). También se ha indicado que algunas isoperoxidasas pueden unirse a pectinas. Se encontró que esta unión es dependiente de Ca^{2+} o del grado de esterificación de las pectinas, en peroxidasas obtenidas de hipocótilos de *Cucurbita pepo* cv. Black Beauty (Penel y Greppin, 1994). En suspensiones celulares de *Arachis hypogaea*, se observó que la secreción de una peroxidasa catiónica es dependiente de Ca^{2+} (Xu y van Huystee, 1993), lo cual sugiere

que su disponibilidad podría regular la actividad de las peroxidasas.

1.5. Importancia de las peroxidasas.

Las peroxidasas participan en la síntesis de compuestos de la pared celular y en procesos de destoxicación de peróxido de hidrógeno o hidroperóxidos orgánicos (Asada, 1992). La ascorbato peroxidasa está involucrada en la destoxificación y usa ascorbato como dador de electrones, el cual es considerado altamente específico; no obstante ascorbato también puede ser utilizado por otros tipos de peroxidasas como las de tipo guaiacol. Este hecho sugiere un grado de flexibilidad en las defensas antioxidantes y puede facilitar un importante papel regulatorio en el metabolismo entre la biosíntesis de lignina en la pared celular y la eliminación de exceso de peróxido de hidrógeno en el apoplasto (Mehlhorn y col. 1996).

Las peroxidasas de la pared celular están involucradas en la síntesis de lignina (McDougall, 1991), suberina (Espelie y col. 1986), síntesis y polimerización de polifenoles (Lagrimini, 1991), así como en la insolubilización de proteínas en la pared celular (Fry, 1987; Iiyama y col. 1994). La lignina es un polímero complejo altamente ramificado, compuesto de subunidades aromáticas derivado de la polimerización oxidativa de los alcoholes cinámicos (monolignoles): p-cumarol, coniferol y sinapol alcohol; la cual es depositada en las paredes celulares de determinados tejidos vegetales dándoles rigidez, firmeza e hidrofobicidad (Whetten y Sederoff, 1995). Esta es una de las varias respuestas en la defensa de patógenos (Lange y col. 1995). Las ligninas generalmente son clasificadas como: ligninas guaiacol, guaiacol-siringol o guaiacol-siringol-p-hidroxifenol, de acuerdo a si ellas son de gimnospermas, angiospermas o pastos, respectivamente. En las monocotiledóneas, la lignina ha sido ampliamente estudiada en las Poaceae (cereales y

pastos), donde se ha encontrado que además de contener los 3 monolignoles, también contienen ácidos hidroxicinámicos (ácidos ferúlico y p-cumárico, son los más abundantes), los cuales están unidos a la lignina mediante enlaces éster y éter y a polisacáridos por uniones éster (Lewis y Yamamoto, 1990). También se ha establecido que los monolignoles son compuestos inestables y relativamente tóxicos, pero al ser glicosilados se estabilizan y se hacen no tóxicos, pudiendo así ser acumulados en algunas especies ó estar libres, siendo estos últimos polimerizados hacia lignina por oxidasas de la pared celular usando un mecanismo de radical libre. Dos clases diferentes de enzimas, las peroxidasas y lacasas realizarían la polimerización de monolignoles (Imberty y col. 1985; Bao y col. 1993).

Peroxidasas específicas de la pared celular son requeridas para generar peróxido de hidrógeno y radicales monolignoles en la formación de lignina. La generación de peróxido de hidrógeno es necesario para la oxidación y polimerización de alcoholes cinámicos (Elstner, 1976 ; Gross, 1977). Empleando suspensiones de paredes celulares aisladas de raíces de *Armoracia lapathifolia* Gilib., se demostró la participación de peroxidasas unidas a pared celular en la formación de H_2O_2 a expensas de NADPH o de NADH que actúan como donadores de electrones; esta reacción fué estimulada por iones Mn^{2+} y ácido p-cumárico (Elstner, 1976). Así también, en cultivos de tejidos de *Nicotiana tabacum*, se ha demostrado que las peroxidasas de pared celular catalizaron la formación de H_2O_2 (Mäder, 1980). El NADH en la pared celular sería aportado por una malato deshidrogenasa presente en este compartimento. Esta observación fué demostrada, cuando secciones de tallos de *Nicotiana tabacum* var. Samsun, fueron colocados en un medio de reacción conteniendo NAD, malato y cofactores (ácido p-cumarico y $MnCl_2$); se observó que el guaiacol reaccionó tiñendo las paredes celulares de tejido xilemático en proceso de diferenciación (Goldberg y col. 1985).

La suberina, es un compuesto formado por un dominio alifático (constituído mayormente por ácidos grasos hidroxilados y ácidos dicarboxílicos) y un dominio aromático, que en analogía a la lignificación, son polimerizados por peroxidasas unidas a la pared celular (Kolattukudy, 1984). Su presencia, hace que la pared celular actúe como una barrera efectiva de protección contra el ingreso de patógenos y la suberización de las paredes, ocurre como una respuesta a las heridas, permitiendo así la curación. (Espelie y col. 1986; Robb y col. 1991).

1.6. Peroxidasas en el crecimiento.

Las peroxidasas restringen el crecimiento de las plantas por rigidización de la pared celular, al catalizar la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos. Estos se encuentran unidos por enlaces éster a los polisacáridos no celulósicos de la pared (Cassab y Varner, 1988; Fry, 1986; Iiyama y col. 1994).

El control del crecimiento por peroxidasas de la pared celular ha sido estudiado en varias especies. Por ejemplo, en hipocótilos de *Vigna radiata*, se observó disminución de la tasa de crecimiento acompañada por el aumento de la actividad peroxidasa desde el ápice a la base (Goldberg y col. 1986), ó en regiones cada vez más alejadas de la zona de crecimiento en hojas de *Festuca arundinacea* Schreb (MacAdam y col. 1992). Así también con el propósito de establecer la interrelación entre el crecimiento y las peroxidasas, Zheng y Huystee (1992) incubaron segmentos de hipocótilos de *Arachis hypogaea* L. en un medio que contenía el inhibidor de crecimiento meta-fluoro-tirosina (MFT). Se encontró alteraciones en la actividad peroxidasa correlacionadas con la inhibición del crecimiento; es decir la lenta elongación causada por la adición de MFT fué acompañada por un aumento de la actividad peroxidasa de pared celular, demostrando así

la existencia de un correlación inversa entre las peroxidasas y la elongación de hipocótilos de esta planta.

Si las peroxidasas controlan el crecimiento, los factores que modifican el crecimiento también pueden modificar la actividad peroxidasa. Bajo esta consideración, en epicótilos de *Cicer arietinum* L. cv. Castellana, se estudió el efecto de clorpromazina y trifluoperazina, que son inhibidores de la calmodulina. Se encontró disminución de la tasa de elongación de los epicótilos, aumento de la actividad peroxidasa de pared celular y del nivel de compuestos fenólicos. Además se encontró que la actividad peroxidasa disminuyó proporcionalmente cuando extractos enzimáticos fueron incubados en concentraciones crecientes de calmodulina, sugiriendo que este compuesto puede regular la actividad peroxidasa de la pared celular (Sánchez y col. 1989).

1.7. Peroxidasas en la defensa de las plantas.

La biosíntesis de nueva pared celular como una respuesta defensiva al ataque de patógenos (Gaspar y col. 1982), la acumulación de compuestos aromáticos y alifáticos en paredes dañadas por heridas para la formación de una barrera de protección al ingreso de patógenos o pérdida de agua (Espelie, 1986) y la inducción de peroxidasas por heridas (Birecka y Miller, 1974) son observaciones que han permitido señalar a las peroxidasas como un componente de la pared celular que participa en los mecanismos de defensa de las plantas (Cassab y Varner, 1988).

Diversos trabajos demuestran que las peroxidasas estarían participando en los procesos de defensa de las plantas; por ejemplo, se ha encontrado que en tabaco hay 12 isoenzimas, las que han sido clasificadas en 3 subgrupos: aniónicas (pI 3,4-4,0), moderadamente aniónicas (pI 4,5-6,5) y catiónicas (pI 8,1-11); las dos primeras clases de

peroxidasas han sido asociadas con la pared celular y se ha encontrado que las moderadamente aniónicas son preferentemente acumuladas en tallos de tabaco heridos (Lagrimini y Rothstein, 1987), mientras que las catiónicas han sido localizadas en vacuolas (Lamport, 1986). Los estudios inmunocitoquímicos realizados en tubérculos de papa heridos mostraron reacción con un anticuerpo específico para una peroxidasa aniónica asociada con la suberización (Espelie y col. 1986). En el fluido intercelular de una variedad de *Capsicum annuum* resistente a *Phytophthora capsici*, se observó la aparición de una isoperoxidasa ácida (pI 4,4), la que podría ser responsable de la resistencia a este hongo (Alcázar y col. 1995).

En *Hordeum vulgare* L., las peroxidasas han sido estudiadas durante daño mecánico, cuando ocurre infección con hongos e infestación por áfidos, encontrándose variaciones en su actividad en relación al tiempo de infección ó magnitud del daño producido (Russo y Bushnell, 1989; Belefant y col. 1994; Kerby y col. 1992, Indarte, 1995). Se ha encontrado que el aumento de la actividad de peroxidasas extracelulares de hojas de cebada inoculadas con *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, fué consecuencia de dos isoenzimas con pI de 8,5 y 5,2 (Kerby y Somerville, 1989). Al infestar dos cultivares de cebada, uno resistente y otro susceptible con *Diuraphis noxia*, se encontró un mayor número de células colapsadas autofluorescentes en las hojas del cultivar resistente. Esta evidencia fué atribuída al mayor número de pruebas (inserción del estilete) en busca de alimento por el áfido y a la naturaleza fenólica del material fluorescente (Belefant-Miller y col. 1994). En tres variedades de cebada infestadas con *Schizaphis graminum* se encontró aumento de la actividad de peroxidasas de pared celular. Este aumento fué mayor en las variedades que presentaron alta y mediana recuperación del contenido hídrico y clorofila, al retirarse los áfidos de plantas previamente infestadas por 48 horas. Además en estas

variedades se encontró mayor contenido de fenoles de pared celular que en la variedad con baja recuperación (Indarte, 1995).

1.8. Peroxidasas en la resistencia adquirida.

Cuando en los tejidos de las plantas se producen heridas ya sea por daño mecánico, plagas ó ataque de patógenos; una serie de productos de defensa son inducidos, lo cual indica que un set de genes son activados, la mayoría de ellos jugando un rol en la sanación de heridas (Peña-Cortés y Willmitzer, 1995). En el curso de la patogenicidad, ocurren respuestas que se van sucediendo en el espacio y en el tiempo. Uno de los eventos que más rápido ocurre es el aumento oxidativo a nivel de la membrana plasmática (Apostol y col. 1989). La planta al reconocer el patógeno, se activa en ella una señal que conduce a la producción de especies activas de oxígeno (iones superóxido), como una respuesta rápida que precede a la muerte de la célula asociada con la respuesta hipersensitiva (Doke y Ohashi, 1988); también puede producirse peróxido de hidrógeno, el cual puede servir como una señal en la inducción de genes relacionados con la defensa (Levine y col. 1994). Más tarde ocurren otras reacciones de defensa entre las que se incluyen: síntesis de lignina, compuestos antimicrobiales (fitoalexinas), flavonoides, fenólicos y proteínas relacionadas a patogenicidad (proteínas PR) (Lamb y col. 1989; Benhamou, 1996). La lignificación ha sido propuesta como un importante mecanismo de resistencia. La resistencia de la zona hipersensitiva de hojas de *Triticum aestivum* L., a la infección de *Puccinia graminis* Pers. f. sp. tritici Erics. y E. Henn., fué atribuída a la lignificación celular. (Moerschbacher y col. 1990).

Las plantas, al ser atacadas por patógenos, pueden responder y adquirir cierta resistencia a subsecuentes infecciones tanto en las zonas afectadas como en las no

afectadas, es decir son capaces de desarrollar resistencia sistémica adquirida (Enyedi y col. 1992). La respuesta hipersensitiva y la de tejidos distantes del lugar de la infección indican que los patógenos son reconocidos y que la planta responde a esta patogenicidad. Una respuesta es la inducción de las proteínas de resistencia, entre las que se encuentran algunas con actividad enzimática antipatógeno (Raz y Fluhr, 1993) ó que intervienen en la reparación celular (Kogel y col. 1994).

La resistencia sistémica adquirida puede ser inducida en las plantas por tratamiento con ciertos compuestos químicos, que muestran una similar estructura química tales como el benztiazol (BTH), ácido salicílico (SA) y el ácido 2,6-dicloroisonicotínico (DCINA), los cuales inducen resistencia a patógenos y expresión de genes como en la infección con patógenos (Gorlach y col. 1996). La aplicación de DCINA a plántulas de *Hordeum vulgare* indujo resistencia contra el hongo *Erysiphe gaminis* f. sp. hordei, observándose en el comienzo de la resistencia adquirida acumulación de transcritos de genes relacionados con la defensa, dentro de los cuales se encontraron peroxidasas (Kogel y col. 1994).

Se ha propuesto que la resistencia local puede parcialmente ser mediada por elicitores endógenos relativamente inmóviles, tal como oligosacáridos pécticos liberados de la pared celular de la planta (Bishop y col. 1981; Lamb y Dixon, 1990). Pero también se indica que señales moleculares transmisibles a bajas concentraciones pueden activar mecanismos de resistencia en células no directamente invadidas por el patógeno o dañadas por plagas (Enyedi y col. 1992). El ácido salicílico, sistemina, metil jasmonato, ácido jasmónico y etileno, son señales moleculares donde se han orientado muchos trabajos a fin de establecer su involucramiento en las respuestas de resistencia de las plantas.

Se ha investigado la participación del etileno en la vía de transducción de la señal en la inducción de genes de las proteínas PR en hojas de *Nicotiana tabacum* y se encontró que la sensibilidad a etileno es transducida vía la fosforilación de proteínas de una manera rápida, regulada por kinasas y fosfatasa específicas. Los procesos de fosforilación son esenciales en la respuesta a patógenos mediada por etileno en esta planta (Raz y Fluhr, 1993). Anteriormente se ha indicado que, cuando una planta se enfrenta a un patógeno, éste es reconocido por la planta y una serie de respuestas pueden ser activadas. Entre estas respuestas también se incluyen la síntesis y liberación de etileno, el cual puede predisponer a la planta a una adicional infección y así contribuir a la susceptibilidad de la enfermedad (Ecker, 1995). Las plantas responden aumentando la producción de etileno, también ante otros tipos de estrés, como son las heridas, infestación por insectos, alta y baja temperatura, inundación, déficit hídrico, radiación y compuestos químicos (Narayana y col. 1991; Summers y col. 1996; Lutts y col. 1996). Se ha observado que el tratamiento de plantas de *Helianthus annuus* L. con etileno produce proteínas PR (Jung, y col. 1995), ó en plántulas de *Pisum sativum*, aumenta los niveles de la actividad peroxidasa en las paredes celulares de la región inmadura incluyendo el gancho apical (Ridge y Osborne, 1970).

La figura 1 muestra un modelo propuesto por Gaspar y col. (1985) en donde se postula la participación del etileno y peroxidasas básicas y ácidas en la rigidificación de la pared celular como respuesta a estímulos físicos y químicos. En este modelo se explica los siguientes eventos: la depolarización de la membrana celular inducida por estrés genera radicales libres como HO_2^- , los cuales inician la peroxidación de lípidos. La degradación de lipoproteínas de las membranas por la peroxidación conduciría a cambios en el estado y flujo iónico a nivel de la membrana. El nivel elevado de Ca^{2+} endógeno regula la secreción de peroxidasas básicas al espacio libre y su unión a membranas.

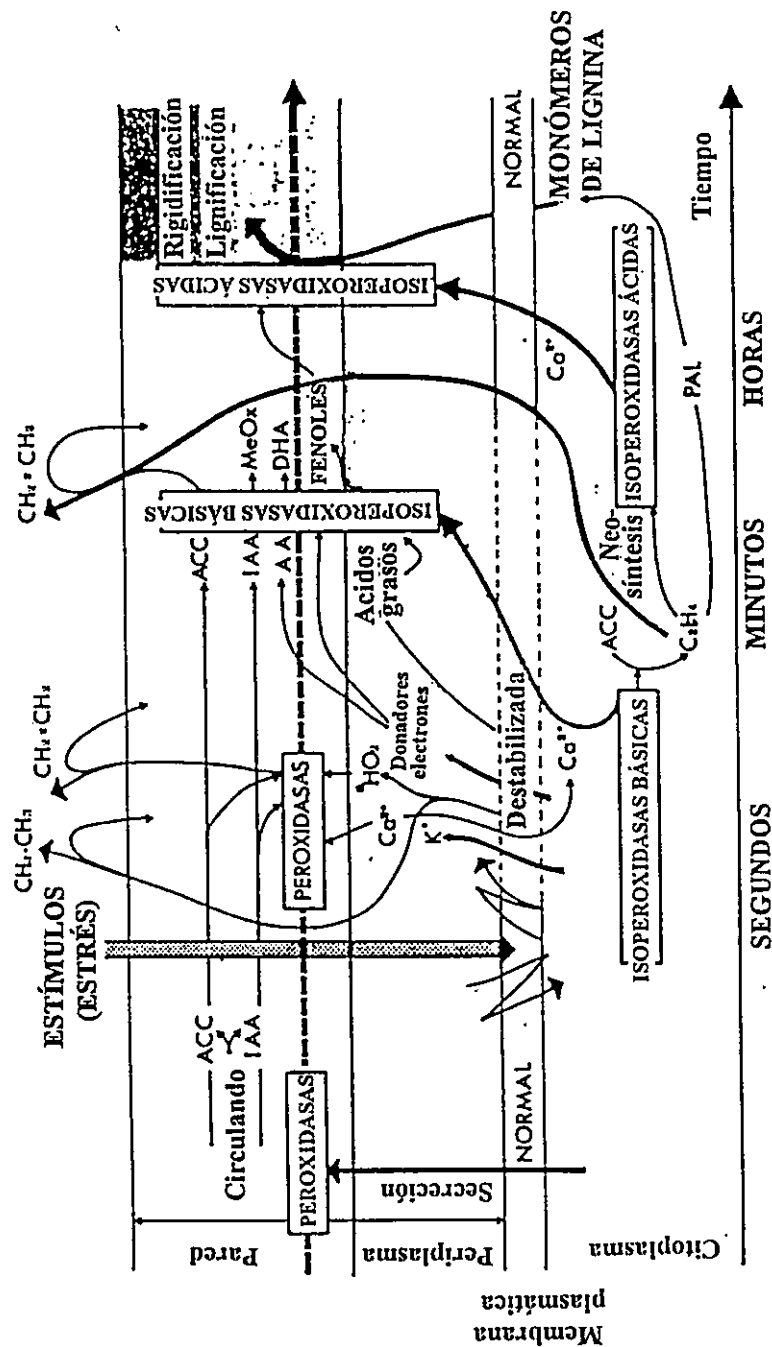


Figura 1. Participación del etileno y de las peroxidasas básicas y ácidas en la rigidez de la pared celular en respuesta a estímulos físicos y químicos, según Gaspar y col. 1985.

En el espacio libre las peroxididasas básicas se asocian con donadores de electrones y ácido indol acético para eliminar los peróxidos, mientras que las unidas a membranas les permite actuar como ACC oxidasa (enzima que cataliza la conversión de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico a etileno) y regular la producción de etileno. El principal rol del etileno es regular la fenilalanina amonio-liasa (PAL, EC 4.3.1.5) y las peroxididasas ácidas de ese modo controlando la lignificación de la pared celular.

El aumento en la producción de etileno en plantas inoculadas con patógenos, ha permitido señalar que esta hormona podría ser involucrada como una de las señales en los mecanismos de resistencia adquirida de las plantas (Enyedi y col. 1992). Se ha sugerido que el etileno puede participar en el reforzamiento de la pared limitando así el ingreso de patógenos. La lignificación en la vecindad inmediata de la infección o herida daría cuenta de este reforzamiento. Sin embargo, no está claro si la inducción sistémica de las defensas bioquímicas es causada por el etileno producido en los lugares infectados. Algunas evidencias sugieren que el etileno es una señal molecular en la resistencia sistémica adquirida, por ejemplo fácilmente difunde de los lugares de infección. Sin embargo se piensa que esta hormona está implicada en la resistencia sistémica local alrededor del lugar de la herida (Enyedi y col. 1992). Estos autores han propuesto el modelo presentado en la figura 2, donde se muestra el involucramiento del etileno en la defensa local y en la inducción de proteínas PR en la resistencia sistémica. En mecanismos de resistencia inducida han sido detectadas peroxididasas junto a proteínas PR (Kogel y col. 1994).

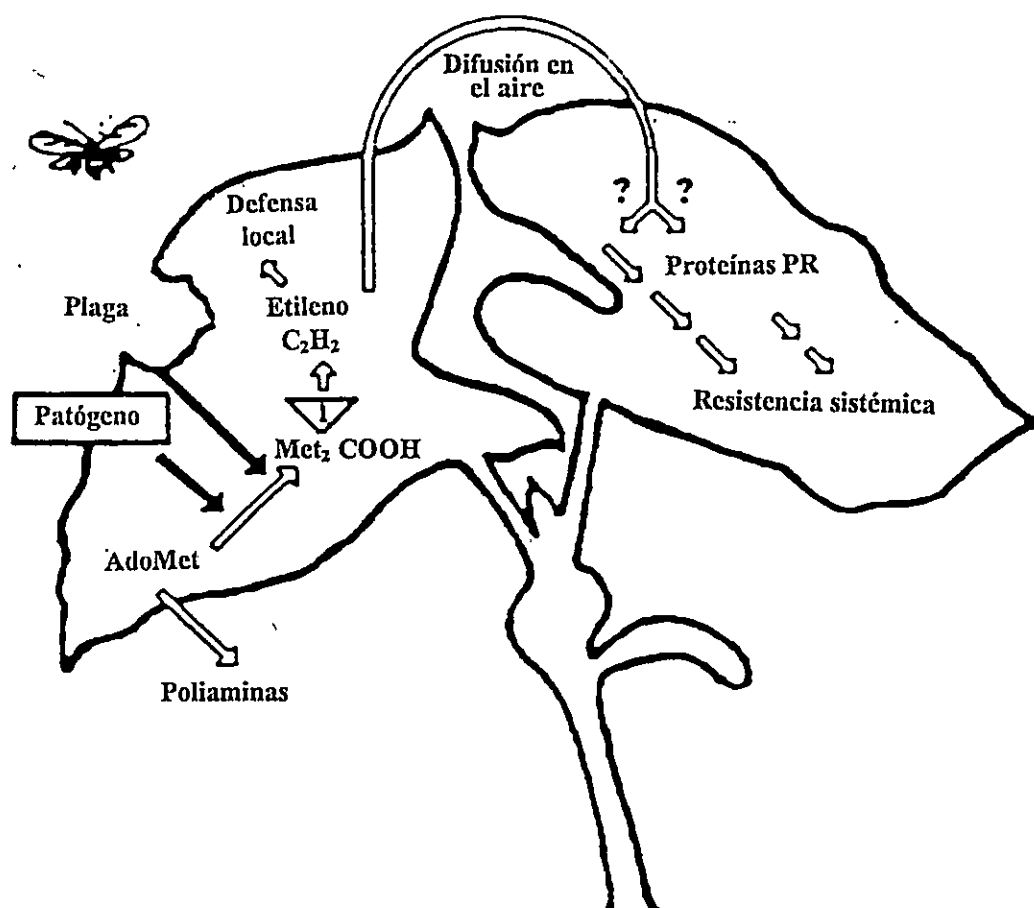


Figura 2. Participación del etileno en la resistencia sistémica adquirida. El daño en las plantas ocasionado por plagas o patógenos conduce a la producción de etileno. El etileno producido puede activar mecanismos de resistencia en la vecindad inmediata del lugar dañado. Puede difundir en el aire y también activar mecanismos de resistencia en tejidos distantes de la infestación o infección. Modelo propuesto por Enyedi y col. 1992.

Los antecedentes revisados anteriormente, revelan la importancia de las peroxidasas en procesos de síntesis y establecimiento de enlaces entre compuestos no celulósicos de la pared, lo cual le permite a esta estructura celular actuar como una barrera eficaz de protección contra el ataque de patógenos ó reparar los daños producidos por los diversos agentes a los que se enfrentan las plantas. Sin embargo no se conoce como varia la actividad de las peroxidasas iónicas y covalentes de pared por infestación con áfidos en relación con la edad de la planta ; si el aumento de la actividad de estas peroxidasas es local (en el lugar de la infestación) o sistémica (en lugares alejados de la infestación), tal como ocurre en otras especies vegetales al enfrentarse a virus, bacterias u hongos. Por ello en este trabajo se propuso estudiar las peroxidasas iónicas y covalentes para responder las interrogantes antes planteadas. Como el etileno es uno de los principales compuestos que libera la planta cuando es herida y por ser también considerado como una de las señales involucradas en mecanismos de resistencia, se propuso estudiar esta hormona como un posible intermediario en el aumento de la actividad de peroxidasas iónicas y covalentes de pared celular en cebada cuando es infestada con áfidos.

Hipótesis.

La infestación con áfidos, produce un aumento de la actividad y aparición de nuevas isoformas de peroxidasas unidas iónica y covalentemente a la pared celular. Estos cambios pueden variar con la edad de la planta y el tiempo de infestación. La actividad de las peroxidasas iónicas y covalentes inducida por los áfidos puede ser sistémica.

Objetivo general.

Estudiar el efecto de la infestación con áfidos en la expresión de peroxidasas unidas iónica y covalentemente a la pared celular en plantas de cebada.

Objetivos específicos.

1. Determinar el efecto de la infestación con áfidos en la actividad de peroxidasas unidas iónica y covalentemente a la pared celular, en plantas de diferente edad.
2. Analizar, si el aumento en la expresión de las peroxidasas iónicas y covalentes de pared celular se debe a la aparición de nuevas isoformas además de las ya presentes, en hojas de cebada infestadas con áfidos.
3. Estudiar si hay inducción sistémica de la actividad de peroxidasas unidas iónica y covalentemente a la pared celular en plantas de cebada infestadas con áfidos.
4. Determinar si el etileno es un posible agente mediador de la inducción sistémica de la actividad peroxidasa iónica y covalente de pared celular por infestación con áfidos.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo.

Para la realización de este trabajo, se utilizaron plantas de *Hordeum vulgare* L. cv. Frontera, las cuales fueron obtenidas de semillas provenientes de la Estación Experimental del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) en Carillanca, Temuco y mantenidas en almacenamiento a 6° C, en el Laboratorio de Fisiología Vegetal.

Las semillas fueron sembradas en recipientes conteniendo vermiculita humedecida con agua corriente y mantenidas en estas condiciones hasta que empezaron a emerger los coleoptilos; después, fueron regadas con la solución nutritiva Phostrogén. Las plántulas crecieron en cámaras de cultivo a 25° C, con un fotoperíodo de 14 horas luz y 10 horas de oscuridad por los tiempos requeridos en los diferentes experimentos.

2.2. Infestación de las plantas con áfidos.

Cuando las plantas alcanzaron 7, 10, 13 y 16 días de edad, fueron infestadas con 20 ninfas (III y IV estadio) de *Schizaphis graminum* Rondani por planta durante 48 y 72 horas. Las ninfas fueron obtenidas de una colonia mantenida en plantas de *H. vulgare* L. cv. Aramir en las mismas condiciones de cultivo que las plantas experimentales. Para cada

edad y período de infestación se consideró 3 repeticiones, así como para sus respectivos controles.

En otros grupos de plantas con 13 días de edad, se realizó la siguiente metodología de infestación: en un grupo de plantas fueron infestadas solamente la lámina y en otro grupo, solamente la vaina de la primera hoja, con el mismo número de áfidos considerados anteriormente y mantenidas bajo infestación por 72 horas. Los áfidos fueron confinados a estas dos estructuras morfológicas de la hoja mediante láminas de polietileno. También se consideró en estos tratamientos y sus respectivos controles 3 repeticiones.

2.3. Obtención de paredes celulares.

Se obtuvieron paredes celulares de plantas de *H. vulgare* L. cv Frontera sin infestar e infestadas, siguiendo básicamente el método descrito por Ros Barceló y col. (1987). El tejido foliar fue congelado y molido en un molinillo con hielo seco, luego macerado en un mortero con una solución amortiguadora de Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2, sacarosa 0,25 M, acetato de magnesio 1 mM, benzamidina 2 mM y 0,05 gr de cuarzo por gramo de peso fresco. El material resultante se filtró a través de cuatro capas de gasa y centrifugó a 1000 g por cinco minutos en una centrifuga Sorvall RC-5B, con un rotor SS-34. El pellet obtenido se lavó tres veces por resuspensión en una solución amortiguadora de Tris-HCl 0,05 M más Triton X-100 al 1 % (v/v), pH 7,2 y luego tres veces con una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0,1 M, pH 6; centrifugando a 2000 g por

cinco minutos en cada lavado. Todos los pasos seguidos en este proceso fueron realizados a 4° C.

2.4. Extracción de proteínas unidas iónica y covalentemente a la pared celular.

Para extraer las proteínas unidas iónicamente a la pared celular, el pellet obtenido anteriormente, fué resuspendido en una solución de cloruro de potasio 1 M, e incubado a 4° C por 2 horas en agitación y luego centrifugado a 15000 g por 30 minutos. En el sobrenadante se extrajeron las proteínas iónicas y en el pellet quedaron las proteínas covalentes, las que fueron extraídas a continuación. El pellet fué lavado tres veces con una solución de cloruro de potasio 1 M, luego resuspendido en una solución amortiguadora de acetato de sodio 50 mM, pH 5,0 conteniendo pectinasa al 2,5 % (v/v), celulasa al 0,65 % (p/v), benzamidina 2 mM y peptatín A 1 µM; manteniéndolo en agitación por 12 horas a 25° C, para finalmente ser centrifugado a 15000 g por 30 minutos. En el sobrenadante se extrajeron las proteínas unidas covalentemente a la pared celular.

2.5. Medición de la actividad peroxidasa.

La actividad de las peroxidases en los extractos iónico y covalente obtenidos por fuerza iónica y digestión enzimática respectivamente fué determinada en una mezcla de reacción formada por una solución amortiguadora de citrato de sodio 0,1 M, pH 4,5, o-

fenilendiamina 5 mM, peróxido de hidrógeno al 0,002 % (v/v) y el extracto enzimático, en un volumen final de 1 ml. a 25° C y después de medir la absorbancia a 450 nm. No se observó reacción enzimática en ausencia de peróxido de hidrógeno.

La actividad de las peroxidasas fué expresada en unidades enzimáticas por gramo de peso seco. Una unidad de actividad peroxidasa fué definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μ mol de o-PDA por minuto, en presencia de peróxido de hidrógeno 0,002 %. En los cálculos de la actividad peroxidasa con este sustrato, se empleó el coeficiente de extinción de $1,01 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

También se midió la actividad peroxidasa en extractos de plantas sin infestar e infestadas, con guaiacol 5 mM ($\epsilon_{470} 26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), ácido ferúlico 50 μ M ($\epsilon_{310} 16,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ó ácido p-cumárico 25 μ M ($\epsilon_{286} 19,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Las concentraciones de los sustratos utilizadas para ensayar las actividades de las peroxidasas fué determinada a partir de las curvas de velocidad en función de la concentración del sustrato respectivas. o-PDA y guaiacol mostraron cinéticas de saturación, en tanto ácido ferúlico y ácido p-cumárico presentaron inhibición por exceso de sustrato. Las concentraciones de ácido ferúlico y ácido p-cumárico utilizadas fueron las más altas que no presentaron inhibición.

2.6. Isoelectroenfoque.

2.6.1. Caracterización mediante isoelectroenfoque de las peroxidasas unidas a la pared celular.

Para el análisis del isoelectroenfoco, se utilizó extractos de proteínas unidas a la pared celular obtenidos de 150 gramos de tejido foliar, siguiendo la metodología descrita anteriormente. Estos extractos fueron desalados y concentrados en microconcentradores Centricon-10 de Amicon (los cuales tienen un límite de exclusión de peso molecular de 10 KD), por centrifugación a 5000 g a 4° C, antes de cargar los geles.

El isoelectroenfoco se realizó en geles de poliacrilamida con un gradiente de pH 3-10 (anfolitos Bio-Rad), en una cámara mini IEF, modelo III Bio-Rad, para lo cual se siguió las especificaciones recomendadas por los fabricantes. Cada carril del gel fue cargado con un volumen de extracto desalado y concentrado de actividad peroxidasa conocida: 2,0 y 1,5 U/gPS para peroxidasa iónica y covalentes respectivamente. Después del corrido electroforético, los geles fueron revelados por actividad, colocándolos en una solución de citrato de sodio 0,1 M, pH 4,5, 4-metoxinaftol 5 mM y peróxido de hidrógeno 0,004 % (v/v) por 1 a 2 minutos; luego fueron lavados con agua destilada, fotografiados y secados.

2.6.2. Determinación del pI de las isoformas reveladas en geles del IEF.

Los pI fueron determinados por interpolación de la curva de movilidad relativa (migración de las proteínas en el IEF) en función del logaritmo de los puntos isoelectrónicos estándares. Se utilizó los estándares de IEF de Bio-Rad, que son una mezcla de nueve proteínas nativas cuyos puntos isoelectrónicos varían de 4,45 a 9,60 (citocromo C, pI 9,60; hemoglobina humana C, pI 7,50; hemoglobina humana A, pI 7,10; mioglobina de equino,

pI 7.00; ficocianina (3 bandas), pI 4,75, 4,65 y 4,45 son resueltas sin necesidad de teñir el gel).

2.6.3. Análisis densitométrico de las bandas reveladas en geles del IEF.

Se obtuvieron densitogramas de geles del IEF realizados con extractos conteniendo peroxidasas unidas ionicamente a la pared celular de plantas de 7, 10, 13 y 16 días de edad sin infestar e infestadas con áfidos, así como de extractos con peroxidasas unidas covalentemente de plantas de 7 días de edad; para lo cual las bandas reveladas por actividad de cada carril del gel fueron escaneadas en un Densitómetro Laser modelo UltroScan XL a 660 nm de longitud de onda.

2.7. Ensayos con etileno.

2.7. 1. Medición de etileno en plantas de cebada.

Plantas de 7 días de edad sin infestar e infestadas con áfidos, se colocaron en frascos de vidrio de 1000 ml los que fueron cerrados herméticamente y mantenidos por 9 horas bajo condiciones de temperatura e iluminación tal como se ha indicado anteriormente. Luego se midió la acumulación de etileno de cada frasco, para lo cual se tomaron muestras de aire con una jeringa de 1 ml, cada 25 minutos durante las 3 primeras horas y después cada hora, e inyectaron en un cromatógrafo de gases Shimatzu GC 8A

equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna de alumina específica para etileno. La temperatura del detector fué de 200° C y de la columna 110° C. Se usó un estándar de etileno de una concentración de 77,2 ppb. La mezcla de arrastre estuvo compuesta por N₂, O₂, H₂ (1,1: 0,5 : 1).

2.7.2. Aplicación de etileno y medición de la actividad de las peroxidasas unidas a la pared celular.

Dos grupos de plantas de 7 días de edad fueron colocadas en frascos de vidrio tal como lo descrito anteriormente; a un grupo se le inyectó etileno en una concentración de 40 ppm, con una jeringa a través de una goma ubicada en la tapa del frasco, el otro grupo se utilizó como control. Después de 6 horas, las plantas de ambos grupos fueron sacadas de los frascos y colocadas en la cámara de crecimiento bajo las condiciones medioambientales antes indicadas. Luego se tomaron muestras de hojas a las 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de etileno; posteriormente se extrajo y analizó la actividad de las peroxidasas unidas iónica y covalentemente a la pared celular, siguiendo la metodología descrita anteriormente.

3. RESULTADOS

3.1. Actividad de las peroxidasas iónicas en plantas sin infestar e infestadas con áfidos.

La actividad de las peroxidasas unidas iónicamente a la pared celular se midió utilizando o-PDA como sustancia donadora de electrones, en los extractos de plantas de diferente edad sin infestar e infestadas.

La actividad de estas peroxidasas en plantas de cebada sin infestar (Fig. 3: A y B, barras vacías), fué aumentando con la edad de la planta, desde un valor de 5,2 U/gPS presentado por las plantas con 7 días de edad hasta 11,4 U/gPS en plantas con 16 días de edad.

La infestación con áfidos, produjo aumento de la actividad de peroxidasas iónicas de pared celular en relación a las plantas control en todas las edades y períodos de infestación consideradas en este estudio (Fig. 3: A y B, barras achuradas), se observó que la actividad fué aumentando con la edad de la planta, hasta los 13 días, donde se observó los valores más altos de inducción de la actividad 18,0 y 21,8 U/gPS para plantas infestadas por 48 y 72 horas respectivamente. En las plantas de 16 días de edad se observó un descenso, siendo más pronunciado en plantas infestadas por 72 horas.

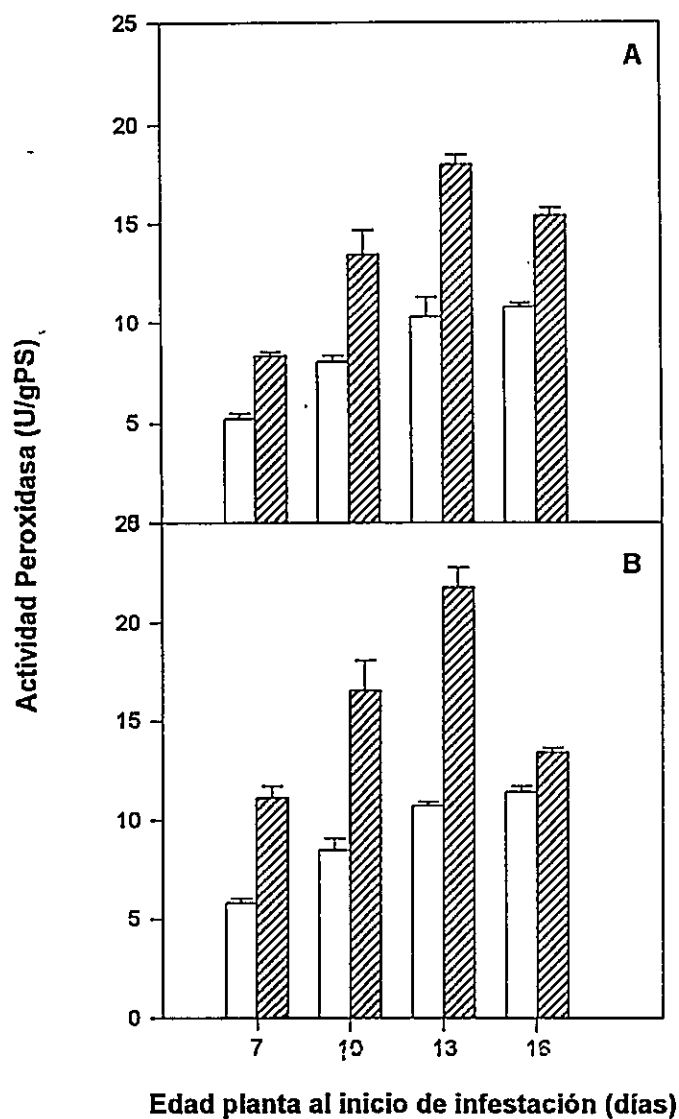


Figura 3. Variación de la actividad de las peroxidasas unidas iónicamente a la pared celular del tejido foliar de plantas de cebada de 7, 10, 13 y 16 días de edad, \square sin infestar y ▨ después de ser infestadas por 48 horas (A) y 72 horas (B), con 20 áfidos por planta. La actividad está expresada en unidades por gramo de peso seco (μ moles de o-PDA oxidado por minuto por gramo de peso seco). Las barras verticales indican el error estándar ($n = 3$).

3.2. Actividad de las peroxidasas covalentes en plantas sin infestar e infestadas con áfidos.

La actividad de las peroxidasas covalentemente unidas a la pared celular, obtenidas del pellet después de haber extraído las peroxidasas iónicas, en las plantas sin infestar mostró un comportamiento similar al mostrado por las peroxidasas iónicas, esto es, la actividad fué aumentando con la edad de la planta, de 16 - 21 U/gPS (plantas de 7 días de edad) aumentó a 44 - 45 U/gPS (plantas de 16 días de edad) (Fig. 4: A y B, barras vacías).

Las peroxidasas unidas covalentemente a la pared celular, también aumentaron en actividad por la infestación con áfidos (Fig. 4: A y B, barras achuradas). Solamente en las plantas de 7, 10 y 13 días de edad para los dos períodos de infestación estudiados, la actividad fué mayor en las infestadas que en sus controles. Podemos observar además que la actividad de peroxidasas covalentes fué aumentando con la edad en plantas infestadas por 48 horas (Fig. 4 A). En cambio, en las plantas infestadas por 72 horas (Fig. 4 B) la actividad aumentó en plantas de 7 y 10 días de edad, disminuyendo a 35,4 U/gPS en plantas de 13 y 16 días de edad.

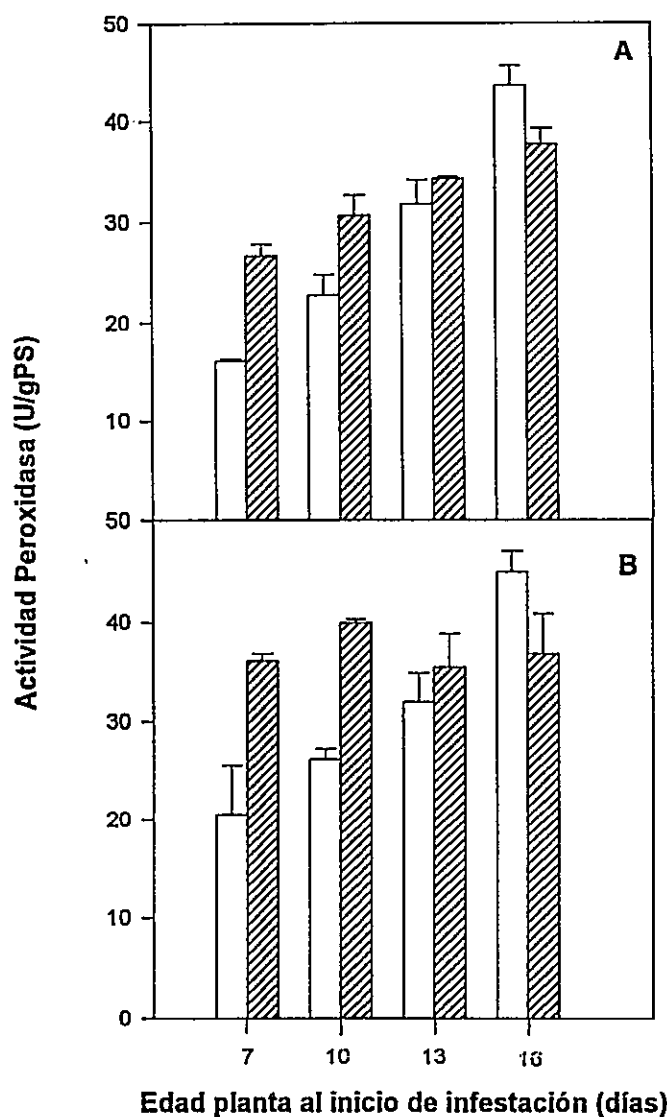


Figura 4. Variación de la actividad de las peroxididasas unidas covalentemente a la pared celular del tejido foliar de plantas de cebada de 7, 10, 13 y 16 días de edad; □ sin infestar y ▨ después de ser infestadas por 48 horas (A) y 72 horas (B), con 20 áfidos por planta. La actividad está expresada en unidades por gramo de peso seco (μ moles de o-PDA oxidado por minuto por gramo de peso seco). Las barras verticales indican el error estándar ($n=3$).

3.3. Porcentaje de acumulación de la actividad peroxidasa unida iónica y covalentemente a la pared celular por infestación con áfidos.

El aumento de la actividad de peroxidasas iónicas y covalentemente por infestación con respecto a sus controles, expresado en porcentaje (Fig. 5: A y B), mostró un comportamiento diferente. El porcentaje del aumento de las peroxidasas iónicas fué aumentando con la edad de la planta hasta los 13 días, donde se registraron los valores más altos (78 % y 104 % para 48 y 72 horas de infestación respectivamente), luego se apreció una disminución, siendo más pronunciada en plantas de 16 días infestadas por 72 horas. En cambio, el porcentaje del aumento de la actividad de peroxidasas covalentes fué disminuyendo con la edad de la planta (Fig. 5, B); las plantas con 16 días de edad no respondieron a la infestación en este tipo de peroxidasas.

3.4. Actividad de las peroxidasas iónicas y covalentes de plantas sin infestar e infestadas con sustratos artificiales y naturales.

Cuando se midió la actividad de las peroxidasas con o-PDA, guaiacol (sustratos artificiales), ácido ferúlico y ácido p-cumárico (sustratos naturales), en plantas sin infestar e infestadas, encontramos que los porcentajes de actividad iónica inducida después de 48 horas de infestación mostraron valores similares; mientras que en extractos obtenidos de plantas después de 72 horas de infestación, el porcentaje obtenido para o-PDA fué notoriamente mayor que para los demás sustratos (Tabla 1).

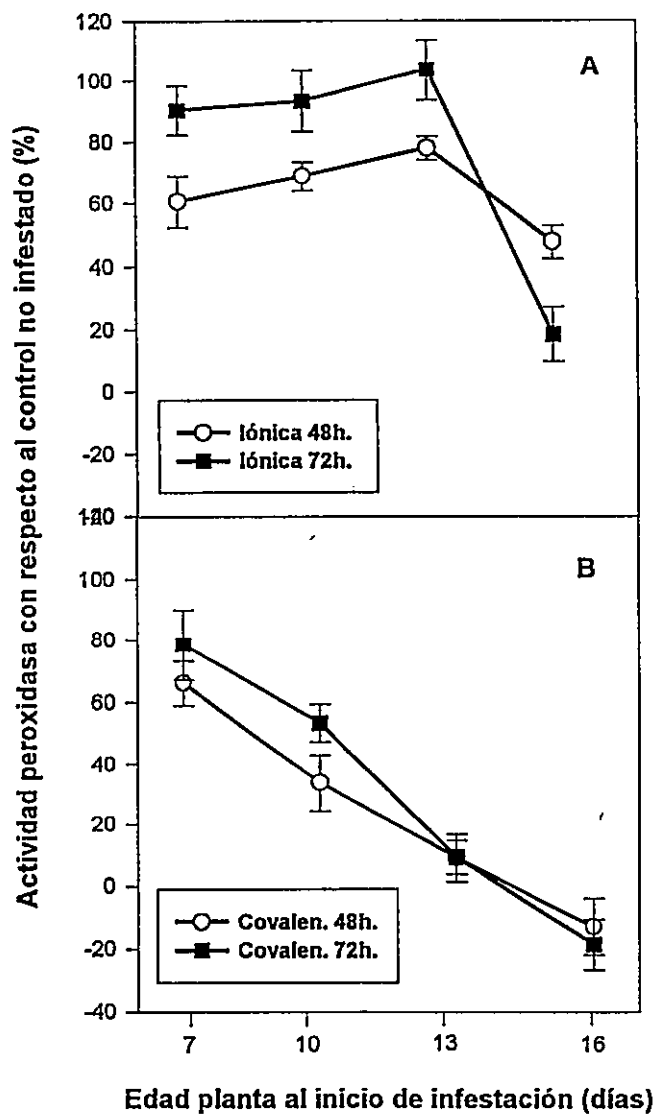


Figura 5. Aumento (%) de la actividad de peroxidasas iónicas (A) y covalentes (B) de pared celular en plantas de 7, 10, 13 y 16 días de edad, infestadas con áfidos por 48 y 72 horas. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas y las barras verticales el error estándar.

Tabla 1. Aumento de la actividad peroxidasa unida iónicamente a la pared celular por infestación con áfidos, con diferentes sustratos en plantas de *H. vulgare*.

Sustratos	Actividad Peroxidasa Iónica (U/gPS x10)					
	Después de 48 horas de infestación			Después de 72 horas de infestación		
	<i>Control</i>	<i>Infestada</i>	<i>Incremento (%)</i>	<i>Control</i>	<i>Infestada</i>	<i>Incremento (%)</i>
O-PDA	80,00 ± 0,03	135,00 ± 0,12	69	85,00 ± 0,06	165,00 ± 0,20	94
Guaiacol	0,96 ± 0,05	1,58 ± 0,01	65	1,49 ± 0,01	2,26 ± 0,01	52
Ac. Ferúl.	0,94 ± 0,01	1,57 ± 0,20	67	2,06 ± 0,20	2,78 ± 0,20	35
Ac.p-Cum.	0,39 ± 0,03	0,63 ± 0,01	62	0,58 ± 0,04	0,82 ± 0,30	41

En los porcentajes de actividad covalente inducida en plantas infestadas por 48 horas a diferencia de las iónicas, se observó un mayor porcentaje para o-PDA que para los otros sustratos; esta característica también se presentó en las plantas infestadas por 72 horas (Tabla 2).

3.5. Analisis de las isoformas de peroxidasas unidas iónicamente a la pared celular mediante isoelectroenfoque.

El patrón de distribución de las isoformas de peroxidasas unidas iónicamente a la pared celular, obtenido de plantas de 7, 10, 13 y 16 días de edad, sin infestar e infestadas por 72 horas (Fig. 6), mostró la presencia de isoformas básicas y ligeramente ácidas. La infestación indujo la expresión de una isoforma con pI 6,76 en plantas de 7 días de edad, la cual se mantuvo en plantas de 10 días aunque con menor actividad; además se observó aumento en la actividad de las isoformas con pI 6,96, 7,98 y 8,54, así lo demuestra también los densitogramas correspondientes a las isoformas de plantas de esta edad sin infestar (Fig. 7 A) e infestadas (Fig. 7 B). En plantas de 10 días de edad no infestadas e infestadas se observó la aparición de una isoforma con pI 7,75, ésta también estuvo presente en plantas de 13 y 16 días. La infestación en plantas de 10 y 13 días, produjo el aumento en la actividad de casi todas las isoformas presentes, siendo más acentuado este aumento en las isoformas con pI 8,54, 8,88 y 6,96, un comportamiento parecido se observó en plantas con 16 días de edad, aunque también se evidenció disminución de la

Tabla 2. Aumento de la actividad peroxidasa unida covalentemente a la pared celular por infestación con áfidos, con diferentes sustratos en plantas de *H. Vulgare*.

Sustratos	Actividad Peroxidasa Covalente (U/gPS x 10)					
	Después de 48 horas de infestación			Después de 72 horas de infestación		
	<i>Control</i>	<i>Infestada</i>	<i>Incremento (%)</i>	<i>Control</i>	<i>Infestada</i>	<i>Incremento (%)</i>
O-PDA	228,00 ± 0,20	307,00 ± 0,20	35	262,00 ± 0,11	399,00 ± 0,04	52
Guaiacol	2,65 ± 0,05	2,86 ± 0,20	8	2,89 ± 0,70	3,65 ± 0,50	26
Ac. Ferúl.	4,00 ± 4,50	4,50 ± 0,01	13	4,11 ± 0,01	5,25 ± 0,01	28
Ac.p-Cum.	1,28 ± 0,01	1,39 ± 0,30	9	1,35 ± 0,08	1,59 ± 0,30	18

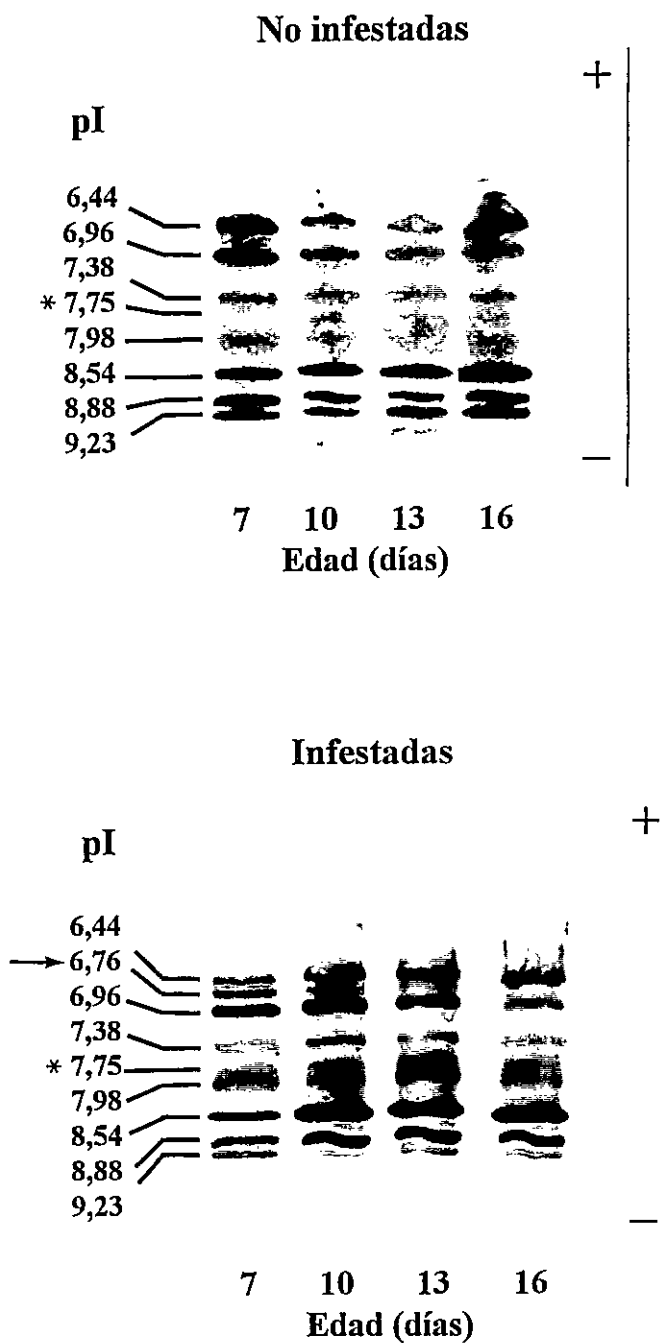


Figura 6. Efecto de la infestación con áfidos en el patrón de IEF de peroxidases iónicas de pared celular de hojas de cebada. Extractos conteniendo actividad peroxidasa, fueron preparados de 150 gramos de tejido fresco, de plantas sin infestar e infestadas con áfidos por 72 horas. Cada carril fué cargado con 2 Unidades medida con o-PDA y electroenfocado en un gradiente de pH 3-10. Las isoformas fueron detectadas con 4-metoxinaftol 5 mM y H_2O_2 0,004 % (v/v). Los pI se muestran a la izquierda. La flecha y asteriscos indican nuevas isoformas.

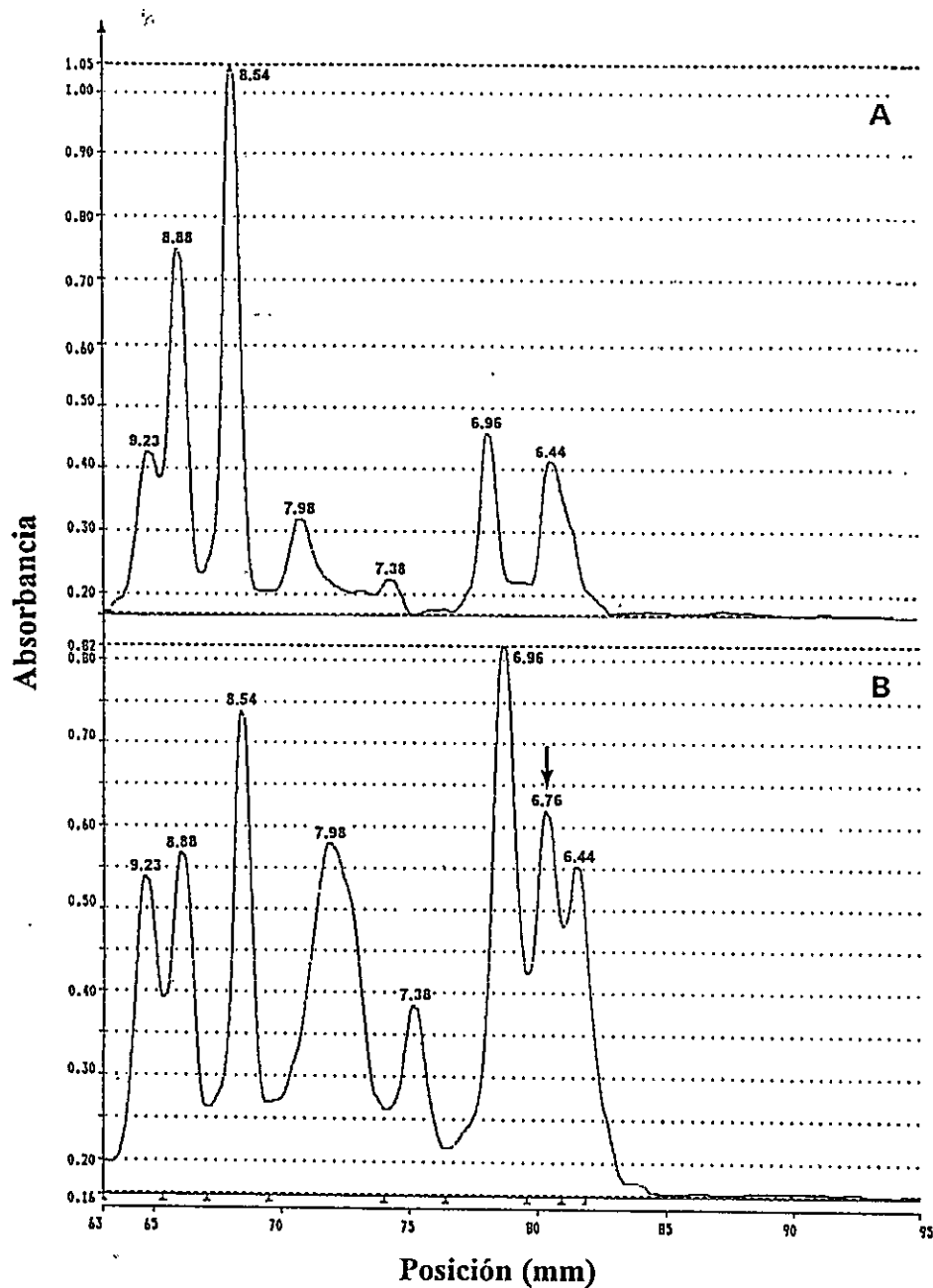


Figura 7. Densitogramas de las isoformas iónicas reveladas por actividad con 4-metoxinaftol, correspondientes a plantas de 7 días de edad, no infestadas (A) e infestadas (B) por 72 horas. Cada banda revelada en geles del IEF fué escaneada a 660 nm. Los números indican el pI de cada isoforma. La flecha indica nueva isoforma inducida por infestación.

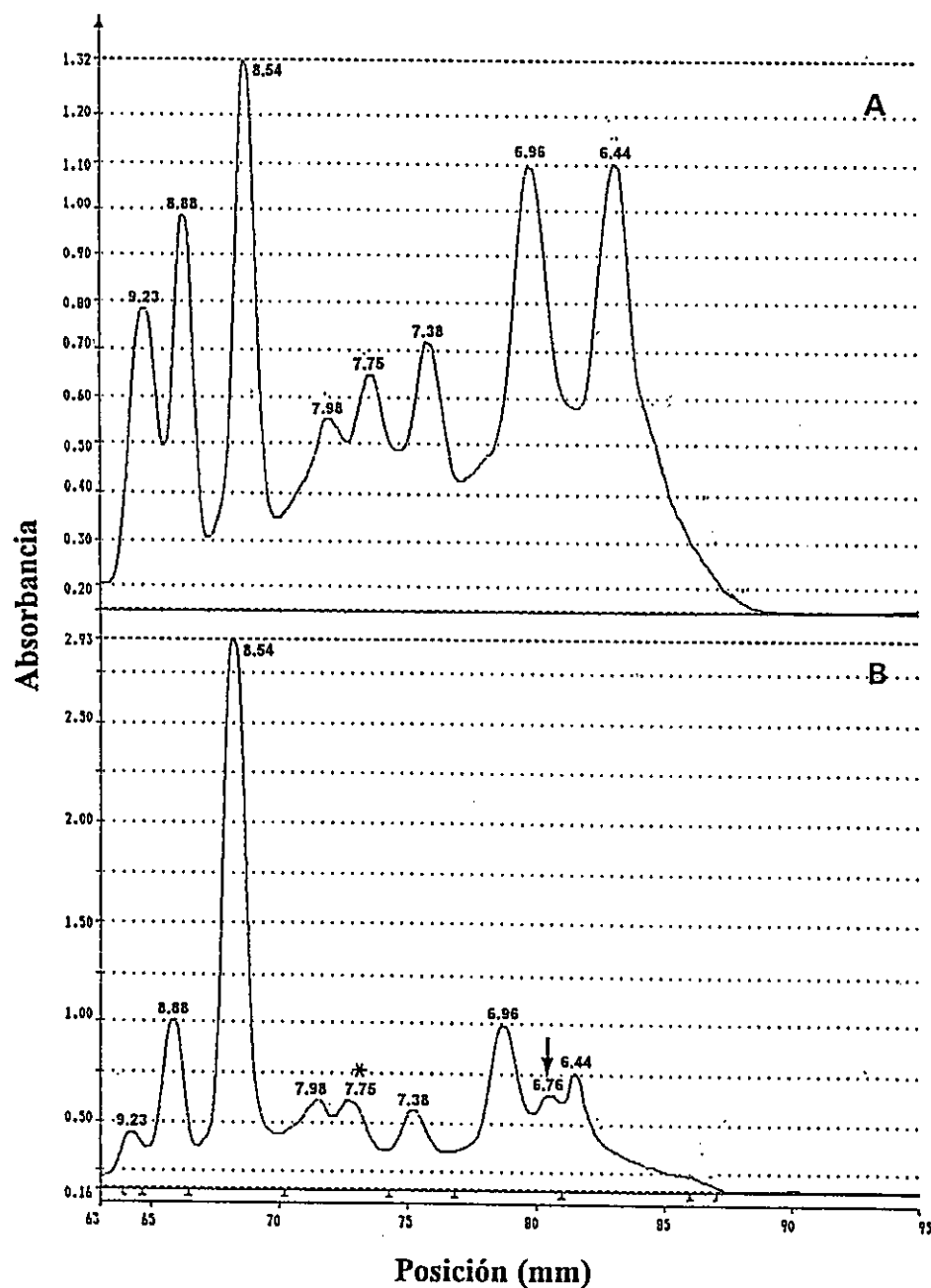


Figura 8. Densitogramas de las isoformas iónicas reveladas por actividad con 4-metoxinaftol, correspondientes a plantas de 10 días de edad, no infestadas (A) e infestadas (B) por 72 horas. Cada banda revelada en geles del IEF fué escaneada a 660 nm. Los números indican el pI de cada isoforma. La flecha indica nueva isoforma inducida por infestación. El asterisco indica la nueva isoforma inducida por edad.

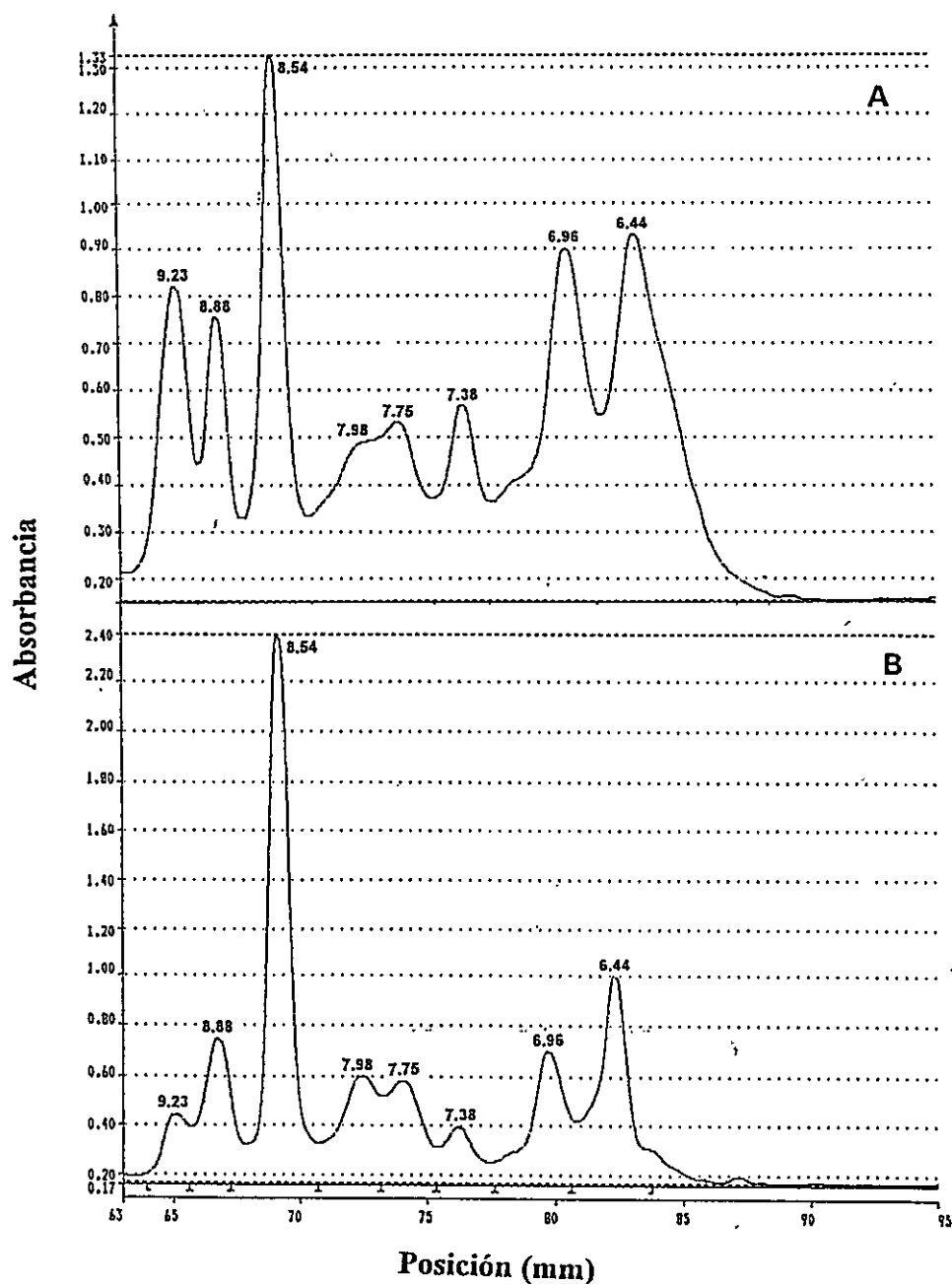


Figura 9. Densitogramas de las isoformas iónicas reveladas por actividad con 4-metoxinaftol, correspondientes a plantas de 13 días de edad, no infestadas (A) e infestadas (B) por 72 horas. Cada banda revelada en geles del IEF fué escaneada a 660 nm. Los números indican el pI de cada isoforma. El asterisco indica la nueva isoforma inducida por edad.

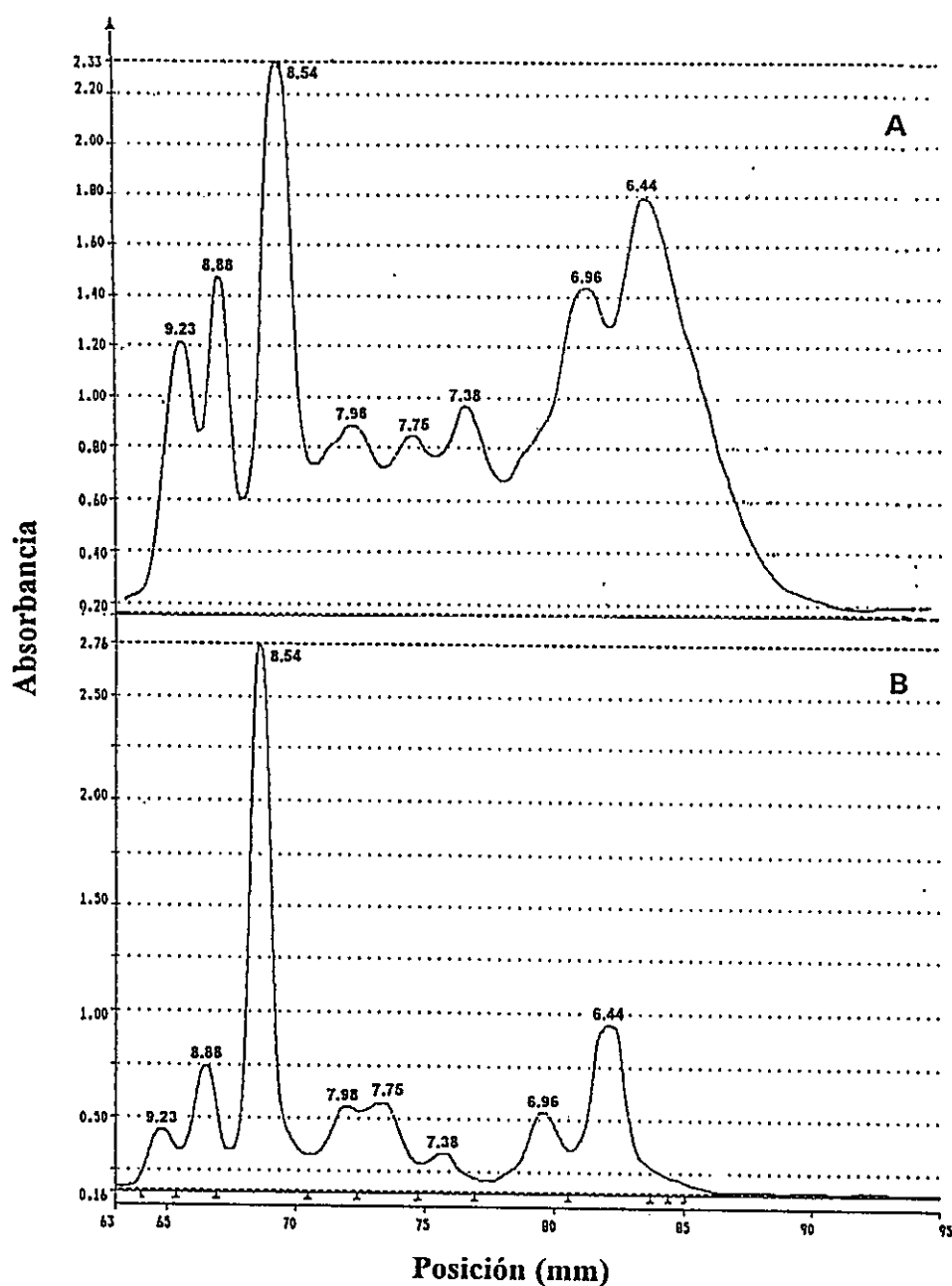


Figura 10. Densitogramas de las isoformas iónicas reveladas por actividad con 4-metoxinaftol, correspondientes a plantas de 16 días de edad, no infestadas (A) e infestadas (B) por 72 horas. Cada banda revelada en geles del IEF fué escaneada a 660 nm. Los números indican el pI de cada isoforma. El asterisco indica la nueva isoforma inducida por edad.

actividad de isoformas que mostraron actividad aumentada en plantas de menor edad, principalmente de la isoforma con pI 7,38.

Los densitogramas obtenidos de plantas de 10, 13 y 16 días de edad sin infestar e infestadas que se muestran en las Figs. 8, 9 y 10: A y B respectivamente, muestran los cambios ocurridos en la actividad de las isoperoxidasas en estas plantas.

3.6. Análisis de las isoformas de peroxidasas unidas covalentemente a la pared celular mediante isoelectroenfoque.

Debido a que la infestación produjo mayor inducción de peroxidasas covalentes en plantas de 7 días de edad infestadas por 72 horas, que en las plantas de las otras edades consideradas en este trabajo (Fig. 5 B), se realizó el análisis de las isoformas mediante el isoelectroenfoque, solamente en estas plantas. El perfil electroforético del IEF de las peroxidasas unidas covalentemente, (Fig. 11), mostró mayor número de isoformas distribuidas en un rango más amplio de pI que las peroxidasas iónicas, siendo la mayoría de ellas ácidas; se observó también, que la infestación produjo aumento de la actividad de isoformas ya presentes, principalmente de las isoformas con pI 7,60 y 5,95, tal como se observa en los densitogramas que se muestran en la figura 12: A y B.

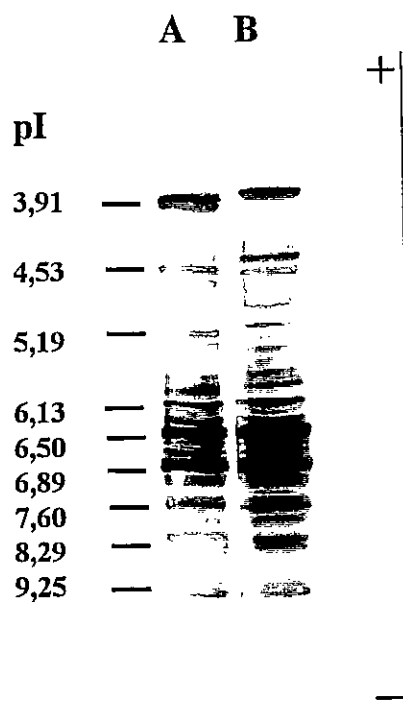


Figura 11. Efecto de la infestación con áfidos en el patrón de IEF de peroxidasa covalentes de pared celular de hojas de cebada. Extractos con actividad peroxidasa covalente fué obtenida por digestión enzimática tal como lo indicado en material y métodos, de plantas de 7 días de edad sin infestar e infestadas por 72 horas. Cada carril fué cargado con 1.5 Unidades medida con o-PDA y electroenfocado en un gradiente de pH 3-10. Las isoformas fueron detectadas con 4-metoxinaftol 5mM y H_2O_2 0,004 % (v/v). No infestadas (A), infestadas (B). Los pI se muestran a la izquierda.

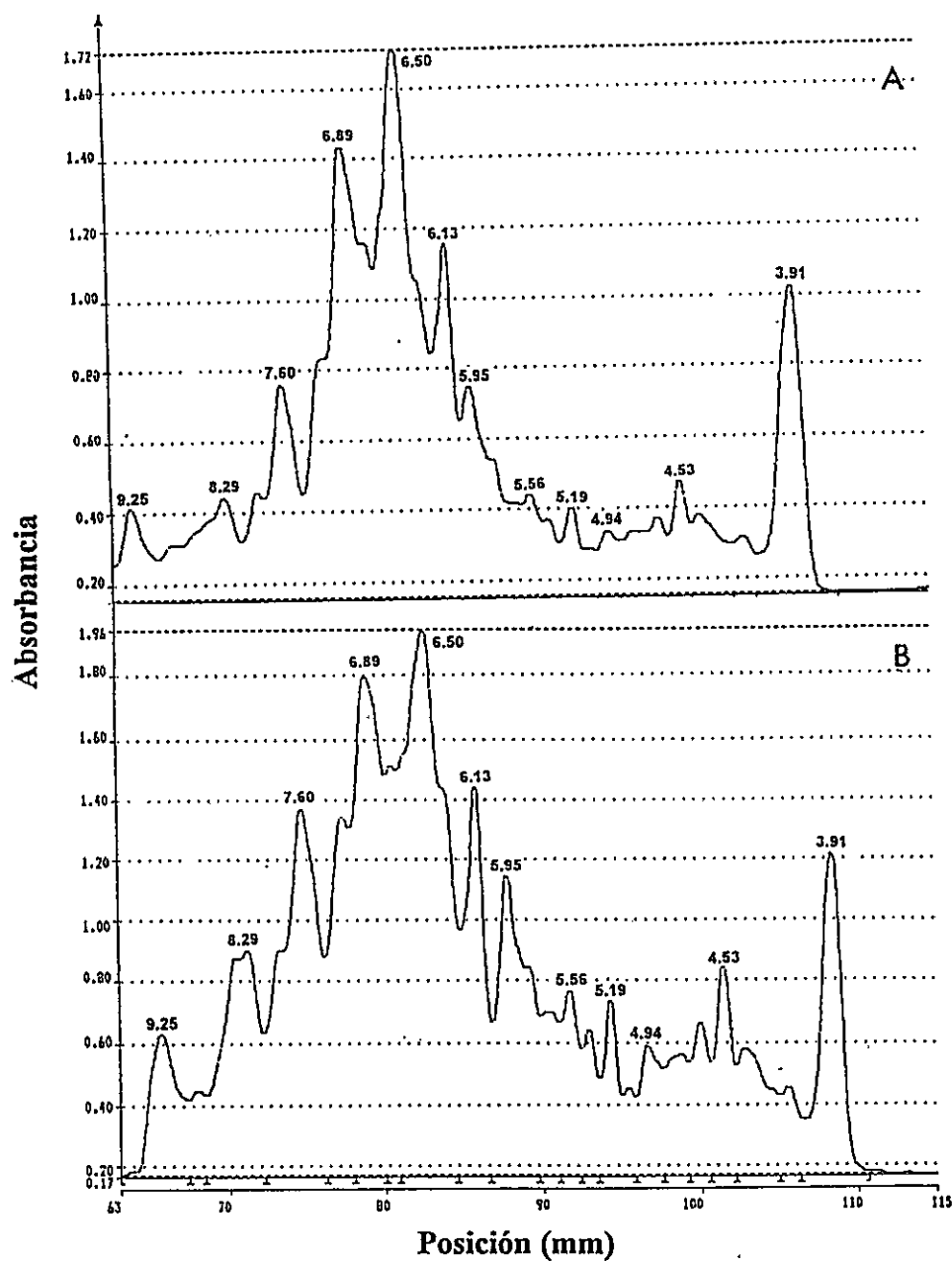


Figura 12. Densitogramas de las isoformas covalentes reveladas con 4-metoxinaftol, correspondientes a plantas de 7 días de edad, sin infestar (A) e infestadas (B) por 72 horas. Las bandas reveladas en geles del IEF fueron escaneadas a 660 nm. Los números indican el pI de cada isoforma.

3.7. Acumulación sistémica de peroxidasas unidas iónica y covalentemente a la pared celular en plantas de cebada infestadas con áfidos.

La tabla 3, muestra los resultados obtenidos de la actividad de las peroxidasas unidas iónica y covalentemente a la pared celular de la vaina y lámina de la primera hoja, de plantas con 13 días de edad infestadas por separado, tal como se indica en material y métodos. Se encontró que la actividad peroxidasa iónica de las vainas infestadas aumentó en relación al control, pero esta actividad fué aún mayor (38,9 U/gPS), cuando se infestó solamente la lámina; en cambio la actividad iónica de las láminas no mostró variación al infestar la vaina ó la lámina. La actividad peroxidasa covalente de las vainas infestadas, aumentó en relación al control (de 44,5 a 55,7 U/gPS), mientras que esta actividad practicamente se mantuvo en plantas donde se infestó solamente la lámina. En las láminas, la actividad peroxidasa covalente mostró una ligera disminución de la actividad con respecto al control cuando fueron infestadas las vainas ó láminas.

3.8. Acumulación de etileno en plantas de cebada sin infestar e infestadas.

Cuando se midió la cantidad de etileno producido en las plantas infestadas y sin infestar durante 9 horas, se encontró que la producción de etileno aumentó constantemente en este período. La cantidad de etileno acumulado comenzó a ser significativamente mayor en las plantas infestadas a partir de las 3 horas.

Tabla 3. Acumulación sistémica de la actividad peroxidasa de pared celular, en *H vulgare* var. Frontera por infestación con *S. graminum*. Se infestó la vaina ó lámina de la primera hoja de plantas con 13 días de edad durante 72 horas. Los valores representan el promedio de 3 repeticiones \pm el error estándar.

Hoja	Actividad peroxidasa (U/gPS)			
	Iónica		Covalente	
	Vaina	Lámina	Vaina	Lámina
No infestada	14,7 \pm 0,4	14,5 \pm 1,0	44,5 \pm 0,4	67,5 \pm 0,6
Vaina infestada	27,8 \pm 0,8	14,6 \pm 0,7	55,7 \pm 1,6	61,0 \pm 1,8
Lámina infestada	38,9 \pm 0,3	15,6 \pm 0,6	53,3 \pm 2,2	62,7 \pm 1,0

A las 9 horas cuando se terminó el experimento, la acumulación de etileno llegó a 64 ppm en las plantas infestadas y a 42 ppm en las no infestadas, lo que representa un 52 % de etileno acumulado por infestación (Fig. 13).

3.9. Actividad de las peroxidasas unidas iónica y covalentemente a la pared celular en plantas tratadas con etileno.

La aplicación de un pulso de etileno por 6 horas a plantas de cebada, causó aumento en la actividad de las peroxidasas iónicas (Fig. 14 A); se observó durante las primeras horas un aumento de la actividad tanto en las plantas tratadas con etileno como en las plantas controles. El aumento fue máximo a las 24 horas, (8,3 U/gPS) en las plantas tratadas manteniéndose la actividad a este nivel hasta las 48 horas. En el control el aumento fue más lento llegando a un máximo (6,8 U/gPS) a las 48 horas, descendiendo la actividad posteriormente en ambos grupos.

La actividad de las peroxidasas unidas covalentemente a la pared celular en plantas tratadas con etileno (Fig. 14 B), no presentó variaciones significativas con respecto a las plantas control. En ambas hubo un descenso de la actividad hasta las 12 horas para subir al doble a las 24 horas. A las 96 horas las plantas control tuvieron una actividad mayor (19 U/gPS) que las tratadas (16 U/gPS).

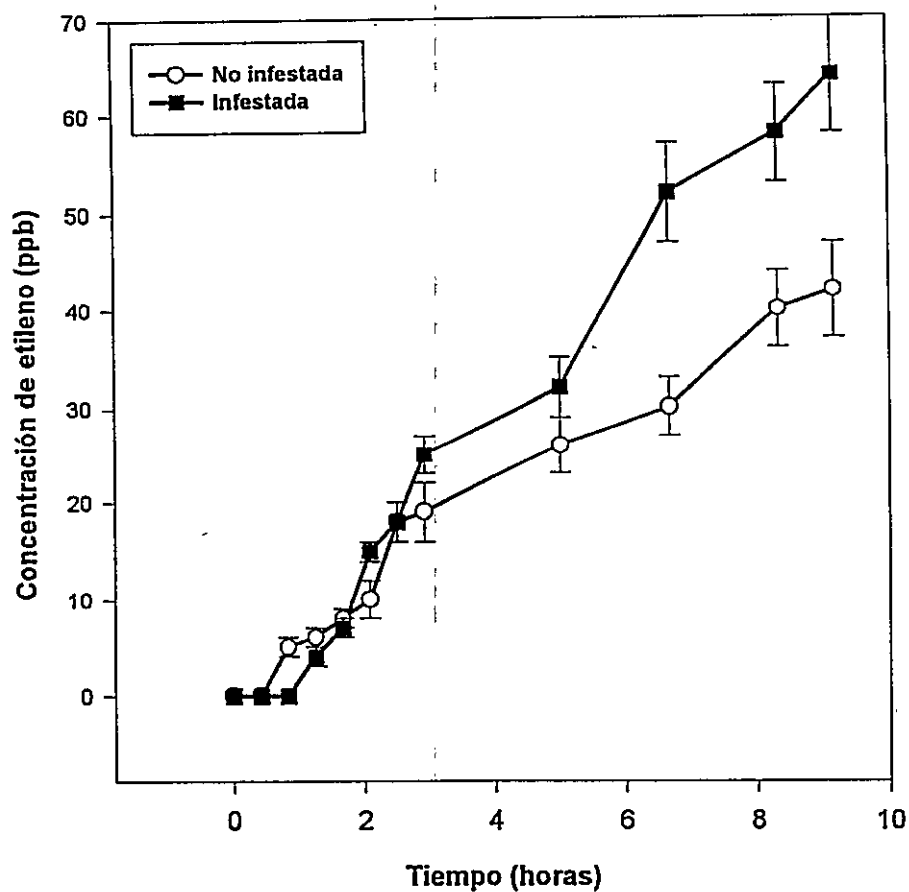


Figura 13. Efecto de la infestación con áfidos en la producción de etileno a través del tiempo en plantas de cebada. Se midió la cantidad de etileno liberado (partes por billón) en plantas de 7 días de edad, sin infestar e infestadas con áfidos, tal como se indica en material y métodos. Las barras verticales indican el error estándar ($n = 3$).

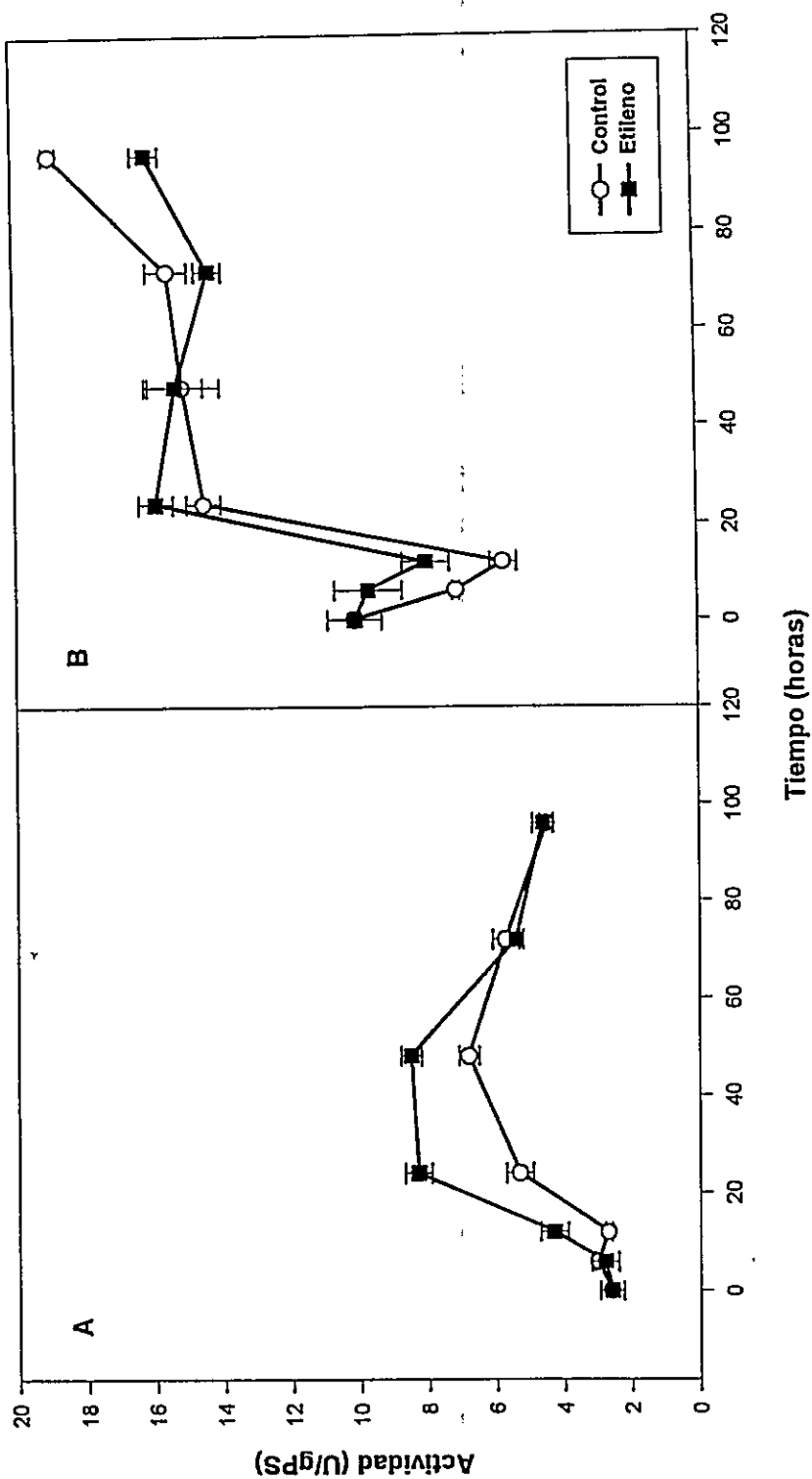


Figura 14. Efecto del etileno en la actividad de peroxidadas iónicas (A) y covalentes (B) de pared celular en plantas de cebada. Se inyectó etileno (40 ppm) a frascos herméticamente cerrados conteniendo plantas de 7 días de edad. Después de 6 horas las plantas fueron liberadas y se midió la actividad peroxidada con o-PDA, por diferentes períodos de tiempo. Cada valor corresponde al promedio de 3 repeticiones. Las barras representan el error estándar.

4. DISCUSIÓN

La participación de peroxidasas en la biosíntesis de componentes de la pared celular, así como en reacciones que conducen a su rigidización, sugiere que estas enzimas están relacionadas estrechamente con procesos involucrados en el crecimiento, diferenciación, defensa y reparación de tejidos dañados por patógenos, plagas ó agentes mecánicos. Ante estos tipos de estrés, las plantas responden con variaciones en la actividad de peroxidasas unidas a la pared celular (Fry, 1979 ; Lagrimini, 1991; Kerby y Somerville, 1992; Iiyama y col. 1994).

4.1. Aumento de la actividad de peroxidasas unidas iónicamente a la pared celular.

Los resultados obtenidos en este trabajo, demostraron aumento de la actividad de peroxidasas iónicas de pared celular en plantas de cebada de diferente edad, tanto sin infestar como infestadas con áfidos. El aumento de la actividad observado en plantas sin infestar, sería consecuencia de los procesos metabólicos propios del crecimiento y desarrollo de la pared celular como por ejemplo la lignificación. El aumento de esta actividad con la edad de la planta ha sido observado en muchas especies; así por ejemplo, en epicótilos de *Cicer arietinum* L. cv. Castellana, se encontró que la actividad de las peroxidasas iónicas, aumentó con la edad de los epicótilos siendo máxima cuando los epicótilos dejaron de crecer (Sánchez y col. 1989; Valero y col. 1991). Una menor actividad de las peroxidasas de pared celular en el tiempo de máximo crecimiento ha sido mostrada también en plántulas de *Arachis hypogaea* L. (Zheng y Huystee, 1992),

coleoptilos y raíces de *Oryza sativa* L. (Lee y Lin, 1995), en hojas de *Festuca arundinacea* Scrb (MacAdam y col. 1992), etc.

La actividad peroxidasa unida iónicamente a la pared celular en plantas de cebada de 7, 10, 13 y 16 días de edad, sometidas a infestación con áfidos aumentó después de 48 y 72 horas, en relación a sus respectivos controles sin infestar. La misma tendencia ha sido observada en tres cultivares de esta especie vegetal por Indarte (1995), al infestar plantas de 7 días de edad con el áfido *S. graminum* por diferentes periodos de tiempo. Resultados similares fueron encontrados para la actividad de peroxidasas extracelulares de cebada cuando fué inoculada con *Erisiphe graminum* f. sp. hordei (Kerby y Somerville, 1989).

Trabajos realizados en dicotiledóneas y gimnospermas bajo diferentes condiciones de estrés, también, han mostrado aumento en la actividad peroxidasa de pared celular ó en la actividad peroxidasa total (Svalheim y Robertsen, 1990; Lagrimini, 1991; Riquelme y Cardemil, 1993; Alcázar y col. 1995).

El descenso de la actividad peroxidasa observada en las plantas de 16 días de edad parece indicar que las plantas infestadas no requieren una alta actividad de peroxidasas para protegerse de la infestación, posiblemente por haber acumulado suficiente cantidad de compuestos fenólicos. Estos en último término pueden contribuir a la lignificación de la pared, así como participar en la síntesis de metabolitos repelentes a insectos (Lagrimini y col. 1990).

4.2. Aumento de la actividad de peroxidasas unidas covalentemente a la pared celular.

La actividad de las peroxidasas unidas covalentemente a la pared celular, en

plantas de cebada sin infestar mostró valores más altos, pero con la misma tendencia que las peroxidases iónicas ; es decir, fué aumentando con la edad de la planta, indicando que estas peroxidases podrían estar involucradas en procesos de diferenciación de la pared, controlando el crecimiento y la lignificación de las plantas de cebada (Cooper y Varner, 1984). Esta planta al igual que otras Poáceas desarrolla esclerénquima el cual presenta paredes lignificadas. Durante la lignificación de fibras de *Linum usitatissimum* L., se encontró aumento de la actividad peroxidasa covalentemente unida a la pared celular (McDougall, 1991). Resultados similares han sido comunicados por Sánchez y col. (1996) en hipocótilos de *Pinus pinaster* a diferentes edades.

El aumento de la actividad de peroxidases covalentes de pared celular por la infestación con áfidos encontrado en este trabajo, también ha sido reportado por Indarte (1995) en tres variedades de cebada de 7 días de edad, quién encontró además aumento de polifenoles en diferentes tejidos de las hojas. Similarmente se ha encontrado que la acumulación de un material conteniendo lignina y suberina alrededor de heridas causadas mecánicamente en tallos de *Linum usitatissimum* var. Belinka, fué precedido por el aumento de la actividad de peroxidases covalentes de pared celular (McDougall, 1993).

El aumento de la actividad de peroxidases unidas a la pared y su posible rol en la defensa de la planta, podría deberse también a la acumulación de fenoles y compuestos oxidados que pueden ser tóxicos o repelentes para los insectos. Es el caso de haber observado en hojas de cebada, en los lugares donde el áfido *Diuraphis noxia* inserta su estilete, la presencia de un material autofluorescente de naturaleza fenólica, lo cual confiere un sabor desagradable. Esta repelencia producida por acúmulo de fenoles hace que el áfido busque nuevos sitios de alimentación. En consecuencia aumenta el número de heridas con el consiguiente incremento de material fenólico y de lignina, induciendo enzimas involucradas en la biosíntesis de estos compuestos (Belefant-Miller y col. 1994).

Los componentes químicos producidos en las heridas causadas por microagujas son sin embargo diferentes a los acumulados por heridas causadas por patógenos como es el caso de *E. graminis* en coleoptilos de cebada (Russo y Bushnell, 1989). En tejidos heridos se ha observado la deposición de lignina, mediada por el aumento de la actividad de peroxidasas (Lagrimini, 1991).

4.3. Comportamiento de las peroxidasas de pared celular acumuladas por infestación.

Los porcentajes de acumulación de la actividad de peroxidasa iónica y covalente de pared celular por efecto de la infestación con áfidos, mostraron un comportamiento diferente con la edad de la planta. La actividad iónica aumentó con la edad de la planta, en cambio la actividad covalente fué disminuyendo con la edad de la planta, lo que parece indicar que son las peroxidasas iónicas y no las covalentes las que cumplen un papel en el crecimiento y desarrollo de la cebada. Al comparar el nivel de aumento de la actividad peroxidasa unida iónica y covalentemente a la pared celular inducida por los áfidos, encontramos también que éste fué más alto en las peroxidasas iónicas que en las covalentes para todas las edades estudiadas. Estos resultados indican que la actividad de las peroxidasas unidas iónicamente a la pared celular de hojas de cebada, se inducen más por la infestación con áfidos que las peroxidasas covalentes, lo que también parece favorecer la idea que son las peroxidasas iónicas las que pueden cumplir un rol en la defensa de la infestación. Aumento en la actividad de peroxidasas iónicas ha sido informado durante el crecimiento de hipocótilos de *Arachis hypogaea* L., cuando segmentos de hipocótilos de esta planta son cultivados con meta fluoro tirosina (MFT), un inhibidor del crecimiento. En este caso las peroxidasas iónicas muestran un aumento

de actividad mayor que las peroxidasas covalentes de pared celular (Zheng y Huystee, 1992). Similares resultados han sido observados al acumularse fenoles y lignina en la pared celular de coleoptilos de *Avena sativa* L. (Gonzales, L., com. pers.) y en plántulas de *Araucaria araucana* por heridas (Riquelme y Cardemil, 1993).

El similar porcentaje de aumento de la actividad de peroxidasas unidas iónicamente a la pared celular de hojas de cebada infestadas por 48 horas encontrado para o-PDA, guaiacol, ácido ferúlico y ácido p-coumárico (Tabla 1), nos podría estar indicando que estas peroxidasas son capaces de oxidar indistintamente uno u otro de los sustratos utilizados. En cambio, hay una marcada diferencia en el porcentaje de aumento de la actividad para o-PDA (94 %), en relación a los porcentajes presentados en orden decreciente por guaiacol, ácido p-coumárico y ácido ferúlico, en plantas con 72 horas de infestación. Esta diferencia podría ser consecuencia de cierta afinidad hacia el o-PDA de alguna isoforma(s) presente en estas plantas, posiblemente con la nueva isoforma de pI 6,76 inducida por infestación. Este podría ser también el caso de las peroxidasas covalentes. En otras plantas se ha encontrado similitudes ó diferencias de las peroxidasas para oxidar una variedad de sustratos. Al realizar el análisis histoquímico en tallos de *Nicotiana tabacum* var. Samsun, Pang y col. (1989), encontraron que las peroxidasas presentes en todas las paredes celulares fueron capaces de oxidar diaminobenzidina (DAB), parafenilendiamina-pirocatecol (PPD-PC) ó guaiacol; en cambio las peroxidasas de paredes celulares que estaban en proceso de lignificación (esclerénquima, fibras y xilema joven) solamente oxidaron sales de ácido ferúlico ó siringaldazina. Así también, en el IEF de las isoperoxidasas de pared de hipocótilos de *Lupinus albus* L., éstas mostraron afinidad por sustratos con estructura guaiacol pero no con siringaldazina (Ros Barceló y col. 1987).

4.4. Efecto de la infestación con áfidos y de la edad de la planta en la expresión de isoformas de peroxidasas unidas a la pared celular.

La infestación indujo la expresión de una nueva isoforma de peroxidasa ácida en plantas infestadas de 7 y 10 días de edad no presentándose en plantas de 13 y 16 días de edad, lo que parece indicar que esta isoforma cumpliría un papel de defensa en edades tempranas de la planta. Variaciones en el aumento de la actividad vinculadas a una isoenzima ha sido postulado durante el estrés. En el IEF del fluido intercelular de hojas de *H. vulgare* infectadas por *E. graminis*, el aumento de la actividad peroxidasa fué atribuído a la isoenzima de pI 8,5 (Kerby y Somerville, 1992); el aumento de la actividad peroxidasa en hipocótilos de *Cucumis sativus* L. heridos o inoculados con *Cladosporium cucumerinum*, fué consecuencia del aumento en la actividad de una peroxidasa constitutiva con pI 8,9 como también de la expresión de nuevas isoenzimas de peroxidasas con pI ácidos y básicos (Svalheim y Robertsen, 1990).

El IEF realizado en plantas de cebada de diferente edad, mostró la presencia de isoformas de peroxidasas en su mayoría básicas. En otras especies se señala que peroxidasas básicas se encuentran mayormente asociadas a la pared celular y son las que controlarían el crecimiento (Hu y col. 1989; Burel y col. 1994). La aparición de la isoforma con pI 7,75 en plantas de 10, 13 y 16 días de edad, tanto sin infestar como infestadas, confirma que el patrón isoenzimático es fuertemente dependiente del estado de desarrollo de la planta (Penel y Greppin, 1994). La expresión de numerosas isoenzimas en los diferentes tejidos y especies de plantas, pueden ser productos de la expresión de varios genes o de modificaciones postraslacionales de un gen (Triplet y Mellon, 1992). Diversos trabajos muestran variaciones en la expresión de peroxidasas; por ejemplo, la presencia de dos isoperoxidasas fuertemente básicas (pI 9,5 y 9,7) unidas iónicamente a

pared celular de hipocótilos de *Lupinus albus* L. ocurrió solamente en hipocótilos de 5 días de edad, estando casi ausentes en hipocótilos de más edad (Ros Barceló y col. 1991). El análisis del mRNA que codifica la peroxidasa BP1 de semillas del mutante Risoe 1508 de *Hordeum vulgare* L. mostró que esta peroxidasa solamente está presente por unos pocos días, alrededor de 15 días después del florecimiento y además está confinada al endospermo de la semilla (Rasmussen y col. 1991 en Rasmussen y col 1997). En nuestro trabajo no podemos decir aún si estas dos nuevas isoformas, la de pI 6,76 inducida por infestación y la de pI 7,75 inducida durante el desarrollo son producto de la expresión de genes o son productos de cambios postranscripcionales o postraduccionales.

4.5. Acumulación sistémica de peroxidasas unidas a la pared celular en la cebada.

Al analizar los resultados de la actividad de peroxidasas unidas a la pared celular de la vaina y lámina de la primera hoja encontramos, que la actividad de peroxidasas iónicas de las vainas infestadas solamente en las láminas mostró valores más altos que cuando fueron infestadas las vainas mismas. Este comportamiento evidencia, que el daño producido por los áfidos causa un aumento sistémico de la actividad de peroxidasas iónicas en la cebada, posiblemente como un mecanismo de protección preventivo de los tejidos no infestados aún. En hojas de cebada tratadas con ácido 2,6-dicloroisonicotínico, el cual induce resistencia sistémica a *E. graminis*, se encontró aumento en la expresión de proteínas relacionadas con la defensa de la planta, dentro de las cuales fueron detectadas peroxidasas unidas iónicamente a la pared (Kogel y col. 1994). Sin embargo, se menciona en este trabajo que existen controversias en relación a si la resistencia en monocotiledóneas es expresada sistémicamente ó solo ocurre localmente en la vecindad del lugar de la inoculación primaria del hongo (Hwang y Heitefuss, 1982 en Kogel y col.

1994). En dicotiledóneas, sin embargo, se ha demostrado que la resistencia sistémica puede ser inducida. La inoculación de la primera hoja de *Cucumis sativus* L. con *Pseudomonas syringae* pv *syringae* mostró resistencia sistémica dentro de 24 horas después de inocular el patógeno y que existe una correlación entre el comienzo de la resistencia y la aparición sistémica de isoformas de peroxidasas apoplásticas (Smith y col. 1991). Señales físicas y/o químicas han sido propuestas en la participación de los mecanismos de resistencia en tejidos alejados del daño. La sistemina, el ácido salicílico, ácido jasmónico, metil jasmonato y etileno han sido involucrados como intermediarios en las respuestas de resistencia por patógenos o plagas (Enyedi y col, 1992). Las observaciones realizadas por Rasmussen y col. (1991) en plantas de *Cucumis sativus* L., inoculadas con *Pseudomonas syringae* pv *syringae*, demuestran que la hoja inoculada debe permanecer unida a la planta por lo menos 6 horas para que peroxidasas apoplásticas sean inducidas sistémicamente. En este sistema la actividad peroxidasa aumentó después de 24 horas de la aplicación exógena de ácido salicílico. Shulaev y col, (1995) han reportado en plantas de *Nicotiana tabacum* cv Xanthi-nc inoculadas con el virus del mosaico del tabaco (TMV), que el ácido salicílico es una señal trasladada via floema en la resistencia sistémica adquirida y en la inducción sistémica de proteínas PR. También se ha sugerido en esta planta, que el etileno puede actuar como una señal en la resistencia sistémica adquirida mediada por etileno (Thompson y col. 1994 en Ecker, 1995). Sin embargo, es posible que otras interacciones planta-patógeno puedan usar diferentes mecanismos de señal a larga distancia (Shulaev y col 1995). En la interacción de infestación de cebada por áfidos, estaría aún por demostrarse si estos intermediarios podrían estar involucrados en la respuesta sistémica de aumento de actividad de peroxidasas iónicas, como también, la identificación de la vía que conduce la señal a distancia.

4.6. Acumulación de etileno por infestación con áfidos y acumulación de peroxidasas unidas a la pared en plantas de cebada tratadas con etileno.

Uno de los primeros eventos que se detecta en la interacción planta-patógeno ó frente a daño mecánico es el rápido aumento de la producción de etileno (Ecker, 1995, O'Donnell y col. 1996).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la infestación con *S. graminum* aumentó la producción de etileno en plantas de cebada en relación a sus controles sin infestar. Resultados similares han sido establecidos en cultivares de cebada susceptibles y resistentes a *Diuraphis noxia* (Miller y col. 1994).

Existe un efecto del etileno en los niveles de peroxidasas. Esto ha sido documentado para diferentes especies vegetales (Cassab y col. 1988; Abeles y col. 1989a; 1989b). Nuestros resultados demuestran que hay también un aumento en la actividad de peroxidasas con pulsos de etileno. La aplicación de un pulso de etileno de 40 ppm aumentó la actividad de peroxidasas iónicas de pared celular alcanzando valores máximos a las 48 -72 horas. Estos resultados sugieren que el etileno podría estar involucrado en el aumento de actividad o expresión de peroxidasas en cebada. Cvikrová y col. (1994) encontraron resultados similares al aplicar étefon (sustancia liberadora de etileno) a cultivos celulares embriogénicos y a embriones separados de *Medicago sativa* L. Si bien la interrelación entre etileno y peroxidasas no es conocida (Cvikrová y col. 1994), los inhibidores de etileno y compuestos liberadores de etileno pueden afectar la actividad de las peroxidasas vía la inducción de nuevas enzimas (González y col. 1991).

Indarte (1995), encontró que la actividad de las peroxidasas unidas iónicamente a la pared celular disminuyó en plantas de cebada de 7 días de edad sometidas a infestación por 12 y 24 horas, con más horas de infestación la actividad fué aumentando. Los valores

de actividad de estas peroxidasas obtenidos en el presente trabajo mostraron un aumento a partir de las 6 horas, cuando las plantas de cebada fueron sometidas a un pulso de etileno. Estos resultados sugieren que el etileno podría actuar como una señal en el aumento de peroxidasas iónicas de la pared celular tanto en las zonas infestadas como en los tejidos distantes de la infestación (según el modelo presentado en la figura 2). Experimentos con inhibidores de la síntesis de etileno, como son el AVG (aminoetoxivinilglicina) y el AOA (ácido aminoxiacético), podrían confirmar si esta hormona esta involucrada en el aumento de actividad de la enzima por infestación. Además del etileno, otros posibles intermediarios en la inducción de señales debieran investigarse a futuro como por ejemplo: ácido salicílico, ácido jasmónico y metil jasmonato, ácido absícico, etc. Los resultados de las peroxidasas iónicas obtenidos en las vainas y láminas de las hojas infestadas con áfidos sugieren que también estaría participando en esta respuesta sistémica una señal que se traslocaría vía floema.

5. CONCLUSIONES

1. La infestación con áfidos causa un aumento de la actividad de peroxidasas unidas iónica y covalentemente a la pared celular por sobre el control en plantas de cebada. La magnitud del aumento de actividad es mayor en las iónicas que en las covalentes.
2. El aumento de la actividad de las peroxidasas iónicas y covalentes de pared celular por infestación varía con la edad de la planta, siendo menor en las plantas de mayor edad.
3. El aumento de la actividad de las peroxidasas iónica y covalentemente unidas a la pared cuando hay infestación por áfidos observado en cebada, es consecuencia principalmente del aumento de la actividad de isoformas ya existentes. Sin embargo, hay dos nuevas isoformas de peroxidasas iónicas una inducida en el desarrollo y otra por infestación que contribuirían también al aumento de la actividad.
4. La infestación de la lámina de la hoja produjo aumento de la actividad de peroxidasas unidas iónicamente a la pared, no sólo en el lugar de la infestación sino también en la vaina de la hoja; sin embargo, cuando se infestó la vaina la actividad aumentó sólo localmente. Por lo tanto la infestación provocó una respuesta local y sistémica en la actividad de esas peroxidasas. La actividad de las peroxidasas covalentemente unidas sólo aumentaron en las vainas infestadas.

5. El etileno provocó aumento de la actividad de peroxidasas iónicas y no de las covalentes. Esto sugiere que el etileno podría actuar como un intermediario en el aumento de la actividad de estas peroxidasas en las zonas de infestación como también en la respuesta sistémica.

6. BIBLIOGRFIA

- Abeles, F.B.; Hershberger, W.L.; Dunn, L.J. 1989a. Hormonal regulation, and intracelular localization of a 33-KD catinic peroxidase in excised cucumber cotyledons. *Plant Physiol.* 89: 664-668.
- Abeles, F.B.; Biles, C.L.; Dunn, L.J. 1989b. Hormonal regulation and distribution of peroxidase isoenzymes in the cucurbitaceae. *Plant Physiol.* 91: 1609-1612.
- Alcázar, M.D.; Egea, C.; Espín, A.; Candela, E. 1995. Peroxidase isoenzymes in the defense of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiol. Plant.* 94: 736-742.
- Apostol, L.; Heinstejn, P.F.; Low, P.S. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol.* 90: 109-116.
- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85: 235-241.
- Bao, W.; O'Malley, D.M.; Whetten, R.; Sederoff, R.R. 1993. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science* 260: 672-674.
- Belefant-Miller, H.; Porter, D.R.; Pierce, M.L.; Mort, A.J. 1994. An early indicator of resistance in barley to Russian wheat aphid. *Plant Physiol.* 105: 1289-1294.
- Benhamou, N. 1996. Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science* 7: 233-240.
- Birecka, H.; Miller, A. 1974. Cell wall and protoplast isoperoxidases in relation to injury, indoleacetic acid, and ethylene effects. *Plant Physiol.* 53: 569-574.
- Bishop, P.D.; Makus, D.J.; Pearce, G.; Ryan C.A. 1981. Proteinase inhibitor-inducing factor activity in tomato leaves resides in oligosaccharides enzymically released from cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6: 3536-3540.
- Burel, C.; Berthe, T.; Mery, J-C.; Morvan, C.; Balange, A.P. 1994. Isoelectric focusing analysis of peroxidases in flax seedling hypocotyls grow in different light conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 32: 853-860.
- Cabrera, H.M.; Argandoña, V.H.; Corcuera, L.J. 1994. Metabolic changes in barley seedlings at different aphid infestation levels. *Phytochemistry* 35: 317-319.

- Cabrera, H.M.; Argandoña, V.H.; Zúñiga, G.E.; Corcuera, L.J. 1995. Effect of infestation by aphids on the water status of barley and insect development. *Phytochemistry* 40: 1083-1088.
- Carpita, N.C. 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 445-476.
- Cassab, G.; Lin, J.-J.; Lin, L.-S.; Varner, J.E. 1988. Ethylene effect on extensin and peroxidase distribution in the subapical region of pea epicotyls. *Plant Physiol.* 88: 522-524.
- Cassab, G.I. y Varner, J.E. 1988. Cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 321-353.
- Cooper, J.B. y Varner, J.E. 1984. Cross-linking of soluble extensin in isolated cell walls. *Plant Physiol.* 76 : 414-417.
- Corcuera, L. J. 1993. Biochemical basis for the resistance of barley to aphids. Review article number 78. *Phytochemistry* 33: 741-747.
- Cortázar, S. R. 1980. Virus del enanismo amarillo de la cebada (B y DV) y áfidos en trigo en la región centro-norte de Chile. *Agricultura Técnica* 40: 53-57.
- Cvikrová, M.; Hrubcová, M.; Vágner, M.; Machácková, I.; Eder, J. 1994. Phenolic acids and peroxidase activity in alfalfa (*Medicago sativa*) embryogenic cultures after ethephon treatment. *Physiol. Plant.* 91: 226-233.
- Doke, N. y Ohashi, Y. 1988. Involvement of an O₂⁻ generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32: 163-175.
- Ecker, J.R. 1995. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* 268: 667-675.
- Elstner, E.F. y Heupel, A. 1976. Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.). *Planta* 130: 175-180.
- Enyedi, A.J.; Yalpani, N.; Silverman, P.; Raskin, I. 1992. Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell* 70: 879-886.
- Espelie, K.E.; Franceschi, V.R.; Kolattukudy, P.E. 1986. Immunocytochemical localization and time course of appearance of an onion peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue. *Plant Physiol.* 81: 487-492.

- Fry, S.C. 1979. Phenolic components of the primary cell wall and their possible role in the hormonal regulation of growth. *Planta* 146: 343-351.
- Fry, S.C. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 165-186.
- Fry, S.C. 1987. Formation of isodityrosine by peroxidase isozymes. *J. Exp. Bot.* 38: 853-862.
- Gaspar, T.; Penel, C.; Thorpe, T.; Greppin, H. 1982. Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. pp 253. Université of Genève - Centre de Botanique, Genève.
- Gaspar, T.; Penel, C.; Castillo, F.J.; Greppin, H. 1985. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol. Plant.* 64: 418-423.
- Gijzen, M.; van Huystee, R.; Buzzell, R. 1993. Soybean seed coat peroxidase. *Plant Physiol.* 103: 1061-1066.
- Gillikin, J.W. y Graham, J.S. 1991. Purification and developmental analysis of the major anionic peroxidase from the seed coat of *Glycine max*. *Plant Physiol.* 96: 214-220.
- Goldberg, R.; Le, T.; Catesson, A.M. 1985. Localization and properties of cell wall enzyme activities related to the final stages of lignin biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 36: 503-510.
- Goldberg, R.; Imberty, A.; Chu-Ba, J. 1986. Development of isoperoxidases along the growth gradient in the mung bean hypocotyl. *Phytochemistry* 25: 1271-1274.
- González, A.; Sánchez Tamés, R.; Rodríguez, R. 1991. Ethylene in relation to protein, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rooting in hazelnut cotyledons. *Physiol Plant.* 83: 611-620.
- Görlach, J.; Volrath, S.; Knauf-Beiter, G.; Hengy, G.; Beckhove, U.; Kogel, K-H.; Oostendorp, M.; Staub, T.; Ward, E.; Kessmann, H.; Ryals, J. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8: 629-643.
- Gross, G.G.; Janse, C.; Elstner, E.F. 1977. Involvement of malate, monophenols, and the superoxide radical in hydrogen peroxide formation by isolated cell walls from horseradish

(*Armoracia lapathifolia* Gilib.). *Planta* 136: 271-276.

Hu, C.; Smith, R.; van Huystee, R. 1989. Biosynthesis and localization of peanut peroxidases. A comparison of the cationic and anionic isozymes. *J. Plant Physiol.* 135: 391-397.

Iiyama, K.; Lam, T.B.-T.; Stone, B.A. 1994. Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol.* 104: 315-320.

Imberty, A.; Goldberg, R.; Catesson, A-M. 1985. Isolation and characterization of *Populus* isoperoxidases involved in the last step of lignin formation. *Planta* 164: 221-226.

Indarte, R.G. 1995. Capacidad de recuperación de plantas de cebada infestadas por áfidos su relación con las peroxidases y compuestos fenólicos de pared celular. Tesis de Magister, Universidad de Chile.

Jackson, P.; Ricardo, C.P.P. 1994. An examination of the peroxidases from *Lupinus albus* L. hypocotyls. *Planta* 194: 311-317.

Jung, J-L.; Maurel, S.; Fritig, B.; Hahne, G. 1995. Different pathogenesis-related-proteins are expressed in sunflower (*Helianthus annuus* L.) in response to physical, chemical and stress factors. *J. Plant Physiol.* 145: 153-160.

Kerby, K.; Somerville, S. C. 1989. Enhancement of specific intercellular peroxidase following inoculation of barley with *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiol. Mol. Pathol.* 35: 323-337.

Kerby, K. y Somerville, S. 1992. Purification of an infection-related, extracellular peroxidase from barley. *Plant Physiol.* 100: 397-402.

Kim, S-H.; Terry, M.E.; Hoops, P.; Dauwalder, M.; Roux, S.J. 1988. Production and characterization of monoclonal antibodies to wall-localized peroxidases from corn seedlings. *Plant Physiol.* 88: 1446-1453.

Kogel, K-H.; Beckhove, U.; Dreschers, J.; Munch, S.; Rommé, Y. 1994. Acquired resistance in barley. *Plant Physiol.* 106: 1269-1277.

Kolattukudy, P.E. 1984. Biochemistry and function of cutin and suberin. *Can. J. Bot.* 62: 2918-2933.

Lagrimini, L.M. 1991. Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant Physiol.* 96: 577-583.

- Lagrimini, L.M.; Bradford, S.; Rothstein, S. 1990. Peroxidase-induced wilting in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 2: 7-18.
- Lagrimini, L.M.; Rothstein, S. 1987. Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* 84: 438-442.
- Lamb, C.J.; Lawton, M.A.; Dron, M.; Dixon, R.A. 1989. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* 56: 215-224.
- Lamb, C.J.; Dixon, R.A. 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 439-463.
- Lamport, D.T.A. 1986. Roles for peroxidases in cell wall genesis, in: H. Greppin, C. Penel and Gaspar (Eds), *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, Univ. Geneva, Switzerland, 199-208.
- Lange, B.M.; Lapierre, C.; Sandermann, H. 1995. Elicitor-induced spruce stress lignin. Structural similarity to early developmental lignins. *Plant Physiol.* 108: 1277-1287.
- Lee, M.Y.; Choi, Y.; Kim, S.S. 1994. Purification and immunological relationships of six radish isoperoxidases. *Plant Physiol. Biochem.* 32: 259-265.
- Lee, T-M.; Lin, Y-H. 1995. Changes in soluble and cell wall-bound peroxidase activities with growth in anoxia-treated rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles and roots. *Plant Science* 106: 1-7.
- Levine, A.; Tenhaken, R.; Dixon, R.; Lamb, C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- Lewis, N.G. y Yamamoto, E. 1990. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 455-496.
- Li, Z-C.; McClure, J. W. 1990. Soluble and bound hydroxiprolin-rich glycoproteins in control and wounded oat and barley primary leaves. *Phytochemistry* 29: 2811-2813.
- Li, Z-C.; McClure, J.W.; Hagerman, A.E. 1989. Soluble and bound apoplastic activity for peroxidase, β -D-glucosidase, malate dehydrogenase, and nonspecific arylesterase, in barley (*Hordeum vulgare* L.) and oat (*Avena sativa* L.) primary leaves. *Plant Physiol.* 90: 185-190.
- Lutts, S.; Kinet, J-M.; Bouharmont, J. 1996. Ethylene production by leaves of rice (*Oryza sativa* L.) in relation to salinity tolerance and exogenous putrescine application.

Plant Science 116: 15-25.

MacAdam, J.W.; Nelson, C.J.; Sharp, R.E. 1992. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. *Plant Physiol.* 99: 872-878.

Mäder, M.; Ungemach, J.; Schloß, P. 1980. The role of peroxidase isoenzyme groups of *Nicotiana tabacum* in hydrogen peroxide formation. *Planta* 147: 467-470.

Markola, A.M.; Vare, H.; Ohtonen, R.; Siegel, B.Z.; Siegel, S.M. 1991. Diversified patterns of substrate peroxidation in *Pinus sylvestris* and other species, a developmental comparative study. En Biochemical, Molecular, and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. University M. Curie-Sklodowska Lublin, Poland and University of Geneva, Switzerland. 305-314.

Mauch, F.; Hadwiger, L.A.; Boller, T. 1984. Ethylene: symptom, not signal for the induction of chitinase and B-1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. *Plant Physiol.* 76: 607-611.

Mazza, G.; Welinder, K.G. 1980. Covalent structure of turnip peroxidase 7. Cyanogen bromide fragments, complete structure and comparison to horseradish peroxidase c. *Eur. J. Biochem.* 108: 481-489.

McDougall, G.J. 1991. Cell-wall-associated peroxidases and lignification during growth of flax fibres. *J. Plant Physiol.* 139: 182-186.

McDougall, G.J. 1992. Changes in cell wall-associated peroxidases during lignification of flax fibres. *Phytochemistry* 31: 3385-3389.

McDougall, G.J. 1993. Accumulation of wall-associated peroxidases during wound-induced suberization of flax. *J. Plant Physiol.* 142: 651-656.

Mehlhorn, H.; Lelandais, M.; Korth, H.G.; Foyer, C.H. 1996. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Letters* 378: 203-206.

Miller, H.L. ; Neese, P.A. ; Ketring, D.L. ; Dillwith, J.W. 1994. Involvement of ethylene in aphid infestation of barley. *J. of Plant Growth Regulation* 13 : 167-171.

Moerschbacher, B.M.; Noll, U.; Gorrichon, L.; Reisener, H-J. 1990. Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust. *Plant Physiol.* 93: 465-470.

- Narayana, I.; Lalonde, S.; Saini, H.S. 1991. Water-stress-induced ethylene production in wheat. *Plant Physiol.* 96: 406-410.
- O' Donnell, P.J.; Calvert, C.; Atzorn, R.; Wasternack, C.; Leyser, H.M.O.; Bowles, D.J. 1996. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 274: 1914-1917.
- Pang, A.; Catesson, A-M.; Francesch, C.; Rolando, C.; Goldberg, R. 1989. On substrate specificity of peroxidases involved in the lignification process. *J. Plant Physiol.* 135: 325-329.
- Penel, C.; Greppin, H. 1994. Binding of plant isoperoxidases to pectin in the presence of calcium. *FEBS Letters* 343: 51-55.
- Peña-Cortés, H.; Willmitzer, L. 1995. The role of hormones in gene activation in response to wounding. P.J. Davies (ed.), *Plant Hormones*. Netherlands 395-414.
- Polle, A.; Otter, T.; Seifert, F. 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol.* 106: 53-60.
- Prasad, T.K.; Anderson, M.D.; Stewart, C.R. 1995. Localization and characterization of peroxidases in the mitochondria of chilling-acclimated maize seedlings. *Plant Physiol.* 108: 1597-1605.
- Rasmussen, C.B.; Henriksen, A.; Abelskov, A.K.; Jensen, R.B.; Rasmussen, S.K.; Hegaard, J.; Welinder, K.G. 1997. Purification, characterization and stability of barley grain peroxidase BP 1, a new type of plant peroxidase. *Physiol. Plant.* 100: 102-110.
- Rasmussen, J.B.; Hammerschmidt, R.; Zook, M.N. 1991. Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol.* 97: 1342-1347.
- Raz, V.; Fluhr, R. 1993. Ethylene signal is transduced via protein phosphorylation events in plants. *Plant Cell* 5: 523-530.
- Ridge, I.; Osborne, D.J. 1970. Hydroxyproline and peroxidases in cell walls of *Pisum sativum*: regulation by ethylene. *J. Exp. Bot.* 21: 843-856.
- Riquelme, A. y Cardemil, L. 1993. Peroxidases in the cell walls of seeds and seedlings of *Araucaria araucana*. *Phytochemistry* 32: 15-20.
- Robb, J.; Lee, S.W.; Nazar, R.N.; Mohan, R.; Kolattukudy, P.E. 1991. Chemical characterization of stress-induced vascular coating. *Plant Physiol.* 97: 526-536.

- Ros Barceló, A.; Munoz, R.; Sabater, F. 1987. Lupin peroxidases. I. Isolation and characterization of cell-wall-bound isoperoxidase activity. *Physiol. Plant.* 71: 448-454.
- Ros Barceló, A.; Pedreño, M.A.; Muñoz, R.; Sabater, F. 1988. Lupin peroxidases. II. Binding of acidic isoperoxidases to cell walls. *Physiol. Plant.* 73: 238-244.
- Ros Barceló, A.; Ferrer, M.A.; Florenciano, E.G.; Muñoz, R. 1991. The tonoplast localization of two basic isoperoxidases of high pI in *Lupinus*. *Bot Acta.* 104: 272-278.
- Russo, V.M. y Bushnell, W.R. 1989. Responses of barley cells to puncture by microneedles and to attempted penetration by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Can. J. Bot.* 67: 2912-2921.
- Saeki, K.; Ishikawa, O.; Fukuoka, T.; Nakagawa, H.; Kai, Y.; Kakuno, T.; Yamashita, J.; Kasai, N.; Horio, T. 1986. Barley leaf peroxidase: Purification and characterization. *J. Biochem.* 99: 485-494.
- Sánchez, M.; Peña, M.J.; Revilla, G.; Zarra, I. 1996. Changes in dehydrodiferulic acids and peroxidase activity against ferulic acid associated with cell walls during growth of *Pinus pinaster* hypocotyls. *Plant Physiol.* 111: 941-946.
- Sánchez, O.J.; Pan, A.; Nicolás, G.; Labrador, E. 1989. Relation of cell wall peroxidase activity with growth in epicotyl of *Cicer arietinum*. Effects of calmodulin inhibitors. *Physiol. Plant.* 75: 275-279.
- Schloss, P.; Walter, C.; Mäder, M. 1987. Basic peroxidases in isolated vacuoles of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 170: 225-229.
- Shualev, V.; León, J.; Raskin, I. 1995. Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? *Plant Cell* 7: 1691-1701.
- Smith, J.A.; Hammerschmidt, R.; Fulbright, D.W. 1991. Rapid induction of systemic resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 38: 223-235.
- Summers, J.E.; Voesenek, L.A.C.J.; Blom, C.W.P.M.; Lewis, M.J.; Jackson, M.B. 1996. *Potamogeton pectinatus* is constitutively incapable of synthesizing ethylene and lacks 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase. *Plant Physiol.* 111: 901-908.
- Svalheim, O. y Robertsen, B. 1990. Induction of peroxidases in cucumber hypocotyls by wounding and fungal infection. *Physiol. Plant.* 78: 261-267.

- Tadeo, R.F. y Primo-Millo, E. 1990. Peroxidase activity changes and lignin deposition during the senescence process in *Citrus* stigmas and styles. *Plant Science* 68: 47-56.
- Takahama, U.; Egashira, T. 1991. Peroxidases in vacuoles of *Vicia faba* leaves. *Phytochemistry* 30: 73-77.
- Torsethaugen, G.; Pitcher, L.H.; Zilinskas, B.A. Pell, E.J. 1997. Overproduction of ascorbate peroxidase in the tobacco chloroplast does not provide protection against ozone. *Plant Physiol.* 114: 529-537.
- Triplett, B.A. y Mellon, J.E. 1992. Purification and characterization of anionic peroxidases from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Science* 81: 147-154.
- Valero, P.; Nicolás, G.; Labrador, E. 1991. Variations of cell wall peroxidases in epicotyls of *Cicer arietinum* during growth. *Plant Science* 74: 171-178.
- Valpuesta, V.; Quezada, M.A.; Sánchez-Roldán, C.; Tigier, H.A.; Heredia, A.; Bukovac, M.J. 1991. Involvement of peroxidase isoenzymes in the growth of peach fruits. En *Biochemical, Molecular, and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. University M. Curie-Sklodowska Lublin, Poland and University of Geneva, Switzerland. 315-324.
- van Huystee, R.B. y Zheng, X. 1995. Peanut peroxidase, its location and extensin, coniferyl oxidation. *Plant Physiol. Biochem.* 33: 55-60.
- Welfinder, K.G. 1979. Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. Amino and carboxyl termini, cyanogen bromide and tryptic fragments, the complete sequence, and some structural characteristics of horseradish peroxidase c. *Eur. J. Biochem.* 96: 483-502.
- Whetten, R. y Sederoff, R. 1995. Lignin biosynthesis. *The Plant Cell* 7: 1001-1013.
- Xu, Y. y van Huystee, R. B. 1993. Association of calcium and calmodulin to peroxidase secretion and activation. *J. Plant Physiol.* 141: 141-146.
- Zheng, X y van Huystee, R. B. 1992. Peroxidase-regulated elongation of segments from peanut hypocotyls. *Plant Science* 81: 47-56.
- Zmrhal, Z. y Machácková, I. 1978. Isolation and characterization of wheat peroxidase isoenzyme B1. *Phytochemistry* 17: 1517-1520.