

UCH-RC
DOC-B
6643e
c.1

**EFFECTO DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO SOBRE PEROXIDASAS
DE LA PARED CELULAR DE COLEOPTILOS DE AVENA**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias



por

Luis Fernando González López

Mayo, 1998

Director de Tesis : Dr. M. Cecilia Rojas G.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato :

LUIS FERNANDO GONZÁLEZ LÓPEZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 28 de Julio de 1998.

Director de Tesis :

Dra. M. Cecilia Rojas

M. Cecilia Rojas

Comisión de Evaluación de la Tesis :

Dr. Jorge Babul

Jorge Babul

Dr. Juan Brunet

Juan Brunet

Dra. Loreto Holuigue

Loreto Holuigue

Dr. Octavio Monasterio

Octavio Monasterio

Dr. Hermann Niemeyer M.

Hermann Niemeyer



Dedicado

Al abnegado y valioso esfuerzo de los estudiantes de postgrado

AGRADECIMIENTOS

Mantengo muy profundos sentimientos de agradecimientos a mis primeros profesores de la Universidad de Talca, que aun con las limitaciones y dificultades de otros tiempos me dejaron la inquietud por la labor científica que he desarrollado desde entonces.

Mis sinceros agradecimientos a M. Cecilia Rojas por su dedicación y preocupación, no sólo por mi trabajo, sino también por mi persona a pesar de los contratiempos y diferencias que logramos superar constructivamente.

Durante el tiempo y dedicación invertido en este proceso formativo, no puedo dejar de reconocer la participación del profesor Hermann Niemeyer M., quien me brindó el alentador estímulo y confianza en mi trabajo, así como a los profesores Liliana Cardemil y Luis Corcuera, por su constante apoyo incondicional y por mostrarme parte del mundo vegetal. En especial a los profesores Hermann Niemeyer F., Jorge Babul y Octavio Monasterio, quienes estimularon mi interés por la bioquímica.

A mis amigos y a María Antonieta que aliviaron la angustia de los momentos menos gratos.

Mi deuda de gratitud es infinita con el Dr. Norman Lewis y la Dra. Laurence Davin del *Biochemistry Institute* en *Washington State University*, al otorgarme todas las facilidades para trabajar en su laboratorio, desde el financiamiento de mi estadía hasta la amable acogida en su hogar.

Finalmente, mis agradecimientos por el financiamiento de esta tesis son para Conicyt a través del proyecto Fondecyt 2950050 y para la Vicerrectoría académica, Depto. Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile.

INDICE DE MATERIAS

Título	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Índice de materias	iv
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xiii
Lista de abreviaciones	xvi
RESUMEN	xviii
ABSTRACT	xxii
1.0 INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Características generales de la actividad peroxidasa</i>	1
1.2 <i>Distribución y localización subcelular de peroxidasas</i>	3
1.3 <i>Heterogeneidad molecular de la actividad peroxidasa</i>	5
1.4 <i>Mecanismo catalítico de peroxidasas</i>	6
1.5 <i>Biogénesis del H₂O₂ en la pared celular</i>	9
1.6 <i>Función de la actividad peroxidasa en plantas</i>	11
1.6.1 <i>Crecimiento vegetal</i>	13
1.6.2 <i>Estructura de pared celular primaria y el origen de su extensibilidad</i>	14

1.6.3 <i>Papel de la actividad peroxidasa en las características físicas y químicas de la pared celular</i>	15
1.7 <i>Reguladores del crecimiento y modulación de la actividad peroxidasa de la pared celular</i>	17
2.0 MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1 <i>Material vegetal</i>	22
2.2 <i>Extracción de peroxidasas intercelulares</i>	22
2.3 <i>Obtención y purificación de paredes celulares para extracción enzimática</i>	22
2.4 <i>Extracción de peroxidasas unidas a la pared celular</i>	23
2.5 <i>Cromatografía de intercambio iónico</i>	24
2.6 <i>Preparación de paredes celulares para extracción de fenoles y lignina</i>	24
2.7 <i>Extracción y determinación de ácidos ferúlico y diférulico unido a la pared celular</i>	25
2.8 <i>Determinación de lignina</i>	26
2.9 <i>Ensayo de actividad peroxidasa</i>	26
2.10 <i>Formación y descomposición del CIII</i>	28
2.11 <i>Isoelectroenfoque</i>	28
2.12 <i>Ensayo de actividad de enzimas antioxidantes</i>	29
2.13 <i>Determinación de glutatión reducido y oxidado</i>	30

2.14 <i>Determinación de proteínas modificadas oxidativamente</i>	31
2.15 <i>Determinación de peroxidación de lípidos</i>	32
2.16 <i>Tratamiento de coleoptilos de avena con AIA o DIMBOA</i>	33
2.17 <i>Análisis estadísticos</i>	34
3.0 RESULTADOS	34a
3.1 DISTRIBUCIÓN DE PEROXIDASAS EN EL COMPARTIMENTO DE LA PARED CELULAR Y SU PARTICIPACIÓN EN LA SÍNTESIS DE DIFERULATO Y LIGNINA	34a
3.1.a <i>Obtención de paredes celulares y actividad peroxidasa asociada</i>	34a
3.1.b <i>Reacciones catalizadas por la actividad peroxidasa asociada a la pared celular y relacionadas a la síntesis de diferulato y lignina</i>	38
3.1.c <i>Patrón isoenzimático de peroxidasas asociadas a la pared celular</i>	45
3.1.d <i>Relación entre la actividad peroxidasa y la acumulación de diferulato y lignina en la pared celular</i>	48
3.1.d.1 <i>Separación de fenoles esterificados a las paredes celulares de avena mediante HPLC</i>	48
3.1.d.2 <i>Actividad peroxidasa y polímeros fenólicos en paredes celulares de segmentos de coleoptilos de avena</i>	51
3.2 REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y PEROXIDASAS DE PARED CELULAR.	55

3.2.a. AIA, auxina estimuladora del crecimiento	55
3.2.a.1. <i>La auxina AIA estimula el crecimiento de coleoptilos de avena</i>	55
3.2.a.2. <i>El AIA disminuye la actividad peroxidasa de pared celular en coleoptilos de avena</i>	55
3.2.a.3. <i>El AIA altera el patrón de isoformas con actividad peroxidasa asociada a la pared celular de coleoptilos de avena</i>	60
3.2.a.4 <i>Utilización de AIA y fenoles por isoperoxidasas ácidas y básicas de la pared celular</i>	64
3.2.a.5 <i>Acumulación de diferulato lignina en paredes celulares de coleoptilos de avena tratados con AIA</i>	69
3.2.b DIMBOA, ácido hidroxámico inhibidor del crecimiento	72
3.2.b.1. <i>DIMBOA inhibe el crecimiento de coleoptilos de avena</i>	72
3.2.b.2 <i>DIMBOA estimula la oxidación de NADH catalizada por peroxidases de pared celular</i>	74
3.2.b.3 <i>Acumulación de lignina y ácido diférulico en paredes celulares de coleoptilos de avena tratados con DIMBOA</i>	86
3.2.b.4 <i>DIMBOA aumenta el estatus oxidativo celular</i>	89
4.0 DISCUSIÓN	102
4.1 <i>Participación de las peroxidases iónicas en la modulación de la estructura de pared celular</i>	103

<i>4.2 Control del AIA sobre la actividad peroxidasa de la pared celular</i>	105
<i>4.3 Participación del AIA en los procesos de la pared celular que determinan la elongación celular y su relación con la actividad peroxidasa</i>	106
<i>4.4 Potencial daño oxidativo en el tejido tratado con AIA</i>	110
<i>4.5 Papel del DIMBOA en la actividad peroxidasa de pared celular y la relación con su efecto de inhibición del crecimiento</i>	114
<i>4.6 DIMBOA impide la continuidad del proceso de elongación celular. Inducción de un estado de estrés oxidativo.</i>	117
5.0 CONCLUSIONES	125
6.0 REFERENCIAS	128

Lista de Figuras

- Figura 1 :** Ciclo oxidativo y peroxidativo en las reacciones catalizadas por peroxidasas. 8
- Figura 2 :** Diagrama esquemático de las posibilidades de entrecruzamiento covalente de polisacáridos y lignina en la pared celular. 16
- Figura 3 :** Efecto de H_2O_2 y catalasa en el curso temporal de la oxidación de NADH estimulada por ácido ferúlico y catalizada por peroxidasas de la fracción iónica de la pared celular de coleoptilos de avena. 45
- Figura 4 :** Secuencia de aparición del patrón de isoformas con actividad peroxidasa en un gel de IEF durante la tinción con *o*-PDA y H_2O_2 . 47
- Figura 5 :** Patrón de isoformas con actividad peroxidasa contenidas en las fracciones covalente, iónica e intercelular de paredes celulares de coleoptilos de avena. 48
- Figura 6 :** Separación de compuestos fenólicos de la pared celular mediante HPLC. 50
- Figura 7 :** Acumulación de diferulato y actividad peroxidasa en la fracción iónica y covalente de paredes celulares durante el tiempo de incubación de segmentos de coleoptilos de avena. 52
- Figura 8 :** Acumulación de lignina y diferulato en paredes celulares durante el

fracción iónica separadas por cromatografía de intercambio catiónico.	66
Figura 17 : Niveles de ácidos diferúlico y ferúlico en paredes celulares de coleoptilos de avena durante el tiempo de incubación con AIA.	70
Figura 18 : Niveles de lignina en paredes celulares de coleoptilos de avena durante el tiempo de incubación en presencia o ausencia de AIA.	71
Figura 19 : Inhibición del crecimiento de segmentos de coleoptilos de avena por DIMBOA.	73
Figura 20 : Estimulación por DIMBOA del consumo de oxígeno durante la oxidación de NADH catalizada por peroxidasas de la fracción iónica de la pared celular de coleoptilos de avena.	77
Figura 21 : Curso temporal de la reacción de oxidación de NADH catalizada por peroxidasas de la fracción iónica en presencia de DIMBOA.	79
Figura 22 : Barridos espectrales en la oxidación de NADH en presencia de DIMBOA y catalizada por peroxidasas de la pared celular de coleoptilos de avena.	80
Figura 23 : Cambios espectrales en la formación del CIII de la peroxidasa de rábano con NADH y en su descomposición en presencia de DIMBOA.	84
Figura 24 : Descomposición del CIII de la peroxidasa de rábano por DIMBOA o ácido <i>p</i> -cumárico.	85

	tiempo de incubación de segmentos de coleoptilos de avena	53
Figure 9 :	Razón ferulato a diferulato en paredes celulares de segmentos de coleoptilos de avena a diferentes tiempos de incubación.	54
Figura 10 :	Crecimiento de segmentos de coleoptilos de avena después de 24 h de incubación con AIA.	57
Figura 11 :	Variación en el peso fresco o seco de segmentos de coleoptilos de avena durante el tiempo de incubación en presencia o ausencia de AIA.	58
Figura 12 :	Disminución de la actividad peroxidasa en las fracciones de pared celular de coleoptilos de avena durante el tiempo de incubación con AIA.	59
Figura 13 :	Patrón de IEF de isoformas con actividad peroxidasa contenida en la fracción iónica de paredes celulares de coleoptilos controles y tratados con AIA.	61
Figura 14 :	Patrón de IEF de isoformas con actividad peroxidasa contenida en la fracción covalente de paredes celulares de coleoptilos controles y tratados con AIA.	62
Figura 15 :	Patrón de IEF de isoformas con actividad peroxidasa contenida en la fracción intercelular de paredes celulares de coleoptilos controles y tratados con AIA.	63
Figura 16 :	Patrón de IEF de los grupos de isoformas ácidas y básicas de la	

- Figura 25 :** Niveles de ácidos diferúlico y ferúlico en paredes celulares de coleoptilos de avena durante el tiempo de incubación con DIMBOA. 87
- Figura 26 :** Niveles de lignina en paredes celulares de coleoptilos de avena durante el tiempo de incubación en presencia o ausencia de DIMBOA. 88
- Figura 27 :** Actividad catalasa y ascorbato peroxidasa en extractos (líquido sobrenadante 10.000 xg) de coleoptilos de avena durante el tiempo de incubación en presencia o ausencia de DIMBOA. 91
- Figura 28 :** Actividad superóxido dismutasa en extractos (líquido sobrenadante de 10.000 xg) de coleoptilos de avena durante el tiempo de incubación en presencia o ausencia de DIMBOA. 92
- Figura 29 :** Niveles de lípidos peroxidados en coleoptilos de avena durante el tiempo de incubación en presencia o ausencia de DIMBOA. 93
- Figura 30 :** Niveles de carbonilos en proteínas modificadas oxidativamente en coleoptilos de avena durante la incubación en presencia o ausencia de DIMBOA. 94
- Figura 31 :** Variación de los niveles de glutatión reducido y oxidado en segmentos de coleoptilos de avena sometidos a distintos tratamientos. 98
- Figura 32 :** Razón de los niveles de glutatión reducido a oxidado en segmentos

de coleoptilos de avena sometidos a distintos tratamientos.	99
Figura 33 : Variación de los niveles de glutatión reducido y oxidado en coleoptilos de avena pretratados con AMT y sometidos a distintos tratamientos.	100
Figura 34 : Razón de los niveles de glutatión reducido a oxidado en coleoptilos de avena pretratados con AMT y sometidos a distintos tratamientos.	101
Figura 35 : Esquema de reactividad del grupo electrófilo en la forma abierta del DIMBOA en equilibrio con la forma hemiacetálica cíclica.	122

Lista de Tablas

- Tabla 1 :** Purificación de paredes celulares de coleoptilos de avena.
Exhaustividad de los lavados con Triton X-100. 35
- Tabla 2 :** Actividad de enzimas marcadoras en fracciones de pared celular
obtenidas por el procedimiento de lavado con Triton X-100 o por
infiltración al vacío de los coleoptilos. 36
- Tabla 3 :** Actividad peroxidasa asociada al compartimento de la pared
celular en coleoptilos de avena. 37
- Tabla 4 :** Utilización de sustratos fenólicos por peroxidosas contenidas en
las fracciones iónica y covalente de la pared celular de coleoptilos
de avena. 42
- Tabla 5 :** Utilización de H_2O_2 y NADH por peroxidosas contenidas en la
fracción iónica y covalente de paredes celulares de coleoptilos de
avena. 43
- Tabla 6 :** Estimulación por fenoles de la oxidación de NADH catalizada por
peroxidosas de la fracción iónica y covalente de paredes celulares
de coleoptilos de avena. 44
- Tabla 7 :** Separación de isoformas ácidas y básicas de peroxidasa desde la
fracción iónica de paredes celulares de coleoptilos de avena por

	cromatografía en carboximetil sepharose.	67
Tabla 8 :	Utilización de AIA, sustratos fenólicos y H ₂ O ₂ por isoperoxidasas ácidas y básicas de la fracción iónica de pared celular de coleoptilos de avena.	68
Tabla 9 :	Estimulación por DIMBOA de la oxidación de NADH catalizada por peroxidasas de la pared celular de coleoptilos de avena.	74
Tabla 10 :	Oxidación de NADH catalizada por peroxidasas de la fracción iónica de la pared celular de coleoptilos de avena en presencia de DIMBOA e inhibidores de la actividad peroxidasa.	76
Tabla 11 :	Utilización de DIMBOA en presencia de H ₂ O ₂ por peroxidasas de la pared celular de coleoptilos de avena.	81

ABREVIACIONES

AHX	ácido hidroxámico
AIA	ácido indol-3-acético
AMT	3-amino-1,2,4-triazol
ascpx	ascorbato peroxidasa
BSA	seroábumina de bovino
CA	coniferil alcohol
CIII	compuesto III
2,4-D	2,4-diclorofenoxi acético
DFA	ácido diferúlico o diferulato
DIMBOA	2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-(nitrobenzoico)
E _{0.5}	concentración de semisaturación del compuesto estimulador de la oxidación de NADH.
E-FA	ácido trans-ferúlico
FC	fracción covalente de pared celular
FI	fracción iónica de pared celular
Fint	fracción de fluido intercelular
GSH	glutación reducido

GSSG	glutación oxidado
GST	glutación transferasa
g tf	gramo de tejido fresco
g ps	gramo de tejido seco
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
IEF	isoelectroenfoque
MES	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
NADH	β -nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NBT	azul de p-nitro tetrazolio
<i>o</i> -PDA	orto-fenilendiamina
<i>p</i> -CA	ácido para-cumárico
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
px(s)	peroxidasa(s)
S _{0.5}	concentración de semisaturación del sustrato.
SDS	dodecil sulfato de sodio
SOD	superóxido dismutasa
TBA	ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
t _R	tiempo de retención
Up _x	unidad de actividad peroxidasa
2-VP	2-vinilpiridina

RESUMEN

La actividad peroxidasa (px) asociada a la pared celular participa en la regulación del crecimiento vegetal al catalizar la formación de lignina y puentes diferulato (DFA), proceso que disminuye la libertad de movimiento de la matriz de polisacáridos y la propiedad extensible de la pared celular. La actividad px de la pared celular también participaría en la generación de H_2O_2 a partir de NADH y O_2 , oxidante necesario para las reacciones de polimerización fenólica. En consecuencia con este fenómeno, existe una bien documentada relación entre pxs y la limitación del crecimiento vegetal. Así entonces, usando como material vegetal el coleoptilo de avena, se estudió las pxs de pared en relación al efecto de ciertos compuestos naturales que modifican el crecimiento, tales como el ácido indolacético (AIA), que lo estimula y el ácido hidroxámico DIMBOA, que lo inhibe. Se asumió la hipótesis que compuestos que afectan el crecimiento (AIA y DIMBOA), afectarían también la actividad de pxs y el nivel de polímeros fenólicos generados por éstas en las paredes celulares.

Empleando un método basado en exhaustivos lavados con Tritón X-100, un detergente no iónico, se obtuvo un sedimento de paredes celulares libres de contaminantes que normalmente co-purifican con éstas (mitocondrias, plasmalema, retículo endoplásmico). El sedimento de pared purificado contenía cerca de un 0,6% de la actividad px total presente en el coleoptilo. La actividad px pudo ser liberada de la pared, aumentando la fuerza iónica (fracción iónica) o bien destruyendo la estructura de los

polisacáridos de la pared (fracción covalente). También fue posible obtener una tercera fracción de pared, que contenía un 0,4% del total de actividad px en el coleoptilo, infiltrando el tejido intacto con una solución de CaCl_2 20 mM (fracción intercelular). Las pxs de las fracciones iónica y covalente de pared fueron caracterizadas cinéticamente en la utilización de sustratos fenólicos precursores de DFA y lignina, H_2O_2 y en la oxidación de NADH por O_2 , así como en su composición de isoformas a través de isoelectroenfoque. Estos estudios revelaron diferencias cinéticas que sugieren una mayor relevancia de las pxs iónicas por sobre las covalentes, en la formación de DFA y lignina en la pared celular. Esta idea fue apoyada cuando en paredes de segmentos de coleoptilos en crecimiento se observó que la actividad px en la fracción iónica aumentó cerca de un 50% por sobre la covalente, aumento que precedió a la acumulación de DFA y lignina.

Al estudiar el efecto del AIA a una concentración fija de la hormona que produce cerca de la máxima elongación de los coleoptilos de avena (40 μM), se encontró que la actividad px de la pared disminuyó desde la primera hora de tratamiento hasta alcanzar un 60-70% de disminución después de 22 h. La inhibición de la actividad px fue mayor en cerca de un 30%, en la fracción iónica e intercelular con respecto a la covalente. Sin embargo, durante este período, el AIA no modificó los niveles de DFA y lignina en las paredes celulares, pero alteró notablemente la composición de isoformas de la actividad px asociada a las fracciones de pared. El AIA disminuyó preferencialmente la actividad de isoformas ácidas de px ($\text{pI} \sim 4,0-5,5$) en las tres fracciones de pared analizadas. Las isoformas ácidas presentaron una mayor eficacia de oxidación del AIA con respecto a las isoformas básicas. Así parece ser que el efecto del AIA sobre la actividad de las pxs, más

que modificar las propiedades físicas y químicas de la pared celular, minimizaría el potencial daño oxidativo derivado de la oxidación del AIA en presencia de pxs, una reacción que genera especies radicalarias y H_2O_2 . El potencial daño en las cercanías de la membrana pondría en riesgo la integridad celular; de modo que la respuesta de inhibición de la actividad px en la pared inducida por el AIA, sería de crucial importancia durante el crecimiento de tejidos juveniles, como el coleoptilo, habitualmente expuestos a altas concentraciones de AIA.

Finalmente, al estudiar el efecto del DIMBOA, se encontró que este compuesto inhibió notablemente el crecimiento de los coleoptilos de avena, a la vez que estimuló la oxidación de NADH catalizada por pxs de la pared celular. Esta reacción acumuló H_2O_2 , producto de la efectiva descomposición provocada por DIMBOA, de una forma catalíticamente inactiva en la oxidación de NADH, el denominado compuesto III. El H_2O_2 formado en esta reacción, incrementó los niveles de DFA y lignina en las paredes de coleoptilos en un 30% y 55%, respectivamente, durante las primeras 10 h de tratamiento con DIMBOA. Sin embargo, el exceso de H_2O_2 formado y posibles efectos tóxicos del DIMBOA *per se*, indujeron en los coleoptilos un estado de estrés oxidativo, evidenciado por la disminución de la actividad de enzimas antioxidantes (catalasa y ascórbico peroxidasa), disminución de glutatión reducido y aumento del glutatión oxidado, además de un incremento en los niveles de lípidos y proteínas modificadas oxidativamente. Así, el efecto del DIMBOA sobre las pxs en la generación de H_2O_2 , daría cuenta del marcado efecto inhibitorio del crecimiento que presenta este ácido hidroxámico: en períodos cortos, favorecería la acumulación de polímeros fenólicos en la pared; mientras que en

períodos más largos, promovería un estado de estrés oxidativo inducido por la acumulación de H_2O_2 y especies radicalarias derivadas del peróxido.

En síntesis, los resultados de esta tesis indican que las pxs son blanco de los reguladores del crecimiento AIA y DIMBOA, los que modifican la actividad de pxs de la pared celular y su participación en el proceso de elongación de los coleótilos de avena.

ABSTRACT

The wall bound peroxidase (px) activity participate in the regulation of plant growth by catalyze the formation of the phenolic polymers, lignin and diferulate bridges (DFA), process which decrease both the mobility of the polysaccharide matrix and the extensible property of the cell wall. Wall bound px activity would also participate in the generation of H_2O_2 from NADH and O_2 , oxidant needed for the phenolic polymerization reactions. In agreement with this phenomenon, a well documented relationship exists between px activity and plant growth limitation. So then, using oat coleoptiles as plant material, the wall pxs were studied in relation to the effect of certain natural compounds that modify plant growth, such as indolacetic acid (IAA), which stimulates growth, and the hydroxamic acid DIMBOA, which inhibits it. It was assumed the hypothesis that compounds that affect growth (AIA and DIMBOA), would also alter px activity as well as the level of phenolic polymers generated by them in the cell walls.

Utilizing a method of washes of wall fragments with Triton X-100, a non-ionic detergent, it was possible to get a cell wall pellet free of normally co-purifying contaminants (mitochondria, plasma membrane, endoplasmic reticulum). The purified cell wall pellet contained around 0.6% of the total px activity present in the oat coleoptile. Px activity could be released from the walls by increasing the ionic strength (ionic fraction) or by destroying the wall polysaccharide structure (covalent fraction). It was also possible to get a third wall fraction, containing 0.4% of total px activity in the

coleoptile, by vacuum-infiltration of the intact tissue with 20 mM CaCl₂ (intercellular fraction). The ionic and covalent cell wall fractions were kinetically characterized in their rates of utilization of phenolic substrates precursor of DFA and lignin, H₂O₂ and NADH oxidation, as well as in their px isoform composition through isoelectrofocusing. These studies revealed kinetic differences suggesting a higher relevance of the ionic pxs than the covalent ones in the DFA and lignin synthesis at the cell wall. This proposal was supported by the fact that the ionically bound px increased 50% over the covalently bound in walls of growing coleoptile segments, increase that preceded the DFA and lignin accumulation.

Studying the effect of IAA, at a fixed hormone concentration (40 μM), which produces almost maximal oat coleoptile elongation, it was found that wall bound px activity diminished from the first hour of treatment reaching a 60-70% decrease after 22 h. The inhibition of px activity was 30% higher in the ionic and intercellular fractions than in the covalent one. However, during this period, the IAA did not modify DFA and lignin levels in the cell walls, but it altered notably the isoform composition of the px activity associated to the cell wall fractions. The IAA diminished preferentially the px activity of acidic isoforms (pI~ 4.0-5.5) in the three wall fractions analyzed. The acidic isoforms showed a higher efficacy of IAA oxidation with respect to basic isoforms. Thus it seem to be that the hormonal effect on px activity, rather than to modify the physical and chemical cell wall properties, could be related to prevent the potential oxidative damage derived from the IAA oxidation by pxs, a reaction generating radical species and H₂O₂. The potential damage near the plasma membrane would risk the cellular integrity; so that, the

inhibition response of wall bound pxs induced by IAA would be of crucial importance during the growth of young tissues, like the coleoptile, constantly exposed to high IAA concentrations during the development.

Lastly, studying the effect of DIMBOA, it was found that this compound effectively inhibited the oat coleoptile growth, and stimulated at the same time the NADH oxidation catalyzed by wall-bound pxs. This reaction accumulated H_2O_2 , as result of the effective decomposition of compound III induced by DIMBOA, an inactive catalytic form of px in the NADH oxidation. The H_2O_2 generated through this reaction increased the DFA and lignin levels in the walls of oat coleoptiles by 30% and 55%, respectively, during the first 10 h of treatment with DIMBOA. However, the excess of H_2O_2 generated and possibly some toxic effects of DIMBOA *per se*, induced an oxidative stress state in the coleoptiles, as evidenced by the decrease of antioxidant enzyme activities (catalase, ascorbate peroxidase), the decrease of reduced glutathione and increase of oxidized glutathione, as well as by increment in the levels of both oxidatively modified lipids and proteins. Thus, the effect of DIMBOA on pxs in the generation of H_2O_2 could account for the marked growth inhibitory effect induced by this hydroxamic acid: at short treatment times, it would favor the accumulation of phenolic polymers in the cell walls; while at longer times, it would promote an oxidative stress state induced by the H_2O_2 accumulation and radical species derived from the peroxide.

In synthesis, the outputs of this thesis work indicate that pxs are targets of the growth regulators IAA and DIMBOA, who modify the wall bound px activity and its participation in the elongation process of the oat coleoptiles.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Características generales de la actividad peroxidasa*

La actividad peroxidasa (px), en general, es desarrollada por enzimas que, aun cuando poseen sitios catalíticos completamente diferentes, pueden reducir el H_2O_2 a expensas de la oxidación de una amplia variedad de sustratos (Dunford y Stillman, 1976; van Huystee, 1987; Welinder, 1991). Así es como enzimas con grupos prostéticos hemínicos (ferriprotoporfirina) en el sitio activo, han sido clasificadas junto con pxs no hemínicas como oxidorreductasas dentro del grupo EC 1.11.1.x, donde x depende de la naturaleza del reductor utilizado (Welinder, 1991). Por ejemplo, se conocen ciertas pxs de algas café y rojas, líquenes y hongos, las cuales no poseen hemo como grupo prostético, sino vanadio (Vilter, 1984; De Boer y col., 1986). Estas enzimas, clasificadas con EC 1.11.1.8, catalizan la oxidación de bromuro y yoduro en presencia de H_2O_2 , por lo cual también han sido llamadas bromoperoxidasas (Vilter, 1984; De Boer y col., 1986; Almeida y col., 1996).

Entre las pxs con grupo hemo, se han distinguido tres diferentes superfamilias caracterizadas por poseer un plegamiento trimidimensional particular, originado probablemente de un gen ancestral único: las pxs de plantas (Mn-peroxidasa, ligno-peroxidasa, px de rábano, etc), pxs de animales (lactoperoxidasa, mieloperoxidasa, etc.) y las catalasas, con miembros entre las plantas y animales (Welinder, 1991; Welinder y col., 1992).

Las pxs de la superfamilia de plantas, contienen la secuencia conservada de residuos Arg-Leu-x-Phe-His-Asp en el sitio activo, donde x puede ser Val, His o Thr. En tanto, en las pxs de la superfamilia de animales y la superfamilia de catalasas, los residuos catalíticos conservados corresponden a Lys-Glu-His-Asn-Arg e His-Asn, respectivamente (Welinder, 1985; Welinder, 1991). Sin embargo, la gran diferencia de la superfamilia de catalasas con respecto a los otros grupos de peroxidases, es que el reductor que utilizan para descomponer el enlace O-O del peróxido es, precisamente, otra molécula de H₂O₂.

La familia de pxs de plantas se distribuye en tres clases de acuerdo a la identidad en la secuencia de aminoácidos (Welinder, 1991; Welinder y col., 1992) :

Clase I: comprende pxs de origen procariótico (citocromo *c* px de *P. aureginosa*)

Clase II: pxs extracelulares de hongos (Mn⁺²-peroxidasa, lignina-peroxidasa)

Clase III: pxs de secreción de plantas (px de rábano)

Al interior de la familia de pxs de plantas, las distintas clases agrupan enzimas con características estructurales únicas. Por ejemplo, destacan las características estructurales de la citocromo *c* px de levaduras (clase I): posee 2 grupos hemo unidos covalentemente a una cadena polipeptídica única y su actividad es independiente de Ca⁺², a diferencia de todas las pxs de plantas analizadas que requieren de este catión para mantener su estabilidad conformacional (Welinder, 1991; Fülöp, 1996). Las citocromo *c* pxs tampoco poseen puentes disulfuro, mientras que las pxs de plantas y animales poseen 4 altamente conservados, aunque entre ellas, los puentes se ubican en distintas regiones de la cadena polipeptídica (Welinder, 1991).

Otro ejemplo de la variedad estructural lo representa la ascorbato px (ascpx), denominada así por su alta especificidad en la oxidación de este sustrato. Esta enzima no es una glicoproteína, como la mayoría de las pxs de plantas y, además, presenta un átomo de Fe adicional no unido al grupo hemo (Asada, 1991; De Gara y col., 1996). Dadas las características estructurales de la ascpx citosólica y cloroplástica, más relacionadas a las pxs bacterianas y a la citocromo *c* px de levadura, ellas han sido clasificadas como pxs de la clase I.

Por su parte, la información acerca de pxs de monocotiledóneas es escasa y está relacionada a algunos estudios en cebada, donde se han caracterizado algunas isoenzimas básicas de pxs (Hejgaard y col., 1991). En comparación a las pxs de rábano, estas isoformas aisladas desde hojas de cebada poseen sólo un 50% de similaridad en la secuencia de aminoácidos, presentan un menor grado de glicosilación y un desplazamiento en la absorción máxima en la banda de Soret de 403 a 398 nm (Hejgaard y col., 1991). De este modo, estas isoformas de cebada podrían representar una nueva familia de pxs de plantas (Welinder, 1991) y constituye un estímulo a la investigación de pxs en monocotiledóneas.

1.2 Distribución y localización subcelular de peroxidasas

La actividad pxs en plantas está ampliamente distribuida en diferentes tejidos y órganos vegetales, tales como fluido de gutación, tejido xilématico y floemático, raíces, hipocotilos, coleoptilos, hojas, flores, frutos, polen, etc. (Shanon y col., 1966; Ros Barceló y col., 1987; van Huystee, 1987; Abeles y Biles, 1991; Gillikan y Graham, 1991).

También a nivel subcelular presentan una amplia distribución, encontrándose en la pared celular, membrana plasmática, membranas mitocondriales y de la fracción microsomal, tonoplasto, líquido vacuolar y peroxisomas, entre otros (Goldberg y col., 1985; Ros Barceló y col., 1987; Li y col., 1989; Takahama y Egashira, 1991; Rodgers y col., 1993; Miyake y Asada, 1992). Particularmente, las pxs en la pared celular se encuentran asociadas débilmente por enlaces iónicos o fuertemente atrapadas entre la red de polímeros estructurales. Estas últimas, sólo pueden liberarse al degradar enzimáticamente los polisacáridos de la pared (Goldberg y col., 1985; Ros Barceló y col., 1987). Las pxs también pueden encontrarse en contacto con la pared, solubles en el líquido apoplástico (Li y col., 1989; MacAdam y col., 1992).

La destinación de la enzima a diferentes compartimentos sub-celulares es un tema poco conocido y podría estar determinado por varios factores. Uno de ellos es la presencia de carbohidratos unidos a su estructura, los cuales pueden constituir entre 7 y 17% de su peso molecular (Chibbar y van Huystee, 1986; van Huystee, 1987). De hecho, al inhibir el proceso de glicosilación con tunicamicina en cultivos celulares de maní, la secreción de px hacia la pared fue notablemente disminuida (Ravi y col., 1986). También son importantes en la destinación de las pxs señales en la cadena polipeptídica, como en el transporte de pxs hacia la vacuola que está determinado por un péptido señal en el extremo carboxilo que las dirige hacia ese organelo (van Huystee, 1987). Más aún, la secreción de pxs es dependiente de Ca^{+2} y, en algunos casos, la presencia de Ca^{+2} determina la unión de pxs a membranas o pectinas de la pared celular (Penel, 1991; Xu y van Huystee, 1993; Penel y Greppin, 1994)

1.3 *Heterogeneidad molecular de las peroxidases*

La complejidad de isoformas con actividad px en un organismo, ha sido evidente desde la introducción de técnicas analíticas de electroforesis. Sin embargo, las distintas isoformas no son necesariamente producto de genes únicos o duplicación de los mismos, sino también podrían ser resultado de modificaciones post-traduccionales (heterogeneidad en el tipo y cantidad de carbohidratos unidos o procesamiento de secuencias C-terminales) así como de artefactos en la extracción de la enzima, tales como el entrecruzamiento con fenoles (van Huystee, 1987; Welinder, 1991; Wan y van Huystee, 1993).

De acuerdo a las características de carga neta en la molécula proteica, las isoformas son reconocidas como aniónicas (ácidas), neutras o catiónicas (básicas), las cuales pueden presentar características físicas y químicas particulares. Por ejemplo, las isoformas aniónicas y catiónicas en rábano y maní, difieren en su composición de aminoácidos y carbohidratos, movilidad electroforética, propiedades cinéticas y especificidad de sustrato (Shanon y col., 1966; Kay y col., 1966; van Huystee, 1987; Hu y col., 1990; Zheng y van Huystee, 1991). A pesar de estas diferencias, las principales isoformas de pxs aisladas desde raíces de rábano y nabo o desde cultivos celulares de tabaco y maní, presentan masas moleculares similares entre 38.000 y 45.000 (Welinder, 1985; Hu y col., 1990; Lang y col., 1990).

Las variadas isoformas de px están ampliamente distribuidas en diferentes compartimentos celulares, pero aún se desconocen, en gran medida, los mecanismos para el transporte específico a estos compartimentos (van Huystee, 1987). Muchas de estas

isoformas poseen un patrón de expresión que puede estar regulado por el desarrollo e influenciado por estímulos ambientales tales como temperatura, luz, infección por patógenos, hormonas vegetales, metales, herbicidas, gases atmosféricos (Mato, 1983; Castillo y Greppin, 1986; van Huystee, 1987; Karataglis y col., 1991; Martínez y col., 1996).

1.4 Mecanismo catalítico de peroxidases

Las pxs catalizan la oxidación de una amplia variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos en presencia de H_2O_2 (Dunford, 1976; Rodríguez y van Huystee, 1994). Además, las pxs de plantas pueden oxidar ciertos sustratos como NADH, AIA o hidroquinonas, utilizando como oxidante el oxígeno molecular (Yamazaki y Yokota, 1965; Halliwell, 1978). Ambos ciclos catalíticos en la misma enzima, denominados el ciclo peroxidativo y oxidativo, respectivamente, se representan esquemáticamente en la Fig. 1. En el ciclo peroxidativo, las pxs utilizan dos sustratos en un mecanismo cinético de ping-pong (Dunford, 1976): el H_2O_2 y un reductor del denominado CI, un complejo enzimático verdoso resultante de la unión del peróxido al grupo hemo de la enzima (reacción 1). Los principales eventos en el ciclo peroxidativo incluyen el rompimiento heterolítico del enlace O-O en el H_2O_2 , para liberar un átomo de oxígeno como H_2O y el otro se une al Fe hemínico. En este proceso se requiere la participación de 2 electrones, uno de los cuales proviene del átomo de Fe y así generar una especie ferril en donde el Fe hemínico se encuentra como Fe^{+4} , mientras que el segundo electrón es aportado por el anillo porfirínico o bien de la transferencia hacia éste desde la proteína (Dunford, 1976;

Ortiz de Montellano, 1992; Rodríguez y van Huystee, 1994). A continuación, el CI es reducido en dos pasos univalentes por un dador electrónico (AH), que en plantas es generalmente un compuesto fenólico, AIA o NADH. La primera reducción genera un intermediario rojo, el CII (reacción 2) y, en una segunda reducción, se regenera la enzima férrica (reacción 3) (Dunford, 1976; Ortiz de Montellano, 1992). Las correspondientes especies radicalarias del reductor difunden desde el sitio catalítico (Yamazaki y col., 1960)(A·, en reacciones 2 y 3), para dismutar espontáneamente o acoplarse para formar estructuras poliméricas (como en la formación de lignina)



Por otro lado, en el ciclo oxidativo de la enzima la oxidación de los sustratos procede a través de un complejo enzimático ferroso, el CIII. El CIII se forma por la reducción univalente del Fe hemínico por el sustrato dador de electrones (RH), junto con la oxigenación de la enzima (reacción 4 y 5):



El CIII, $\text{Px (Fe}^{+2} - \text{O}_2\text{)}$, es catalíticamente inactivo debido a su lenta descomposición ($k=2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) (Aguda y Larter, 1990), proceso que puede ser considerablemente

acelerado por fenoles para regenerar la enzima férrica y liberar el oxígeno como radical superóxido $O_2^{\cdot-}$ (reacción 6) (Halliwell, 1978). El ciclo oxidativo de las pxs es fuertemente dependiente de Mn^{+2} , el cual parece favorecer la dismutación del radical de oxígeno hacia H_2O_2 (Halliwell, 1978; Aguda y Larter, 1990), según:



El H_2O_2 producido puede ser utilizado luego por la enzima en su ciclo peroxidativo (reacciones 1-3 y Fig. 1), para oxidar el sustrato dador de electrones (RH) e incluso el mismo fenol que acelera la descomposición del CIII (Halliwell, 1978; Pedreño y col., 1988).

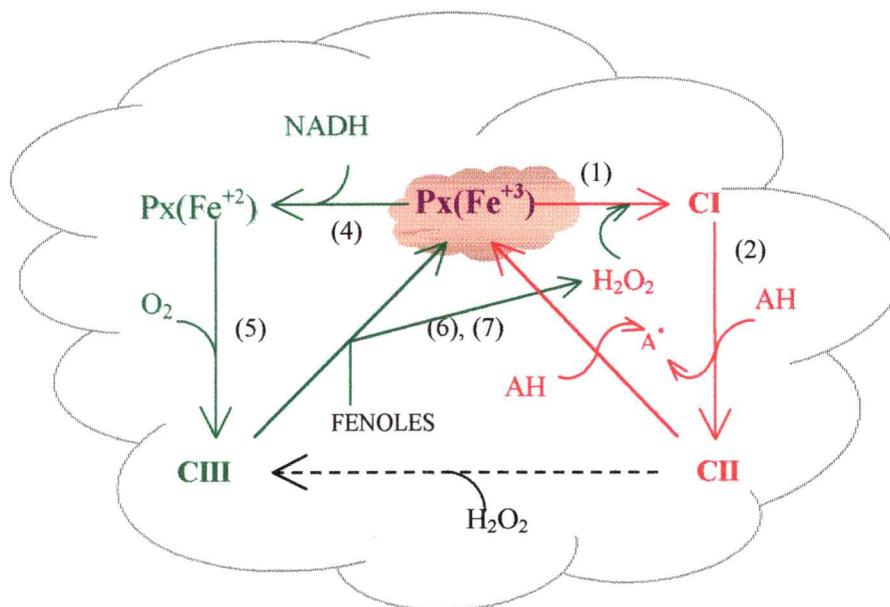


Figura 1: Ciclo oxidativo y peroxidativo en las reacciones catalizadas por peroxidasas. Px (Fe^{+3/+2}), peroxidasa en estado férrico o ferroso; CI, compuesto I; CII, Compuesto II; CIII, compuesto III; AH, dador de electrones (fenoles, AIA, NADH). Los números junto a las flechas hacen referencia a las reacciones descritas en el texto.

La existencia de este ciclo oxidativo-peroxidativo en la misma molécula enzimática, ha llevado a establecer la autosuficiencia del sistema de peroxidasas en la pared celular para llevar a cabo la polimerización oxidativa de fenoles y generar el H_2O_2 necesario para esta reacción (Pedreño y col., 1995). Sin embargo, es importante mencionar que otros mecanismos han sido postulados para la biogénesis del H_2O_2 requerido para la formación de polímeros fenólicos en la pared celular de plantas, como se describe a continuación.

1.5 Biogénesis del H_2O_2 en la pared celular.

Uno de los mecanismos de generación de H_2O_2 en la pared celular es a través del ciclo oxidativo de las peroxidasas, que se describió anteriormente. Este modelo está fuertemente apoyado por la presencia de pxs solubles en el líquido apoplástico y unidas a la pared celular (iónica y covalente) (Eltner y Heupel, 1976; Goldberg y col., 1985; Ros Barceló y col., 1987; Li y col., 1989; MacAdam y col., 1992) así como por la presencia de NAD, de cofactores fenólicos y Mn^{+2} en la pared celular (Hartley y Morrison, 1991; Shinkle y col., 1992). Además, existiría un continuo aporte de NADH en este compartimento a través de la actividad malato deshidrogenasa presente en la pared celular (Gross, 1977; Mäeder y Schloss, 1979).

También se ha propuesto la formación de H_2O_2 en la pared celular a través de la reducción de O_2 por NADH, mediada por coenzimas de flavina (Hwang 1982). En este mecanismo la coenzima (FMN o FAD), reducida por NADH reacciona con O_2 para generar peróxidos flavínicos, los cuales reemplazarían el H_2O_2 como oxidante en las

reacciones catalizadas por pxs. Sin embargo, se ha estimado que el proceso dependiente de FMN es menos eficiente que aquel dependiente de Mn^{+2} en la oxidación de NADH mediada por pxs (Stich y Eberman, 1984).

La autooxidación de fenoles podría constituir una fuente del H_2O_2 en la pared celular (Cohen y Heikkila, 1974; Misra y Fridovich, 1974). Jiang y Miles (1993) han propuesto que el H_2O_2 podría originarse en la oxidación de fenoles (catequina) por fenolasa o tirosinasa, reacción que genera especies ariloxi (quinonas) radicalarias capaces de reducir O_2 hasta H_2O_2 .

Por otro lado, Apostol y col. (1985) sugieren que el H_2O_2 podría originarse a nivel de la membrana a través de una NAD(P)H oxidasa; sin embargo, este modelo no concuerda con estudios citoquímicos que indican que el sistema generador de H_2O_2 coexiste con la actividad px de pared, independiente de la membrana (Goldberg y col., 1987; Czaninski y col., 1993). A pesar de esta evidencia, se ha propuesto que otro posible candidato para la biogénesis de H_2O_2 es la actividad superóxido dismutasa en la pared (Ogawa y col., 1996), la cual podría interactuar con el sistema de oxidasas de membrana para generar el H_2O_2 . Finalmente, se ha postulado que el H_2O_2 podría originarse a expensas de la oxidación aeróbica de AIA mediada por pxs de pared, en un mecanismo similar a la oxidación de NADH (Smith y col., 1982; Pedreño y col., 1988, 1995). Este modelo se apoya en que el AIA se encuentra soluble en el apoplasto, donde además es posible detectar productos de su descomposición peroxidativa (Pedreño y col., 1988; Sánchez-Bravo y col., 1988).

1.6 *Función de la actividad peroxidasa en plantas.*

Entre las funciones fisiológicas de la actividad px en plantas, se reconocen:

- La formación y degradación de lignina y suberina, polímeros fenólicos depositados en la pared y que sirven como una barrera física, rígida e hidrofóbica que impide el avance de patógenos e infecciones (van Huystee, 1987; Lewis y Yamamoto, 1990; Graham y Graham, 1991; Whetten y Sederoff, 1995). La polimerización oxidativa de fenoles en la formación de lignina o suberina es atribuida específicamente a pxs de pared celular; pero ellas también serían importantes en la biogénesis de H_2O_2 a través de la oxidación de NADH, como ha sido discutido anteriormente.
- La formación de taninos y de una variedad de productos oxidados que pueden formar parte del sistema de defensa contra insectos y patógenos (Kobayashi y col., 1996).
- la participación en el metabolismo de fitohormonas, en la degradación del AIA (Gaspar y col., 1985; Gazarian y col., 1996) y en la última etapa de la biosíntesis del etileno, catalizando la oxidación del precursor ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) (Osswald y col., 1989; Acosta y col., 1991a).
- La detoxificación de sustancias complejas y tóxicas como compuestos organoclorados, hidroperóxidos, halogenuros, fenoles, etc. (Vilter, 1984; Pfanz y Oppman, 1991; Miland y col., 1996; De Gara y col., 1996; Dean y Devarenne, 1997). Las pxs mejor caracterizadas en funciones detoxificantes son la ascp_x y la glutatión peroxidasa (Nakano y Asada, 1981; Dean y Dearenne, 1997).

A pesar de toda la información disponible, la determinación de la función específica de las distintas isoformas de pxs ha resultado una tarea difícil, debido a la gran

variedad de isoformas, su amplia distribución en distintos tejidos y compartimentos celulares y, también a su amplia especificidad de sustrato. En determinados tejidos o compartimentos subcelulares, ciertas isoformas han sido involucradas preferencialmente, ya sea en la formación de lignina, la producción de H_2O_2 o la degradación de AIA (Mäder y col., 1980; Gaspar y col., 1985; Graham y Graham, 1991; Zheng y van Huystee, 1992b).

Un aspecto relevante del papel fisiológico de la actividad px de pared celular, es su participación en la limitación del crecimiento vegetal. Esta relación está basada en diferentes observaciones que demuestran una relación inversa entre la actividad px de pared y la velocidad de crecimiento asociada a la edad del tejido o a diferentes regiones a lo largo del eje de la planta. Por ejemplo, en segmentos de hipocotilos de *Vigna radiata*, la tasa de crecimiento disminuye desde el ápice a la base, mientras que la actividad px unida iónicamente a la pared aumenta en el mismo sentido (Goldberg y col., 1986); en variedades enanas de *Pisum sativum* se encuentra una mayor actividad px en la pared en comparación a variedades de tallo largo (Jupe y Scott, 1989); en epicotilos de *Cicer arietinum* la actividad px es mínima a los 3 días de edad, período que coincide con su máximo crecimiento y de ahí en adelante la actividad px aumenta y se mantiene alta hasta el sexto día, cuando disminuye el crecimiento del tejido (Sánchez y col., 1989). La prueba más directa de la relación entre px y crecimiento, viene de experimentos en los cuales hipocotilos de *Arachis hypogaea* incubados con anticuerpos específicos contra una de las pxs más abundantes en las paredes celulares de este tejido, incrementaron significativamente su crecimiento. Más aún, la incubación del hipocotilo con un exceso de

la px pura aislada de las paredes celulares, redujo la elongación del tejido después de 48 h (Zheng y van Huystee, 1992a).

Para comprender las bases bioquímicas de la correlación encontrada entre la actividad px y el crecimiento, es necesario considerar algunos aspectos del crecimiento vegetal, además de la estructura y propiedades mecánicas de la pared celular.

1.6.1 *Crecimiento vegetal*

En el crecimiento de las plantas están involucrados dos procesos básicos: la división y la elongación celular (Albersheim, 1975). Aún cuando la división celular es necesaria para el crecimiento, ella no produce un aumento directo en el volumen celular pues cada célula hija posee cerca de la mitad del volumen celular parental. Así, sólo la elongación de las células hijas aporta un incremento en el tamaño de una fila de células (Albersheim, 1975; Cosgrove, 1986).

La célula vegetal en crecimiento posee una considerable presión de turgor debido a que el protoplasto es levemente comprimido por la estructura de la pared celular. Sin embargo, el crecimiento no sería posible si la tensión de la estructura de la pared no fuese relajada, cortando, modificando, acomodando o desplazando sus componentes poliméricos. De esta forma se alivia la presión sobre el protoplasto, se disminuye el turgor y así se permite la entrada de agua, proceso que va acompañado de una inevitable extensión de la pared celular (Cosgrove, 1986, 1993a,b). Así, la elongación celular depende de las propiedades mecánicas de la pared que permitan su relajación.

1.6.2 Estructura de la pared celular primaria y origen de su extensibilidad.

La pared celular primaria de plantas está formada por una red de microfibrillas de celulosa, un polímero lineal de D-glucosa con enlaces $\beta(1\rightarrow4)$. Las microfibrillas conforman estructuras lineales compactas, prácticamente cristalinas y libres de agua. Las cadenas de celulosa en la microfibrilla son estabilizadas por puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo fuera del plano piranósido. A esta estructura básica, se unen a través de enlaces de hidrógeno a la superficie de la microfibrilla, cadenas lineales y ramificadas de polímeros hemicelulósicos (polímeros $\beta(1\rightarrow4)$ de D-glucosa o xilosa con ramificaciones de galactosa y arabinosa, principalmente) y pectínicos (polímeros helicoidales $\alpha(1\rightarrow4)$ de D-galacturonanos y de ramanogalacturanos) (Albersheim, 1975; Varner y Lin, 1989; Carpita y Gibeaut, 1993).

La pared celular contiene, además, una variedad de proteínas estructurales y enzimas unidas débilmente por interacciones iónicas o bien atrapadas en la red de polisacáridos de pared. Las proteínas de pared mejor caracterizadas son las denominadas extensinas, una familia de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, serina y tirosina (Varner y Lin, 1989). Otras proteínas estructurales de pared son las denominadas proteínas ricas en prolina (PRP) y aquellas ricas en glicina (GRP) (Keller, 1993; Showalter, 1993). Estas proteínas están relacionadas al reforzamiento de la pared celular a través de acoplamiento covalentes intra o intermoleculares, en algunos casos gatillados por el aumento de H_2O_2 durante la infección por patógenos o como respuesta a heridas (Bradley y col., 1992; Showalter, 1993). En esta matriz estructural de la pared celular, una variedad de ácidos hidroxicinámicos, tales como el ácido ferúlico y el *p*-cumárico, se

encuentran esterificados o eterificados a arabinoxilanos y xiloglucanos (hemicelulosas) en monocotiledóneas, o a polisacáridos pectínicos en dicotiledóneas (Varner y Lin, 1989; Carpita y Gibeaut, 1993; Iiyama y col., 1994).

1.6.3 Papel de la actividad peroxidasa en las características físicas y químicas de la pared celular.

Como ya se analizó, el crecimiento de las plantas depende en gran medida de la relajación de la pared celular. Tal relajación es el resultado de modificaciones bioquímicas de los componentes de la pared. Así es como algunas proteínas de pared podrían participar en su relajación al catalizar la hidrólisis o transglicosilación de los polisacáridos de la pared, como recientemente ha sido propuesto para la denominada expansina y la endoxiloglucano transferasa, respectivamente (Cosgrove, 1993b; McQueen-Mason y Cosgrove, 1995). También es ampliamente aceptado que las pxs, al catalizar el acoplamiento oxidativo de los residuos fenólicos, así como la formación y deposición de lignina, limitan la libertad de movimiento de los polisacáridos y, en consecuencia, rigidizan la estructura de pared haciéndola menos extensible (Fry, 1986; Iiyama y col., 1994). Un esquema que representa esta situación en la pared celular se muestra en la Fig. 2. El polímero de lignina, producto de la actividad px, es depositado en la pared celular y unido a través de enlaces éster y éter con los polisacáridos estructurales. Así también, los residuos fenólicos, como el ferulato esterificado o eterificado a polisacáridos, forman puentes diferulato (DFA) en presencia de px y H_2O_2 (Fig. 2).

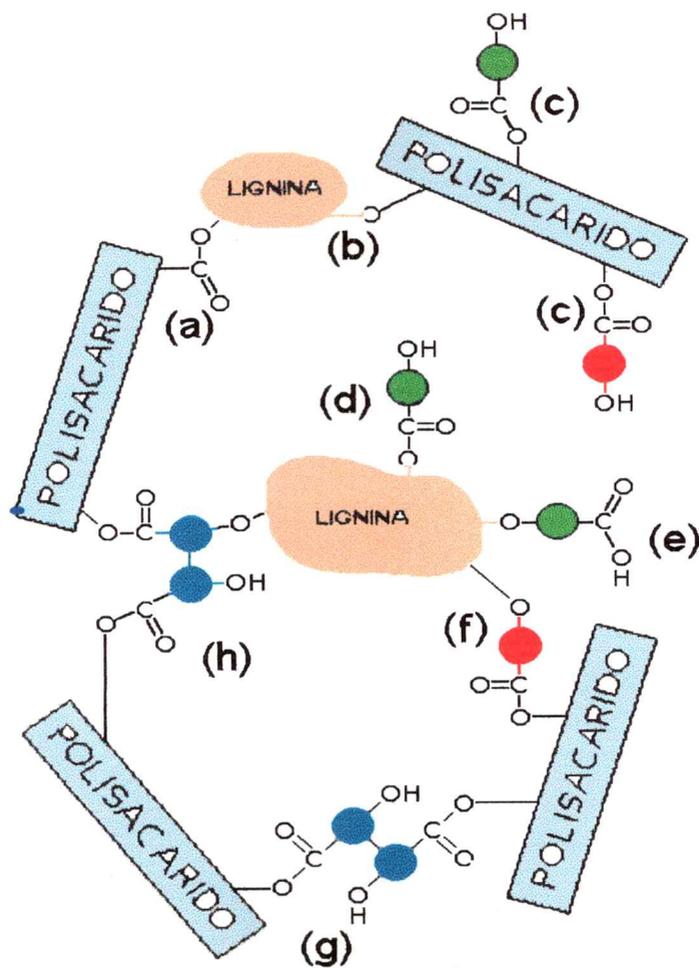


Figura 2: Diagrama esquemático que muestra las posibilidades de entrecruzamiento covalente de polisacáridos y lignina en paredes celulares. ●, ● ácidos hidroxicinámicos (ácido *p*-coumárico, ácido ferúlico); ●—●, ácido diferúlico. (a) y (b), uniones ésteres y éteres directas a lignina, respectivamente. (c) y (d), ácido hiroxicinámico esterificado a polisacáridos y lignina, respectivamente. (e), ácido hidroxicinámico eterificado a lignina. (g), puente diferulato diéster entre polisacáridos. (h), puente diferulato diéster-éter entre polisacáridos y lignina.

La importancia de las pxs en la limitación del crecimiento a través de estas modificaciones estructurales en la pared ha sido evidenciada en coleoptilos de avena y arroz, donde se encontró una relación inversa entre la extensibilidad de la pared celular y la tasa de crecimiento con respecto al contenido de DFA en la pared celular (Kamisaka y col., 1990; Tan y col., 1991, 1992). Además, la actividad px y la acumulación de H_2O_2 en la pared celular podrían contribuir a la disminución de la extensibilidad de la misma, catalizando la formación de puentes isoditrosina entre residuos de tirosina de las extensinas (Fry, 1986; Varner y Lin, 1989). Sin embargo, el entrecruzamiento de la extensina en monocotiledóneas sería de menor importancia (Dr. S. Fry, comunicación personal), debido a su escasa abundancia y acumulación en las paredes celulares de este tipo de plantas (Li y McClure, 1990).

1.7 Reguladores del crecimiento y modulación de la actividad peroxidasa de la pared celular.

Considerando el cúmulo de investigación que involucra a las pxs de la pared como enzimas relevantes en el proceso que determina el crecimiento vegetal, la cuestión fundamental que dio origen al trabajo de tesis que aquí se describe, es que si compuestos que regulan el crecimiento, modificarían la actividad px de la pared celular.

Diversas sustancias que afectan el crecimiento modifican a la vez la actividad px. Entre algunas de estas sustancias figuran iones metálicos, hidroperóxidos, herbicidas, hormonas vegetales, además de factores ambientales y abióticos tales como heridas, infecciones, luz, temperatura y potencial hídrico (Ockerse y Mumford, 1973; Castillo y

Greppin, 1986; van Huystee, 1987; Cakmak y Horst, 1991; Karataglis y col., 1991; Ingemarsson, 1995). Sin embargo, en estos estudios no siempre es claro que la actividad px provenga específicamente de la pared celular. En muchos casos, sólo se trata de actividades medidas en extractos crudos o extraídos de un sedimento que además de pared celular contiene otras fuentes contaminantes con actividad px.

De los factores que afectan la actividad px, uno de los más interesantes son las hormonas vegetales debido a su importante papel en la fisiología de las plantas. Hormonas como el etileno, ácido abscísico, giberelinas y citocininas, han presentado en algunos casos una relación inversa entre su capacidad de regular el crecimiento y la actividad px del tejido analizado (Ockerse y Mumford, 1973; Fry, 1980; Reddy y col., 1985; Chaloupková, 1994; Ingemarsson, 1995). Una de las respuestas hormonales mejor estudiadas es la elongación de coleótilos provocada por el ácido indolacético (AIA). Su efecto sobre el crecimiento de tejidos resulta, en parte, del incremento en la extensibilidad de pared celular (Taíz, 1984; Kutschera y Shopfer, 1986a, b). Se ha postulado que el mecanismo implicado en este proceso estaría relacionado a la acidificación de la pared celular inducida por la hormona, fenómeno que activaría ciertas hidrolasas permitiendo la relajación de la estructura de la pared (Rayle y Cleland, 1992; Cosgrove, 1993b). De hecho, se ha observado que el AIA induce un rompimiento masivo de hemicelulosa en la pared de la epidermis externa de *Pisum sativum* L. (Bret-Harte y Talboltt, 1993). Sin embargo, son escasos los estudios relacionados con el AIA desde el punto de vista de los factores que modulan la rigidización de la estructura de pared, como el análisis del efecto hormonal sobre la actividad px. A pesar de la existencia de algunos escasos reportes que

informan una relación inversa entre el crecimiento estimulado por el AIA y la actividad px total del tejido, no se ha estudiado en detalle el efecto del AIA sobre las isoformas de px y, en la mayor parte de los trabajos, no se informa acerca de la variación en el nivel de polímeros fenólicos generados por la actividad px de la pared, a fin de establecer apropiadamente una relación de consecuencia con el proceso del crecimiento.

Es ampliamente aceptado que el control hormonal sobre la actividad px podría ser indirecto, a nivel de la expresión del gen, la traducción o el transporte y distribución de la enzima a los distintos compartimentos subcelulares o tejidos (Birecka y Miller, 1974; Fry, 1980; Klotz y Lagrimini, 1996). Sin embargo, a diferencia de las fitohormonas, otros compuestos biosintetizados por plantas, que también afectan el crecimiento vegetal, podrían alterar directamente la actividad catalítica de las pxs. En esta categoría se encuentran los ácidos hidroxámicos (AHX), metabolitos secundarios que poseen la función química $R-CO-NROH$, presentes en gramíneas como maíz, trigo, cebada (Niemeyer, 1988) y también en algunas dicotiledóneas (Pratt y col., 1995). El AHX más abundante en extractos de maíz y trigo, la 2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona (DIMBOA), inhibe el crecimiento de raíces y coleótilos etiolados de *Avena sativa* L. y *Avena fatua* L., especies que no contienen AHX (Niemeyer, 1988; Pérez y González, 1989). Algunas evidencias indirectas sugieren que el efecto de los AHX sobre el crecimiento podría deberse, en parte, a la modulación directa de la actividad px. Por ejemplo, desde largo tiempo se conoce que el ácido benzohidroxámico forma un complejo estable y reversible con la px de rábano (Shonbaum, 1973; Aviram, 1981). Más aun, en raíces intactas de *Pisum sativum* y *Zea mays*, el ácido benzohidroxámico y el

salicilhidroxámico, estimulan el consumo de oxígeno derivado posiblemente de la actividad de oxidación de NADH catalizada por pxs NADH (Brouwer y col., 1986).

El DIMBOA ha sido descrito también como un compuesto fitotóxico, efecto que podría comprender un conjunto de alteraciones metabólicas tales como la inhibición de la actividad mitocondrial y cloroplástica y la inactivación irreversible de grupos SH esenciales en proteínas y enzimas (Queirolo y col., 1983; Niemeyer, 1988; Cuevas y col., 1990; Massardo y col., 1994). Sin embargo, no está claro que estos efectos expliquen la limitación del crecimiento, la que podría más bien estar relacionada con el efecto del DIMBOA sobre la actividad px de la pared celular. De hecho, durante la preparación del proyecto de tesis, ya había observado que el DIMBOA estimula fuertemente la oxidación de NADH catalizada por pxs de pared celular de coleoptilos de avena, con la consiguiente producción de H_2O_2 .

Tomando en conjunto los antecedentes aquí introducidos, el contenido fundamental de la hipótesis en que se basó el presente trabajo es: si la actividad px de pared celular participa en la regulación del crecimiento vegetal, entonces compuestos que afectan el crecimiento, alteran la actividad px y el nivel de polímeros fenólicos (diferulato y lignina) en la pared celular. Los compuestos reguladores del crecimiento estudiados en esta tesis fueron la hormona vegetal AIA (un estimulador del crecimiento) y el ácido hidroxámico DIMBOA (un inhibidor del crecimiento). Es importante mencionar, que en esta hipótesis no se excluye la posibilidad que otros procesos afectados por el AHX contribuyan también en alguna medida a la inhibición del crecimiento. Basado en esta hipótesis, el objetivo general de este trabajo de tesis fue estudiar el efecto de reguladores

del crecimiento sobre la actividad peroxidasa de pared celular y establecer su relación con el fenómeno del crecimiento vegetal.

Los objetivos específicos desarrollados comprendieron el aislamiento de paredes celulares libres de contaminantes subcelulares, la obtención de distintas fracciones de pxs asociadas a las paredes para el análisis de su composición isoenzimática y de las reacciones relacionadas con la síntesis de H_2O_2 , diferulato y lignina. Más aún, se estudió el efecto del AIA sobre la actividad total y el patrón isoenzimático de las pxs unidas a la pared celular, así como el efecto del DIMBOA sobre la oxidación de NADH catalizada por px. Finalmente se analizó el efecto de ambos reguladores del crecimiento sobre el contenido de los ácido ferúlico y diférulico, así como de lignina asociados a la pared celular.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 *Material vegetal*

Semillas de avena (*Avena sativa* L. var. Nehuén) fueron crecidas en vermiculita húmeda a 22-25°C en la oscuridad. Después de 6 días, los coleoptilos fueron cortados en segmentos de 1 a 1,5 cm, 3 mm bajo el ápice y así usados en todos los experimentos descritos en esta tesis.

2.2 *Extracción de peroxidasas intercelulares*

Los coleoptilos de avena fueron infiltrados dos veces por 2 min a 600 mm Hg de vacío en presencia de Tris-HCl (10 mM, pH 7,2) conteniendo 20 mM CaCl₂. Luego, los coleoptilos se dispusieron ordenadamente en forma vertical en jeringas de 50 ml adaptadas con un tubo Eppendorff en el extremo, para recoger el líquido después de centrifugar el sistema a 500 xg por 5 min. La **fracción intercelular** recuperada fue analizada por la presencia de contaminantes citoplásmicos, evaluando la actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Li y col., 1989).

2.3 *Obtención y purificación de paredes celulares para extracción enzimática*

Los coleoptilos de avena (100-150 g pf) fueron macerados en mortero con igual volumen de una solución que contenía: Tris-HCl (50 mM, pH 7,2), fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 0,1 mM, polivinilpirrolidona (PVPP) insoluble 5% p/v, MgCl₂ 5 mM y 5g de arena por 100 g de tejido. El homogeneizado fue filtrado a través de gasa y

centrifugado a 1000 xg por 5 min. El precipitado fue lavado cinco veces resuspendiéndolo en 25 ml de Tris-HCl (50 mM, pH 7,2) con 1% p/v Triton X-100 y centrifugando a 2000 xg por 5 min cada vez. El sedimento resultante fue lavado otras tres veces con la misma solución, pero sin detergente, para obtener la **fracción de pared celular** purificada. Lo exhaustivo y la efectividad del procedimiento fue estimada ensayando la actividad de enzimas marcadoras de mitocondrias (citocromo *c* oxidasa), de retículo endoplásmico (citocromo *c* reductasa insensible a antimicina A) y de membrana plasmática (5'-AMP nucleotidasa), como ha sido descrito por Briskin (Briskin y col., 1987). El fosfato liberado de la actividad 5'-AMP nucleotidasa, fue determinado según el método de Berenblum (Linderberg y Ernster, 1963).

2.4 Extracción de peroxidasas unidas a la pared celular

La fracción purificada de pared celular fue incubada con KCl 1 M por 4 h sobre hielo y con leve agitación. Luego, la mezcla se centrifugó a 5000 xg por 10 min y el líquido sobrenadante constituyó la **fracción iónica** de pared celular. La pared celular remanente fue lavada otras cuatro veces con KCl 1 M como antes y luego fue resuspendida en 2 ml de Na-acetato (0,1 M, pH 5,0) con 25 U/ml de celulasa y 3 U/ml de pectinasa, ambas de *Aspergillus niger* (Sigma Chem. Co.). Una unidad (U) de pectinasa o celulasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de ácido galacturónico a partir de poligalacturonato por min a pH 4,0 y 25°C ó 1 μmol de glucosa desde celulosa por hora a pH 5,0 y 37°C, respectivamente. Además, a esta solución se agregó como inhibidores de proteasas PMSF 1 mM, benzamidina 2 mM y pepstatin A.

1 μ M. La mezcla fue incubada a 25°C con agitación por 18 h. El líquido sobrenadante de la mezcla centrifugada a 5.000 xg por 10 min constituyó la **fracción covalente** de pared celular.

2.5 Cromatografía de intercambio iónico

Las isoformas ácidas y básicas de peroxidasa en la fracción iónica fueron separadas mediante cromatografía de intercambio catiónico. Para ello se utilizó una columna de carboximetil sepharose (5 cm x 0,6 cm d.i.), equilibrada en amortiguador fosfato (15 mM, pH 6,4). Después de aplicar la muestra concentrada y dializada (1,5 ml), la columna se lavó con la misma solución de equilibrio, registrando constantemente la actividad px (con *o*-PDA y H₂O₂) en el efluente. La enzima retenida en la columna se eluyó con KCl 1 M. Las fracciones recuperadas fueron concentradas y dializadas por centrifugación en tubos Centricon[®] (límite de exclusión de 10.000) y guardadas a -20°C en glicerol 25% v/v hasta su análisis.

2.6 Preparación de paredes celulares para extracción de fenoles y lignina

Todos los procedimientos fueron realizados bajo luz fluorescente para prevenir la isomerización de los fenoles a extraer. Coleoptilos (1,5 a 2,5 g) mantenidos a -70°C después del correspondiente tratamiento, fueron macerados en mortero con nitrógeno líquido y luego con una solución de 2% p/v de Triton X-100, azida 50 mM y KCl 1 M. El sedimento de la suspensión centrifugada a 10.000 xg por 5 min fue sucesivamente tratado por 15 min con vigorosa agitación con : metanol dos veces, H₂O, 1% p/v SDS, H₂O dos

veces, etanol, metanol/cloroformo (1:1 v/v), etanol y H₂O dos veces. El material remanente fue incubado con 5 ml de α -amilasa (1 mg/ml) en Tris-HCl (50 mM, pH 7,0) por 6 h y luego con 5 ml de pronasa E (0,5 mg/ml) en el mismo amortiguador por 12 h. Finalmente, las paredes celulares fueron lavadas otra vez con H₂O, etanol, etanol/cloroformo (1:1 v/v) y secadas a 40°C.

2.7 Extracción y determinación de ácidos ferúlico y diferúlico unidos a las paredes celulares

Los fenoles esterificados a los polisacáridos de pared celular fueron liberados por hidrólisis alcalina. Para ello, 20 a 40 mg de pared celular se trataron por 20 h en agitación y a temperatura ambiente con 5 ml de NaOH 2 M desgaseado en frascos sellados bajo N₂. Una solución de ácido 3,4-dihidroxicinámico (ácido cafeico) fue adicionado a las muestras como estándar interno. Después de la hidrólisis, la fracción alcalina fue acidificada a pH 2,0 con HCl y extraída cuatro veces con 10 ml de éter etílico. Los extractos etéreos se reunieron, se secaron al vacío y se guardaron a -20°C hasta el análisis. Las muestras fueron analizadas mediante HPLC en un sistema Waters modelo 600E con un procesador Ultra Wisp modelo 715 y un detector con arreglo de fotodiodo. La técnica se ejecutó usando una columna analítica de fase reversa Nova-Pak C₁₈ de Waters (150 x 3,9 mm d.i.) y detectando la absorbancia a 310 nm en el efluente. El flujo por la columna fue de 0,9 ml/min y la elución consistió de un gradiente convexo entre acetonitrilo y una solución de ácido acético al 3% v/v en agua bidestilada desionizada. Después de la inyección de la muestra, el acetonitrilo fue mantenido en 5% por 5 min, se

incrementó a 10% en 15 min y luego a 20% en los siguientes 25 min. La proporción de acetonitrilo fue mantenida en 20% por 10 min, luego incrementada linealmente a 50% en 5 min y después de 2 min se disminuyó a un 5% por 13 min adicionales. La cantidad de cada fenol analizado se calculó de acuerdo al rendimiento del estándar interno y a la curva de calibración obtenida con el estándar respectivo. Una muestra de ácido E,E-diferúlico auténtico fue gentilmente facilitada por el Dr. Norman Lewis, Washington State University.

2.8 Determinación de lignina

El contenido de lignina fue ensayado en las paredes celulares saponificadas según el método de Iiyama y Wallis (1990). Las paredes celulares secas (5-10 mg) se dispusieron en tubos de vidrio y se disolvieron en 2 ml de bromuro de acetilo al 25% p/p en ácido acético glacial con 80 μ L de HClO₄. Los tubos sellados se incubaron a 70°C por 30 min con agitación ocasional. Luego, una alícuota de la mezcla se diluyó con 5 ml de NaOH 2M (1 ml) y ácido acético (4 ml). El contenido de lignina fue estimado registrando la absorbancia de las muestras a 280 nm contra un blanco que fue corrido en paralelo con las muestras.

Cada determinación fue realizada por triplicado a partir de tres muestras independientes.

2.9 Ensayo de actividad peroxidasa

Todos los ensayos se realizaron en cubetas de 1 ml a 24°C en un

espectrofotómetro Shimadzu UV-120. Regularmente la actividad px fue ensayada con *o*-PDA 5 mM, CA 0.08 mM o E-FA 0.08 mM, todos en presencia de H₂O₂ 0.5 mM en amortiguador citrato (0,1 M, pH 4,5). El cambio en absorbancia debido a la oxidación de *o*-PDA, E-FA, *p*-CA o CA fue seguido a 450 nm ($\epsilon=1,05 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 310 nm ($\epsilon=16 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 286 nm ($\epsilon=19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y 260 nm ($\epsilon=2,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), respectivamente. La velocidad de utilización de H₂O₂, fue ensayada en amortiguador fosfato (0,1 M, pH 6,0) con guaiacol 5mM, o bien con E-FA 0,1 mM en amortiguador citrato (0,1 M, pH 4,5) como reductores. La actividad de oxidación de NADH se midió por la disminución de la absorbancia a 340 nm ($\epsilon=6,02 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en una mezcla de reacción que contenía: MnSO₄ 50 μM , NADH 0,16 mM en amortiguador fosfato (0,1 M, pH 7,0) y concentraciones variables de fenoles (E-FA, *p*-CA) o DIMBOA. La oxidación de NADH también se siguió registrando el consumo de oxígeno en un oxígrafo Hansatech modelo CB1, calibrado entre 0 (agotamiento de oxígeno en la solución con ditionito de sodio) y 0,253 mmol/ml (concentración de oxígeno en agua destilada a 25°C). La oxidación de AIA fue ensayada espectrofotométricamente siguiendo el aumento de absorbancia a 250 nm en amortiguador fosfato (0,1 M, pH 6,2) con *p*-CA 80 μM , MnSO₄ 50 μM y concentraciones variables de AIA.

La velocidad de transformación del sustrato en cada ensayo se calculó de la pendiente de las curvas de progreso, mientras que los parámetros cinéticos aparentes de $S_{0.5}$ y $V_{\text{máx}}$ se calcularon a partir del ajuste de los datos de velocidad por análisis de regresión no lineal.

2.10 Formación y descomposición del CIII

La forma catalíticamente inactiva de la px, el CIII, fue formado mezclando NADH 1 mM con px de rábano 1.2 μ M (isoenzima C, Boehringer Co.) en amortiguador málico (50 mM, pH 5,6). Después de 1 a 2 min se detectó la aparición del CIII, evidenciado por la banda de absorción a 418, 543 y 575 nm, como ha sido descrito anteriormente (Yokota y Yamazaki, 1965; Tamura y Yamazaki, 1972; Acosta y col., 1991b). El efecto del DIMBOA y el *p*-CA sobre la estabilidad del CIII fue seguido por la disminución de la absorbancia a 418 nm al agregar concentraciones variables de estos compuestos a la mezcla de reacción después de 4 min.

2.11 Isoelectroenfoque

La técnica de isoelectroenfoque (IEF) se realizó en geles ultrafinos (0,4 mm) de acrilamida (5%) con 2% de anfolitos Pharmalyte (intervalo de pH 3 a 10, Pharmacia Co.), utilizando una cámara Bio-Rad modelo 111 según las especificaciones del fabricante. Previo a la corrida, las muestras fueron desaladas y concentradas por centrifugación en tubos Centricon® (límite de exclusión de 10.000). Para ello, los tubos Centricon® fueron pre-tratados entre 2 y 5 h con una solución de BSA 1 mg/ml para disminuir la adsorción inespecífica de las muestras a la membrana concentradora del tubo. Además, las muestras fueron centrifugadas a 10.000 $\times g$ por 15 min antes de disponerlas en los tubos Centricon® y, durante la concentración, fueron lavadas con una solución de anfolitos 1% v/v, Triton X-100 0,05% p/v y glicerol 5% v/v, para prevenir la agregación y precipitación de la muestra. Después de la corrida de IEF, los geles se tiñeron con 4-

metoxi-1-naftol o 4-cloro-1-naftol 5 mM y H₂O₂ 0,04% v/v en amortiguador citrato (0,1 M, pH 4,5). El gradiente de pH formado en el gel fue determinado con un electrodo de superficie.

2.12 Ensayo de actividad de enzimas antioxidantes

Los coleoptilos de avena (2 a 3 g), fueron lavados profusamente en agua destilada antes de macerarlos en mortero con amortiguador Tris-HCl (50 mM, pH 7,0) que contenía benzamidina 5 mM, pepstatin A 1 μM y PMSF 0,1 mM. El homogeneizado se centrifugó a 10.000 xg por 15 min y el líquido sobrenadante se usó para ensayar la actividad enzimática.

La actividad ascp_x se ensayó siguiendo la disminución en absorbancia a 290 nm ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Nakano y Asada, 1981). La mezcla de reacción contenía amortiguador fosfato (50 mM, pH 7,0), EDTA 0,1 mM, 0,5 mM L-ascorbato, 90 μM H₂O₂ y 10 a 20 μl del extracto enzimático.

La actividad catalasa se ensayó midiendo la descomposición del H₂O₂ a 240 nm ($\epsilon = 35,8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Lardinois y col., 1996). El medio de reacción contenía H₂O₂ 10 mM y 0,1 mM EDTA en amortiguador fosfato (0,1 M, pH 6,8).

La actividad superóxido dismutasa (SOD) se evaluó en un ensayo de competencia midiendo la inhibición de la reducción de azul de *p*-nitro tetrazolio (NBT) por radicales O₂⁻, derivados de la fotoxidación de riboflavina (Cakmak y Horst, 1991). El medio de reacción contenía amortiguador Tris-HCl (50 mM, pH 7,8) con EDTA 0,1 mM, L-metionina 12 mM, Na₂CO₃ 50 mM, NBT 75 μM, riboflavina 1 μM y 15 a 20 μl del

extracto enzimático. La reducción de NBT fue evaluada siguiendo el aumento en absorbancia a 560 nm, después de 30 min de exponer la mezcla de reacción a luz fluorescente en presencia y ausencia del extracto enzimático. La reducción de NBT aumentó linealmente con el volumen de extracto enzimático y con el tiempo de fotoxidación, al menos hasta 1 h de incubación en las condiciones descritas.

Cada determinación fue realizada por triplicado en, al menos, dos experimentos independientes.

2.13 Determinación de glutatión reducido y oxidado

Los coleoptilos se maceraron en ácido sulfosalicílico 5% p/v, el homogeneizado se centrifugó a 10.000 xg por 15 min y el líquido sobrenadante fue usado para los análisis posteriores. Los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) fueron determinados enzimáticamente según el método de Griffith (1980). El GSH total (GSH+GSSG) es oxidado por el ácido 5,5'-ditiobis-(nitrobenzoico) (DTNB) y reducido por NADPH en presencia de GSH reductasa. La mezcla de reacción en amortiguador fosfato (0,1 M, pH 7,5) contenía: EDTA 6,3 mM, DTNB 0,7 mM, GSH reductasa 0,55 U (tipo IV, Sigma Chem. Co.) y 10 a 20 µl de la muestra. La velocidad de formación del 5-tio-2-nitrobenzoato, fue registrada a 412 nm. En un ensayo por separado, el contenido de GSSG fue determinado de la misma manera pero adicionando 2-vinilpiridina (2-VP) para evitar la reacción con el GSH. La 2-VP reacciona irreversiblemente con el GSH sin afectar la actividad de la GSH reductasa, como ocurría con el tradicional método de Tietze (1969) que utilizaba N-etilmaleimida. En este ensayo, una alícuota de 100 a 200 µl

del extracto ácido de la muestra se combinó con 12 μl de 2-VP y 20 μl de una solución de trietanolamina 50% v/v en agua. La mezcla se agitó vigorosamente en Vortex por 1 min cada 5 a 10 min durante 30 min, después de los cuales un volumen de 10 a 50 μl fue analizado en el ensayo enzimático descrito anteriormente. El contenido de GSH fue estimado de la diferencia entre el contenido de GSH total y el de GSSG. Paralelamente, se preparó una curva de calibración con GSH.

Cada determinación fue realizada por triplicado en muestras independientes de un experimento.

2. 14 Determinación de proteínas modificadas oxidativamente

El método utilizado se basa en la acumulación de grupos carbonilo en las proteínas modificadas oxidativamente, los cuales pueden ser evaluados al derivatizar las proteínas con una hidrazina para formar la respectiva hidrazona (Stadtman, 1993; Reznick y Lester, 1994). Para el análisis, los coleoptilos (1,0 a 1,5 g) después del correspondiente tratamiento, fueron profusamente lavados en agua destilada y macerados en mortero con 2 ml de amortiguador Tris-HCl (50 mM, pH 7,2) que además contenía: PMSF 40 $\mu\text{g/ml}$, pepstatin A 7 $\mu\text{g/ml}$, benzamidina 2 mM, EDTA 1 mM y hidroxitolueno butilado 0.05% p/v (BHT). El homogeneizado se centrifugó a 10.000 xg por 15 min y el líquido sobrenadante se mezcló con estreptomocina 1% p/v por 15 min a temperatura ambiente y con agitación constante. La mezcla se centrifugó a 10.000 xg por 10 min y el líquido sobrenadante, conteniendo 0,5 a 1,0 mg/ml de proteína (método de Bradford), se precipitó con una solución acuosa de TCA 10% p/v. El sedimento se resuspendió en 1 ml

de una solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina 10 mM (DNPH), hidroclorehidrato de guanidinio 6 M, SDS 7.5 % p/v y HCl 2.5 M. Se preparó un tubo blanco como antes, pero sin la hidrazina. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente por 25 min en oscuridad y con agitación en Vortex por 1 min cada 5 min. Luego se precipitó con 1 ml de TCA al 20% p/v en agua y se centrifugó a 10.000 xg por 10 min. El sedimento de proteínas derivatizadas con DNPH fue lavado una vez con TCA al 10% p/v en agua y luego tres veces con etanol/acetato de etilo 1:1. Finalmente, el sedimento lavado y secado a 37°C por 2 h, se resuspendió a 37°C con agitación ocasional en 1 ml de hidroclorehidrato de guanidinio 6 M con ácido trifluoroacético 0,05% v/v. El contenido de grupos carbonilo en las muestras fue cuantificado a 375 nm contra el blanco preparado sin DNPH, usando un $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Reznick y Lester, 1994). La absorbancia a 280 nm de la réplica de cada muestra no tratada con DNPH, fue utilizada para normalizar el contenido de grupos carbonilo por mg de proteína sobre la base de una curva estándar preparada con BSA.

Cada determinación fue realizada por triplicado en muestras independientes de un experimento.

2.15 Determinación de peroxidación de lípidos.

Los productos derivados de la peroxidación de lípidos, principalmente insaturados de membrana, se cuantificaron mediante derivatización con ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (Gutteridge y Halliwell, 1990). Sin embargo, se realizaron algunas importantes modificaciones a fin de evitar interferencias o sobrestimaciones debido a la autooxidación

de lípidos durante el procesamiento de la muestra (Gutteridge y Halliwell, 1990; Palamanda y Kehrer, 1992; May y col., 1996). Así, coleoptilos de avena después del correspondiente tratamiento, fueron profusamente lavados en agua destilada y después en etanol al 50% v/v por 1 min. Luego, se maceraron en mortero con 2 ml de una solución que contenía TCA 0,5% p/v, SDS 0,125% p/v y BHT 0,10% p/v. La mezcla homogeneizada se centrifugó a 10.000 xg por 10 min y 0,5 ml del líquido sobrenadante se mezclaron con 1,0 ml de una solución que contenía TBA 0.5% p/v, BHT 0,05% p/v (la solución se agitó a 40 a 45°C para su disolución), 125 µl de SDS al 3% p/v y 125 µl de HCl al 50% v/v. La mezcla se incubó por 20 min a 80°C con ocasional agitación en Vortex, se enfrió rápidamente sobre hielo y los productos que reaccionaron con TBA, fueron extraídos con 800 µl de 1-butanol y cuantificados espectrofotométricamente a 532 nm ($\epsilon=155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) contra un blanco corrido en paralelo con las muestras. La contribución de la absorción inespecífica debido a la reacción con azúcares o aldehídos se registró a 600 nm y se restó de la lectura a 532 nm (May y col. 1996).

Cada determinación fue realizada por triplicado en muestras independientes de un experimento.

2.16 Tratamiento de coleoptilos de avena con AIA o DIMBOA

Coleoptilos etiolados de 6 días de edad fueron cortados en segmentos de 1,0 a 1,5 cm, 3 mm bajo el ápice. Se lavaron exhaustivamente bajo agua destilada y fueron mantenidos en amortiguador MES (5 mM, pH 5,8) hasta su uso. En un primer tipo de experimentos, segmentos de coleoptilos de 10 mm fueron ubicados en placas petri con

concentraciones variables de AIA desde 0 a 300 μM en amortiguador málico (5 mM, pH 5,5) y sacarosa 1% p/v. En el tratamiento con DIMBOA el medio de incubación no contenía sacarosa. El crecimiento de los coleoptilos fue evaluado midiendo su incremento en longitud después de incubarlos en oscuridad a 23-25° por 20 h.

En otro tipo de experimentos, los segmentos de coleoptilos fueron incubados como antes pero en presencia o ausencia de AIA 40 μM o DIMBOA 75 μM . El crecimiento fue medido a diferentes tiempos de incubación, como la variación de peso fresco o peso seco con respecto a un control sin AIA o DIMBOA. La solución de incubación fue renovada al menos tres veces durante el experimento.

2.17 Análisis estadísticos

Las diferencias estadísticamente significativas que se indican en el texto y tablas de resultados, se realizaron utilizando una prueba t de student o una prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para comparar diferencias entre medias y valores en experimentos con tratamientos múltiples, respectivamente.

3. RESULTADOS

3.1 DISTRIBUCIÓN DE PEROXIDASAS EN EL COMPARTIMENTO DE PARED CELULAR Y SU PARTICIPACIÓN EN LA SÍNTESIS DE DIFERULATO Y LIGNINA.

3.1.a. *Obtención de paredes celulares y actividad peroxidasa asociada*

Se obtuvo una fracción de pared celular de coleoptilos de avena libre de contaminantes subcelulares mediante sucesivos lavados de un sedimento crudo de pared (1.000 xg por 5 min) con Triton X-100. Después de cinco lavados con el detergente fue posible remover un 98% de la actividad px presente en el sedimento de pared crudo, principalmente proveniente de contaminantes membranosos (Tabla 1). Los siguientes tres lavados sin detergente, sirvieron sólo para retirar el exceso del mismo (Tabla 1). El sedimento de pared purificado de este modo no presentó actividad de las enzimas marcadoras para mitocondria (citocromo oxidasa, EC 1.9.3.1), retículo endoplásmico (NADH-citocromo *c* reductasa, EC 1.6.99.3) y membrana plasmática (AMP-nucleotidasa, EC 3.1.3.5) (Tabla 2). Más aún, ninguna de estas actividades fue detectada en una fracción concentrada y dializada de proteínas solubilizadas con KCl 1 M desde los fragmentos purificados de pared celular (fracción iónica, concentrada 45 veces en tubos Centricon[®], Tabla 2). Así, cualquier actividad px adicional liberada desde el sedimento purificado de pared fue principalmente, sino exclusivamente, de naturaleza extraprotoplásmica.

Tabla 1: Purificación de paredes celulares de coleoptilos de avena. Exhaustividad de los lavados con Triton X-100 ^a.

FRACCION	Actividad Peroxidasa ^b μ mol/min/g tf
Mezcla homogeneizada	565,3 ± 83,2
Líquido sobrenadante de 1.000 xg	395,4 ± 42,6
Crudo de paredes celulares (sedimento de 1.000 xg)	87,3 ± 19,0
1 ^{er} lavado con Triton X-100	36,6 ± 4,1
2 ^{do} lavado con Triton X-100	14,4 ± 0,40
3 ^{er} lavado con Triton X-100	2,8 ± 0,10
4 ^{to} lavado con Triton X-100	0,05 ± 0,02
5 ^{to} lavado con Triton X-100	0,02 ± 0,01
1 ^{er} lavado con Trizma	0,04 ± 0,02
2 ^{do} lavado con Trizma	0,03 ± 0,01
3 ^{er} lavado con Trizma	0,02 ± 0,01
sedimento de paredes celulares purificado	2,7 ± 0,54

a, Los valores corresponden al promedio de 6 preparaciones distintas.

b, ensayo con *o*-PDA y H₂O₂ como se describe en Materiales y Métodos.

Tabla 2 : Actividad de enzimas marcadoras en fracciones de pared celular obtenidas por el procedimiento de lavado con Triton X-100 o por infiltración de los coleoptilos.

Fracción	Citocromo c oxidasa ^a (mitocondria)	NADH- citocromo c reductasa ^a (ret. end.)	AMP- nucleotidasa ^b (plasmalema)	glucosa-6- fosfato deshidrogenasa (citosol) ^c	Peroxidasa ^d
Intercelular (infiltrada)	ne	ne	ne	nd	114,9
Homogeneizado	16,0	16,2	51,7	8,2	30409
Crudo de pared celular	4,0	0,8	2,5	ne	10300
Sedimento de pared celular purificado	nd	nd	nd	ne	125,4
Iónica (no dializada)	nd	nd	nd	ne	73,2
Iónica (dializada y concentrada 45x)	nd	nd	nd	ne	68,2

Actividades enzimáticas correspondientes a 55 g de tejido fresco.

nd, no detectada

ne, no ensayada

a, μmol citocromo C / min ; **b**, μmol PO_4^3 liberado / min; **c**, μmol NADH / min; **d**, μmol *o*-PDA / min

El sedimento de paredes celulares tratado con KCl 1M y luego con celulasa y pectinasa, rindió cantidades equivalentes de actividad px contenida en la fracción iónica y covalente, respectivamente (1,2 a 1,4 $\mu\text{mol}/\text{min}$ por g tf, Tabla 3). No se detectó actividad px adicional en el sedimento de paredes celulares después del tratamiento con celulasa y pectinasa. La actividad px extraída desde los espacios intercelulares mediante infiltración de coleoptilos (fracción intercelular), representó el 44% de la actividad asociada al compartimento de pared celular y, en conjunto, la actividad px de las tres fracciones de pared representa cerca del 1% del total presente en el coleoptilo (Tabla 3). La actividad px en cualquiera de las fracciones de pared fue estable al menos por tres semanas a -20°C .

En adelante, las fracciones de pared serán designadas como FI (fracción iónica), FC (fracción covalente) y Fint (fracción intercelular).

Tabla 3 : Actividad peroxidasa asociada al compartimento de la pared celular en coleoptilos de avena.

Fracción	Actividad Peroxidasa * ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gtf}$)	Porcentaje del total en el coleoptilo	Porcentaje del total en pared celular
Mezcla de homogeneizado	528 ± 71	100	-
Intercelular (infiltrada)	$2,09 \pm 0,30$	0,40	44
Iónica (1-2)	$1,43 \pm 0,22$	0,27	30
Covalente	$1,25 \pm 0,10$	0,24	26

* Ensayo con *o*-PDA 5 mM y H_2O_2 0,5 mM en citrato 0,1 M pH 4,5

3.1.b. *Reacciones catalizadas por la actividad peroxidasa asociada a la pared celular y relacionadas con la síntesis de diferulato y lignina.*

Inicialmente, durante el desarrollo del trabajo de tesis, se consideró estudiar la actividad px de pared contenida únicamente en las FI y FC. Sólo al final del trabajo, se incluyeron algunos estudios con la Fint. Algunos autores han sugerido que la Fint y FI están en un equilibrio mediado por H^+ (Ros Barceló y col., 1988, 1989) y, a juzgar por una relativa similaridad en la distribución del patrón de isoformas con actividad px entre ambas (ver más adelante), probablemente ambas fracciones compartirían algunas isoperoxidasas del mismo origen. Por esta razón y para evitar excesiva laboriosidad en algunos análisis, sólo se ha considerado la FI o la Fint.

Las peroxidadas contenidas en la FI y la FC de pared, oxidaron varios precursores de los polímeros fenólicos DFA y lignina, tales como alcohol coniferílico (CA), el ácido *p*-cumárico (*p*-CA) y ácido E-ferúlico (E-FA). Estos sustratos no fueron utilizados en ausencia de H_2O_2 . La velocidad inicial máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y la concentración de sustrato de semisaturación, $S_{0.5}^*$, fueron calculadas de las respectivas curvas de saturación a una concentración fija de H_2O_2 (* el parámetro cinético de K_m , restringido a una sola entidad molecular, ha sido reemplazado por el de $S_{0.5}$ para definir la cinética hiperbólica en el conjunto de isoformas con actividad px presentes en cada fracción de pared). El cociente $V_{m\acute{a}x}/S_{0.5}$, que determina la velocidad de utilización de los sustratos a concentraciones subsaturantes, también fue calculado para ambas fracciones enzimáticas. En tanto, a causa de la presencia de celulasa y pectinasa en la FC, los datos de velocidad

son presentados sobre la base del peso fresco de tejido utilizado en la preparación de las fracciones enzimáticas de pared.

La FI presentó una marcada especificidad de sustrato hacia CA y E-FA, a juzgar por la mayor velocidad de utilización de estos sustratos en comparación al *p*-CA, tanto a concentraciones saturantes ($V_{m\acute{a}x}$) como subsaturantes ($V_{m\acute{a}x}/S_{0.5}$) (Tabla 4). En contraste, la FC utilizó preferencialmente CA, mientras que E-FA y *p*-CA fueron pobremente oxidados (Tabla 4). Comparando los valores de $V_{m\acute{a}x}/S_{0.5}$ en ambas fracciones, se observa que la FI utilizó E-FA y CA con una velocidad 3,2 y 2,1 veces mayor que la FC, respectivamente ($p < 0,01$, Tabla 4). También, la FI utilizó el H_2O_2 1,7 veces más eficientemente que la FC ($p < 0,01$), en la oxidación de guaiacol, un análogo estructural del CA ($V_{m\acute{a}x}/S_{0.5}$, Tabla 5).

Como se presenta más adelante, el E-FA está presente en las paredes celulares del coleoptilo de avena (y también probablemente el derivado alcohólico, CA), en niveles de 2 a 4 μg por mg de pared celular, razón por lo cual, los resultados cinéticos antes descritos adquieren una relevancia funcional que, en conjunto, sugieren que las pxs contenidas en la FI podrían tener una mayor participación que aquellas incluidas en la FC, en la polimerización de fenoles para formar puentes diferulato y lignina en la pared celular.

Las pxs de la FI y FC también catalizaron la oxidación de NADH con oxígeno molecular, una reacción que genera H_2O_2 (Yokota y Yamazaki, 1965; Elstner y Heupel, 1976; Haliwell, 1978). En ausencia de efectores, la velocidad de oxidación de NADH por las fracciones de pared celular, fue baja comparada con la velocidad de peroxidación

(comparar valores de las Tablas 4 y 6); sin embargo, esta reacción fue considerablemente estimulada por fenoles como el *p*-CA (Tabla 6). La participación de pxs en la oxidación de NADH quedó demostrada por la inhibición de la reacción con cianuro (inactivador de hemoproteínas), quercetina, ácido gentsico y ácido ascórbico, todos eficientes inhibidores de la enzima (Brouwer y col., 1986).

Cuando la oxidación de NADH se determinó en presencia de *p*-CA 70 μ M y concentraciones variables de NADH, la FI utilizó este sustrato con una velocidad ($V_{m\acute{a}x}/S_{0.5}$) 1,7 veces mayor con respecto a la observada en la FC ($p < 0,2$, Tabla 5). Alternativamente, a una concentración fija de NADH (0,16 mM), se investigó el efecto de concentraciones variables de estimuladores fenólicos. El efecto de estimulación obtenido con E-FA y *p*-CA, presentó una cinética de saturación hiperbólica y de las respectivas curvas se calcularon los valores de $V_{m\acute{a}x}$, $E_{0.5}$ (concentración de semisaturación del estimulador) y el factor de estimulación, obtenido de la razón entre $V_{m\acute{a}x}$ y la velocidad de la reacción en ausencia del estimulador (Tabla 6). Se encontró que el mejor estimulador de la reacción fue el *p*-CA, tanto en la FI como en la FC, al presentar factores de estimulación de 1375 y 300, respectivamente. El E-FA en cambio, fue un pobre estimulador de la reacción, aumentándola solo 28 y 3 veces en la FI y FC, respectivamente. Así, la oxidación de NADH fue estimulada preferencialmente en la FI con respecto a la FC en 4,5 y 10 veces en presencia de *p*-CA y FA, respectivamente (Tabla 6).

La eficiencia de los fenoles en la estimulación de la oxidación de NADH, se relacionó en forma inversa con su velocidad de utilización ($V_{m\acute{a}x}/S_{0.5}$) por la px en

presencia de H_2O_2 . El *p*-CA, un sustrato pobremente utilizado en el ciclo peroxidativo, es un eficiente estimulador del ciclo oxidativo de la enzima (comparar Tablas 4 y 6). En tanto, la oxidación de NADH en presencia de E-FA fue pobremente estimulada y presentó un tiempo de retardo en las curvas de progreso, el cual disminuyó a concentraciones crecientes del fenol. Este tiempo de retardo parece reflejar la lenta acumulación de H_2O_2 durante el ciclo oxidativo de la enzima, pues la adición de H_2O_2 1 μ M disminuyó este tiempo de retardo de 18 a 7 minutos, mientras que la adición de catalasa aumentó considerablemente este retardo (Fig. 3). Así parece ser que la utilización peroxidativa del fenol compite con el efecto de estimulación del mismo en la oxidación de NADH. Consecuente con esta idea, el CA, el mejor sustrato utilizado por la px en presencia de H_2O_2 (Tabla 4), fue incapaz de estimular la oxidación de NADH en ambas fracciones de pared (Tabla 6).

Tabla 4 : Utilización de sustratos fenólicos por peroxidasas contenidas en las fracciones iónica y covalente de la pared celular de coleoptilos de avena.

SUSTRATO	PARAMETRO	PEROXIDASAS FRACCIÓN IÓNICA	PEROXIDASAS FRACCIÓN COVALENTE
Ácido ferúlico	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{M}/\text{min}$)	$20,3 \pm 2,0$	$21,0 \pm 3,5$
	$S_{0,5}$ (μM)	$15,0 \pm 3,2$	$49,6 \pm 1,3$
	$V_{m\acute{a}x}/S_{0,5}$ (min^{-1})	$1,35 \pm 0,33^a$	$0,42 \pm 0,08^b$
Ácido <i>p</i> - cumárico	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{M}/\text{min}$)	$9,1 \pm 0,5$	$24,1 \pm 0,15$
	$S_{0,5}$ (μM)	$54,9 \pm 4,3$	$117,2 \pm 0,1$
	$V_{m\acute{a}x}/S_{0,5}$ (min^{-1})	$0,16 \pm 0,04^c$	$0,20 \pm 0,06^c$
Alcohol coniferílico	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{M}/\text{min}$)	$323,1 \pm 26,0$	$248,0 \pm 10,1$
	$S_{0,5}$ (μM)	$42,0 \pm 5,0$	$66,5 \pm 4,8$
	$V_{m\acute{a}x}/S_{0,5}$ (min^{-1})	$7,70 \pm 1,5^d$	$3,73 \pm 0,6^e$

Las condiciones del ensayo se describen en Materiales y Métodos, utilizando H_2O_2 0,5 mM. Los valores de velocidad están normalizados por gramo de tejido fresco. Las letras distintas en los valores de $V_{m\acute{a}x}/S_{0,5}$ indican la diferencia significativa del valor tabulado ($p < 0,01$).

Tabla 5: Utilización de H₂O₂ y NADH por peroxidasas contenidas en la fracción iónica y covalente de las paredes celulares de coleoptilos de avena.

Sustrato	Parámetro	PEROXIDASAS FRACCIÓN IÓNICA	PEROXIDASAS FRACCIÓN COVALENTE
H ₂ O ₂ ^a	V _{máx} (μM/min)	232,0 ± 18,3	245,3 ± 9,4
	S _{0.5} (μM)	102,0 ± 8,4	187,1 ± 14,5
	V _{máx} /S _{0.5} (min ⁻¹)	2,3 ± 0,3 ^c	1,3 ± 0,2 ^d
NADH ^b	V _{máx} (μM/min)	35,4 ± 3,6	49,1 ± 7,1
	S _{0.5} (μM)	87,0 ± 4,0	200,5 ± 15,0
	V _{máx} /S _{0.5} (min ⁻¹)	0,41 ± 0,06 ^e	0,24 ± 0,05 ^f

Valores de velocidad normalizados por gramo de tejido fresco.

a, El ensayo contenía guaiacol 5 mM y concentraciones variables de H₂O₂ en amortiguador fosfato (0,1 M, pH 6,0).

b, El ensayo contenía *p*-CA 75 μM y concentraciones variables de NADH en amortiguador fosfato (0,1 M, pH 6,0).

Las letras distintas en los valores de V_{máx}/S_{0.5} indican la diferencia significativa del valor tabulado (p<0,01, para c y d y p<0,2 para e y f).

Tabla 6: Estimulación por fenoles de la oxidación de NADH catalizada por peroxidasas de la fracción iónica y covalente de las paredes celulares de coleoptilos de avena.

Estimulador	FRACCIÓN IÓNICA			FRACCIÓN COVALENTE		
	$V_{\text{máx}}^{\text{a}}$ ($\mu\text{M}/\text{min}$)	$E_{0.5}^{\text{b}}$ (μM)	Factor de estimulación ^c	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{M}/\text{min}$)	$E_{0.5}$ (μM)	Factor de estimulación
Ninguno	$0,12 \pm 0,02$	---	1	$0,51 \pm 0,04$	----	1
Ácido ferúlico	$3,4 \pm 0,2$	$4,4 \pm 0,3$	28	$1,38 \pm 0,09$	$0,68 \pm 0,20$	2,7
Ácido <i>p</i> -cumárico	$165,0 \pm 5,5$	210 ± 14	1375	153 ± 4	268 ± 10	300
Alcohol coniferílico	$0,12 \pm 0,02$	---	1	$0,51 \pm 0,04$	----	1

a, Los valores de velocidad están normalizados por gramo de tejido fresco.

b, $E_{0.5}$, concentración de semi-saturación del estimulador

c, Razón entre la $V_{\text{máx}}$ y la velocidad de oxidación de NADH en ausencia del estimulador.

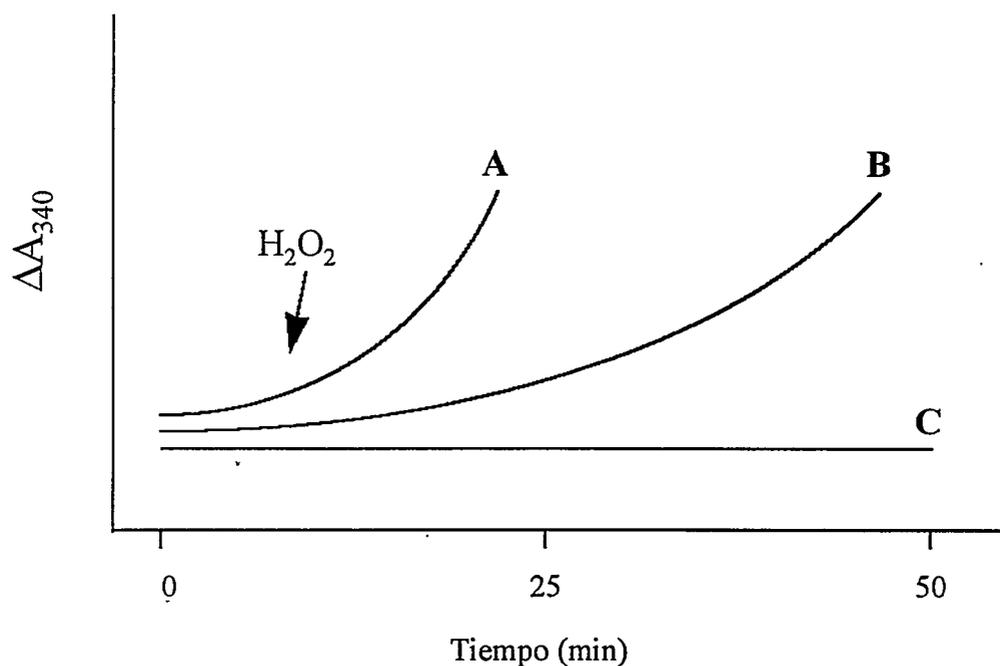


Figura 3 : Efecto de H_2O_2 (A, 1 μM) y catalasa (C, 1 μg de *Aspergillus Niger*, Sigma Chem. Co.) en el curso temporal de la oxidación de NADH estimulada por ácido ferúlico y catalizada por peroxidasas de la fracción iónica de paredes celulares de coleoptilos de avena (B). El medio de reacción contenía NADH 0,16 mM, Mn^{+2} 50 μM , ácido ferúlico 10 μM y 1,7 U de actividad peroxidasa (medida con *o*-PDA 5 mM y H_2O_2 0,5 mM) en amortiguador fosfato (0,1M, pH 7,0).

3.1.c. Patrón isoenzimático de las peroxidasas asociadas a la pared celular

El patrón de isoformas con actividad px en las fracciones de pared celular fue estudiado mediante la técnica de IEF. Las características de este método permitieron obtener una excelente resolución de las bandas enfocadas y una adecuada tinción de la

actividad px de las mismas en menos de 5 min (Fig 4). La visualización rápida de la actividad px en el gel evitó la pérdida de proteínas desde el gel a la solución de tinción, sobretodo si se considera que la técnica emplea geles de baja concentración de acrilamida (5%), ultrafinos (0,4 mm) y que no se sometieron a un proceso de fijación antes del revelado. La tinción completa de las bandas en el gel fue similar usando 4-metoxi-1-naftol, 4-cloro-1-naftol, guaiacol y *o*-PDA. Sin embargo, para la tinción rutinaria de los geles se prefirieron los derivados naftólicos, los cuales, a diferencia del guaiacol y el *o*-PDA, son transformados por la actividad px en un producto coloreado e insoluble que permite mantener los geles teñidos inalterables por meses.

Cuando se investigó la composición de isoformas con actividad px en las fracciones de pared, se observaron diferencias notables en el IEF en un intervalo de pH de 3 a 10 (Fig. 5). La FC presentó principalmente isoformas neutras y ácidas (pI entre 4,5 y 6,5), mientras que la FI contenía isoformas neutras (pI entre 4,8 y 6,0) y básicas (pI entre 8 y 10) (Fig. 5). La banda más básica en la FI (pI alrededor de 9,6) no fue detectada en la FC, aún en geles con FC que contenían 3 veces mayor actividad px que la FI. El patrón de isoformas con actividad px fue similar, ya sea revelado con *o*-PDA, 4-metoxi-1-naftol o 4-cloro-naftol en presencia de H₂O₂. Las diferencias en el patrón de isoformas en la FC, no se deben a una desglicosilación parcial mediante la acción de glicanasas presentes en la preparación de celulasa y pectinasa, pues el tratamiento de la FI por 12 h con celulasa y pectinasa no alteró el patrón de isoformas y tampoco las constantes cinéticas aparentes en la utilización de los sustratos E-FA y CA. Más aun, las preparaciones comerciales de celulasa y pectinasa carecían de actividad px en la oxidación de *o*-PDA o CA.

Finalmente, la Fint presentó un patrón de isoformas con actividad px cualitativamente más parecido al observado en la FI que en la FC (Fig. 5). La Fint se compone de un conjunto de isoformas ácidas y neutras de pI entre 4,8 y 6,0 y de dos isoformas básicas con pIs de aproximadamente 7,5 y 9,6, respectivamente. El patrón de isoperoxidasas de la Fint sufrió variaciones durante la incubación de coleoptilos de avena por 24 h, pues algunas de las isoformas ácidas y neutras, así como la isoforma más básica (pI 9,6), desaparecieron del fluido intercelular extraído a las 8 y 22 h, pero apareció una nueva banda de pI 6,2 desde las 8 h de incubación (ver Fig. 15, columnas A, C y E).

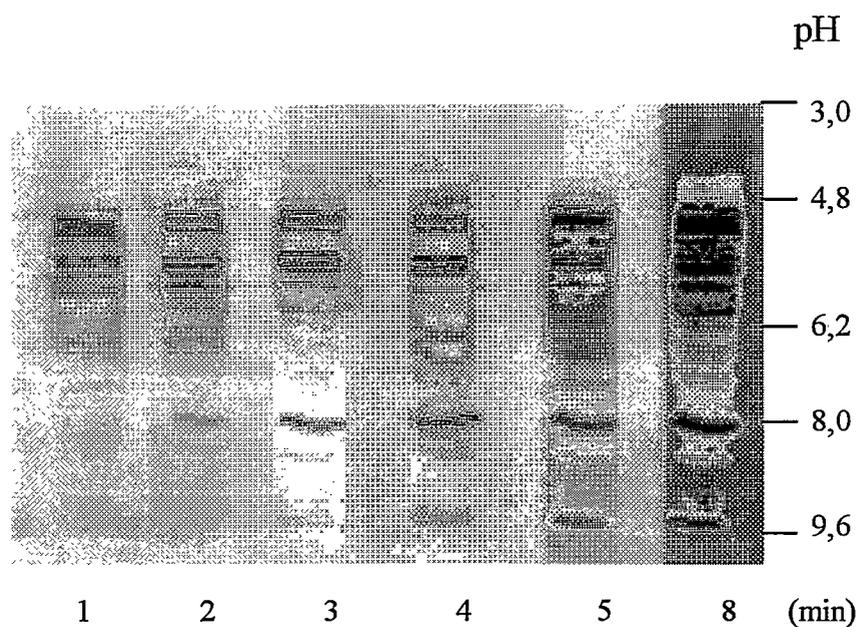


Figura 4 : Secuencia de aparición del patrón de isoformas con actividad peroxidasa en un gel de IEF durante la tinción con *o*-PDA y H_2O_2 , como se describe en materiales y Métodos. La muestra enzimática aplicada al gel (1,5 UPx, medida con *o*-PDA y H_2O_2), proviene de un extracto de coleoptilos de avena (líquido sobrenadante 10.000 xg).

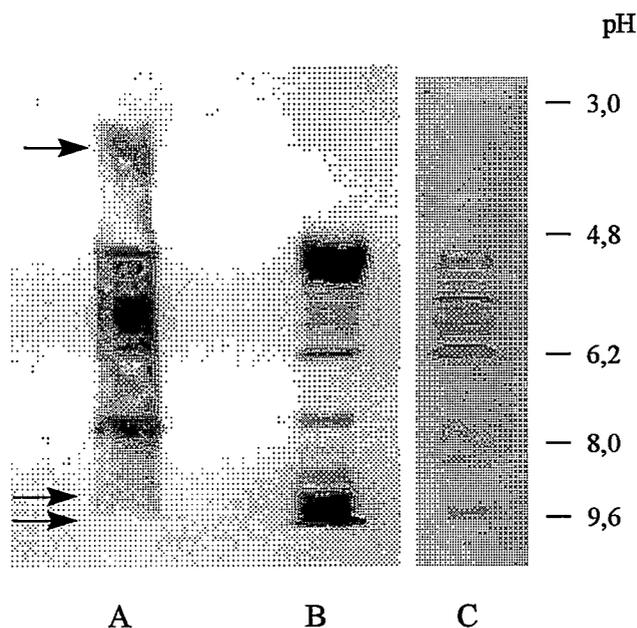


Figura 5 : Patrón de isoformas con actividad peroxidasa contenidas en las fracciones covalente (A), iónica (B) e intercelular (C) de paredes celulares de coleoptilos de avena. El gel de IEF fue teñido con 4-metoxi-1-naftol y H_2O_2 . Las flechas indican las principales diferencias en la composición de isoformas entre las tres fracciones de pared.

3.1.d. *Relación entre la actividad peroxidasa y la acumulación de diferulato y lignina en la pared celular.*

3.1.d.1. *Separación de fenoles esterificados a las paredes celulares de avena mediante HPLC*

Los diversos compuestos esterificados a la pared celular de coleoptilos de avena, fueron eficientemente resueltos a través de HPLC con la adaptación de un gradiente convexo como se describió en la sección de Materiales y Métodos. Las condiciones del método generaron una excelente resolución de los compuestos fenólicos estándares de

interés como el *p*-CA, E-FA y DFA, así como de los compuestos presentes en las muestras saponificadas de pared celular (Fig. 6 A-B). Una corrida típica de un extracto saponificado se muestra en la Fig. 6B, donde los picos de fenoles fueron identificados por comparación del tiempo de retención con el estándar y su respectivo espectro UV. Fue posible de determinar las áreas y de las respectivas curvas de calibración para cada compuesto fenólico analizado, que los niveles aproximados de E-FA, *p*-CA y DFA en los coleoptilos de avena de 6 días están en el orden de 2 a 3 μg , 0,06 a 0,08 μg y 0,1 a 0,3 μg por mg de pared celular, respectivamente. Así, el E-FA es el principal fenol en paredes celulares de coleoptilos, presente en aproximadamente 36 y 12 veces la cantidad de *p*-CA y DFA, respectivamente.

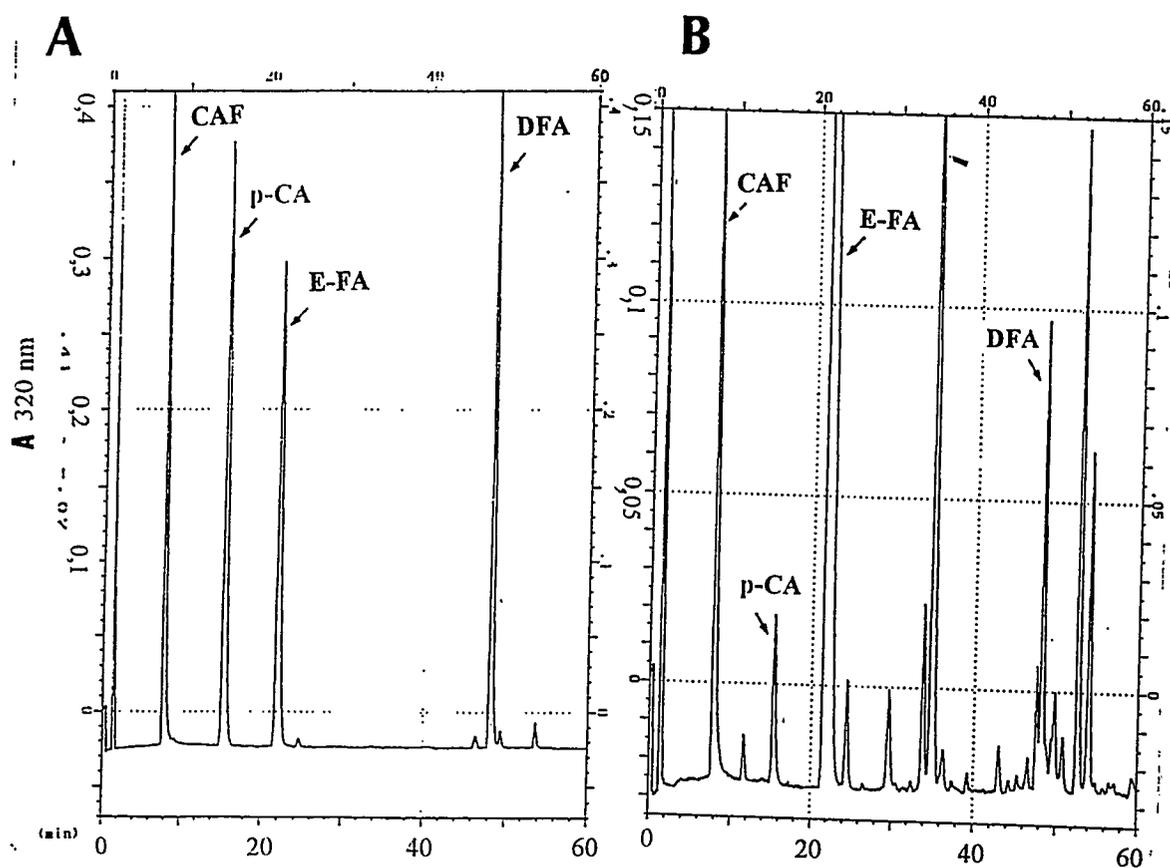


Figura 6 : Separación de compuestos fenólicos mediante HPLC utilizando un gradiente convexo de acetonitrilo / ácido acético 3%. **A**, cromatografía de una mezcla de compuestos estándares (7 μg cada uno) : ácido cafeico (CAF, estándar interno, t_R alrededor de 9 min), ácido *p*-cumárico (p-CA, t_R alrededor de 15,5 min), ácido ferúlico (E-FA, t_R alrededor de 22 min), ácido diferúlico (DFA, t_R alrededor de 48 min). **B**, cromatografía típica de un extracto saponificado de paredes celulares de coleoptilos de avena.

3.1.d.2. *Actividad peroxidasa y polímeros fenólicos en las paredes celulares de segmentos de coleoptilos*

La actividad px presente en la FI y FC aumentó considerablemente cuando se incubaron segmentos de coleoptilos en una solución aireada de MES (5 mM, pH 5,8) (Fig. 7). Este efecto, en coleoptilos que aun continúan en crecimiento, fue evidente después de 4,5 h de incubación y se niveló entre las 10 y 24 h de incubación (Fig. 7). El aumento de actividad px fue observado usando como sustratos NADH, CA u *o*-PDA en presencia de H₂O₂; sin embargo, fue un 50 a 60% mayor en la FI en comparación a FC (Fig. 7). En forma paralela se determinaron los niveles de E-FA, DFA y lignina asociados a las paredes de los segmentos de coleoptilos, los cuales presentaron un incremento en su acumulación posterior al incremento de la actividad px en la FI (Figs. 7 y 8). Más aún, el nivel de DFA aumentó en la pared más rápidamente que el de E-FA, a juzgar por la disminución en la razón E-FA/DFA desde las 10 h de incubación de los coleoptilos (Fig. 9). En conjunto, estos resultados sugieren que la formación de DFA y lignina en segmentos de coleoptilos de avena, podría estar preferencialmente asociada a la actividad px de la FI de pared celular.

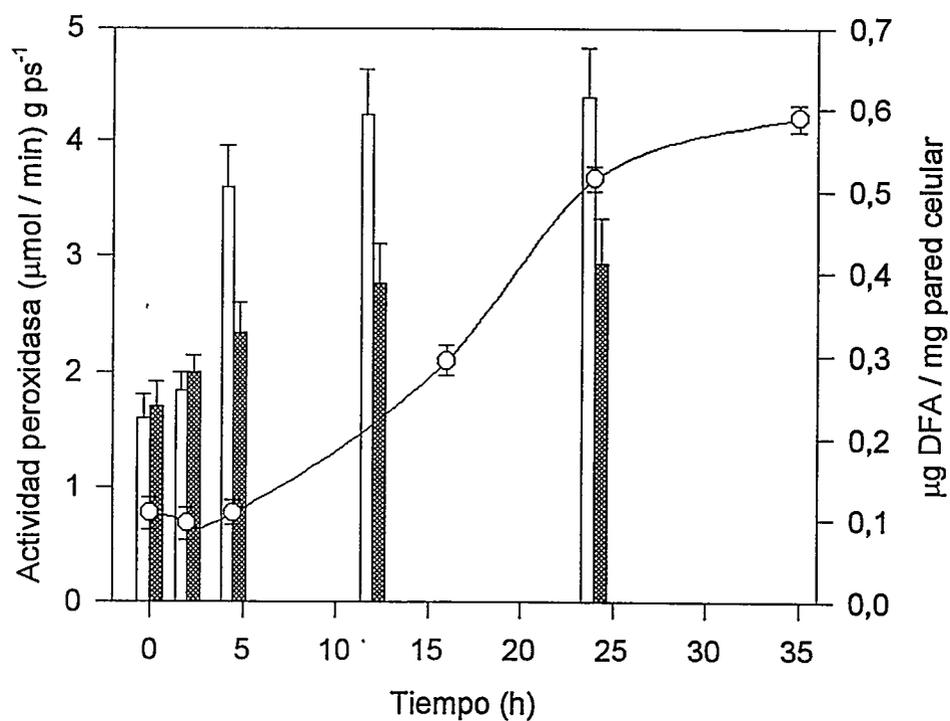


Figura 7 : Acumulación de diferulato (DFA, \bigcirc) y actividad peroxidasa en la fracción iónica (\square) y covalente (\blacksquare) de paredes celulares durante el tiempo de incubación de segmentos de coleoptilos de avena. Los valores representan la media \pm d.e. de tres fracciones independientes de una muestra de tejido.

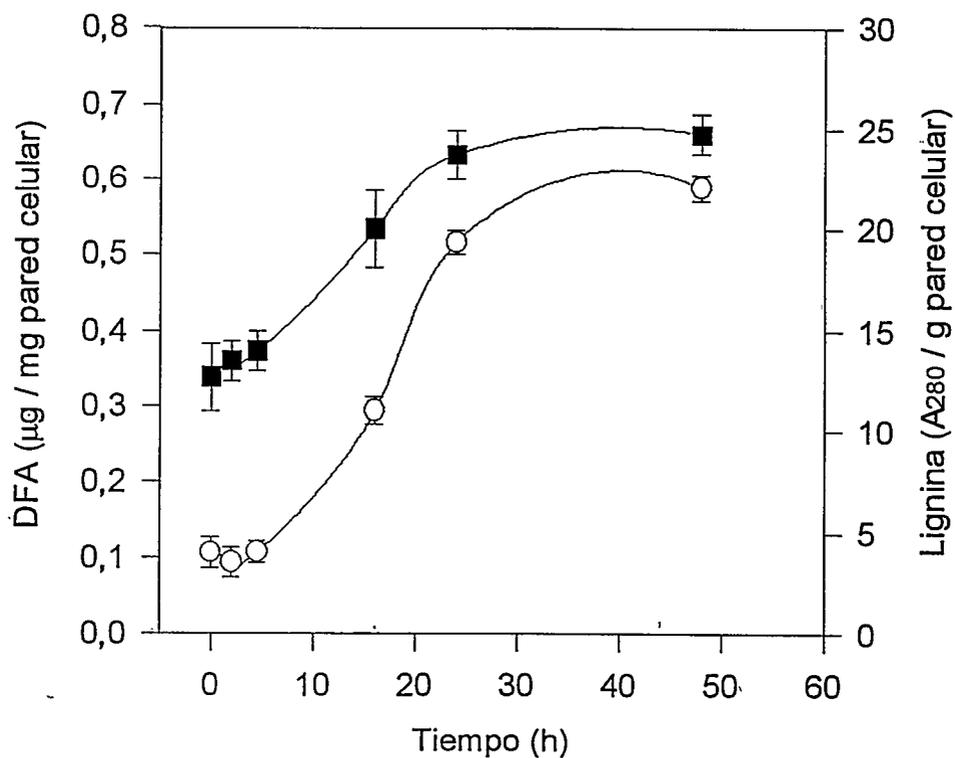


Figura 8 :Acumulación de lignina (■) y diferulato (DFA, O) en paredes celulares durante el tiempo de incubación de segmentos de coleoptilos de avena. Los valores representan la media \pm d.e. de tres fracciones independientes de una muestra de tejido.

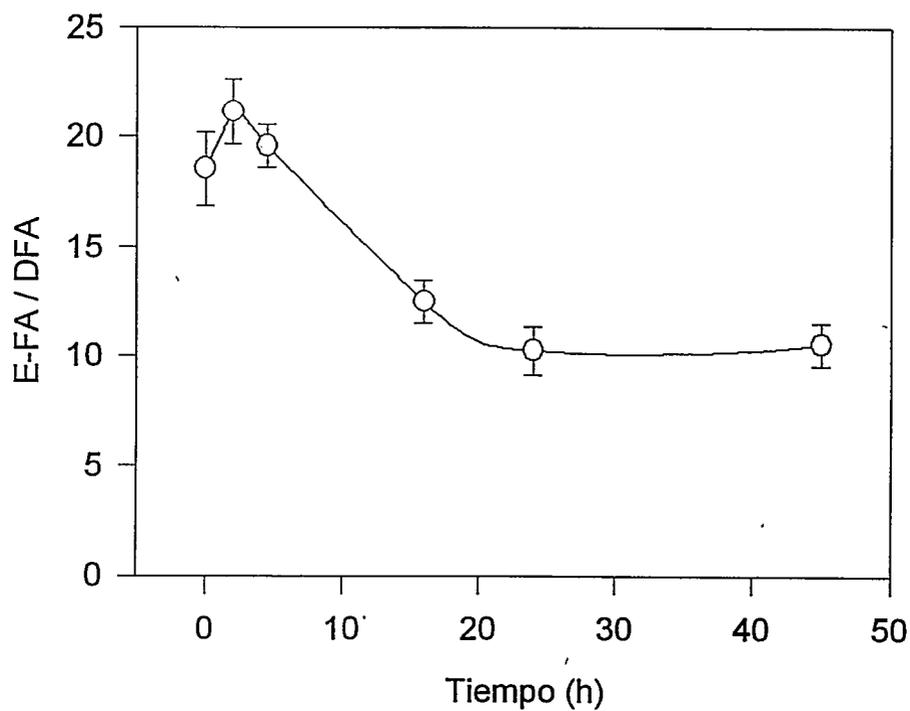


Figura9 : Razón ferulato (E-FA) a diferulato (DFA) en paredes celulares de segmentos coleoptilos de avena a diferentes tiempos de incubación. Los valores representan medias \pm d.e. de tres fracciones independientes de una muestra de tejido. Los valores de E-FA y DFA a $t=0$ fueron de 1,78 y 0,095 μg por mg de pared celular.

3.2 REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y PEROXIDASAS DE LA PARED CELULAR

3.2.a. AIA, auxina estimuladora del crecimiento.

3.2.a.1 *La auxina AIA estimula el crecimiento de coleoptilos de avena*

Los segmentos etiolados de coleoptilos de avena crecieron proporcional al logaritmo de la concentración de AIA hasta un 25% de su longitud inicial (Fig. 10). A una concentración fija de AIA de 40 μM , la cual produce la máxima respuesta de elongación, el crecimiento de los coleoptilos fue también dependiente del tiempo de incubación, lográndose un incremento máximo cerca de las 10-12 h de incubación de un 46% del peso fresco y un 20% del peso seco original (Fig. 11).

3.2.a.2. *El AIA disminuye la actividad peroxidasa de pared celular en coleoptilos de avena*

En coleoptilos de avena incubados con 40 μM AIA, la actividad px asociada a las fracciones iónicas, intercelular y covalente de pared celular, disminuyó notablemente con respecto al control desde la primera hora de tratamiento (Fig. 12). Un efecto similar se ha informado para la auxina sintética, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), la cual disminuyó la actividad px extraída por infiltración desde hipocotilos de lupino (Ros Barceló y col., 1987).

A pesar que la actividad px de pared disminuyó en general por efecto de la hormona, se observaron interesantes diferencias en el grado de inhibición en las distintas

fracciones de pared estudiadas cuando la actividad enzimática fue medida con CA o NADH (Fig. 12). La actividad px en la FI y Fint disminuyó hasta un 50 a 60%, mientras que en la FC disminuyó sólo hasta un 30 a 35% de la actividad inicial (Fig. 12). Esta diferencia en la inhibición de la actividad px entre la FC y las otras fracciones de pared, no se observó cuando la actividad px fue medida con *o*-PDA (Fig. 12). Así, estos resultados sugieren que el tratamiento hormonal podría afectar preferencialmente a isoperoxidasas específicas en la utilización de sustratos naturales presentes en la pared celular. El origen, consecuencias y ventajas de este fenómeno serán discutidas en la sección de "Discusión".

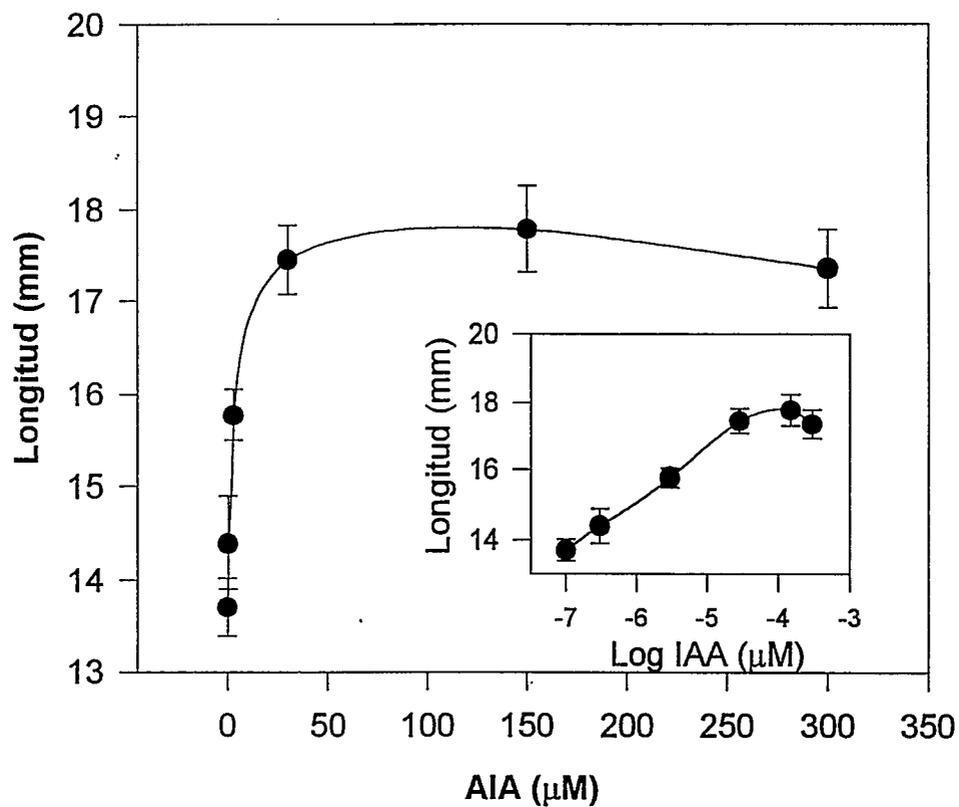


Figura 10 : Crecimiento de segmentos de coleótilos de avena de 10 mm, después de 24 h de incubación con AIA . Inserto : Curva de crecimiento expresada en concentración logarítmica del AIA.

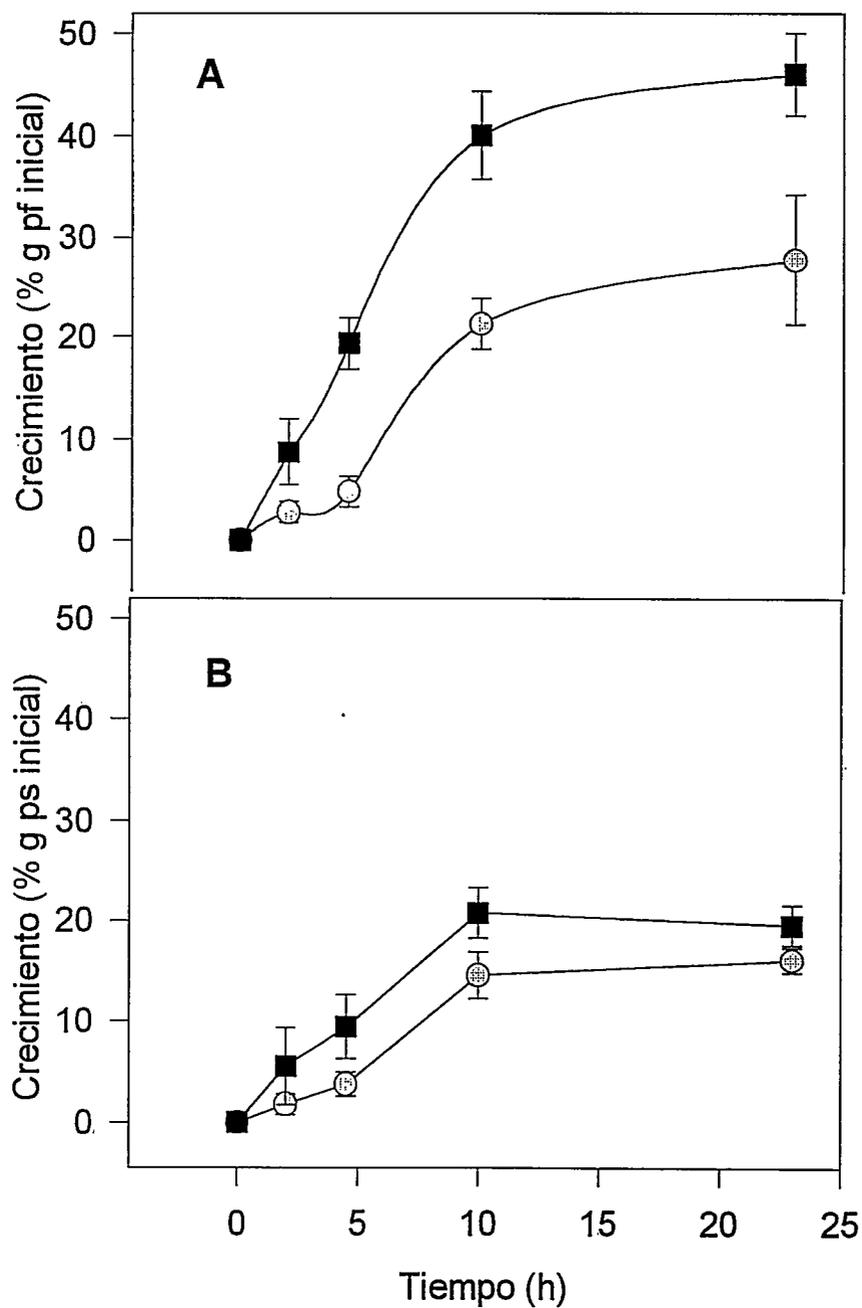


Figura 11 : Variación en el peso fresco (A) o seco (B) de segmentos de coleoptilos de avena durante el tiempo de incubación en presencia (■) o ausencia (○) de AIA 40 μ M.

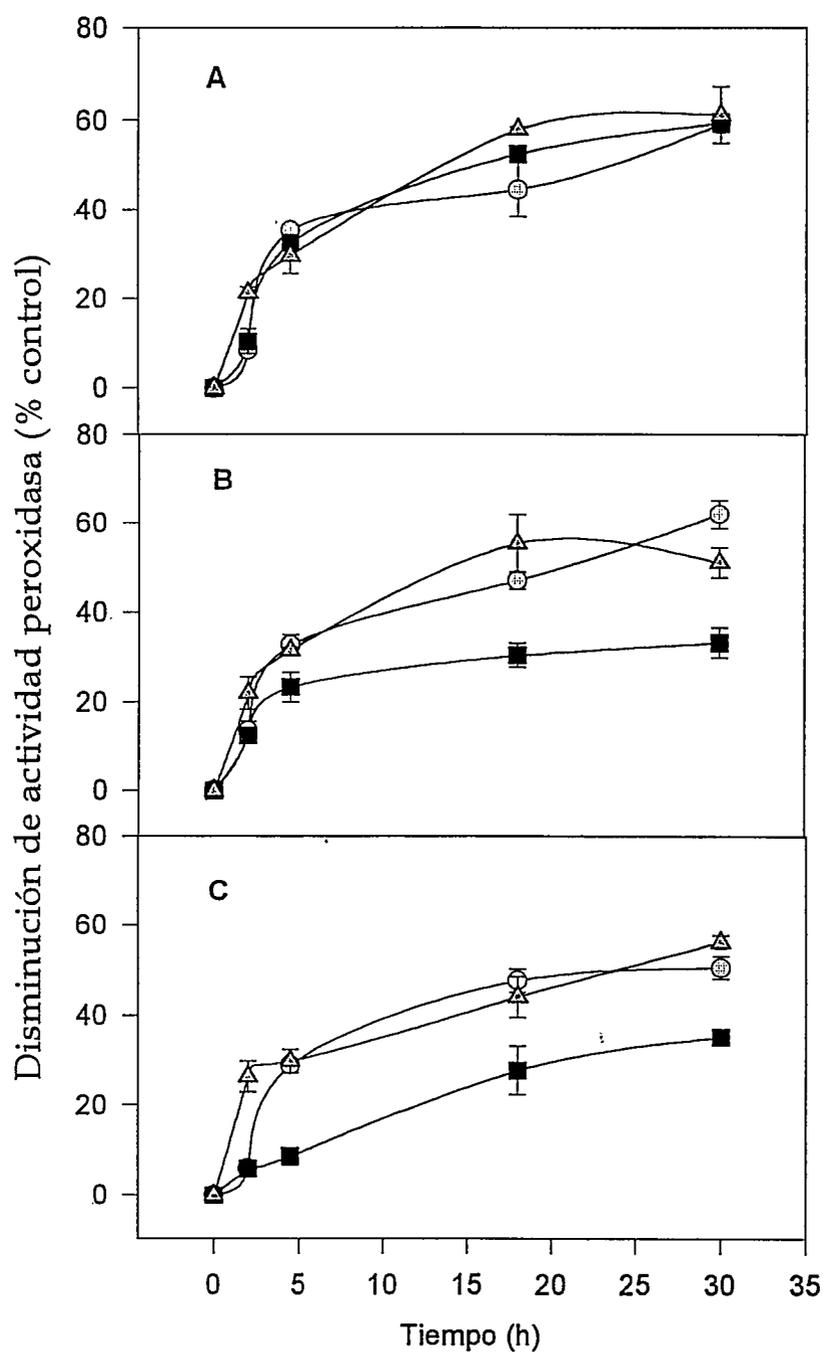


Figura 12 : Disminución de la actividad peroxidasa contenida en las fracciones iónica (O), covalente (■), e intercelular (▲) de paredes celulares de coleoptilos de avena durante la incubación con AIA 40 μ M (■, O, ▲). La actividad peroxidasa fue ensayada con o-PDA (A), alcohol coniferílico (B) o NADH (C).

3.2.a.3. *El AIA altera el patrón de isoformas con actividad peroxidasa asociada a la pared celular de coleoptilos de avena*

El tratamiento de los coleoptilos con AIA 40 μM provocó alteraciones en el patrón de isoperoxidasas contenida en las FI, FC e Fint de pared celular. Como se muestra en las Figs. 13 a 15, el IEF reveló que en todas las fracciones de pared el tratamiento con la hormona por 20 h redujo la actividad de isoformas ácidas (pI 4,0 a 5,0) al final de 20 h de tratamiento. Debido a la mayor facilidad de obtención de la Fint de pxs con respecto a las FI y FC, fue posible estudiar en esta fracción los cambios de isoperoxidasas a distintos tiempos de tratamiento con AIA (Fig. 15). La hormona no modificó el patrón de isoformas a las dos horas de tratamiento, pero aumentó la actividad de una isoforma ácida (pI 5,5) a las 8 h, cuya actividad disminuye junto con un grupo de isoformas más ácidas de pIs entre 4 y 5 a las 24 h de tratamiento. Una forma básica de pI 9,6, pre-existente en el fluido intercelular de coleoptilos a las 2 h, reapareció al final de las 24 h de tratamiento con AIA. La forma básica de pI 9,6 también aumentó en actividad en la FI de coleoptilos tratados con AIA por 24 h (Fig. 13). El aumento de actividad de isoformas básicas por efecto del AIA ha sido frecuentemente reportado en la literatura y generalmente atribuido a la activación de isoformas pre-existentes (Gaspar y col., 1985; Ferrer y col., 1991). Un posible mecanismo involucrado en la activación de pxs básicas postula la disminución de compuestos fenólicos que enmascaran la actividad px (Kevers y col., 1984; Gaspar y col., 1985). También se ha sugerido la secreción de pxs básicas a la pared inducida por Ca^{+2} y AIA (Gaspar y col., 1983; Xu y van Huystee, 1993).

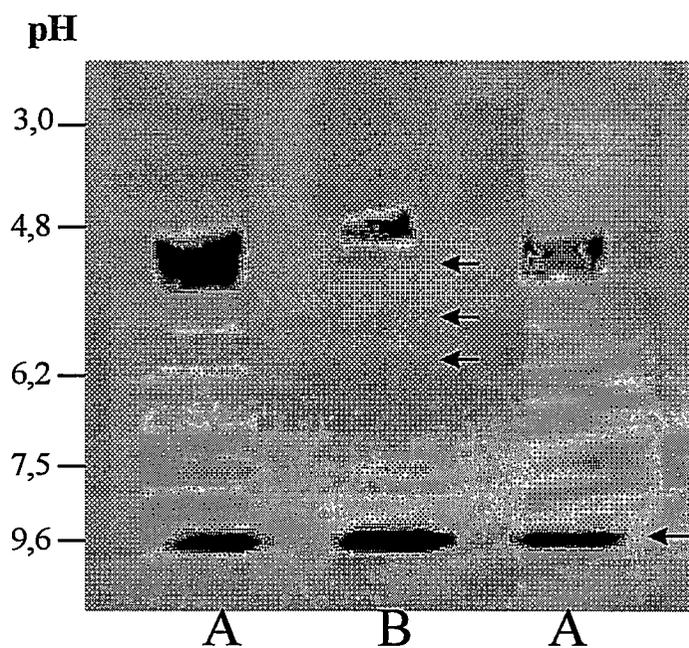


Figura 13: Patrón de IEF de isoformas con actividad peroxidasa contenida en la fracción iónica de paredes celulares de coleoptilos controles (A) y tratados con AIA 40 μM (B). El gel de IEF fue teñido con 4-metoxi-1-naftol y H_2O_2 . Las flechas indican las isoformas alteradas por el tratamiento hormonal.

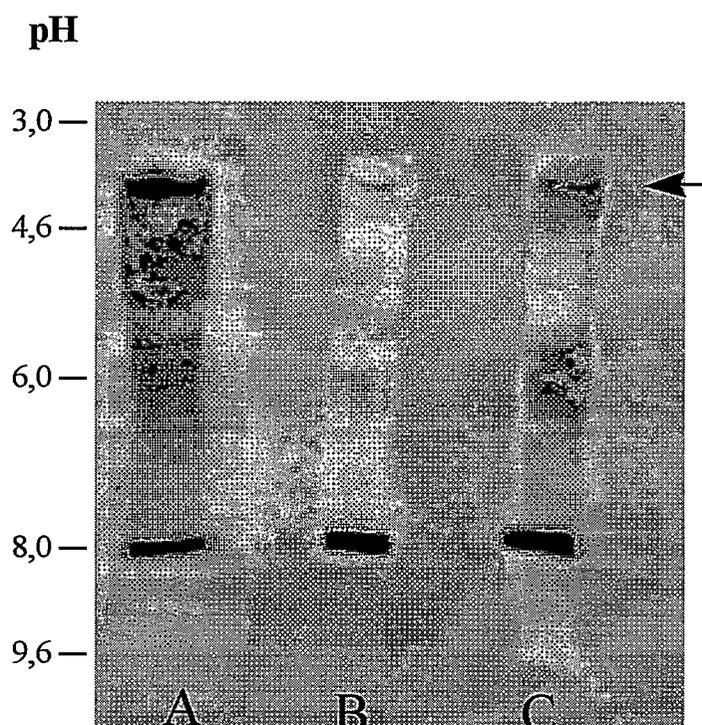


Figura 14: Patrón de IEF de isoformas con actividad peroxidasa contenida en la fracción covalente de paredes celulares de coleoptilos controles (A) y tratados con AIA 40 μ M (B, C). El gel de IEF, teñido con 4-metoxi-1-naftol y H_2O_2 , fue cargado con 1,0 U (A, B) y 1,5 U (C) de actividad peroxidasa, medidas con o-PDA. La flecha indica el principal grupo de isoformas alteradas por el tratamiento hormonal.

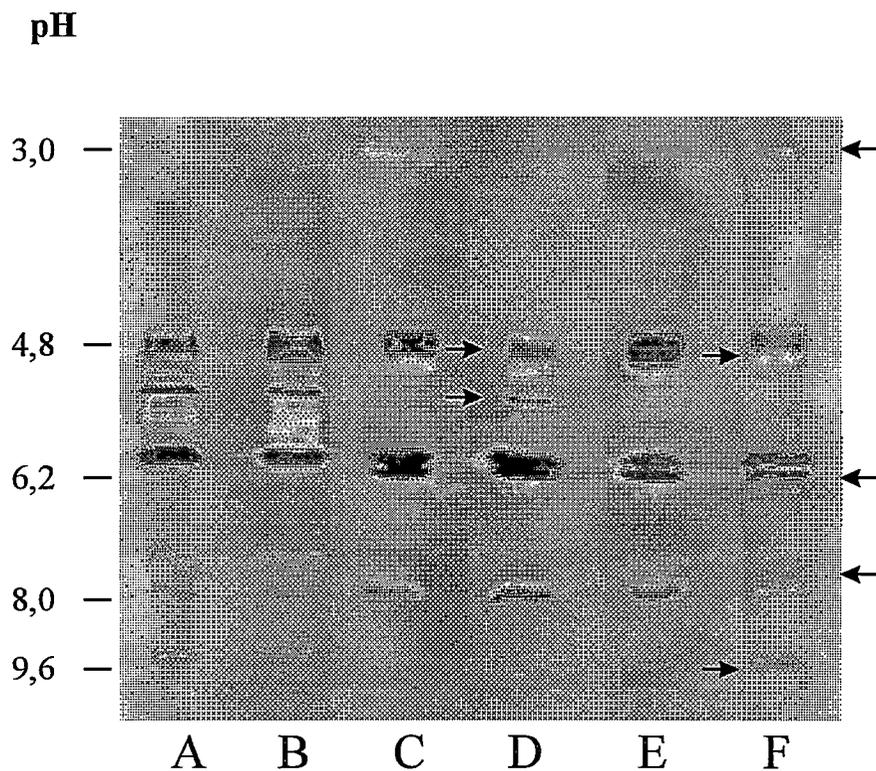


Figura 15: Patrón de IEF de isoformas con actividad peroxidasa contenida en la fracción intercelular de paredes celulares de coleoptilos de avena controles (A, C, E) y tratados con AIA 40 μ M (B, D, F) durante 2 (A, B), 8 (C,D) y 20 h (E, F). El gel de IEF, teñido con 4-metoxi-1-naftol y H_2O_2 , fue cargado con 1,2 Upx medida con o-PDA y H_2O_2 . Las flechas indican los principales cambios de isoformas en el tiempo de tratamiento.

3.2.a.4. Utilización de AIA y fenoles por isoperoxidasas ácidas y básicas de la pared celular.

Las isoperoxidasas ácidas y básicas fueron separadas desde la FI de pared mediante cromatografía en una columna de carboximetil sepharose. La actividad px que no fue retenida en la columna contenía isoformas ácidas, mientras que la actividad px retenida en la columna contenía dos isoformas básicas (Fig. 16). Después del paso por la columna, se recuperó el 72% de la actividad px sometida a la separación. Del total de proteínas de pared contenidas en la FI, la fracción básica (retenida en la columna) contiene cerca de 1,5 y 7,0 veces la actividad px y proteínas, respectivamente, de la fracción ácida (no retenida) (Tabla 7). Estos resultados reflejan la condición polianiónica de la pared celular, probablemente debido a la presencia de polisacáridos pectínicos ácidos, con gran capacidad de retención de moléculas catiónicas (básicas).

Las fracciones de isoperoxidasas ácidas y básicas fueron analizadas en su capacidad de utilizar como sustratos AIA, H₂O₂, FA y CA. Todos los ensayos presentaron curvas de saturación hiperbólicas y, excepto en la oxidación de AIA, no se observó reacción en ausencia de H₂O₂, descartando la posible interferencia con actividad polifenoloxidasa. En la Tabla 8, se muestran los valores de V_{máx} y S_{0.5} calculados del ajuste de las respectivas curvas de saturación, así como los valores de velocidad a concentraciones subsaturantes V_{máx}/S_{0.5}. Los valores de velocidad fueron normalizados sobre la base del peso del tejido fresco (tf), unidades de actividad px (Up_x, mediadas con *o*-PDA) agregadas al medio de ensayo o la absorbancia a 403 nm. Este último valor refleja el contenido hemínico debido mayoritariamente a la presencia de px en la muestra

(van Huystee, 1987). El E-FA y el CA fueron los sustratos mejor utilizados por ambos grupos de isoformas en presencia de H_2O_2 , a juzgar por los valores más altos de la razón $V_{m\acute{a}x}/S_{0.5}$ usando cualquiera de las normalizaciones de la velocidad (g tf, Upx, o A_{403}) (Tabla 8). El AIA, dependiendo del parámetro de normalización de la velocidad, fue utilizado con baja eficiencia catalítica en comparación al resto de los sustratos analizados. Sin embargo, las isoformas ácidas y básicas presentaron diferencias en la utilización de los sustratos fenólicos y de AIA, especialmente cuando se comparan los valores normalizados por la A_{403} o g tf. Las isoformas ácidas utilizaron cerca de 4 veces más efectivamente el AIA que las isoformas básicas, en tanto, que las isoformas básicas fueron aproximadamente 2, 5 y 3 veces más eficientes que las isoformas ácidas en la utilización de FA, CA y H_2O_2 , respectivamente ($p < 0,01$, Tabla 8). Las isoformas ácidas son las especies preferencialmente inhibidas por el tratamiento con AIA en todas las fracciones de pared y, considerando que éstas son más eficientes en la utilización del AIA que las isoformas básicas, la respuesta global del coleoptilo tratado con AIA, incluyendo la inhibición de la actividad px de pared, al parecer tiende a evitar la destrucción oxidativa de la hormona. Esta idea será analizada en detalle en la próxima sección.

Por otra parte, las diferencias cinéticas en la utilización de CA, E-FA y H_2O_2 entre los grupos de isoformas en la FI, sugieren un importante papel de las isoformas básicas en la mayor relevancia de la FI con respecto a la FC en la oxidación y polimerización de sustratos fenólicos en la pared celular.

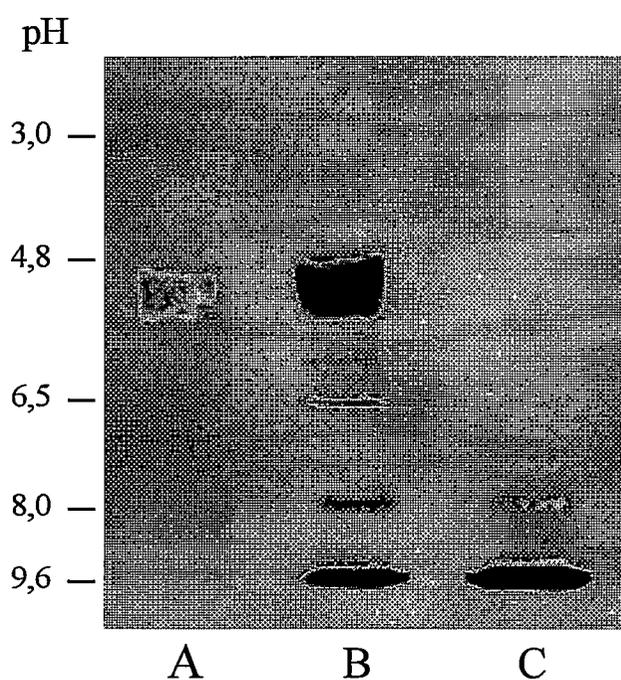


Figura 16: Patrón de IEF de los grupos de isoformas ácidas (A) y básicas (C) de la fracción iónica (B) de la pared celular, separadas por cromatografía de intercambio catiónico en una columna de carboximetil sepharose. El gel de IEF fue teñido con 4-metoxi-1-naftol y H_2O_2 .

Tabla 7 : Separación de isoformas ácidas y básicas de peroxidasa desde la fracción iónica de paredes celulares de coleoptilos de avena por cromatografía en carboximetil Sepharose.

Fracción	Volumen total (ml)	Proteína total (mg)	Actividad Peroxidasa total ($\mu\text{mol}/\text{min}$)*
Retenida en columna (isoperoxidasas básicas)	6,50	0,11	774
No retenida en columna (isoperoxidasas ácidas)	7,25	0,76	448

* La muestra de fracción iónica cargada en la columna contenía 1656 U de actividad peroxidasa, medidas con o-PDA 5 mM y H_2O_2 0,5 mM

Tabla 8: Utilización de AIA, sustratos fenólicos y H₂O₂ por isoperoxidasas ácidas y básicas de la fracción iónica de pared celular de coleoptilos de avena.

Sustrato	Isoperoxidasa	V _{máx}			S _{0,5} μM	V _{máx} /S _{0,5} (min ⁻¹)		
		mM/min (1)	mM/min (2)	μM/min (3)		1 (x 10 ⁻³)	2 (x 10 ⁻³)	3 (x 10 ⁻²)
Ácido Ferúlico	Ácida	55,9 ± 4,5	308,8 ± 25	11,4 ± 0,9	59,2 ± 4,1	0,94 ± 0,08	5,2 ± 0,4	19,3 ± 1,5
	Básica	61,2 ± 6,8	1089 ± 131	37,5 ± 4,5	91,2 ± 8,3	0,67 ± 0,07	11,9 ± 1,4	41,1 ± 5,0
Alcohol Coniferílico	Ácida	282 ± 14	1635 ± 71	57,4 ± 3	454 ± 37	0,62 ± 0,09	3,6 ± 0,3	13,0 ± 2,0
	Básica	383 ± 25	6819 ± 441	235 ± 15	330 ± 36	1,16 ± 0,06	20,7 ± 1,1	71,0 ± 3,0
H ₂ O ₂	Ácida	8,3 ± 0,4	44,9 ± 1,8	1,7 ± 0,1	20,2 ± 1,6	0,41 ± 0,03	2,2 ± 0,2	8,3 ± 1,0
	Básica	5,8 ± 0,1	102,5 ± 2,5	3,5 ± 0,1	12,8 ± 1,1	0,45 ± 0,05	8,0 ± 0,9	27,5 ± 3,3
AIA	Ácida	6,7 ± 0,4	37,6 ± 2,4	1,4 ± 0,1	57,5 ± 5,5	0,12 ± 0,01	0,65 ± 0,005	2,42 ± 0,2
	Básica	3,6 ± 0,3	62,9 ± 4,4	2,2 ± 0,2	381 ± 45	0,09 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,57 ± 0,06

(1) Valores de velocidad normalizados por Upx de la muestra enzimática utilizada.

(2) Valores de velocidad normalizados por la A₄₉₃ de la muestra enzimática utilizada.

(3) Valores de velocidad normalizados por gramo de tejido fresco del cual se obtuvo la FI.

3.2.a.5. *Acumulación de diferulato y lignina en las paredes celulares de coleoptilos de avena tratados con AIA*

El tratamiento de los coleoptilos con AIA no afectó significativamente el nivel de polímeros fenólicos de lignina y DFA en la pared celular en las primeras 22 h de tratamiento, período en el cual se observó el efecto hormonal sobre el crecimiento (Figs. 17 y 18). Sólo después de 48 h de tratamiento el AIA redujo los niveles de DFA y lignina, pero al parecer este efecto no tendría una relación causal con la elongación del coleoptilo promovido por el AIA, sino más bien podría ser una consecuencia de la disminución de la actividad px de pared desde la primera hora de tratamiento. A pesar de ello, en distintos experimentos con coleoptilos tratados con AIA se observó una tendencia de aumento en los niveles de DFA después de las 24 h de tratamiento (Fig. 17), que podría estar relacionada con el reforzamiento de la estructura de pared distendida por la hormona durante la estimulación del crecimiento.

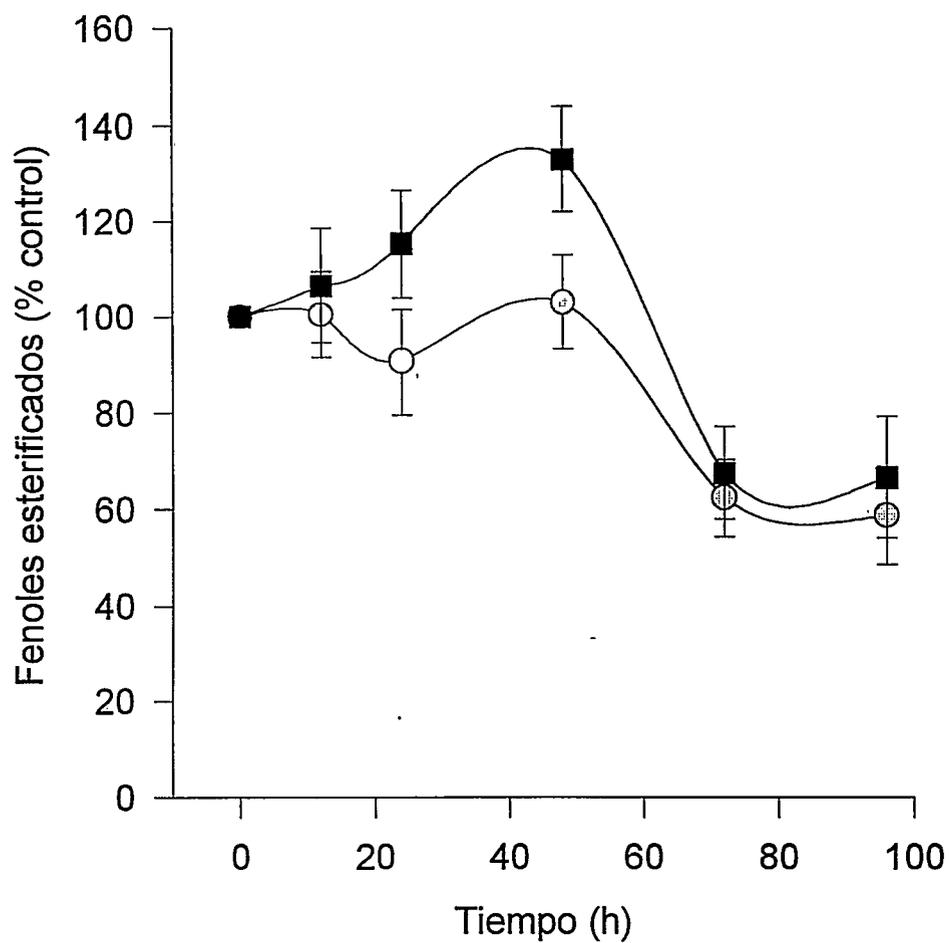


Figura 17 : Niveles de ác. diferúlico (DFA, ■) y ferúlico (E-FA, ○) en paredes celulares de coleoptilos de avena durante el tiempo de incubación con AIA 40 μ M. Los niveles de E-FA y DFA al inicio del experimento fueron de 3,60 y 0,29 μ g por mg de pared celular.

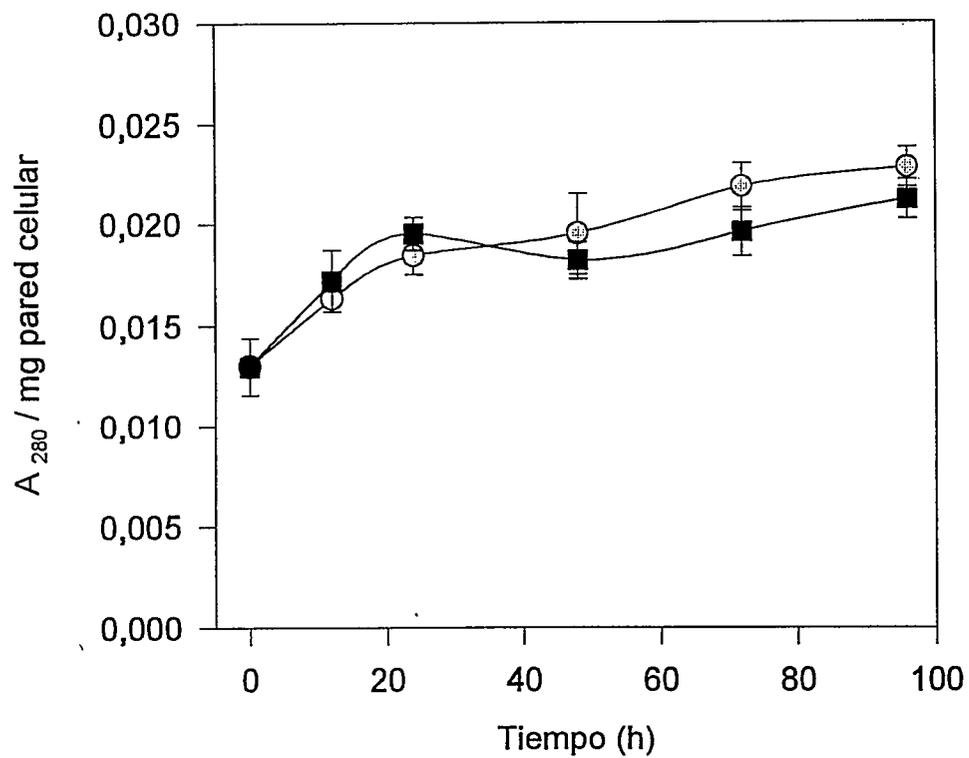


Figura 18 : Niveles de lignina en paredes de coleoptilos de avena durante el tiempo de incubación en presencia (■) o ausencia (○) de AIA 40 μM

3.2.b DIMBOA, ácido hidroxámico inhibidor del crecimiento

3.2.b.1 *DIMBOA inhibe el crecimiento de coleoptilos de avena*

El crecimiento de los coleoptilos de avena, evaluado en la variación de longitud, fue notablemente reducido con respecto al control desde un 29% en presencia de DIMBOA 50 μM , hasta casi un 45% a concentraciones por sobre los 150 μM de DIMBOA ($p < 0.01$, Fig. 19a). Más aun, a una concentración fija de 75 μM , el efecto inhibitorio del DIMBOA sobre el crecimiento se detectó por una disminución del 80% en la acumulación de peso fresco, desde las 2 h de tratamiento (Fig. 19b). Todos los siguientes experimentos con DIMBOA fueron realizados con una concentración de 75 μM , con la cual se obtiene cerca de la máxima inhibición del crecimiento de los coleoptilos de avena (Fig. 19b).

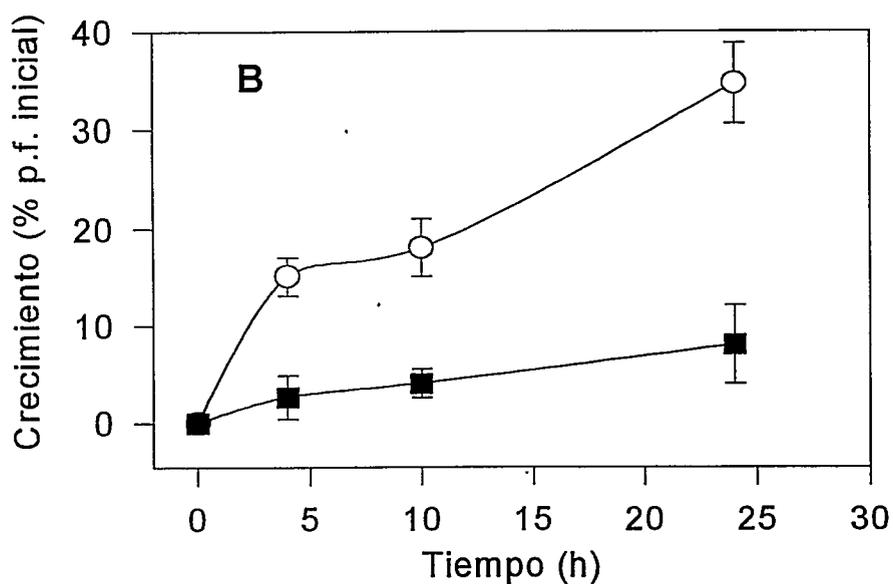
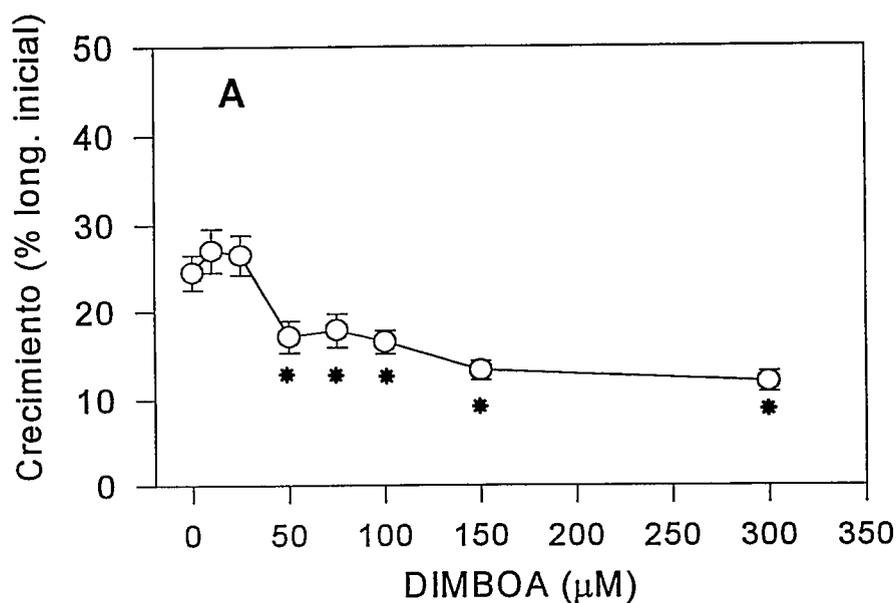


Figura 19 : Inhibición del crecimiento de segmentos de coleótilos de avena por DIMBOA. **A**, variación en longitud de segmentos de coleótilos de después de 24 h con DIMBOA. Los * indican los valores significativamente distintos del control determinado en una prueba de mínima diferencia significativa ($p < 0,01$). **B**, variación en la acumulación de peso fresco de coleótilos durante la incubación en ausencia (O) o presencia (■) de DIMBOA 75 μM .

3.2.b.2 DIMBOA estimula la oxidación de NADH catalizada por peroxidasas de la pared celular de coleoptilos de avena.

El DIMBOA resultó ser un efectivo estimulador de la oxidación de NADH catalizada por pxs de pared en el coleoptilo de avena. El efecto fue dependiente de la concentración de DIMBOA con una cinética de saturación. La máxima velocidad de oxidación de NADH en presencia de DIMBOA fue similar a la obtenida en presencia de *p*-CA (Tabla 9 y 6), con factores de estimulación de 1523 y 246 para la FI y FC, respectivamente (Tabla 9).

Tabla 9 : Estimulación por DIMBOA de la oxidación de NADH catalizada por peroxidasas de la pared celular de coleoptilos de avena.

FRACCIÓN	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{M}/\text{min}$)	$E_{0.5}$ (μM)	$V_{\text{máx}}/E_{0.5}$ (min^{-1})	Factor de estimulación*
Iónica	$182,8 \pm 15,0$	$95,5 \pm 13,1$	$1,91 \pm 0,32$	1523
covalente	$125,7 \pm 2,0$	$139,2 \pm 3,8$	$0,9 \pm 0,05$	246

Los valores de velocidad están normalizados por gramo de tejido fresco.

*Razón entre $V_{\text{máx}}$ y la velocidad de oxidación de NADH en ausencia de DIMBOA ($0,12 \mu\text{M}/\text{min}$ y $0,51 \mu\text{M}/\text{min}$ para la fracción iónica y covalente, respectivamente).

La velocidad de oxidación de NADH a concentraciones subsaturantes de DIMBOA ($V_{\text{máx}}/E_{0.5}$), resultó ser de 2 veces mayor para la FI que para la FC ($p < 0,01$, Tabla 9), lo que apoya un papel preferencial de las pxs de la FI en la generación de H_2O_2 a nivel de la pared por efecto del ácido hidroxámico. De este modo, serían las pxs de la FI las principalmente implicadas en modificar las características físicas y químicas de la pared celular como elemento en la limitación del crecimiento inducido por DIMBOA. La reacción fue efectivamente catalizada por la actividad px presente en las fracciones de pared celular, pues durante la estimulación con DIMBOA la reacción fue inhibida entre un 72 a 99% al adicionar quercetina, ácido gentísico, SOD, ascorbato y cianuro (Tabla 10), todos ellos eficientes inhibidores de las pxs (Halliwell, 1978; Brouwer y col., 1986). Se ha informado que el radical O_2^- participa como intermediario en la oxidación de NADH catalizada por pxs (Yokota y Yamazaki, 1965; Elstner y Heupel, 1976; Halliwell, 1978), lo que explica el efecto inhibitorio de la SOD en esta reacción (Tabla 10).

Tabla 10 : Oxidación de NADH catalizada por peroxidasa de la fracción iónica de la pared celular de coleoptilos de avena en presencia de DIMBOA e inhibidores de la actividad peroxidasa.

ADICIÓN	Oxidación NADH ($\mu\text{M}/\text{min}$)*	% Inhibición de la reacción estimulada
Ninguna	0,17	-
DIMBOA 75 μM	73,70	-
" + quercetina (0,5 mM)	20,64	72
" + ác. gentísico (0,5 mM)	10,63	85
" + ác. ascórbico (0,5 mM)	0,40	99
" + KCN (0,3 mM)	11,13	85
" + SOD (39 U)	11,06	85

* Valores de velocidad normalizados por gramo de tejido fresco del cual fue preparada la fracción enzimática de pared celular.

Al determinar el consumo de oxígeno durante la oxidación de NADH, se pudo demostrar que la reacción estimulada por DIMBOA genera y acumula H_2O_2 . En efecto, agregando un exceso de catalasa a distintos tiempos del transcurso de la reacción estimulada por DIMBOA, se observó una liberación de oxígeno proporcional al progreso de la misma (Fig. 20). Dado que la catalasa descompone el H_2O_2 a $\frac{1}{2} \text{O}_2$ y H_2O , estos resultados indican que la liberación de oxígeno en el medio fue debida a la descomposición del H_2O_2 acumulado en la oxidación de NADH estimulada por DIMBOA. Por cada mol de O_2 que se consume en la reacción de oxidación de NADH antes de agregar catalasa, aproximadamente $\frac{1}{2}$ mol de O_2 es liberado después de agregar

catalasa (Fig. 20, B). Esta estequiometría es la esperada para la oxidación de NADH catalizada por peroxidadas (Yokota y Yamazaki 1965, Halliwell 1978).

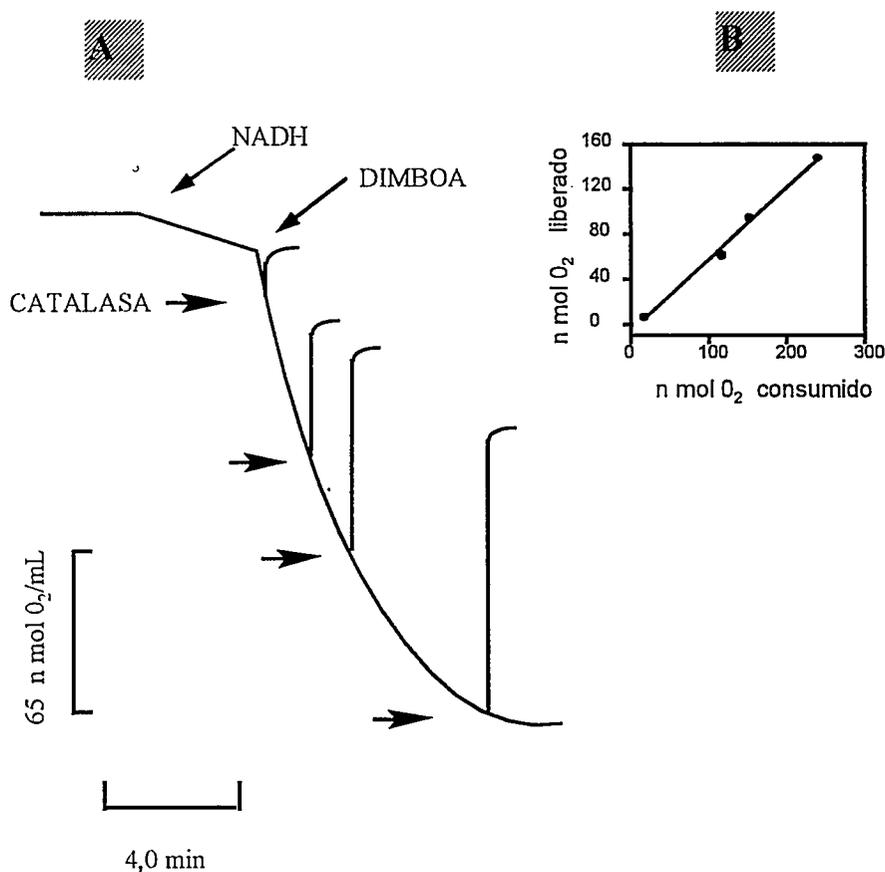


Figura 20 : A, Estimulación por DIMBOA del consumo de oxígeno durante la oxidación de NADH catalizada por peroxidadas de la fracción iónica de la pared celular de coleoptilos de avena. A diferentes tiempos de la reacción, indicado por las flechas, se agregaron 45 μ g de catalasa (de *Aspergillus niger*, Sigma Chem. Co.) a la reacción que contenía NADH 0,3 mM, MnSO₄ 50 μ M, DIMBOA 75 μ M y fracción iónica (0,5 UPx, medida con *o*-PDA 5 mM y H₂O₂ 0,5 mM) en amortiguador fosfato (0,1M, pH 7,0). Los registros de los ensayos separados han sido reunidos y redibujados en la figura. B, consumo y liberación de O₂ antes y después de la adición de catalasa, durante el progreso de la reacción. La pendiente de la recta fue de 0,6.

Durante la oxidación de NADH estimulada por DIMBOA y seguida espectrofotométricamente a 340 nm, se observó un incremento en la absorbancia cuando prácticamente todo el NADH había sido consumido (Fig. 21). Paralelo a este efecto se observó un cambio de coloración en la mezcla de reacción desde incolora a café claro. Una serie de barridos de absorbancia entre 300 y 600 nm de la mezcla de reacción revelaron que junto con el completo consumo de NADH, aparecen dos bandas de absorción a 345 y 430 nm (Fig. 22 A-B). Suponiendo que estas bandas correspondían a un producto de descomposición peroxidativa del DIMBOA, se realizaron una serie de barridos de absorbancia entre 300 y 600 nm de una mezcla de reacción que contenía: DIMBOA 75 μM , H_2O_2 0,5 mM y px de la FI (Fig. 22C). Efectivamente, esta reacción generó un producto que presenta exactamente las mismas bandas de absorción a 345 y 430 nm, confirmando la utilización del DIMBOA por peroxidasas de pared en presencia de H_2O_2 (en ausencia del oxidante, no hubo reacción alguna). Estos resultados indican que durante la oxidación de NADH, el DIMBOA no es peroxidado, sino hasta cuando se ha acumulado suficiente H_2O_2 al completarse la oxidación del nucleótido (Fig. 21). Se han obtenido similares resultados a utilizar una preparación comercial pura de isoenzima C de px de rábano (Rojas y col., 1997). Más aún, en estos experimentos, a partir de la completa oxidación de DIMBOA en presencia de H_2O_2 y la px de rábano, fue posible calcular un coeficiente de extinción para el producto de descomposición a 430 nm de $1260 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Rojas y col., 1997).

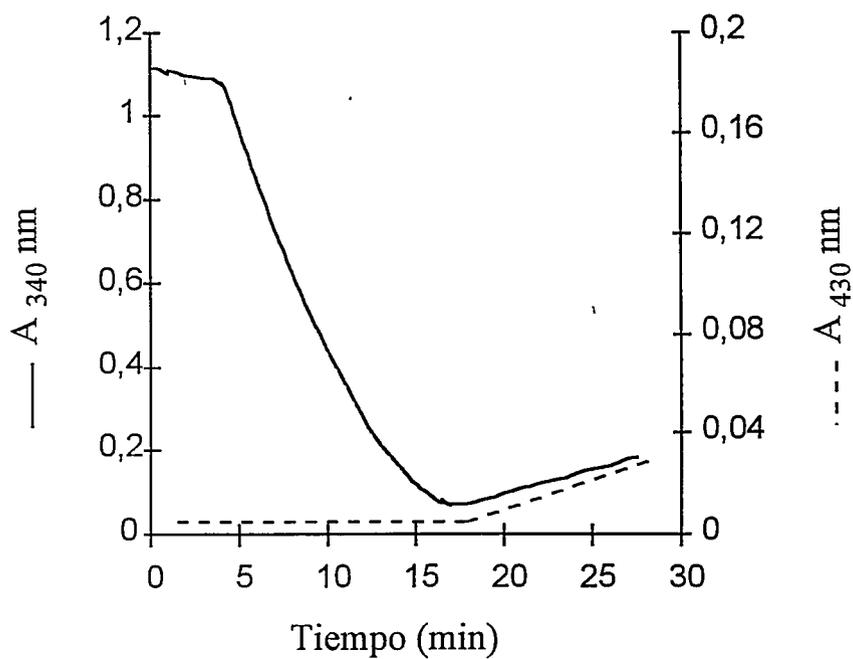


Figura 21 : Curso temporal de la reacción de oxidación de NADH por peroxidasas de la fracción iónica en presencia de DIMBOA. La mezcla de reacción contenía en amortiguador fosfato (0,1 M, pH 7,0) NADH 0,16 mM, Mn^{+2} 50 μ M y 0,5 Upx de la fracción iónica. El curso de la reacción fue seguido espectrofotométricamente por el cambio de absorbancia a 340 nm (—) y 430 nm (----).

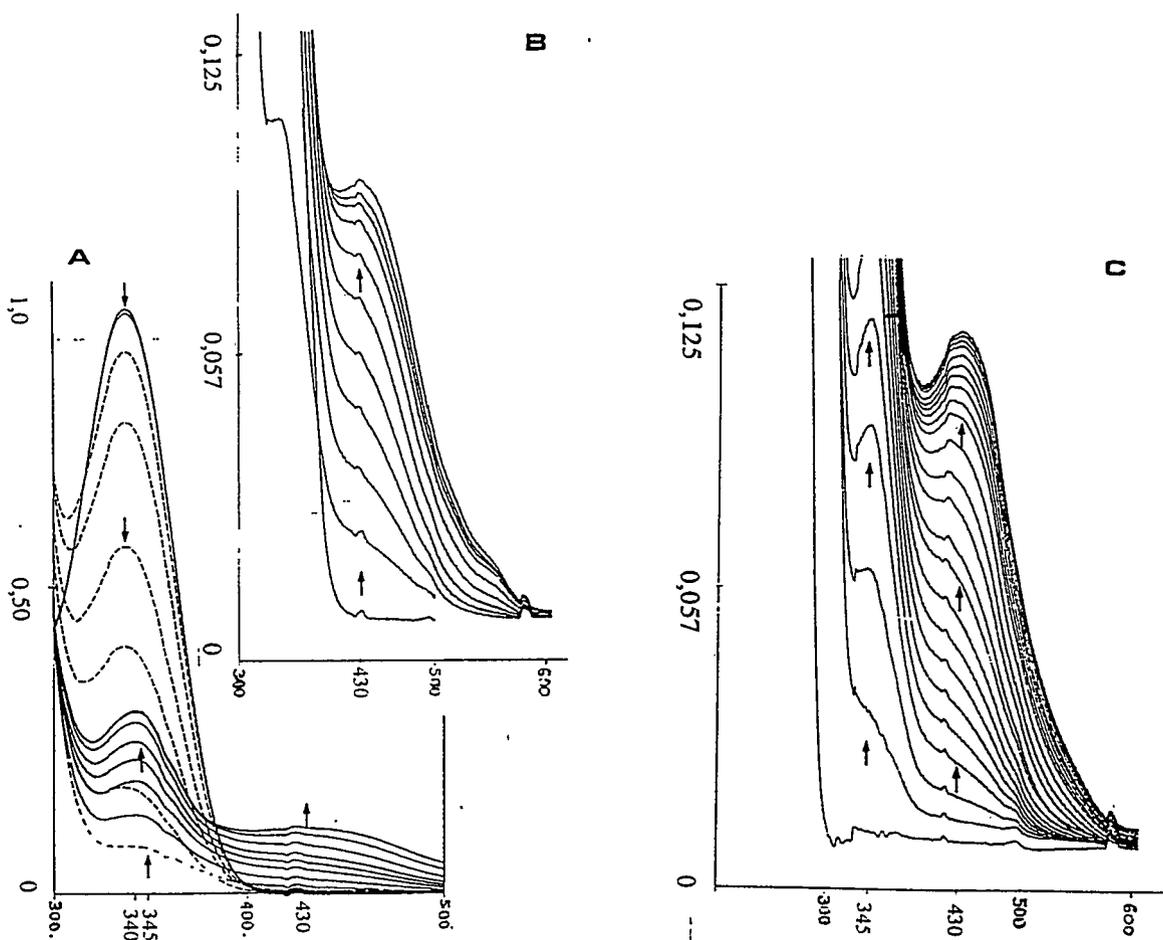


Figura 22 : Barridos espectrales durante la oxidación de NADH en presencia de DIMBOA y catalizada por peroxidasas de la fracción iónica de paredes celulares de coleoptilos de avena (A). Los barridos se tomaron cada 3 min después de mezclar NADH 0,16 mM, $MnSO_4$ 50 μM , DIMBOA 75 μM y 0,5 Upx en amortiguador fosfato 0,1 M, pH 6,8.

B, aumento en absorbancia de la banda a 430 nm en barridos espectrales después de 15 min del inicio de la reacción descrita en A.

C, barridos espectrales en la oxidación de DIMBOA en presencia de H_2O_2 y peroxidasas de la fracción iónica. Los barridos se tomaron cada 2 min después de mezclar H_2O_2 0,5 mM, DIMBOA 75 μM y 0,5 Upx en amortiguador fosfato 0,1 M, pH 6,8.

En vista que el DIMBOA puede ser utilizado como sustrato por pxs en presencia de H_2O_2 , se comparó esta reacción entre las pxs de la FI y FC de paredes celulares del coleoptilo de avena. La reacción fue seguida por el aumento de absorbancia a 430 nm, obteniéndose curvas de saturación hipérbolicas a partir de las cuales se obtuvieron valores de $V_{m\acute{a}x}$ y $S_{0.5}$. Como se muestra en la Tabla 11, el DIMBOA fue utilizado 3,2 veces más eficientemente ($V_{m\acute{a}x}/S_{0.5}$) por la FI que por la FC. Sin embargo, las velocidades máximas de utilización peroxidativa del DIMBOA por las FI y FC fueron 38 y 898 veces menores que las respectivas velocidades de estimulación de oxidación de NADH a concentraciones saturantes del DIMBOA (Tablas 9 y 11). Así, el DIMBOA siendo un eficiente estimulador de la oxidación de NADH, es un pobre sustrato en el ciclo peroxidativo. Estos resultados concuerdan con la relación inversa encontrada para los fenoles entre la eficiencia en la estimulación de la oxidación de NADH y la velocidad de peroxidación de estos compuestos por pxs de pared celular (Tablas 4 y 6).

Tabla 11: Utilización de DIMBOA en presencia de H_2O_2 por peroxidasas de la pared celular de coleoptilos de avena.

Parámetro	Fracción Iónica	Fracción Covalente
$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu M/min$)*	$4,79 \pm 0,89$	$0,14 \pm 0,01$
$S_{0.5}$ (mM)	$5,69 \pm 0,10$	$0,53 \pm 0,08$
$V_{m\acute{a}x}/S_{0.5}$ ($\times 10^4 \text{ min}^{-1}$)	8,41	2,64

*Valores de velocidad normalizados por gramo de tejido fresco.

Con el objeto de investigar en más detalle las bases del efecto estimulador del DIMBOA en la oxidación de NADH, se estudió el efecto de DIMBOA sobre la estabilidad del CIII. El CIII es una forma ferrosa de la px, catalíticamente inactiva en la oxidación de NADH y caracterizada espectrofotométricamente por desplazar la banda de absorción máxima del grupo hemo de 403 a 418 nm (Yokota y Yamazaki, 1965; Tamura y Yamazaki, 1972). La aceleración de la descomposición del CIII y la recuperación de la forma férrica de la enzima pueden constituir un mecanismo por el cual el DIMBOA estimule la oxidación de NADH. De hecho, se ha demostrado que diversos fenoles estimulantes de la oxidación de NADH aceleran la descomposición del CIII (Halliwell, 1978).

Debido a que se requiere una alta concentración de enzima para observar espectrofotométricamente el CIII, estos estudios se realizaron con una preparación comercial de px de rábano (isoenzima C). Como se presenta en la Fig. 23, el DIMBOA descompuso el CIII a juzgar por la completa desaparición del pico a 418 nm y la recuperación del pico a 403 nm de la px férrica. Más aun, los picos a 543 y 575 nm, típicos del CIII (Tamura y Yamazaki, 1972; Acosta y col., 1991), también desaparecieron en presencia de DIMBOA (Fig. 23). En las condiciones en que se generó el CIII, el NADH se encuentra en un exceso de concentración de 800 veces con respecto a la enzima, por lo cual toda la enzima (1,2 μM) debería encontrarse como CIII. De este modo, fue posible calcular un ϵ_{418} para el CIII igual a: $A_{418}/1,2 \mu\text{M} = 75 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La velocidad de descomposición del CIII fue dependiente en forma de saturación hiperbólica con la concentración del DIMBOA, observándose un $V_{\text{máx}}$ de 3,52 $\mu\text{M}/\text{min}$ y una

concentración de DIMBOA de 14,9 μM para lograr la mitad de la $V_{\text{máx}}$ de descomposición (Fig. 24 A). En condiciones en que todo el CIII está acomplejado con DIMBOA la descomposición del CIII depende de una constante cinética y de la concentración del complejo CIII-DIMBOA. Así, a partir de la velocidad de descomposición del CIII a concentración saturante de DIMBOA se calculó una constante cinética igual a $3,52 \mu\text{M min}^{-1}/1,2 \mu\text{M} = 2,93 \text{ min}^{-1}$.

Comparativamente, otro efectivo estimulador de la oxidación de NADH como el *p*-CA (Tabla 6), también aumentó la velocidad de descomposición del CIII de la px de rábano (Fig. 24 B), con una constante cinética de descomposición de $0,21 \text{ min}^{-1}$. Así, el DIMBOA fue 14 veces más efectivo que el *p*-CA en promover la descomposición del CIII formado con la isoenzima C de la px de rábano. La descomposición del CIII por DIMBOA o *p*-CA presentó un tiempo de retardo dependiente en forma inversa con la concentración del efector (insertos en Fig. 24 A-B). Este tiempo de retardo, típico de reacciones inducidas por especies radicalarias (Ferrer y col., 1991), sugiere la acumulación de radicales derivados del DIMBOA o *p*-CA durante la oxidación del CIII.

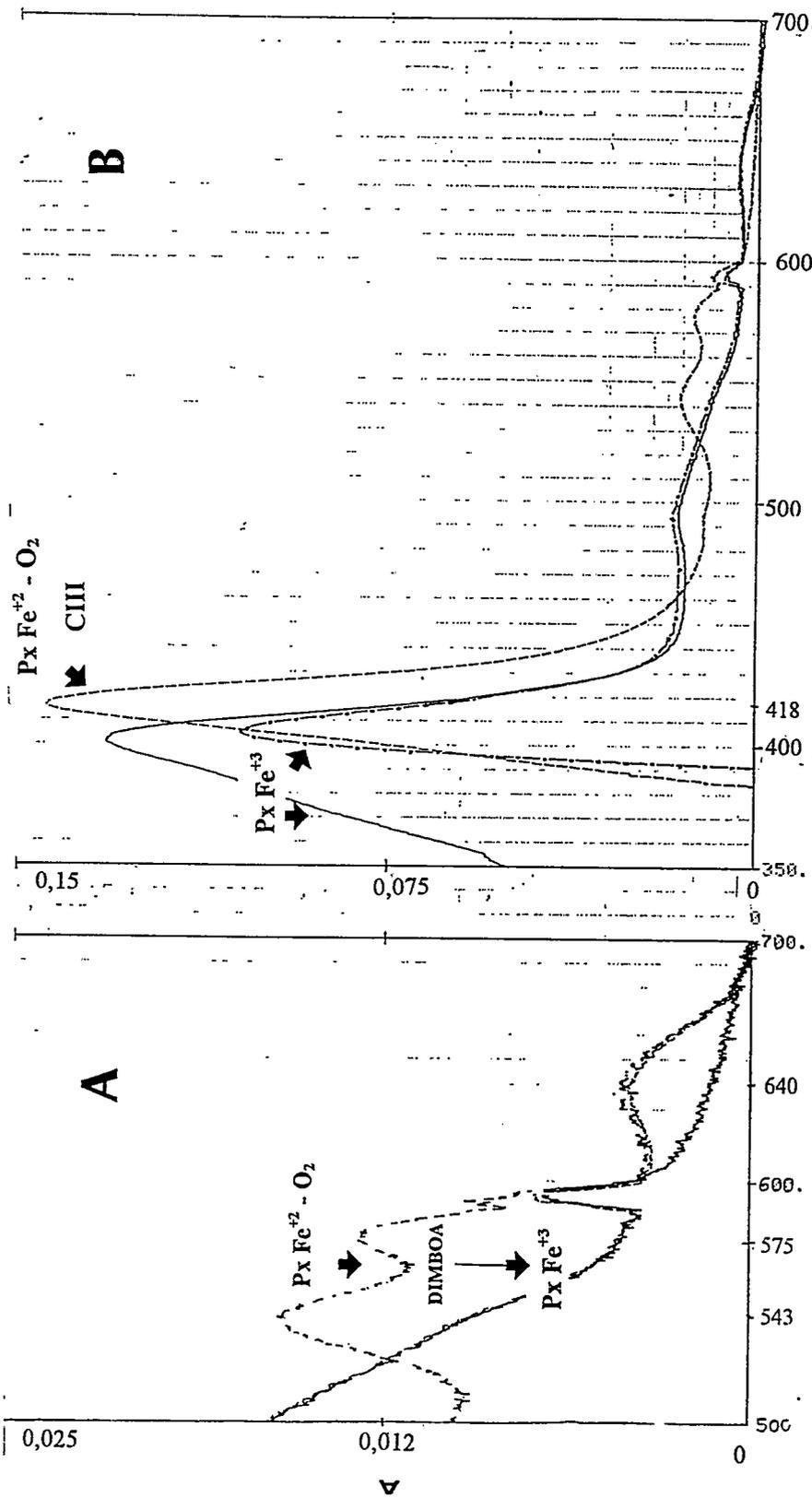


Figura 23 : Cambios espectrales en la formación del CIII de la px de rábano con NADH y en su descomposición en presencia de DIMBOA 75 μM . La mezcla de reacción contenía px de rábano 1,2 μM (isoenzima C) y NADH 1 mM en amortiguador málico 50 mM, pH 5,6. (—), px férrica; (- - -), CIII; (_ _ _ _), CIII donde se formó el CIII. A, desaparición de las bandas máximas de absorción a los 543, 575 y 640 nm del CIII, luego de la adición de DIMBOA. B, desplazamiento en la banda de Soret del máximo de absorción de la px férrica (403 nm) hacia la px férrica (418 nm) en la formación del CIII con NADH.

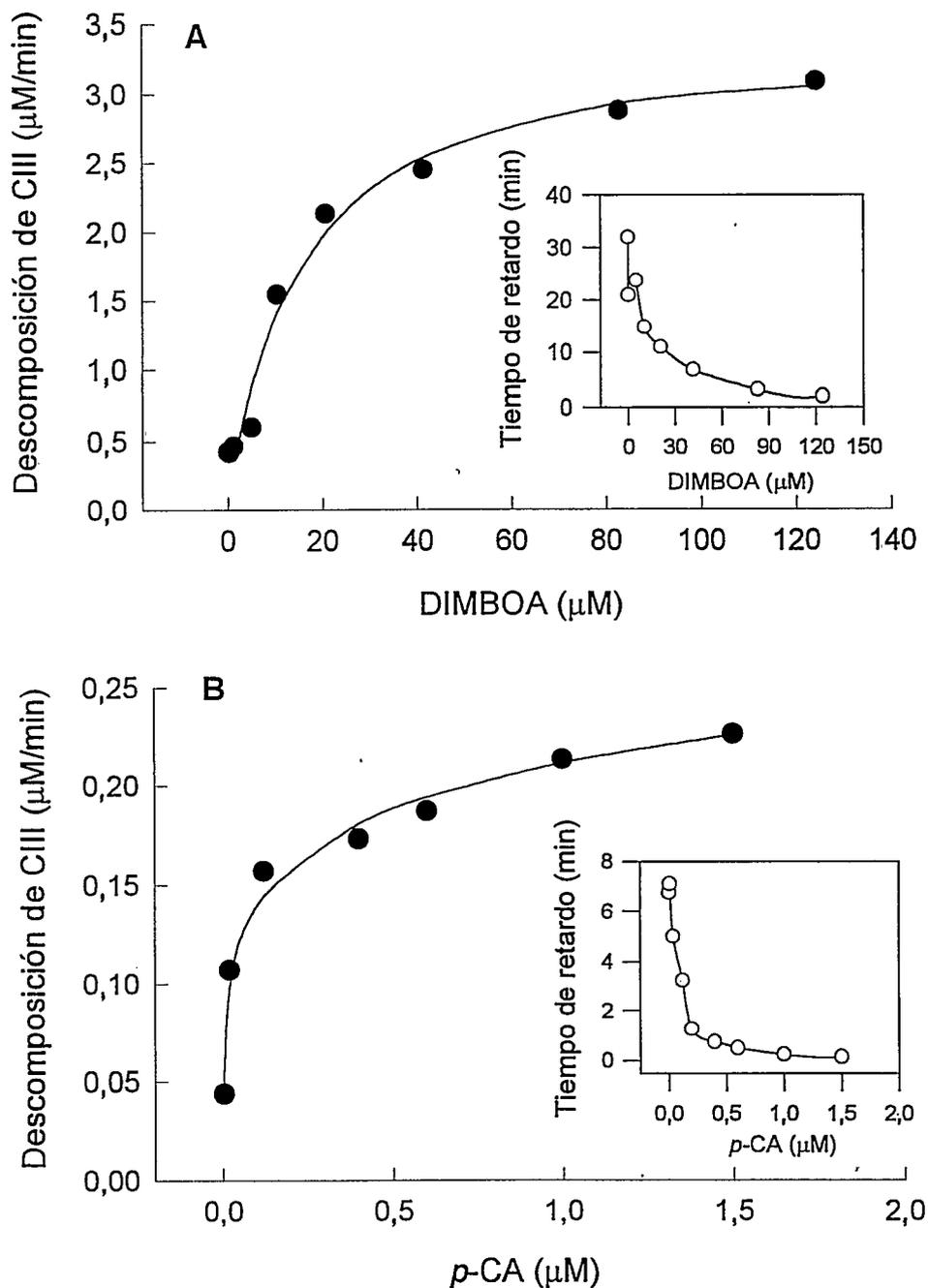


Figura 24 : Descomposición del CIII de peroxidasa de rábano por DIMBOA (A) o ácido *p*-cumárico (*p*-CA, B). Insertos : tiempo de retardo en la descomposición del CIII dependiente de la concentración de DIMBOA (A) o *p*-CA (B).

3.2.b.3 *Acumulación de lignina y ácido diféruico en las paredes celulares de coleoptilos de avena tratados con DIMBOA*

Dado que DIMBOA fue un efectivo estimulador de la oxidación de NADH catalizada por pxs de pared celular, se pensó que el H_2O_2 formado en esta reacción podría ser utilizado por pxs para aumentar la síntesis de polímeros fenólicos como lignina y DFA. Tal mecanismo podría ser parte, entonces, de la inhibición del crecimiento por DIMBOA en el coleoptilo de avena. El DIMBOA a una concentración de $75 \mu M$ efectivamente aumentó el nivel de DFA y lignina en la pared en cerca de un 55 y 30%, respectivamente, en las primeras 10 horas de tratamiento (Figs. 25 y 26). Posteriormente y hasta las 20 h, el nivel de DFA y lignina en la pared disminuyó hasta un 40% bajo el control y luego tendió a recuperarse hasta un 10 a 20% bajo el control en las 48 h del tratamiento (Figs. 25 y 26). Si bien el H_2O_2 puede ser generado en la oxidación de NADH estimulada por DIMBOA y catalizada por pxs de la pared celular, la mayor parte de la actividad px en coleoptilo no se encuentra unida a la pared (Tabla 3). Así, la observación que los niveles de DFA y lignina no se mantuvieron altos por sobre el control como se espera un continuo suministro de H_2O_2 en la pared, sugiere que el exceso de este oxidante o su producción en otros compartimentos celulares por la misma vía, actuaría como un tóxico general deprimiendo el normal funcionamiento celular. Esta idea fue probada experimentalmente midiendo parámetros de estrés oxidativo en los coleoptilos tratados con DIMBOA, tales como la actividad de enzimas antioxidantes (catalasa, ascpX y SOD), oxidación de lípidos y proteínas, así como los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG).

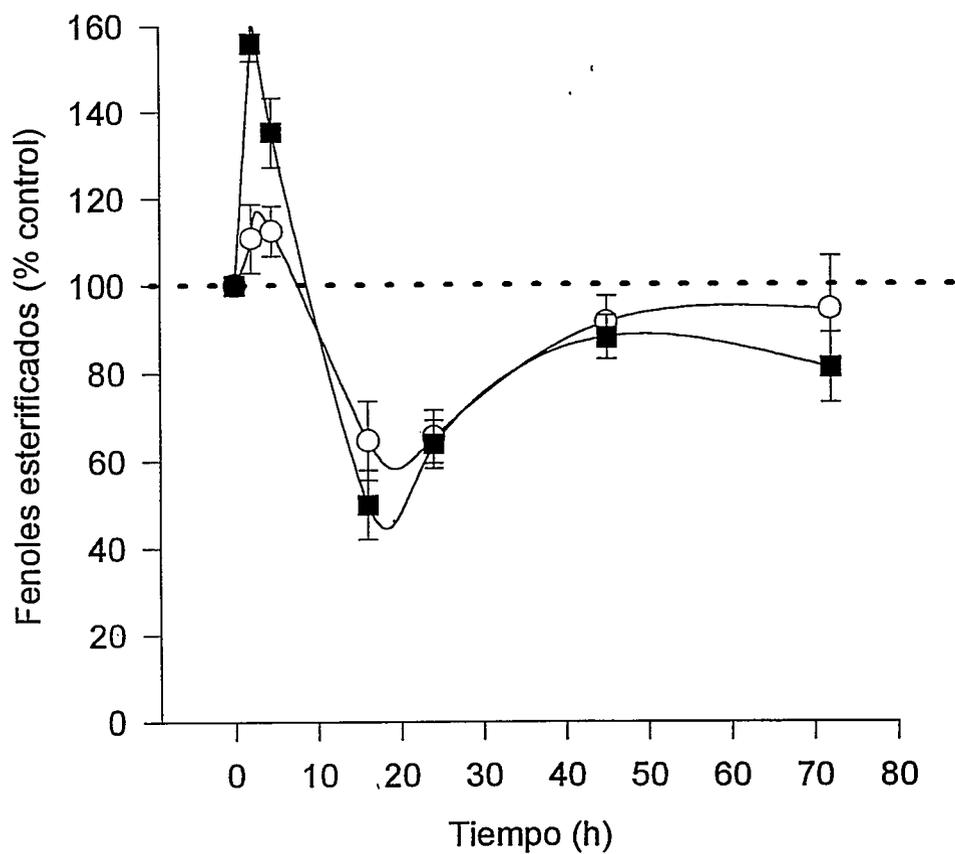


Figura 25 : Niveles de ácidos diferúlico (DFA, ■) y ferúlico (E-FA, O) en paredes celulares de coleoptilos de avena durante el tiempo de incubación con DIMBOA 75 μ M. Los niveles de E-FA y DFA al inicio del experimento fueron de 1,78 y 0,1 μ g por mg de pared celular.

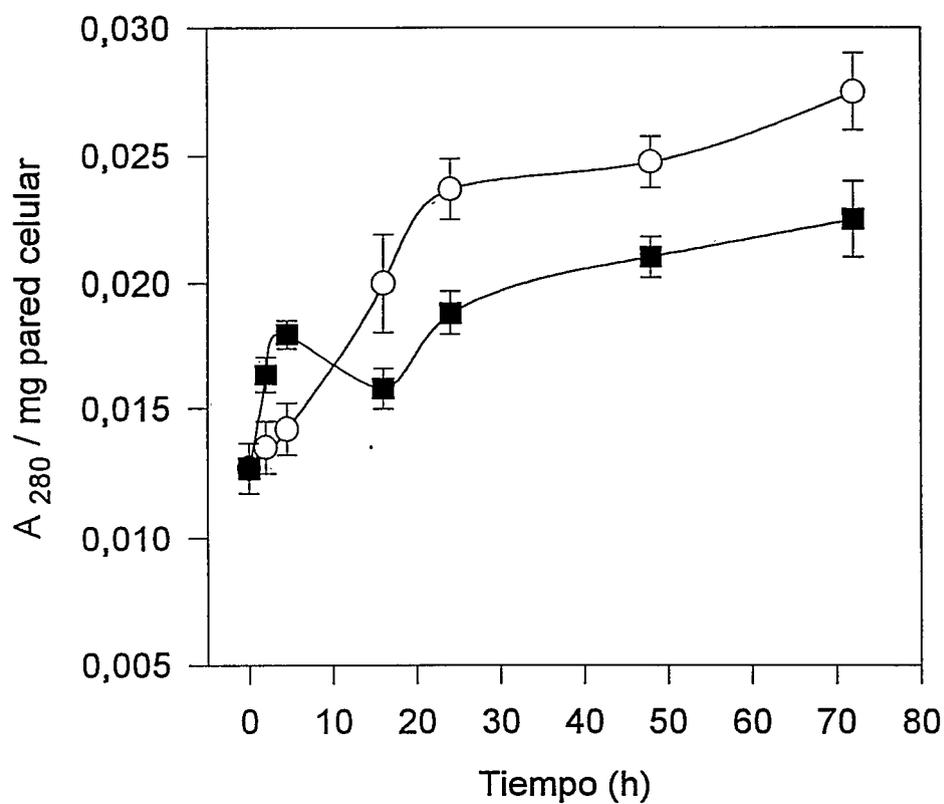


Figura 26 : Niveles de lignina en paredes celulares de coleoptilos de avena durante el tiempo de incubación en presencia (■) o ausencia (O) de DIMBOA 75 μ M. La lignina se cuantificó por la absorbancia a 280 nm de su derivado con bromuro de acetilo, como se describe en Materiales y Métodos.

3.2.b.4. *DIMBOA* aumenta el estatus oxidativo celular

Las actividades catalasa y ascp_x, enzimas citosólicas consideradas antioxidantes pues reducen el H₂O₂, fueron notablemente inhibidas en los coleoptilos desde las primeras horas de tratamiento con DIMBOA 75 μM (Fig. 27). Sin embargo, la actividad SOD fue estimulada hasta un 80% sobre el control desde las 4 h de tratamiento con DIMBOA (Fig. 28). Estos resultados indican que el DIMBOA favorece notablemente un aumento del estado oxidativo del tejido, pues deprime la actividad de enzimas que eliminan el exceso de H₂O₂ producido en la oxidación de NADH. La principal especie asociada al fenómeno oxidativo, además del H₂O₂, podría ser el radical O₂⁻, a juzgar por la inducción de la actividad SOD en coleoptilos tratados con DIMBOA (Fig. 28).

Los ácidos grasos insaturados componentes de membranas, así como las proteínas, son dos de los principales blancos celulares del ataque de especies radicalarias (Gutteridge y Halliwell, 1990; Pacifici y Davies, 1990; Stadtman, 1993). En ambos casos, el ataque radicalario comprende la remoción de un átomo de hidrógeno, convirtiendo a la molécula dadora en otra especie radicalaria. La propagación de esta cadena oxidativa incluye la adición de oxígeno molecular para estabilizar la especie radicalaria, la cual por reordenamiento intra o intermolecular genera, principalmente, malonildialdehído en el caso de lípidos insaturados (Gutteridge y Halliwell, 1990), o la formación de grupos carbonilo en algunos aminoácidos de proteínas (Pro, Lys, Thr) (Stadtman, 1993; Reznick y Lester, 1994). Consecuentemente, la modificación oxidativa de estas macromoléculas lleva a la desorganización funcional de las estructuras o procesos en los cuales participan (permeabilidad de membrana, actividad enzimática, etc.). En coleoptilos tratados con

DIMBOA, los niveles de derivados oxidados de lípidos insaturados, detectados con TBA, incrementaron notablemente hasta un 60% desde las primeras horas de tratamiento ($p < 0,01$, Fig. 29). Del mismo modo, los niveles de grupos carbonilo asociados a proteínas oxidadas, aumentaron en un 45% en las proteínas solubles de los coleoptilos durante las primeras 10 h de tratamiento con DIMBOA ($p < 0,01$, Fig. 30). Estos resultados, en conjunto, indican que el DIMBOA provocó un agudo estrés oxidativo en los coleoptilos, atacando principalmente a lípidos y proteínas. Esta situación podría comprometer, entre otros procesos, la síntesis o transporte de fenoles a la pared para la síntesis de DFA o lignina y así dar cuenta de la disminución de los niveles de los mismos a tiempos largos en la pared de coleoptilos tratados con DIMBOA.

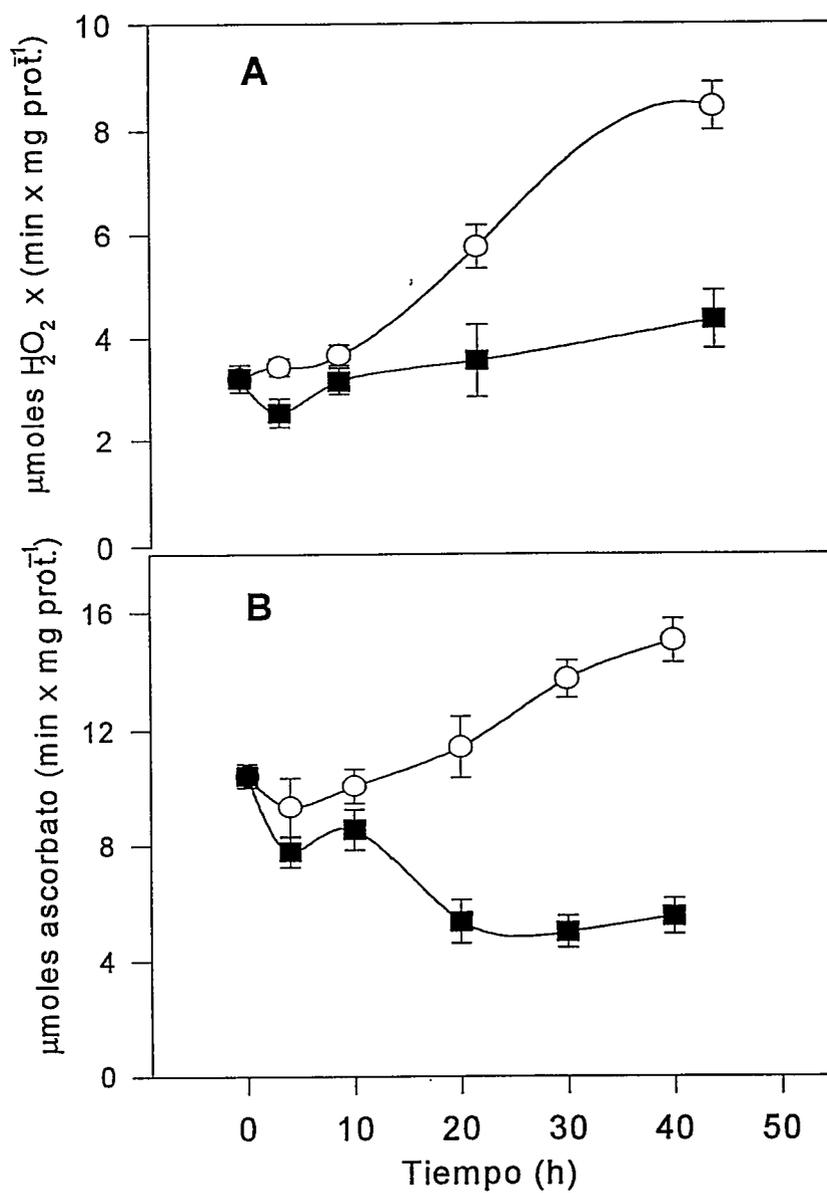


Figura 27 : Actividad catalasa (A) y ascorbato peroxidasa (B) por mg de proteína (mg prot.) en extractos (líquido sobrenadante de 10.000 xg) de coleoptilos de avena durante el tiempo de incubación en presencia (■) o ausencia (○) de DIMBOA 75 μM .

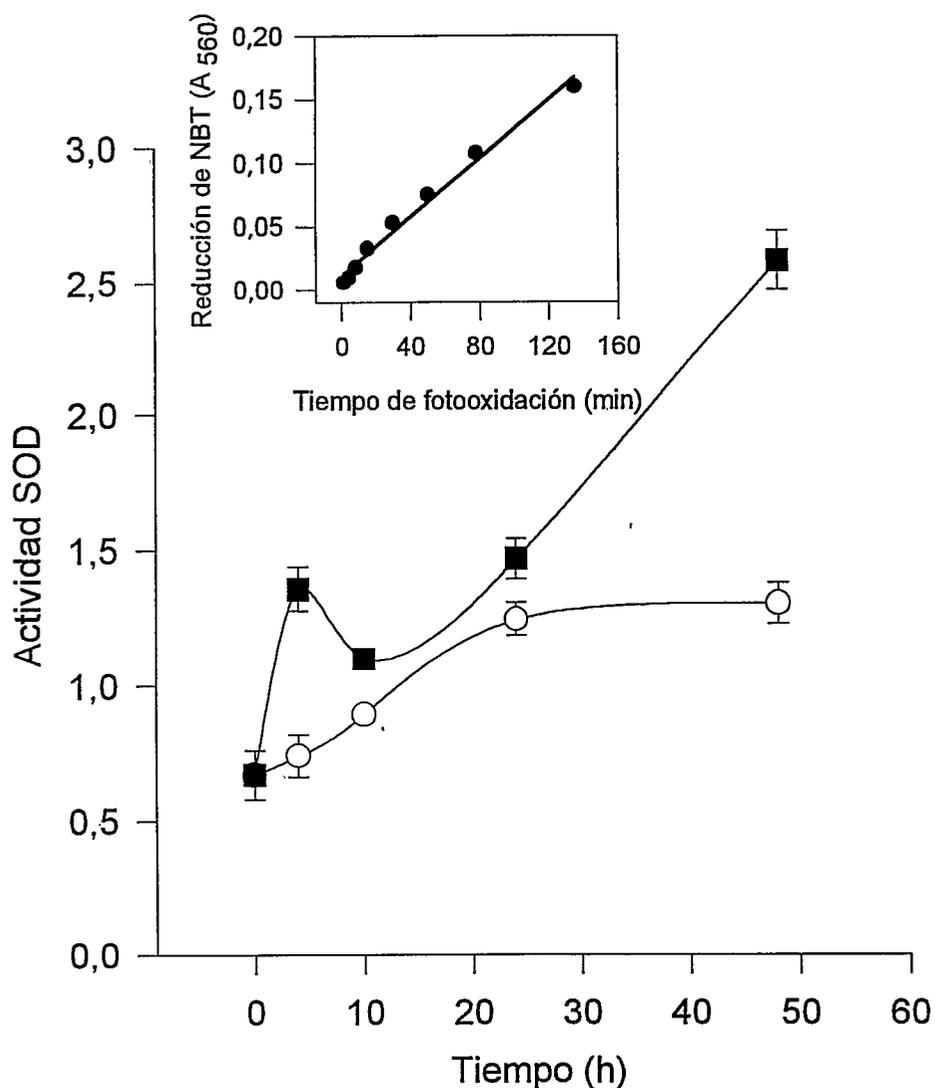


Figura 28 : Actividad superóxido dismutasa (SOD) en extractos (líquido sobrenadante de 10.000 xg) de coleoptilos de avena durante el tiempo de incubación en presencia (■) o ausencia (○) de DIMBOA 75 μ M. La actividad SOD es expresada como la inhibición en la reducción de NBT por mg de proteína. Inserto : curso temporal de la fotorreducción de NBT en las condiciones del ensayo.

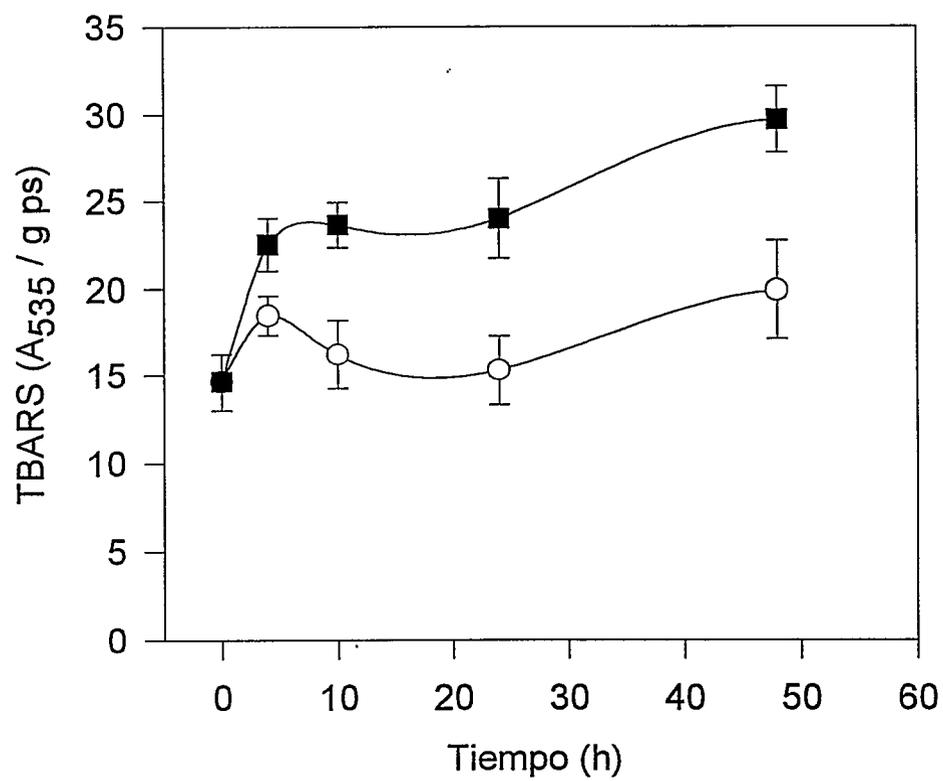


Figura 29 : Niveles lípidos peroxidados (TBARS) en coleoptilos de avena durante el tiempo de incubación en presencia (■) o ausencia (○) de DIMBOA 75 μ M.

Espectro diferencial proteína-hidrazina

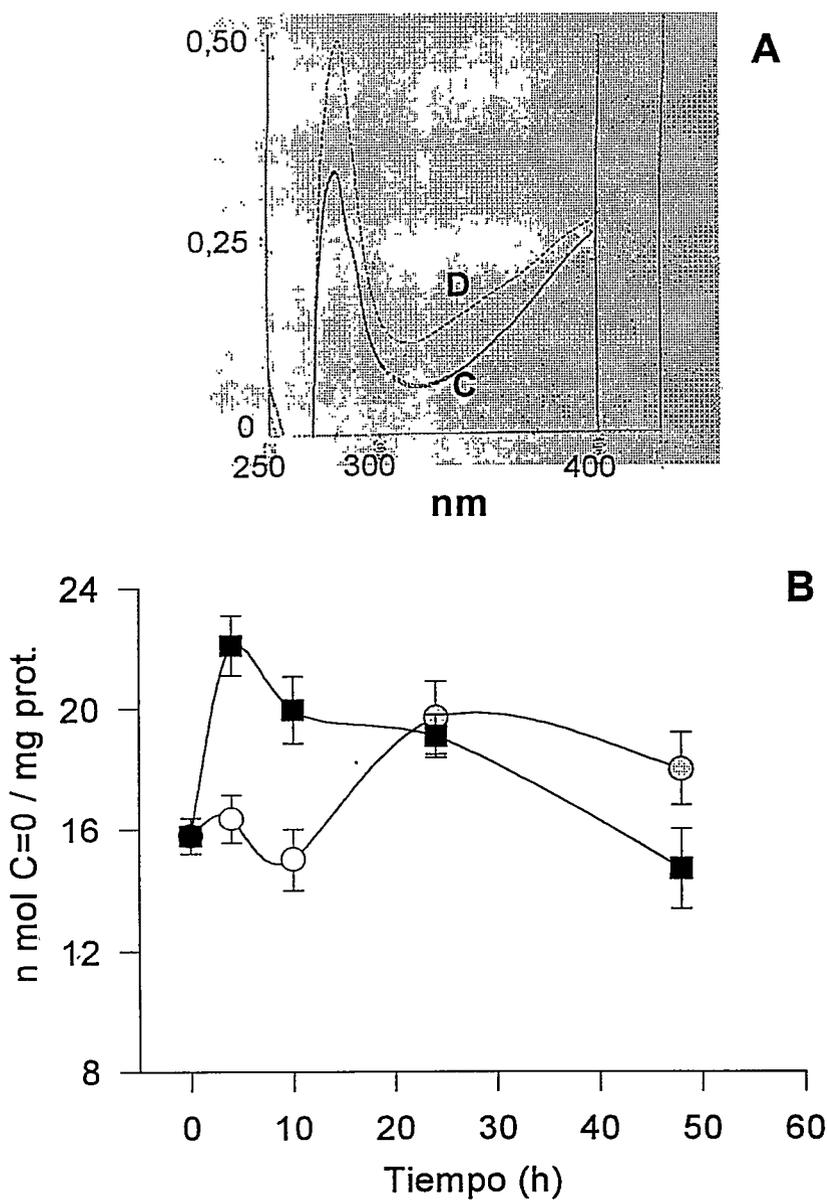


Figura 30 : A, espectro diferencial del complejo proteína-hidrazina en un extracto de proteínas solubles (0,4 mg/ml) de coleoptilos controles (C) o tratados con DIMBOA 75 μ M (D). En cada muestra, el espectro de las proteínas tratadas con hidrazina fue obtenido restando el espectro de igual cantidad proteínas no tratadas con hidrazina. B, niveles de grupos carbonilo por mg de proteína en extractos (líquido sobrenadante de 10.000 xg) de coleoptilos de avena durante el tiempo de incubación en presencia (■) o ausencia (○) de DIMBOA 75 μ M.

DIMBOA ha sido reportado como un fuerte electrófilo capaz de transformar aminas primarias en bases de Schiff, convertir en hemitiocetales y tioacetales, así como de oxidar grupos SH presentes en aminoácidos de proteínas (Niemeyer, 1988; Cuevas y col., 1990). Esta propiedad se debe al equilibrio entre el hemiacetal cíclico y un aldol abierto en el DIMBOA (Niemeyer, 1982, 1988). Por otro lado, el glutatión (GSH), un tripéptido constituido de ácido glutámico, alanina y cisteína, es el metabolito antioxidante más importante en plantas y animales, con un potencial redox adecuado para ofrecer un grupo SH en la amortiguación de especies oxidantes (Alsher, 1989; Zopes y col., 1993). En consecuencia, pareció interesante evaluar el estatus oxidativo de coleoptilos tratados con DIMBOA a través de los niveles de GSH y GSSG. En un primer grupo de experimentos, segmentos de coleoptilos de avena tratados durante 24 h con DIMBOA 0,07 y 0,14 mM, redujeron respectivamente los niveles de GSH en un 37% y 49% ($p < 0,02$) y aumentaron los niveles de GSSG en un 67% ($p < 0,2$) y 126% ($p < 0,05$) en relación a los niveles de GSH y GSSG en los coleoptilos no tratados (Fig. 31 A). Más aún, el nivel de GSH total (GSH + GSSG), disminuyó hasta en un 27% en los coleoptilos tratados con DIMBOA por 24 h. ($p < 0,1$, Fig. 31 B). Consecuentemente, los coleoptilos tratados con DIMBOA 0,07 y 0,14 mM, redujeron proporcionalmente la razón GSH/GSSG en un 63% y 80%, respectivamente en comparación al control no tratado (Fig. 32). Estos resultados sugieren que el tratamiento con DIMBOA induce la oxidación del GSH a GSSG ya sea a través de las especies radicalarias derivadas de la acumulación de H_2O_2 , o bien en la adición directa del DIMBOA al GSH. Sin embargo, la reducción en los niveles de GSH

total podría también ser resultado de la inhibición de su síntesis enzimática o de un aumento en su degradación.

El estatus antioxidante del tejido (aumento en la razón GSH/GSSG o en el nivel de GSH total) puede ser inducido artificialmente en ciertas condiciones de estrés para el tejido (Foyer y col., 1997). En las condiciones de los experimentos, la prolongación del período de incubación de los coleoptilos de 24 a 48 h indujo un moderado aumento en el estatus antioxidante (aumento del GSH total o razón GSH/GSSG) de los coleoptilos, con lo cual se obtiene un tejido potencialmente más resistente al daño oxidativo (Figs. 31 A-B y 32). El tratamiento de estos coleoptilos por un período adicional de 24 h con DIMBOA redujo la razón GSH/GSSG sólo a un 50%, menor que la disminución lograda por el DIMBOA en coleoptilos más jóvenes en el mismo período (Fig. 32).

En otro grupo de experimentos, coleoptilos intactos de 5 días de edad fueron tratados por 24 h con 3-amino-1,2,4-triazol (AMT) 5 mM absorbido por las raíces. El AMT es un inhibidor irreversible de la catalasa (Margoliash y col., 1960; Havir, 1992), de modo que coleoptilos crecidos en presencia de este compuesto debieran ser más sensibles al daño oxidativo, sobretodo de aquel proveniente del H_2O_2 debido a la incapacidad de descomponerlo enzimáticamente. Efectivamente, como se observa en las Figs. 33 y 34, los coleoptilos pretratados con AMT fueron más sensibles al tratamiento con DIMBOA, en los cuales la razón GSH/GSSG disminuyó en un 20% más con respecto a la misma razón en coleoptilos tratados con DIMBOA pero no pretratados con AMT (Fig. 34). En ambos casos, la disminución de la razón GSH/GSSG fue producto de la disminución en los niveles de GSH total y aumento en los niveles de GSSG ($p < 0,05$, Fig. 33 A-B). El

AMT no afectó la velocidad de oxidación de NADH y fenoles catalizado por pxs de pared celular de avena, aún en concentraciones de 10 mM (resultado no presentado).

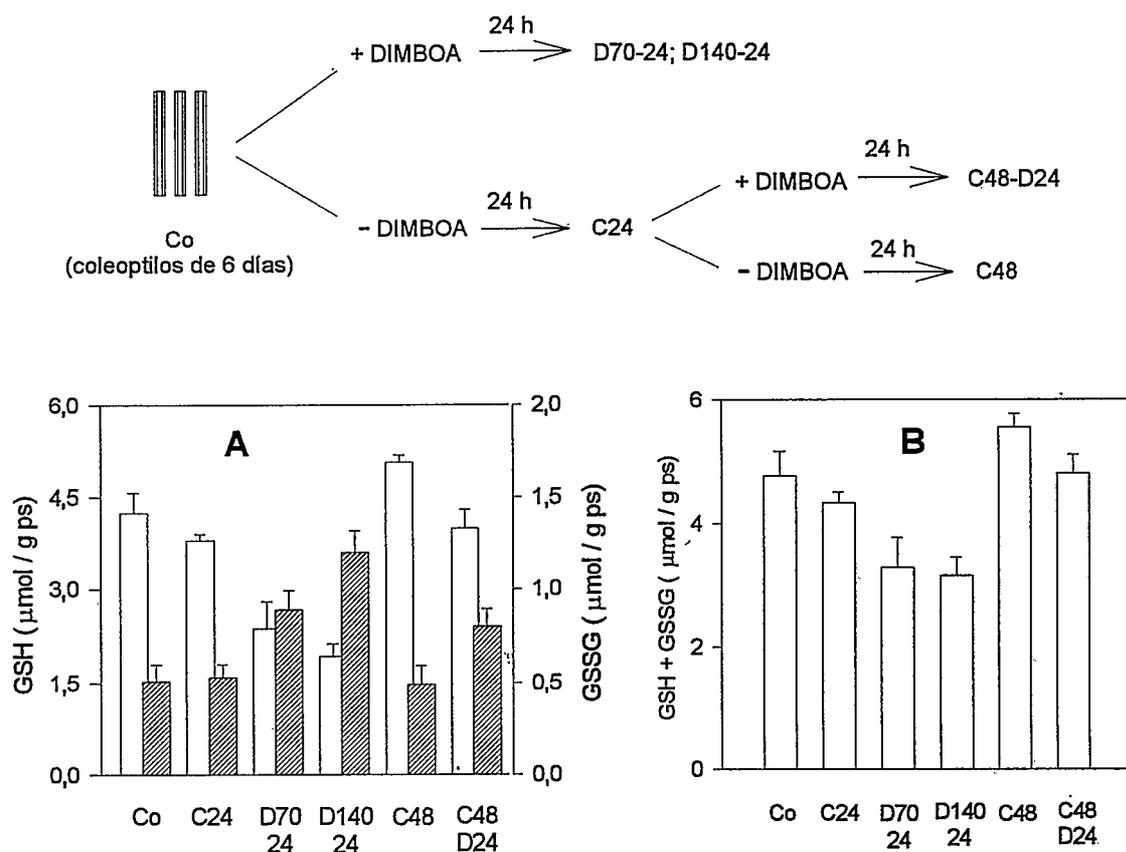


Figura 31 : **A**, variación de los niveles de Glutati6n reducido (\square , GSH) y oxidado (\blacksquare GSSG) en segmentos de coleoptilos de avena sometidos a distintos tratamientos. **B**, suma de los niveles de GSH y GSSG presentados en **A** para cada tratamiento de los coleoptilos. En la cabeza de la figura, se representa un esquema del dise1o experimental. Co, control al inicio del experimento ; C24, coleoptilos control despu6s de 24 h de incubaci6n; D70-24, coleoptilos mantenidos por 24 h con 70 μM DIMBOA ; D140-24, coleoptilos mantenidos por 24 h con 140 μM DIMBOA ; C48 ; coleoptilos control despu6s de 48 h de incubaci6n; C48-D24, coleoptilos incubados 48h, de las cuales las 6ltimas 24 h fueron en presencia de 70 μM DIMBOA.

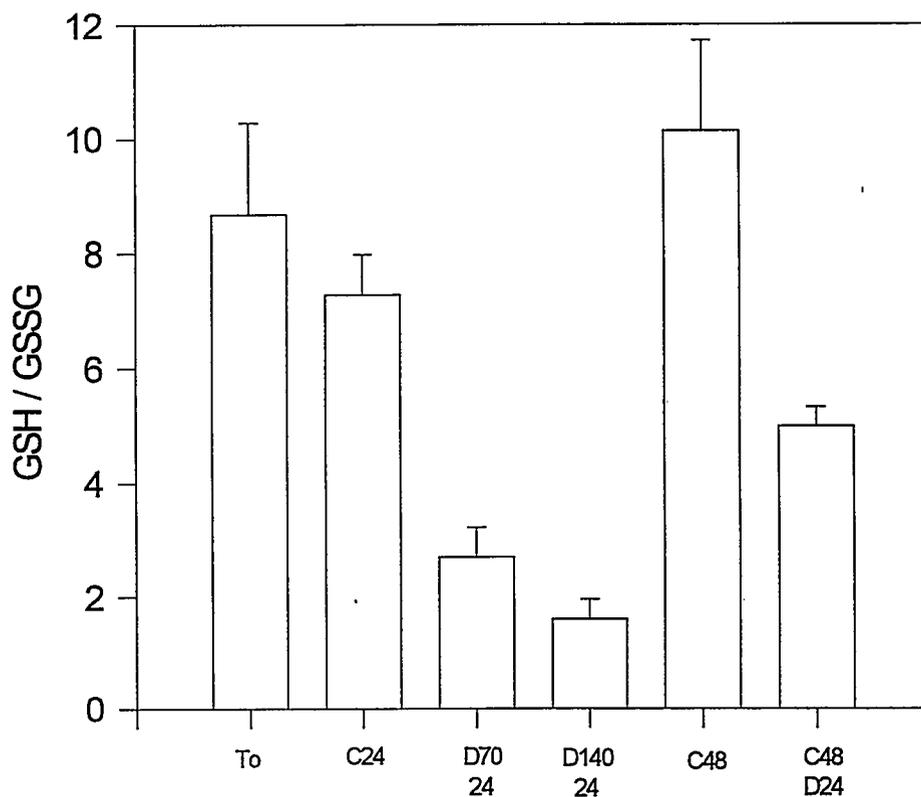


Figura 32 : Razón de los niveles de glutatión reducido (GSH) a oxidado (GSSG) en segmentos de coleoptilos de avena sometidos a distintos tratamientos como se detalla en la leyenda de la Fig. 31.

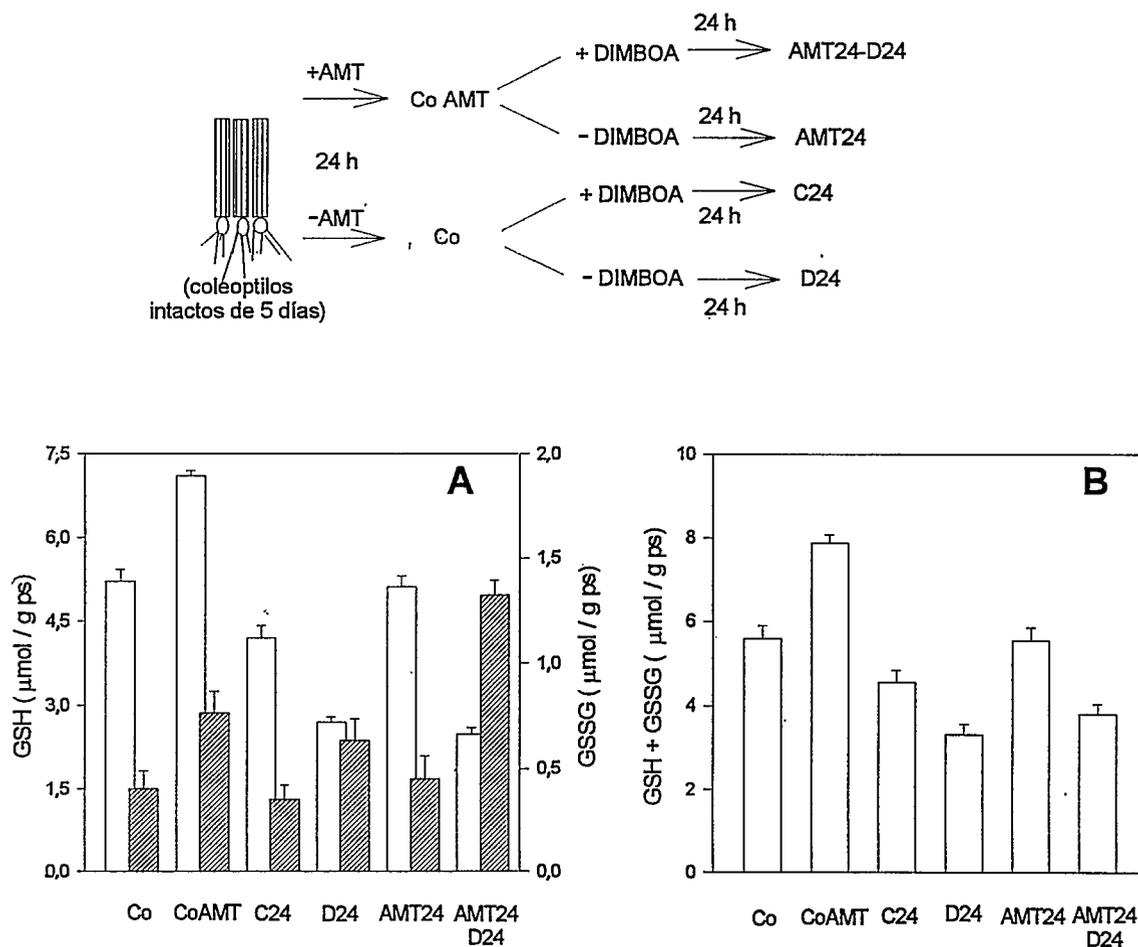


Figura 33 : **A**, variación de los niveles de glutatión reducido (\square , GSH) y oxidado (\blacksquare , GSSG) en coleoptilos de avena pretratados con AMT y sometidos a distintos tratamientos. **B**, suma de los niveles de GSH y GSSG presentados en A para cada tratamiento de los coleoptilos. En la cabeza de la figura, se representa un esquema del diseño experimental. Co, control al inicio del experimento ; CoAMT, coleoptilos pretratados por 24 h con AMT ; AMT24-D24, coleoptilos pretratados con AMT y mantenidos por 24 h adicionales con 70 μ M DIMBOA ; AMT 24, coleoptilos pretratados con AMT y mantenidos 24 h adicionales en ausencia de AMT ; C24, control después de 24 h de incubación; D24, coleoptilos mantenidos por 24 h con 70 μ M DIMBOA.

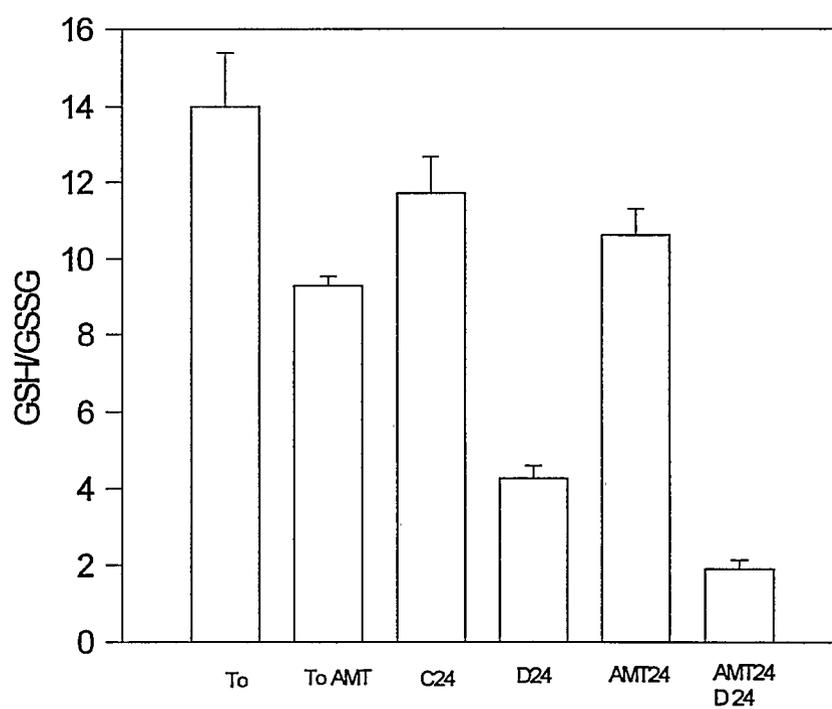


Figura 34 : Razón de los niveles de glutatión reducido (GSH) a oxidado (GSSG) en coleoptilos de avena sometidos a distintos tratamientos como se detalla en la leyenda de la Fig. 33.

4. DISCUSIÓN

Las pxs de plantas han sido principalmente estudiadas en dicotiledóneas, prueba de ello es que gran parte del conocimiento estructural, de síntesis y transporte de estas enzimas, proviene de la amplia investigación en tejidos de rábano, nabo, maní y otras dicotiledóneas. Sólo desde fines de los años 80 comienzan a aparecer los primeros reportes de pxs en monocotiledóneas, lo cual constituye un avance importante por varias razones. Dado que las pxs están relacionadas con la regulación del crecimiento, son precisamente órganos de monocotiledóneas como los coleótilos de arroz y avena, los clásicamente usados para estudiar la fisiología del crecimiento y el efecto de reguladores del crecimiento, como AIA (Taíz y Zeigler, 1991). Las monocotiledóneas, además de constituir un importante modelo de estudio que es necesario seguir explorando para comprender procesos fisiológicos fundamentales, incluyen una amplia variedad de cultivos de gran importancia económica para la alimentación mundial; por lo cual, el conocimiento básico de su biología es necesario para la manipulación y optimización de su producción. Desde este punto de vista, el trabajo de tesis aquí presentado, constituye en sí un significativo aporte en esta materia.

Por otro lado, considerando un aspecto más particular, el trabajo aquí descrito también representa un aporte al conocimiento del papel funcional de las pxs de pared celular en el fenómeno del crecimiento vegetal. Gran parte de la información confusa sobre determinadas funciones específicas de pxs de pared está determinada por la falta de

claridad acerca del origen subcelular de la enzima analizada. En este trabajo han sido aisladas paredes celulares de coleoptilos de avena modificando y adecuando un protocolo anteriormente publicado (Ros Barceló y col. 1987). Tales modificaciones permitieron obtener un pellet de pared, libre de los principales contaminantes subcelulares que contienen actividad px y que podrían enmascarar la conducta y característica de las pxs de pared celular. Además se obtuvo por infiltración de los coleoptilos una fracción de pxs intercelulares que forman parte del compartimento de pared.

4.1. Participación de las peroxidasas iónicas en la modulación de la estructura de pared celular

Los resultados aquí presentados indican que la actividad px contenida en la FI, podría tener un papel funcional más relevante que el de las pxs de la FC en las reacciones que conducen al entrecruzamiento covalente de la estructura de pared celular a través de la formación de puentes diferulato y lignina. Esta proposición se apoya en las siguientes observaciones:

- Las pxs de la FI, en comparación a las pxs de la FC, presentan una mayor eficiencia en la utilización de FA y CA, precursores de los polímeros fenólicos DFA y lignina, respectivamente (Tabla 4). También son las pxs de la FI las más eficientes en la utilización del H_2O_2 , necesario para la reacción de polimerización y, aún más, fueron también más eficientes en catalizar la síntesis de H_2O_2 a partir de la oxidación de NADH (Tablas 5 y 6).

- Por otro lado, el conjunto de actividad px en la FI presenta un importante componente de isoformas básicas (pI aproximado de 9,5), ausente en la FC (Fig. 4). En otras monocotiledóneas tales como *Festuca arundinacea* Shreb., isoformas básicas extremas han sido relacionadas al proceso de rigidización de pared celular (MacAdam y col., 1992) y en plántulas de maní, la inhibición de estas isoformas en la pared celular provocó un incremento de la elongación del hipocotilo (Zheng y van Huystee, 1992a). De hecho, isoformas básicas (catiónicas, con carga superficial neta positiva) podrían ser unidas efectivamente a la matriz negativa de pared celular, lo cual contribuiría a la relevancia de la FI en la oxidación de E-FA para dar origen a puentes DFA y promover la rigidización de la pared (Fry, 1986; MacAdam y col., 1992). Las características cinéticas de estas isoformas básicas, que indican una alta eficiencia en la utilización de sustratos fenólicos como FA, CA y de H₂O₂ (Tabla 8) están en concordancia con estos antecedentes y apoyan la importancia funcional de la actividad px de la FI en la pared de coleoptilos de avena. Adicionalmente, la mayor acumulación de la actividad px de la FI por sobre la actividad px de la FC, precediendo la acumulación de DFA y lignina en las paredes de segmentos de coleoptilos de avena en crecimiento, sugiere una relación funcional importante entre las pxs de la FI y la formación *in vivo* de estos polímeros fenólicos (Figs. 7 y 8). Grabber y Hatfield (1995) han propuesto que la formación de DFA en las paredes primarias estaría limitada por el aporte de H₂O₂ más que por la abundancia de la actividad px asociada a la pared; sin embargo, yo estimo que ambos factores están relacionados y que la mayor inducción de la actividad px de la FI durante el tiempo de incubación de los segmentos de coleoptilos (Fig. 7), sería funcionalmente importante en

la formación de DFA y lignina, debido a un efectivo aporte de H_2O_2 en la pared celular asociado a la FI mediante la oxidación de NADH. En concordancia con estos resultados, durante la respuesta hipersensible a *Puccinia coronata* f.sp. en hojas de avena, se observó un incremento en la actividad px contenida en la FI junto con un incremento en los niveles de DFA asociado a las paredes celulares (Ikegawa y col., 1996).

El proceso de crecimiento en plantas es dependiente de la extensibilidad de la pared celular, la cual ha sido relacionada en forma inversa a los niveles de E-FA y DFA esterificado a las paredes de coleoptilos de avena y arroz (Kamisaka y col., 1990; Tan y col., 1991, 1992). De este modo, el aumento de la actividad px de la FI asociada a la acumulación de fenoles en la pared celular de segmentos de coleoptilos, sugiere para esta clase de pxs un importante papel en la limitación del crecimiento a través del entrecruzamiento fenólico en la pared. De hecho, se ha observado que la actividad px en la FI aumenta hacia los segmentos de menor crecimiento a lo largo del hipocotilo etiolado de poroto (Goldberg y col., 1986, 1987). Esta correlación no se observó con la actividad px presente en la FC (Goldberg y col., 1986).

4.2. Control del AIA sobre la actividad peroxidasa de la pared celular.

La disminución de la actividad px asociada a la pared celular de coleoptilos de avena tratados con AIA fue una respuesta rápida, que se observó desde la primera hora de tratamiento (Fig. 12 A-C). Este efecto ocurrió en paralelo con la estimulación del crecimiento del coleoptilo de avena por AIA (Fig. 12 A-B). En hipocotilos de poroto y lupino se ha observado que el AIA inhibe rápidamente la actividad px en los primeros 15-

30 min de tratamiento (Morrow y Jones, 1986; Ros Barceló y col., 1989), en tanto que en coleoptilos de avena se ha descrito que los primeros cambios en la elongación del tejido por efecto de la auxina, ocurren después de 15 a 20 min de tratamiento (Cleland, 1995). Estos antecedentes sugieren que la inhibición de la actividad px inducida por AIA podría tener mayor relación con las etapas tardías que mantienen el efecto hormonal, que con algún proceso temprano que inicie la elongación del tejido. La principal actividad enzimática que cataliza la oxidación del AIA es la de px, en un mecanismo que utiliza O_2 como oxidante en forma análoga a la oxidación de NADH (Pedreño y col., 1988; Gazarian y col., 1996). Así podría pensarse que una de las primeras respuestas del tejido tratado con AIA, es la inhibición de la actividad px de pared para evitar la destrucción de la hormona y así permitirle ejercer sus efectos fisiológicos, al parecer desencadenados en la unión con un receptor de membrana (Löbler y Klämbdt, 1985; Barbier-Brygoo y col., 1989; Taiz y Zeigler, 1991).

Como sea, la disminución de la actividad px de pared celular parece ser un fenómeno dependiente de la naturaleza hormonal del AIA, pues se ha informado que otra auxina, el 2,4-D, produce la misma respuesta en la actividad px (Ros Barceló y col., 1989).

4.3. Participación del AIA en los procesos de la pared celular que determinan la elongación celular y su relación con la actividad peroxidasa.

Diversos autores han propuesto dos etapas en el proceso de extensibilidad de pared que acompaña a la elongación celular (Cleland, 1971; Hohl y Schopfer, 1992; Hohl

y col., 1995). La primera etapa es la relajación o aflojamiento de la estructura de pared, mediante el rompimiento y reordenamiento de enlaces entre los polímeros estructurales de la pared. Esta relajación reduce la tensión en la pared y el turgor celular, lo cual induce la entrada de agua y la extensión elástica (reversible) de la pared celular. Una vez que la estructura de pared ha sido distendida, se incorporan nuevas unidades estructurales y la nueva conformación es fijada a través de entrecruzamientos covalentes en un proceso dependiente de H_2O_2 y peroxidasa (Hohl y col., 1995). Este mecanismo proporciona la irreversibilidad al fenómeno del crecimiento. De este modo, el proceso global está dado por una continua competencia de fuerzas de procesos relajadores y rigidizantes, pero que inevitablemente termina en uno rigidizador para sostener la estructura expandida (Cosgrove, 1993b; Hohl y col., 1995). A pesar de que ambos procesos operarían constantemente durante todo el crecimiento, el aumento de la actividad px hacia el término del crecimiento produce un aumento de los niveles de DFA y lignina que fijan la estructura de pared, limitando su posterior extensibilidad y la entrada de más agua, con lo cual el crecimiento se detiene (Figs. 7 y 8).

Durante la extensibilidad de la pared, la magnitud del proceso irreversible (rigidizante) depende de la magnitud del proceso reversible (extensión elástica inducida por el turgor) (Hohl y Schopfer, 1992; Hohl y col., 1995). En coleoptilos donde el turgor celular ha sido disminuido incubándolos en una solución de polietilenglicol (PEG), un osmótico no permeable, la magnitud de la extensibilidad elástica inducida por el AIA disminuyó considerablemente con respecto a coleoptilos túrgidos mantenidos en agua destilada (Hohl y col., 1995). Consecuentemente, el incremento del crecimiento

irreversible disminuyó proporcionalmente al grado de extensión elástica inducida por el AIA (Hohl y col., 1995), lo cual se manifestó con una menor acumulación de fenoles (E-FA, DFA) y celulosa en la pared celular de coleoptilos mantenidos en PEG (Wakabayashi y col., 1997). Dado que los niveles de fenoles (FA y DFA) y de celulosa correlacionan fuertemente en forma inversa con la extensibilidad mecánica de la pared celular, se puede pensar que estos coleoptilos estresados osmóticamente presentan una disminuida etapa de fijación de la estructura de pared, proporcional a una también disminuida etapa de extensibilidad elástica condicionada por el turgor celular.

El AIA induce la extensibilidad elástica de la pared (Taiz, 1984; Kutschera y Schopfer, 1986b; Hohl y Schopfer, 1992), relajando su estructura a través del corte y unión de xiloglucanos (Talbot y Ray, 1992). En consecuencia, según lo discutido anteriormente, la etapa irreversible de rigidización debería ser considerablemente mayor en los coleoptilos tratados con AIA con respecto al control no tratado. Sin embargo, la hormona indujo sólo un leve aumento de DFA después de 22 h, cuando ya ha ocurrido la máxima estimulación del crecimiento en el coleoptilo (Fig. 17). La ausencia de mayores niveles de fenoles, DFA y lignina para el reforzamiento de la estructura de la pared durante el crecimiento de coleoptilos tratados con AIA, podría interpretarse como el resultado de la extensiva disminución de la actividad px presente en la pared, especialmente de aquella contenida en la FI, fracción que es eficiente en la utilización de sustratos fenólicos y H_2O_2 (Fig. 12 B-C). Este menor grado de fijación irreversible de lo esperado, como la consecuencia física del aflojamiento de la estructura de pared inducida por el AIA, mantendría continuamente a la pared con una mayor capacidad de

extensibilidad para permitir la entrada de agua durante el crecimiento del coleoptilo estimulado por el AIA.

En estas condiciones, el leve aumento de DFA después de 22 h sería el remanente de un proceso irreversible retrasado por la disminución de la actividad px, que sigue fijando la pared después de su extensiva relajación inducida por la hormona. Además, la pared extendida puede ser reforzada por la deposición de nuevos materiales estructurales como la celulosa (Bret-Harte y col., 1991; Cleland, 1995; Wakabayashi y col., 1997). Debido a que la síntesis de celulosa es independiente de la actividad px, es posible que el mayor aumento de peso seco en coleoptilos tratados con AIA (Fig. 11 B) represente la acumulación efectiva de celulosa para reforzar las paredes de estos coleoptilos.

A pesar de la respuesta de disminución de la actividad px de pared, el tratamiento con AIA indujo el aumento de actividad de dos isoformas básicas en la FI (pI 8,0 y 9,6, Fig. 13) que, a juzgar por este comportamiento y sus características cinéticas de alta eficiencia en la utilización de FA, CA y H₂O₂ (Tabla 8), participarían activamente en el proceso irreversible de extensión de la pared. Sin embargo, la actividad px contenida en la FC podría igualmente contribuir en este proceso de fijación de pared, considerando el menor grado de disminución de actividad px en esta fracción con respecto a la FI y Fint en coleoptilos tratados con AIA (Fig. 12 B-C).

El tratamiento continuo con AIA sobre 48 h indujo también una disminución de los niveles de fenoles esterificados a la pared celular (Fig. 17). Este fenómeno podría ser resultado de un proceso de senescencia celular mediado por etileno, pues se ha

demostrado que el AIA induce la enzima sintetizadora de etileno (Yu y Yang, 1979; Kim y col., 1992).

La anterior discusión explica de acuerdo a los resultados obtenidos, las consecuencias de la disminución de la actividad px de pared celular en coleoptilos tratados con AIA; sin embargo, a continuación se discute un posible origen del fenómeno con algunas relevantes implicancias fisiológicas relacionadas con el crecimiento vegetal.

4.4. Potencial daño oxidativo en el tejido tratado con AIA.

Los tejidos jóvenes en activo desarrollo y crecimiento presentan altas tasas de respiración celular (Lambers, 1985), así también como altas concentraciones de AIA debido a la existencia de un gradiente de concentración que aumenta hacia las regiones más apicales, cercanas a los tejidos meristemáticos donde se sintetiza la hormona (Taíz y Zeigler, 1991). De este modo, es posible pensar que la región elongante (sub-apical) de un tejido juvenil como el coleoptilo, debe estar adaptado para contrarrestar y minimizar el daño celular mediado por especies oxidantes (posiblemente radicalarias) derivadas de una elevada actividad mitocondrial en el proceso respiratorio y del catabolismo enzimático del AIA, proceso que controla el nivel endógeno de la hormona. Las especies radicalarias de origen mitocondrial se producen durante la reducción univalente de ubiquinonas durante el transporte electrónico, las cuales reaccionan con oxígeno para formar radicales O_2^- (Comporti, 1985) En tanto en la oxidación del AIA por pxs se generan especies radicalarias y H_2O_2 en un mecanismo mediado por el CIII y estimulado por Mn^{+2} y monofenoles, similar a la oxidación de NADH (Smith y col., 1982; Pedreño y col., 1988;

Gazarian, 1996). Más aun, se ha informado de daño oxidativo en lípidos de membranas de liposomas y neutrofilos mediado por la actividad px durante la oxidación del AIA (Candeias y col., 1996; de Melo y col., 1997). En este contexto, la disminución de la actividad px de la pared en coleptilos tratados con la hormona, podría ser parte de un mecanismo destinado a contrarrestar el daño oxidativo al evitar la oxidación del AIA. En consecuencia con esta proposición, la actividad px es mínima en los tejidos jóvenes (Ferrer y col., 1991; Taíz y Zeigler, 1991; Valero y col., 1991). Así, la disminución de la actividad px en la pared contribuiría a mantener la integridad funcional de la célula, al disminuir el potencial daño oxidativo en la membrana, estrechamente asociada a la pared celular. La integridad estructural de la membrana celular es particularmente importante para el efecto auxínico de elongación celular, pues el mecanismo de transducción de la señal hormonal comprende la unión del AIA a un receptor, que puede ser una proteína de membrana (Löbner y Klämbdt, 1985; Barbier-Brygoo, 1989), además de un rápido recambio de fosfatidilinositoles estructurales de membrana (Ettlinger y Lehle, 1988) que activarían otras señales intracelulares, como la liberación de Ca^{+2} y la activación de calmodulina (Taíz y Zeigler, 1991).

El potencial daño oxidativo durante las fases activas del crecimiento podría también afectar a las proteínas, incluyendo pxs. Ros Barceló y col. (1989) han sugerido que el AIA promovería una asociación de pxs a la pared celular que las protegería durante esta nociva condición celular. Esta proposición concuerda con los resultados obtenidos en esta tesis, donde se observó que el tratamiento con AIA redujo la actividad px en la FI y Fint en mayor proporción que en la FC (Fig. 12 B-C). De este modo, es

posible pensar que además de la inhibición general de la actividad px de pared, la hormona promueve un proceso de insolubilización de px desde la FI y Fint hacia la FC. Este proceso podría insolubilizar específicamente isoformas fundamentales para la estructura de pared, como aquellas afines a la oxidación de CA y NADH (Fig. 12 B-C). El resguardo temporal de estas isoformas en la pared durante el período de daño, aseguraría su posterior funcionalidad en los procesos estructurales de la pared celular. Un posible mecanismo para el proceso de insolubilización de pxs podría estar mediado por corrientes intracelulares de Ca^{+2} , las cuales han sido detectadas en tejidos tratados AIA (Taíz y Zeigler, 1991) y en estados oxidativos de tejidos tratados con H_2O_2 (Price y col., 1994). El aumento de Ca^{+2} intracelular favorecería la asociación de pxs a polisacáridos pectínicos de pared (Penel 1991, 1994), así como la condensación y entrecruzamiento de las cadenas helicoidales de poligalacturonatos (Carpita y Gibeau, 1993) para conformar una estructura más compacta que atraparía firmemente las pxs asociadas a la pared.

Interesante es mencionar que como un posible complemento de estas repuestas de protección, se ha observado que el AIA induce rápidamente (en minutos) la expresión de genes que codifican para proteínas con actividad glutatión transferasa (GST) (Droog y col., 1993). La actividad GST participa en la protección del daño oxidativo, reduciendo la capacidad tóxica de una gran variedad de electrófilos hidrofóbicos tales como derivados oxidados de lípidos y DNA, al catalizar su conjugación a GSH (Marrs, 1996; Foyer y col., 1997). También se ha observado que algunas proteínas solubles con alta especificidad en la unión por auxinas presentan actividad GST (Bilang y col., 1993). Estas observaciones sugieren la existencia de un mecanismo dedicado a proteger la célula

del daño oxidativo en tejidos jóvenes expuestos a AIA, de las especies tóxicas derivadas del catabolismo de la hormona, o bien dirigido a regular su concentración en la conjugación (e inactivación) con GSH (Marrs, 1996).

Las características cinéticas de las isoformas ácidas de la FI revelan que ellas son más relevantes que las isoformas básicas en la utilización de AIA (Tabla 8) y, por tanto, potencialmente más dañinas para la integridad celular a través de la formación de H_2O_2 y especies radicalarias. Este argumento podría explicar la inhibición preferencial de isoperoxidasas ácidas en paredes de coleoptilos tratados con AIA (Figs. 13 a 15), a través de la inhibición de su síntesis, traducción, transporte hacia la pared o bien a un aumento de su degradación. Recientemente, Klotz y Lagrimini (1996) han informado que el AIA suprime la expresión del promotor de una px ácida en tabaco. En ese estudio, la supresión de la expresión fue también posible con el ácido α -naftilacético, una auxina sintética; sin embargo, otras hormonas vegetales como benciladenina, etileno, giberelinas y ácido abscísico, no afectaron el nivel de expresión del promotor (Klotz y Lagrimini, 1996). La concentración de AIA requerida para lograr la mitad de la máxima supresión de expresión fue de 30 μM , del mismo orden de la concentración usada en los experimentos informados en esta tesis (40 μM). De este modo, la inhibición de la expresión de isoformas ácidas parece ser un efecto específico de auxinas y explicaría la disminución preferencial de la actividad px en estas isoformas observada en mis experimentos (Figs. 13 a 15).

En síntesis, la respuesta del coleoptilo frente al AIA comprende la disminución de la actividad px de pared, posiblemente dirigido a evitar la oxidación de la molécula de

AIA. Este fenómeno contribuiría a minimizar el daño celular derivado del catabolismo oxidativo que regula su concentración y, por otro lado, mantendría intacta la potencialidad de la molécula para desencadenar la serie de eventos bioquímicos que determinan la elongación del tejido. Este mecanismo podría ser complementado con la inhibición preferencial de las isoformas más eficientes en la oxidación de AIA, así como con la activación de un proceso de protección (insolubilización) de isoformas relevantes en las propiedades mecánicas de la pared que regulan el crecimiento. La participación de la actividad px en estos mecanismos constituye un interesante aspecto en la regulación del crecimiento vegetal por auxinas, el cual no había sido considerado anteriormente para este sistema enzimático.

4.5. Papel del DIMBOA en la actividad peroxidasa de pared celular y la relación con su efecto de inhibición del crecimiento.

Los resultados presentados aquí muestran que el DIMBOA es un eficiente estimulador de la oxidación de NADH catalizada por pxs de pared celular del coleoptilo de avena. La reacción estimulada por DIMBOA involucra la participación del radical O_2^- y la formación de H_2O_2 (Tabla 10 y Fig. 20), el cual puede ser utilizado en la oxidación de NADH o en la polimerización de fenoles a nivel de la pared celular. El mecanismo de estimulación incluye el aumento de la velocidad de descomposición del CIII (Figs. 23 y 24A), una forma oxiferrosa catalíticamente inactiva de la enzima formada durante la reacción (Yokota y Yamazaki, 1965; Ricard y Nari, 1967; Tamura y Yamazaki, 1972). En ausencia de cualquier dador de electrones para el CIII (fenoles, DIMBOA), la

oxidación de NADH se detiene después de un ciclo catalítico, pues la descomposición espontánea del CIII es lenta, con una constante cinética de $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Aguda y Larter, 1990). La descomposición del CIII genera radicales O_2^- , los cuales en presencia de Mn^{+2} y NADH formarían el H_2O_2 producido en la reacción (Yokota y Yamazaki, 1977; Halliwell, 1978; Aguda y Larter, 1990). También se ha informado que la oxidación del CIII puede generar directamente H_2O_2 y un estado más oxidado de la enzima, el CII (Dunford y Stillman, 1976). Como sea, el H_2O_2 formado puede ser utilizado en el ciclo peroxidativo de la enzima para la oxidación del NADH o del compuesto estimulador de la descomposición del CIII (Fig. 1) (Halliwell, 1978; Pedreño y col., 1987; Aguda y Larter, 1990). Estas reacciones explicarían la inhibición de la oxidación de NADH por catalasa y SOD (Tabla 10 y Fig. 20), al atrapar el H_2O_2 y el O_2^- que participa como intermediario en esta reacción.

Cuando la enzima funciona en el ciclo peroxidativo, usando parte del H_2O_2 generado en la etapa oxidativa, la oxidación de NADH genera radicales NAD^{\cdot} en la reducción del CI y CII. Estos radicales reaccionan rápidamente con oxígeno molecular para generar radicales O_2^- ($k = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) que tienen dos posibilidades de reacción: con PxFe^{+3} para formar CIII o bien con NADH para formar más H_2O_2 (Yokota y Yamazaki, 1977; Aguda y Larter, 1990). La primera reacción ocurre con una constante de velocidad de $3,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, mientras que para la segunda se ha estimado una constante $k = 6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Aguda y Larter, 1990). Esta última reacción no enzimática es dependiente de Mn^{+2} (Yokota y Yamazaki, 1977; Halliwell, 1978) y, aun cuando la respectiva constante de velocidad en presencia de Mn^{+2} no ha sido determinada, ella

debería competir con la reacción de formación de CIII por los radicales O_2^- . Como sea, durante la oxidación de NADH en presencia de DIMBOA existe la posibilidad de regenerar constantemente el CIII, potenciando la acumulación de H_2O_2 . Hasta el momento, no se conoce evidencia experimental alguna que descarte o reste importancia a la oxidación de NADH como fuente del H_2O_2 en la pared celular. Por el contrario, existen antecedentes independientes que apoyan esta hipótesis. Goldberg y col. (1985,1987) han demostrado mediante pruebas citoquímicas que el sistema generador de H_2O_2 en la pared celular coincide en localización y características con pxs que utilizan NADH. Shinkle y col. (1992), detectaron la presencia de NAD(H) en el fluido apoplástico, mientras que Gross (1977) reportó la presencia de una malato deshidrogenasa fuertemente unida a la pared, la cual reduce específicamente el NAD a expensas de la oxidación de malato a oxalacetato, reciclando así constantemente el NADH en la pared (Elstner y Heupel, 1976; Gross 1977; Mäder y Schloss, 1979).

El DIMBOA es un poderoso agente generador de H_2O_2 a través de la estimulación de la oxidación de NADH, pues es un sustrato pobremente utilizado por las pxs en presencia de H_2O_2 . La $V_{m\acute{a}x}$ de peroxidación de DIMBOA es 38 y 898 veces menor que la $V_{m\acute{a}x}$ obtenida para la oxidación de NADH estimulada por DIMBOA con las FI y FC, respectivamente (Tablas 9 y 11). Estas diferencias explicarían la utilización casi nula del DIMBOA durante la estimulación de la oxidación de NADH (Fig. 21), aun cuando la competencia de NADH por el CI también podría contribuir a este resultado. La utilización del DIMBOA por pxs en presencia de H_2O_2 también es menor que la utilización peroxidativa de los sustratos fenólicos (CA y E-FA), por lo cual el H_2O_2

producido y acumulado en la oxidación de NADH estimulada por DIMBOA podría ser efectivamente utilizado por las pxs en la síntesis de DFA y lignina en la pared celular (Pedreño y col., 1995). El aporte de H_2O_2 inducido por DIMBOA en una reacción catalizada por pxs de pared operaría también *in vivo*, pues existe una notoria acumulación transitoria de DFA y lignina en los coleoptilos tratados con DIMBOA (Figs. 25 y 26). No hay evidencia, ni se ha propuesto otro mecanismo para la formación de estos polímeros fenólicos en la pared que no sea aquel mediado por pxs y H_2O_2 (Markwalder y Neukom, 1976; Fry, 1986; Iyama y col., 1994). Por lo tanto, el aumento de DFA y lignina en coleoptilos tratados con DIMBOA sería resultado de la actividad px tanto en su ciclo oxidativo como peroxidativo, preferencialmente de las px de la FI, a juzgar por la mayor eficiencia de estimulación en la oxidación de NADH en presencia de DIMBOA (Tabla 9) y en la utilización de sustratos fenólicos CA y E-FA (Tabla 4).

4.6. El DIMBOA impide la continuidad del proceso de elongación celular. Inducción de un estado de estrés oxidativo.

Si se piensa en el modelo de extensibilidad de pared celular postulado para explicar el crecimiento, como un fenómeno continuo de relajación, elasticidad (conducida por el turgor) y fijación covalente de la estructura distendida, entonces es esperable que la temprana acumulación de DFA y lignina deprima la posterior relajación y elongación de la pared celular, limitando con ello el crecimiento. Si la relajación está limitada por una pared más rígida, también se limita la entrada de más agua, la distensión de la pared que acompaña al turgor y, por tanto, disminuye el grado de fijación covalente en la pared

celular. Las curvas de acumulación de fenoles y lignina en paredes celulares de coleoptilos tratados con DIMBOA, muestran que después del pico inicial de DFA y lignina a las 5 h, el proceso no es sólo inhibido sino también retardado hasta el final de las 48 h, donde los niveles de fenoles alcanzan valores cercanos a los del control (Fig. 25 y 26). Así, el retardo en la acumulación de fenoles en la pared provocado por el DIMBOA sería consecuencia de una menor extensibilidad elástica de la pared, resultante de la menor capacidad de distensión de la pared después de la temprana acumulación transitoria de DFA y lignina.

La fuerza motriz en el proceso de elongación de la célula vegetal es la entrada de agua (Cosgrove, 1986, 1993b; Cleland, 1995). De este modo, si no existe suficiente presión de turgor que ejerza presión sobre la pared para permitir la entrada de más agua, podría esperarse, en consecuencia, como antes un retardo o disminución del proceso reversible e irreversible de la extensión de la pared celular (Cosgrove, 1993b; Hohl y col., 1995). Así entonces, el DIMBOA también podría interferir con alguna actividad metabólica celular de tal modo de deprimir el turgor celular. Diversas observaciones microscópicas e histológicas han demostrado que el DIMBOA (en altas concentraciones del orden de 5 mM) provoca daños celulares como plasmólisis y colapso celular, acompañado de una inevitable pérdida del turgor celular (Sahi y col., 1995).

Generalmente, se ha asociado la fitotoxicidad del DIMBOA con su capacidad de inhibir la fotosíntesis y la actividad mitocondrial (Queirolo y col., 1983; Niemeyer, 1988; Massardo y col., 1994). Sin embargo, el efecto del DIMBOA informado aquí no estaría relacionado a estos procesos pues ellos fueron realizados en oscuridad, con coleoptilos

etiologados desprovistos de pigmentos fotosintéticos. Además, los efectos tóxicos antes mencionados han sido demostrados sólo en altas concentraciones de DIMBOA del orden de 1 a 2 mM (Queirolo y col., 1983; Massardo y col., 1994), diez a veinte veces la concentración usada en los experimentos con segmentos de coleoptilos (75 a 100 μ M). Aún a concentraciones de 75 a 100 μ M de DIMBOA, los efectos de inhibición de la actividad mitocondrial o cloroplástica son sólo de un 5 a 10 % (Queirolo y col., 1983; Massardo y col., 1994). Así entonces, si el turgor también es afectado por el DIMBOA, la alteración de otras actividades celulares deben dar cuenta de este efecto, como se discute a continuación.

La capacidad de estimulación de la oxidación de NADH promovida por el DIMBOA no sólo está restringida a pxs de pared celular, sino que se presenta también con las pxs intracelulares no asociadas a la pared (resultados no presentados). Este efecto conduciría a la estimulación de la oxidación de NADH en otros compartimentos, además de la pared celular, con la consecuente acumulación de un exceso de H_2O_2 y radicales de O_2 para conformar un estado de estrés oxidativo celular. Esta hipótesis fue abordada analizando la actividad de enzimas implicadas en la defensa antioxidante celular en coleoptilos tratados con DIMBOA. Dos de ellas, la ascp_x y catalasa, fueron notablemente inhibidas desde el inicio del tratamiento con DIMBOA (Fig. 27). Las catalasas descomponen el H_2O_2 hasta agua y oxígeno y están ampliamente distribuídas en la célula vegetal, solubles en el citosol, así como en peroxisomas y glioxisomas (Tolbert, 1981; Hernández-Ruiz y col., 1996). La ascp_x remueve el exceso de H_2O_2 a expensas de la oxidación de ascorbato (Asada, 1991; De Gara y col., 1996) y se encuentra localizada

tanto en cloroplastos como soluble en el citosol (Miyake y Asada, 1992; Hernández-Ruiz, 1996). Se ha descrito que ambas enzimas presentan tanto inhibición (reversible) como inactivación (irreversible) por H_2O_2 (Miyake y Asada, 1996; Lardinois y col., 1996). Particularmente, la inactivación de la ascp_x por H_2O_2 involucra la degradación del CI de la enzima a bajas concentraciones del sustrato ascorbato (Miyake y Asada, 1996). Esta situación es importante en un estado de estrés oxidativo, pues cuando el ascorbato es consumido, la enzima se torna sensible a la inactivación por el exceso de H_2O_2 . Más aún, la ascp_x, a diferencia de la px de rábano o la guaiacol px, es extremadamente sensible a especies radicalarias que se generan en condiciones de estrés oxidativo (Asada, 1991; Miyake y Asada, 1996).

El daño celular inducido por el DIMBOA comprometió la integridad de estructuras particularmente sensibles al daño oxidativo, como proteínas y ácidos grasos. Las proteínas dañadas oxidativamente, detectadas por un aumento de grupos carbonilo en su estructura, son sensibles a la fragmentación, agregación y degradación (Pacifici y Davies, 1990; Stadtman, 1993), deprimiendo importantes funciones que mantienen la dinámica celular. De hecho, la disminución del contenido de grupos carbonilo, luego de su acumulación en el coleoptilo durante las primeras horas de tratamiento con DIMBOA, sugiere el rápido recambio de estas proteínas dañadas oxidativamente (Fig. 30). Por su parte, el daño oxidativo a ácidos grasos insaturados (Fig. 29) favorece la desintegración estructural de membranas y el vaciamiento del contenido celular (Comporti, 1985; Gutteridge y Halliwell, 1990). En conjunto, estas alteraciones celulares son los mejores

candidatos para sugerir una responsabilidad en la disminución del turgor celular en coleoptilos tratados con DIMBOA.

El estado de estrés oxidativo inducido por el DIMBOA sobrepasó la capacidad de algunos elementos del sistema de defensa antioxidante, como ascp_x y catalasa; sin embargo, la actividad SOD presentó un notable aumento desde el inicio del tratamiento con el DIMBOA (Fig. 28). La SOD está distribuída en el citosol, cloroplasto y mitocondrias, presentando una variedad de isoenzimas relativamente resistentes al daño oxidativo y H₂O₂ (Bowler y col., 1992). Además, radicales O₂⁻ inducen la síntesis de *nov*o de la enzima, los cuales son el sustrato que transforma hasta H₂O₂ y O₂. Más aún, en tejidos etiolados, como los coleoptilos utilizados en este trabajo, se acumulan principalmente las isoenzimas insensibles a H₂O₂ (Kanematsu y Asada, 1989; Bowler y col., 1992). Así, el daño oxidativo inducido por DIMBOA podría estar mediado no sólo por H₂O₂, sino también por O₂⁻. Es interesante notar que el daño oxidativo inducido por DIMBOA podría estar notablemente potenciado en coleoptilos con una capacidad reducida de transformar el H₂O₂, debido a la inhibición de ascp_x y catalasa, además de la inducción de la actividad SOD que acumula H₂O₂. En un extensivo daño oxidativo como al que están sometidos los coleoptilos tratados con DIMBOA, la producción adicional de H₂O₂ a través de la actividad SOD podría representar un mecanismo para la activación de nuevas defensas antioxidantes como la inducción de glutatión S-transferasa (Levine y col., 1994; Foyer y col., 1997) y glutatión peroxidasa (Willekens y col., 1997).

En diversos estudios se ha establecido que la reactividad química del DIMBOA está relacionada con la presencia del tautómero de cadena abierta (cetoaldehído), un

potente electrófilo, en equilibrio con la forma cíclica hemiacetálica (Fig. 35) (Niemeyer y col., 1982, 1988). Esta forma reactiva ha sido implicada en la adición nucleofílica y en la oxidación de grupos SH (Niemeyer, 1988; Cuevas y col., 1990). La posible reactividad del DIMBOA con el GSH por esta vía, contribuiría al aumento del estado oxidativo en los coleoptilos tratados con este AHX, expresado en la reducción de la razón GSH/GSSG (Figs. 32 y 34). Al parecer, el DIMBOA disminuiría esta razón no sólo promoviendo la oxidación del GSH, sino también posiblemente mediante la reducción de su síntesis, o bien en la adición nucleofílica del GSH al DIMBOA (Figs. 31 y 33).

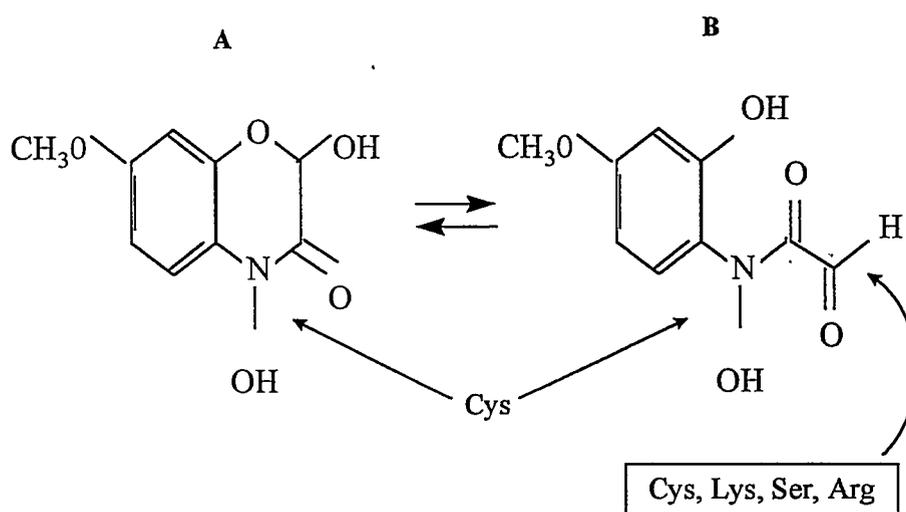


Figura 35 : Esquema de reactividad del grupo electrófilo en la forma abierta de DIMBOA (B), en equilibrio con la forma hemiacetálica cíclica (A).

Finalmente, quisiera hacer un importante alcance de los resultados presentados aquí en relación a los experimentos con DIMBOA. El DIMBOA ha sido postulado como un factor de resistencia de cereales al ataque de insectos, hongos y bacterias (Niemeyer, 1988). En hojas de maíz y trigo, el glucósido de DIMBOA y la enzima que lo hidroliza se encuentran compartimentalizados, previniendo así la liberación de la aglicona tóxica (Massardo y col., 1994); sin embargo, cuando el tejido es dañado por la infección de un patógeno o por el ataque de un insecto, la compartimentalización se rompe provocando la hidrólisis enzimática del glucósido de DIMBOA. En estas condiciones, el DIMBOA puede activar la oxidación de NADH mediada por pxs y acumular H_2O_2 , como ha sido presentado en este trabajo. Esta reacción nunca ha sido considerada antes en la interacción planta-patógeno y podría representar un novedoso mecanismo por el cual las plantas con AHX contrarresten el ataque de patógenos. El H_2O_2 puede ser utilizado como agente antibiótico directamente o inducir el reforzamiento de las paredes celulares del tejido atacado, limitando el avance de la infección. Más aún, en la región afectada el DIMBOA puede originar una extensiva cadena oxidativa que limita la sobrevivencia del patógeno. A largo plazo el H_2O_2 , así como especies radicalarias formadas, podrían servir de señal para inducir la síntesis de proteínas relacionadas a la patogénesis (proteínas PR), algunas de las cuales son enzimas hidrolíticas (glucanasas y quitinasas) (Durner y col., 1997), necesarias para frenar el avance del patógeno. En hojas de tabaco inyectadas directamente con H_2O_2 o compuestos que promueven su generación (AMT, paraquat o glicolato), se observó la inducción de la expresión de genes PR-1 (Chen y col., 1993). Del mismo modo, plantas transgénicas de tabaco deficientes en actividad catalasa

acumulan H_2O_2 junto con la rápida expresión de varias proteínas PR (Chamnongpol y col., 1996). También, peróxidos lipídicos lograron activar la expresión de genes PR-1 en suspensiones celulares de tabaco (Klessig, 1996).

En síntesis, los logros específicos más importantes alcanzados durante el desarrollo del trabajo, aportan nuevos antecedentes sobre tópicos poco considerados acerca del papel funcional de las pxs de la pared celular en la regulación del crecimiento vegetal. Se encontraron notables diferencias cinéticas y de heterogeneidad de isoformas en las fracciones de px unidas a la pared celular, que indican que la actividad px contenida en la FI tendría un relevante papel funcional en la formación de polímeros fenólicos DFA y lignina. El efecto de AIA sobre las pxs de pared celular, sugiere nuevos aspectos en el cual estas enzimas participarían en la regulación del crecimiento inducido por la hormona. Por último, el efecto del DIMBOA en las reacciones catalizadas por pxs permite dar una coherente explicación a su efecto inhibitorio sobre el crecimiento vegetal, cuyas consecuencias podrían tener interesantes alcances en aspectos de la interacción planta-patógeno.

5.0 CONCLUSIONES

Las peroxidasas asociadas a la pared celular de coleoptilos de avena (unidas iónica y covalentemente a la pared o solubles en el espacio intercelular), catalizan distintas reacciones relacionadas con la síntesis de diferulato y lignina, polímeros que determinan la rigidez de la pared y limitan el crecimiento celular. Estas reacciones son la oxidación de alcohol coniferílico y ácido ferúlico con H_2O_2 , así como la oxidación de NADH con O_2 para generar H_2O_2 . Las fracciones de peroxidasas en la pared celular difieren en cuanto a su composición isoenzimática, velocidad de utilización de sustratos fenólicos y de NADH y, posiblemente, también en un aspecto funcional. Las peroxidasas de la fracción iónica parecen ser más importantes que las de la fracción covalente en la formación de diferulato y lignina y, por tanto, podrían regular más directamente las propiedades físicas y químicas de la pared que determinan la elongación del tejido.

En concordancia con su participación en la modulación del crecimiento vegetal, las peroxidasas asociadas a la pared celular fueron alteradas por los reguladores del crecimiento AIA y DIMBOA. El tratamiento de coleoptilos de avena con AIA lleva a concluir que la disminución de la actividad peroxidasa en la pared no estaría directamente relacionada con modificar las propiedades físicas y químicas de la pared, sino más bien a prevenir la destrucción del AIA a fin de permitir ejercer sus efectos hormonales y evitar el potencial daño oxidativo de las especies derivadas de su utilización peroxidativa. El tratamiento de coleoptilos con DIMBOA permite concluir que la formación y deposición

de diferulato y lignina en la pared junto con inducción de un estado de estrés oxidativo en el tejido, resulta de la efectiva formación de H_2O_2 en la oxidación de NADH estimulada por DIMBOA y catalizada por peroxidasas.

Así, la modulación del crecimiento por compuestos como el AIA y DIMBOA parece corresponder a procesos específicos en los cuales las peroxidasas de pared participan y también regulan activamente. Las consecuencias de la participación de la actividad peroxidasa en estos procesos puede modificar directa o indirectamente las propiedades estructurales de la pared celular, así como la estabilidad de importantes macromoléculas (lípidos y proteínas), todos factores, que en conjunto, determinan el fenómeno del crecimiento.

REFERENCIAS

Abeles, F.B. y Biles, C.L. 1991. The peroxidases of xylem sap. En J. Lobarzewski, H. Greppin, C. Penel y Th. Gaspar (eds.), "*Biochemical, Molecular, and Physiological aspects of plant Peroxidases*". pp : 187-195. University of Geneva, Switzerland.

Acosta, M., Arnao, M.B., Casas, J.L., Del Río, J.A, Vioque, B. y Fernández-Maculet, J.C. 1991a. Mechanism of ACC oxidation by peroxidase.. En J. Lobarzewski, H. Greppin, C. Penel y Th. Gaspar (eds.), "*Biochemical, Molecular, and Physiological aspects of plant Peroxidases*". pp : 121-124. University of Geneva, Switzerland.

Acosta, M., Arnao, M.B., Del Río, J.A. y García-Cánovas, F. 1991b. Inactivation of peroxidases. En J. Lobarzewski, H. Greppin, C. Penel y Th. Gaspar (eds.), "*Biochemical, Molecular, and Physiological aspects of plant Peroxidases*". pp : 175-184. University of Geneva, Switzerland.

Aguda, B.D. y Larter, R. 1990. Sustained oscillations and bistability in a detailed mechanism of the peroxidase-oxidase reaction. *J.Amer.Chem. Soc.* 112 :2167-2174.

Albersheim, P. 1975. The walls of growing plant cells. *Scientific American* 232 : 81-95.

Almeida, M. ; Humanes, M. ; Silva, J.A. ; Melo, R. y Fraústo da Silva, J.J.R. 1996. Phyllariopsis Brevevipes : a brown algae with vanadium-dependent iodoperoxidases. En C. Obinger, U. Burner, R. Eberman, C. Penel, H. Greppin (eds.), "*Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology*". pp 146-151. University of Agriculture, Vienna and University of Geneva.

Alsher, R.G. 1989. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol. Plantarum* 77: 457-464.

Apostol, I., Heinstein, P.F. y Löw, P.S. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol.* 90 : 109-116.

Argandoña, V.H. y Corcuera, L.J. 1985. Distribution of hydroxamic acids in *Zea mays* tissues. *Phytochemistry* 24 : 177-178.

Asada, K. 1991. Molecular properties of ascorbate peroxidase in chloroplasts. En J. Lobarzewski, H. Greppin, C. Penel y Th. Gaspar (eds.), "Biochemical, Molecular, and Physiological aspects of plant Peroxidases". pp : 147-158. University of Geneva, Switzerland.

Aviram, I. 1981. The interaction of benzohydroxamic acid with horseradish peroxidase and its fluorescent analogs. *Arch. Biochem. Biophys.* 212 : 483-490.

Barbier-Brygoo, H., Ephritikhine, G., Klämbdt, D., Ghislain, M. y Guern, J. 1989. Functional evidence for an auxin receptor at the plasmalemma of tobacco mesophyll protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 891-895.

Bilang, J., Macdonald, H., King, P. y Sturm, A. 1993. A soluble auxin-binding protein from protein from *Nicotiana glauca* is a glutathione S-transferase. *Plant Physiol.* 102 : 29-34.

Birecka, H. y Miller, A. 1974. Cell wall and protoplast isoperoxidases in relation to injury, indolacetic acid, and ethylene effects. *Plant Physiol.* 53 : 569-574.

Bowler, Ch., Van Montagu, M. e Inzé, D. 1992. Superoxide dismutase and stress

tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43 : 83-116.

Bradley, D.J., Kjelbom, P., Lamb, C.J. 1992. Elicitor- and wound- induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein : a novel, rapid defense response. *Cell* 70 : 21-30.

Bret-Harte, M.S., Baskin, T.I. y Green, P.B. 1991. Auxin stimulates both deposition and breakdown of material in pea outer epidermal wall, as measured interferometrically. *Planta* 185 : 462-471.

Bret-Harte, M.S. y Talbott, L.D. 1993. Changes in composition of the outer epidermal cell wall of pea stems during auxin-induced growth. *Planta* 190 : 369-378.

Briskin, D., Leonard, R. y Hodges, T. 1987. Isolation of the plasma membrane : Membrane markers and general principles. *Meth. Enzymol.* 148 : 542-568.

Brouwer, K., van Valen, T., Day, D.A. y Lambers, H. 1986. Hydroxamate-stimulated O₂ uptake in roots of *Pisum sativum* and *Zea Mays*, mediated by a peroxidase. *Plant Physiol.* 82 : 236-240.

Cakmak, L. y Horst, W. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean. *Physiol. Plantarum* 83 : 463-468.

Candeias, L.P., Folkes, L.K. y Wardman, P. 1996. Enhancement of peroxidase-induced lipid peroxidation by indole-3-acetic acid and : effect of antioxidants. *Redox Report* 2 : 141-147.

Carpita, N.C. y Gibeaut, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants : consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3 : 1-30.

Castillo, F.J. y Greppin, H. 1986. Balance between anionic and cationic extracellular peroxidase activities in *Sedum album* leaves after ozone exposure. Analysis by high-performance liquid chromatography. *Physiol. Plantarum* 68 : 201-208.

Cleland, R.E. 1971. Cell wall extension. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 22 : 197-222.

Cleland, R.E. 1995. Auxin and cell elongation. En P. J. Davies (ed.), "*Plant Hormones*". pp : 214-227. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Cohen, G. y Heikkila, R. 1974. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J. Biol. Chem.* 249 : 2447-2452.

Comporti, M. 1985. Lipid peroxidation and cellular damage in toxicology of liver injury. *Lab. Invest.* 53 : 599-623.

Cosgrove, D.J. 1986. Biophysical control of plant cell growth. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37 : 377-405.

Cosgrove, D.J. 1993a. Wall extensibility : its nature, measurement, and relationship to plant cell growth. *New Phytol.* 124 : 1-23.

Cosgrove, D.J. 1993b. How do plant cell walls extend ?. *Plant Physiol.* 102 : 1-6.

Cuevas, L., Niemeyer, H.M. y Pérez, F.J. 1990. Reaction of DIMBOA, a resistance factor from cereals, with α -chymotrypsin. *Phytochemistry* 29 : 1429-1432.

Czaninski, Y., Sachot, R.M. y Catesson, A.M. 1993. Cytochemical localization of hydrogen peroxide in lignifying cell walls. *Ann. Bot.* 72 : 547-550.

Chaloupková, K. y Smart, Ch. 1994. The abscisic acid induction of a novel peroxidase is antagonized by cytokinin in *Spirodela polyrriza* L. *Plant Physiol.* 105 : 497-507.

Chamnongpol, S., Willekens, H., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W. 1996. Transgenic tobacco with a reduced catalase activity develops necrotic lesions and induces pathogenesis-related expression under high light. *Plant J.* 10 : 491-503.

Chen, Z., Silva, H. y Klessig, D.F. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262 : 1883-1886.

Chibbar, R.N. y van Huystee, R.B. 1986. Immunochemical localization of peroxidases in cultured peanut cells. *J. Plant. Physiol.* 123: 477-486.

De Boer, E. ; Van Kooyk, Y. ; Tromp, M.P.M. ; Plat, H. ; Wever, R. 1986. Bromoperoxidase from *Ascophylum nodosum* : a novel class of enzymes containing vanadium as a prosthetic group ?. *Biochim. Biophys. Acta* 896 : 48-53.

De Gara, L. ; de Pinto, M.C. ; Paciolla, C. ; Cappetti, V. y Arrigoni, O. 1996. Is ascorbate peroxidase only a scavenger of hydrogen peroxide?. En C. Obinger, U. Burner, R. Eberman, C. Penel, H. Greppin (eds.), "*Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology*". pp 157-162. University of Agriculture, Vienna and University of Geneva.

de Melo, M.P., Curi, T.C., Curi, R., Di Mascio, P. y Cilento, G. 1997. Peroxidase activity may play a role in the cytotoxic effect on indole acetic acid. *Photochem. Photobiol.* 65 : 338-341.

Dean, J. y Devarenne, T. 1997. Peroxidase-mediated conjugation of glutathione to unsaturated phenylpropanoids. Evidence against glutathione S-transferase involvement. *Physiol. Plantarum* 99 : 271-278.

Droog, F., Hooykaas, P., Libbenga, K. y van der Zaal, E. 1993. Proteins encoded by auxin-regulated gene family of tobacco share limited but significant homology with glutathione S-transferases and one member indeed shows *in vitro* GST activity. *Plant Mol. Biol.* 21 : 965-972.

Dunford, H.B. y Stillman, J.S. 1976. On the function and mechanism of action of peroxidases. *Coord. Chem. Reviews* 19 : 187-251.

Durner, J., Shah, J. y Klessig, D.F. 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *TIPS* 2 : 266-274.

Elstner, E.F. y Heupel, A. 1976. Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.). *Planta* 130: 175-180.

Ettlinger, C. y Lehle, L. 1988. Auxin induces rapid changes in phosphatidylinositol metabolites. *Nature* 331: 176-178.

Ferrer, M.A., Pedreño, M.A., Muñoz, R. y Ros Barceló, A. 1991. Soluble peroxidase gradients in lupin hypocotyls and the control of the level of polarly transported indole-3-yl-acetic acid. *J. Plant Growth Regul.* 10 : 139-146.

Foyer, C.H., López-Delgado, H., Dat, J.F. y Scott, I.M. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plantarum* 100 : 241-254.

Fry, S.C. 1980. Gibberellin-controlled pectinic acid and protein secretion in growing cells. *Phytochemistry* 19: 735-740.

Fry, S.C. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Ann. Review Plant Physiol.* 37: 165-186.

Fülop, V. 1996. Crystal structure of the di-haem cytochrome c peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. En C. Obinger, U. Burner, R. Eberman, C. Penel, H. Greppin (eds.), "*Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology*". pp 45-51. University of Agriculture, Vienna and University of Geneva.

Gaspar, Th., Kevers, C., Penel, C. y Greppin, H. 1983. Auxin control of calcium-mediated peroxidase secretion by auxin-dependent and auxin-independent sugarbeet cells. *Phytochemistry* 22: 2657-2660.

Gaspar, Th., Penel, C., Castillo, F.J. y Greppin, H. 1985. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol. Plantarum* 64: 418-423.

Gazarian, I.G. ; Ashby, G.A. ; Thornaley, R.N.F. y Lagrimini, L.M. 1996. Study of Indole-3-acetic acid oxidation by molecular oxygen catalyzed by horseradish and tobacco peroxidases. En C. Obinger, U. Burner, R. Eberman, C. Penel, H. Greppin (eds.), "*Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology*". pp 70-75. University of Agriculture, Vienna and University of Geneva.

Gillikan, 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. ; Lê, T. y Catesson, A.M. 1985. Localization and properties of cell wall enzyme activities related to the final stages of lignin biosynthesis. *J. Exper. Botany* 36 : 511-528.

Goldberg, R., Imberty, A. y Chu-Ba, J. 1986. Development of isoperoxidases along the growth gradient in the mung bean hypocotyl. *Phytochemistry* 25: 1271-1274.

Goldberg, R. Liberman, M. Mathiew, C., Pierron, M. y Catesson, A.M. 1987. Development of epidermal cell wall peroxidases along the mung bean hypocotyl : Possible involvement in the cell wall stiffening process. *J. Exp. Botany* 38 : 1378-1390.

Grabber, J.H., Hatfield, R.D., Ralph, J. y Amrhn, N. 1995. Ferulate cross-linking in cell walls isolated from maize cell suspensions. *Phytochemistry* 40 : 1077-1082.

Graham, M. y Graham, T. 1991. Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f.sp *Glycinea* wall glucan. *Plant Physiol.* 97 : 1445-1455.

Griffith, O.W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106 : 559-566.

Gross, G.G. 1977. Cell wall-bound malate dehydrogenase from horseradish. *Phytochemistry.* 16 : 319-321.

Gutteridge, J.M.C. y Halliwell, B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS* 15 : 129-135.

Halliwell, B. 1978. Lignin synthesis: the generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols. *Planta* 140: 81-88.

Hartley, R.D. y Morrison, W.H. 1991. Monomeric and dimeric phenolic acids released from cell walls of grasses by sequential treatment with sodium hydroxide. *J. Sc. Food & Agric.* 55 : 365-375.

Havir, E. 1992. The *in vivo* and *in vitro* inhibition of catalase from leaves of *Nicotiana sylvestris* by 3-amino-1,2,4-triazole. *Plant Physiol.* 99 : 533-537.

Hernández-Ruiz, J., Cano, A., Arnao, M.B., Acosta, M. y Sánchez-Bravo, J. 1996. Distribution of ascorbate- and guaiacol- peroxidase and catalase in etiolated lupin hypocotyls. En C. Obinger, U. Burner, R. Eberman, C. Penel, H. Greppin (eds.), "*Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology*". pp 281-285. University of Agriculture, Vienna and University of Geneva.

Hohl, M. y Schopfer, P. 1992. Growth at reduced turgor : irreversible and reversible cell-wall extension of maize coleoptiles and its implications for the theory of cell wall growth. *Planta* 187 : 209-217.

Hohl, M., Greiner, H. y Schopfer, P. 1995. The cryptic-growth response of maize coleoptiles and its relationship to H₂O₂-dependent cell wall stiffening. *Physiol. Plantarum* 94 : 491-498.

Hu, C., Krol, M. y van Huystee, R.B. 1990. Comparison of anionic with cationic peroxidase from cultured peanut cells. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 22 : 65-70.

- Hwang, R. 1982. An approach to lignification in plants. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 105 : 509-514.
- Iiyama, K. y Wallis, A.F. 1990. Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure. *J. Sc. Food Agric.* 51 : 145-161
- Iiyama, K., Lam, T.B-T. y Stone, B.A.1994. Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol.* 104: 315-320.
- Ikegawa, T., Mayama, S., Nakayashiki, H. y Kato, H. 1996. Accumulation of diferulic acid during the hypersensitive response of oat leaves to *Puccinia coronata* f.sp. *avenae* and its role in the resistance of oat tissue to cell wall degrading enzymes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48 : 245-255.
- Ingemarsson, B. 1995. Ethylene effects on peroxidases and cell growth patterns in *Picea abies* hypocotyl cuttings. *Physiol. Plantarum* 94.: 211-218.
- Jiang, Y. y Miles, P.W. 1993. Generation of H₂O₂ during enzymic oxidation of catechin. *Phytochemistry* 33 : 29-34.
- Jupe, S.C. y Scott, I. 1989. The slender phenotype of pea : stem growth, peroxidase levels and ethylene responses. *Physiol. Plantarum* 77 : 59-66.
- Kamisaka, S., Takeda, S., Takahashi, K. y Shibata, K. 1990. Diferulic and ferulic acid in the cell wall of *Avena* coleoptiles. Their relationships to mechanical properties of the cell wall. *Physiol. Plantarum* 78: 1-7.
- Kanematsu, S. y Asada, K. 1989. CuZn-superoxide dismutases in rice : occurrence of an active, monomeric enzyme and two types of isozyme in leaf and non-photosynthetic tissue. *Plant Cell Physiol.* 30 : 381-391.

Karataglis, S., Moustakas, M. y Symeonidis, L. 1991. Effect of heavy metals on isoperoxidase of wheat. *Biol. Plantarum* 33 : 3-9.

Kay, E., Shanon, L.M. y Lew, J.Y. 1966. Peroxidase isozymes from horseradish roots. II. Catalytic properties. *J. Biol. Chem.* 242 : 2470-2473.

Keller, B. 1993. Structural cell walls proteins. *Plant Physiol.* 101: 1127-1130.

Kevers, C., Coumans, M., Coumans-Gillès, M. y Gaspar, Th. 1984. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro. *Plant Physiol.* 61 : 69-74.

Kim, W.T., Silverstone, A., Yip, W.K., Dong, J.G. y Yang, S.F. 1992. Induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase mRNA by auxin in mung bean hypocotyls and cultured apple shoots. *Plant Physiol.* 98 : 465-471.

Klessig, D.F. 1996. Studies of salicylic acid signal transduction pathway. En G. Stacey, B. Mullin y P. Gresshoff (eds.), "*Biology of plant-microbe interactions*", Vol 4. pp 33-38. International Society for molecular Plant-microbe interactions.

Klotz, K.L. y Lagrimini, L.M. 1996. Phytohormone control of the tobacco anionic peroxidase promoter. *Plant Mol. Biol.* 31 : 565-573.

Kobayashi, A., Fukusaki, E., Kajiyama, S. 1996. Bioactive potentiality of pod products derived from natural simple phenolics. En C. Obinger, U. Burner, R. Eberman, C. Penel, H. Greppin (eds.), "*Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology*". pp 292-297. University of Agriculture, Vienna and University of Geneva.

Kutschera, U. y Schopfer, P. 1986a. In-vivo measurement of cell-wall extensibility in

maize coleoptiles: effects of auxin and abscisic acid. *Planta* 169: 437-442.

Kutschera, U. y Schopfer, P. 1986b. Effect of auxin and abscisic acid on cell wall extensibility in maize coleoptiles. *Planta* 167 : 527-535.

Lambers, H. 1985. Respiration in intact plants and tissues. Its regulation and dependence on environmental factors, metabolism and invaded organisms. En R. Douce y D. Day (eds.), "Higher plant cell respiration", pp 418-473. Springer-Verlag, Berlín.

Lang, S., Hilgenfeldt, U. y Mäder, M. 1990. Purification and immunological characterization of peroxidase-isoenzymes from *Nicotiana tabacum* L.J. *Plant Physiol.* 136: 494-498.

Lardinois, O.M., Mestdagh, M.M. y Rouxhet, P.G. 1996. Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* 1295 : 222-238.

Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. y 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. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 41: 455-496.

Li, Z-Ch. ; 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.

Li, Z-H. y McClure, J.W. 1990. Soluble and bound hydroxyproline-rich glycoproteins in control and wounded oat and barley primary leaves. *Phytochemistry* 29 : 2811-1813.

Linderberg, O. y Ernster, L. 1963. Determination of organic phosphorous compounds by phosphate analysis. *Meth. Biochem. Analysis* 3 : 1-21.

Löbler, M. y Klämbdt, D. 1985. Auxin-Binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.). II. Localization of a putative auxin receptor. *J. Biol. Chem.* 260 : 9854-9859.

MacAdam, J., Sharp, R., Nelson, C. 1992. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. II. Spatial distribution of apoplastic peroxidase activity in genotypes differing in length of the elongation zone. *Plant Physiol.* 99 : 879-885.

Mäder, M. y Schloss, P. 1979. Isolation of malate dehydrogenase from cell walls of *Nicotiana tabacum*. *Plant Sci. Lett.* 17 : 75-80.

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

Margoliash, E., Novogrodsky, A. y Schejter, A. 1960. Irreversible reaction of 3-amino-1 : 2 : 4-triazole and related inhibitors with the protein of catalase. *Biochem. J.* 74 : 339-348.

Markwalder, H.U. y Neukom, H. 1976. Diferulic acid as a possible crosslink in hemicelluloses from wheat germ. *Phytochemistry* 15 : 836-837.

Marrs, K. 1996. The function and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 : 127-158.

Martínez, C., Geiger, J.P., Bresson, E., Daniel, J.F. y Nicole, M. 1996. Isoperoxidases are associated with resistance of cotton to *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum*. En C. Obinger, U. Burner, R. Eberman, C. Penel, H. Greppin (eds.), "*Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology*". pp 322-327. University of Agriculture, Vienna and University of Geneva.

Massardo, F., Zuñiga, G.E., Pérez, L.M. y Corcuera, L.J. 1994. Effects of hydroxamic acids on electron transport and their cellular location in corn. *Phytochemistry*. 35 : 873-876.

Mato, M. 1983. Changes in isoperoxidases induced by hydrophenylacetic acids. *Biol. Plantarum* 25 : 151-154.

May, M., Hammond-Kosak, K. y Jones, J. 1996. Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism, and lipid peroxidation in the Cf-gene-dependent defense response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum*. *Plant Physiol.* 110 : 1367-1379.

McQueen-Mason, S.J. y Cosgrove, D.J. 1995. Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiol.* 107 : 87-100.

Miland, E., Smyth, M., Fágáin, C. 1996. Phenol removal by modified peroxidases. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 67 : 227-236.

Misra, H. y Fridovich, I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247 : 3170-3175.

Miyake, C. y Asada, K. 1992. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiol.* 33 : 541-543.

Miyake, C. y Asada, K. 1996. Inactivation mechanism of ascorbate peroxidase at low concentration of ascorbate ; hydrogen peroxide decomposes compound I of ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 37 : 423-430.

Morrow, D. y Jones, R. 1986. Localization and partial characterization of extracellular proteins centrifuged from pea internodes. *Physiol. Plantarum* 67: 397-407.

Müsel, G., Schindler, T., Bergfeld, R., Ruel, K., Jacquer, G., Lapierre, C. y Schopfer, P. 1997. Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes. *Planta* 201 : 146-159.

Nakano, Y. y Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22 : 867-880.

Niemeyer, H.M., Corcuera, L.J. y Pérez, F.J. 1982. Reaction of a cyclic hydroxamic acid from gramineae with thiols. *Phytochemistry* 21 : 2287-2289.

Niemeyer, H.M. 1988. Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), a defence chemicals in the gramineae. *Phytochemistry* 27: 3349-3358.

Ockerse, R. y Mumford, L. 1973. The regulation of peroxidase activity by gibberellin and auxin in pea stem segments. *Can. J. Bot.* 51 : 2237-2242.

Ogawa, K., Kanematsu, S. y Asada, K. 1996. Intra- and extra-cellular localization of "cytosolic" Cu/Zn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. *Plant Cell Physiol.* 37 : 790-799.

Ortiz de Montellano, P.R. 1992. Catalytic sites of hemoprotein peroxidases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32 : 89-107.

Osswald, W., Schütz, W., Elstner, E.F. 1989. Indole-3-acetic acid and *p*-hydroxiacetophenone driven ethylene formation from 1-aminocyclopropanecarboxylic acid catalyzed by horseradish peroxidase. *J. Plant Physiol.* 134 : 510-513.

Pacifici, R.E. y Davies, K.J.A. 1990. Protein degradation as an index of oxidative stress. *Meth. Enzymol.* 186 : 485-502.

Palamanda, J. y Kehrer, J.P. 1992. Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 293 : 103-109.

Pedreño, M.A., Sabatèr, F., Muñoz, R. y García-Carmona, F. 1987. Effect of different phenols on the NADH-oxidation catalysed by a peroxidase from lupin. *Phytochemistry* 26 : 3133-3136.

Pedreño, M.A., Muñoz, R., Sabater, F. y García-Carmona, F. 1988. Oxidase and peroxidase activities of a cell wall-bound peroxidase acting on indoleacetic acid. Control by *p*-coumaric acid. *Biochem. Int.* 16 : 465-475.

Pedreño, M.A., Ferrer, M.A., Gaspar, Th. , Muñoz, R. y Ros Barceló, A. 1995. The polyfunctionality of cell wall peroxidases avoids the necessity of an independent H₂O₂-

generating system for phenolic coupling in the cell wall. *Plant Peroxidases News Letters*, N°5 : 1-6.

Penel, C. 1991. Ca^{+2} -mediated binding of peroxidases to cell structures. En J. Lobarzewski, H. Greppin, C. Penel y Th. Gaspar (eds.), "*Biochemical, Molecular, and Physiological aspects of plant Peroxidases*". pp : 225-236. University of Geneva, Switzerland.

Penel, C. y Greppin, H. 1994. Binding of plant isoperoxidases to pectin in the presence of calcium. *FEBS lett.* 343 : 51-55.

Pérez, F.J. y González, L.F. 1989. Allelopathic effects of hydroxamic acids from wheat on oat *Avena sativa* L., and on wild oat *Avena fatua* L. En H.M. Niemeyer (ed.), "*Reports on the workshop on Chemical Interactions between organisms*". pp. 107-11. Santiago, Chile.

Pfanz, H. y Oppman, B. 1991. The possible role of apoplastic peroxidases in detoxifying the air pollutant sulfur dioxide. En J. Lobarzewski, H. Greppin, C. Penel y Th. Gaspar (eds.), "*Biochemical, Molecular, and Physiological aspects of plant Peroxidases*": pp : 401-417. University of Geneva, Switzerland.

Pratt, K., Kumar, P. y Chilton, W.S. 1995. Cyclic hydroxamic acids in dicotyledonous plants. *Biochem. Syst. Ecol.* 23 : 781-785.

Price, A.H., Taylor, A., Ripley, S.J., Griffiths, A., Trewavas, A.J. y Knight, M.R. 1994. Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* 6 : 1301-1310.

Queirolo, C.B., Andreo, C.S., Niemeyer, H.M. y Corcuera, L.J. 1983. Inhibition of ATPase from chloroplasts by hydroxamic acid from gramineae. *Phytochemistry.* 22 : 2455-2458.

- Ravi, K., Hu, C., Redi, P.S. y van Huystee, R.B. 1986. Effect of tunicamycin on peroxidase release by cultured peanut suspension cells. *J. Exp. Botany* 37: 1708-1715.
- Rayle, D. L. y Cleland, R.E. 1992 The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* 99: 1271-1274.
- Reddy, K., Subhani, S., Khan, P. y Kumar, K. 1985. Effect of light and benzyladenine on dark-treated growing rice (*Oryza sativa*) leaves. II.Changes in peroxidase activity. *Plant Cell Physiol.* 26 : 987-994.
- Reznick, A. y Lester, P. 1994. Oxidative damage to proteins : spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth. Enzymol.* 233 : 357-363.
- Rodgers, M., Zimmerlin, A., Reichart, D. y Bolwell, G.P. 1993. Microsomally associated heme proteins from french bean : characterization of the cytochrome P450 cinnamate-4-hydrolase and two peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 304 : 74-80.
- Rodríguez, M.J., van Huystee, R.B. 1994. Plant Peroxidases: Interaction between their prosthetic groups. *Phytochemistry* 37 : 1217-1225.
- Rojas, M.C., Pérez, F.J y González, L.F. 1997. Stimulatory effect of DIMBOA on NADH oxidation catalysed by horseradish peroxidase. *Phytochemistry.* 46 : 11-15.
- Ros Barceló, A., Muñoz, R. y Sabater, F. 1987. Lupin isoperoxidases. I. Isolation and characterization of cell wall-bound isoperoxidase activity. *Pysiol. Plant.* 71 : 448-454.
- Ros Barceló, A. Pedreño., M.A., Muñoz, R. y Sabater, F. 1988. Lupin peroxidases. II.Binding of acidic isoperoxidases to cell walls. *Physiol. Plantarum.* 73 : 238-244.

- Ros Barceló, A., Pedreño, M.A., Muñoz, R. y Sabater, F. 1989. Physiological significance of the binding of acidic isoperoxidases to cell walls of lupin. *Physiol. Plantarum* 75 : 267-274.
- Sahi, S.V., Anderson, C.E. y Chilton, W.S. 1995. The corn wound metabolite DIMBOA causes cell death in tobacco and corn. *Plant Science* 108 : 31-40.
- Sánchez, O., Pan, A., Nicolás, G. y Labrador, E. 1989. Relation of cell wall peroxidase activity with growth in epicotyls of *Cicer arietinum*. Effects of calmodulin inhibitors. *Physiol. Plant.* 75 : 275-279.
- Sánchez-Bravo, J., Ortuño, A., Acosta, M. y Sabater, F. 1988. In vivo metabolism of labelled indole-3acetic acid during polar transport in etiolated hypocotyls of *Lupinus albus* : Relationship with growth. *Plant Growth Regul.* 7 : 271-288.
- Shannon, L.M., Kay, E. y Lew, J.Y. 1966. Peroxidases isozymes from horseradish roots. *J. Biol. Chem.* 241 : 2166-2172.
- Shinkle, J.R., Swoap, S.J., Simon, P., Jones, R.L. 1992. Cell wall free space of Cucumis hypocotyls contains NAD and a blue light-regulated peroxidase activity. *Plant Physiol.* 98 : 1336-1341.
- Shonbaum, G.R. 1973. New complexes of peroxidases with hydroxamic acids, hydrazides and amides. *J. Biol. Chem.* 248: 502-511.
- Showalter, A. 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5 : 9-23

- Smith, A.M., Morrison, W.L. y Milham, P.J. 1982. Oxidation of indole-3-acetic acid by peroxidase : involvement of reduced peroxidase and compound III with superoxide as a product. *Biochemistry*. 21 : 4414-4419.
- Stadtman, E.R. 1993. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Ann. Rev. Biochem.* 62 : 797-821.
- Stich, K. y Eberman, R. 1984. Investigation of hydrogen peroxide formation in plants. *Phytochemistry* 23 : 2719-2722.
- Taíz, L. 1984. Plant Cell Expansion : Regulation of cell wall mechanical properties . *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35 : 585-567.
- Taíz, L. y Zeigler, E. 1991. Auxins : growth and tropisms. En E. Brady, L. Donohoe (eds.), "*Plant Physiology*". pp 398-425. Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California.
- Takahama, U. y Egashira, T. 1991. Peroxidases in vacuoles of *Vicia faba* leaves. *Phytochemistry* 30 : 73-77.
- Talbott, L.D. y Ray, P.W. 1992. Changes in molecular size of previously deposited and newly synthesized pea cell wall matrix polysaccharides. *Plant Physiol.* 98 : 369-379.
- Tamura, M. y Yamazaki, I. 1972. Reactions of the oxyform of horseradish peroxidase. *J. Biochem.* 71 : 311-319.
- Tan, K-S., Hoson, T., Masuda, Y. y Kamisaka, S. 1991. Correlation between cell wall extensibility and the content of diferulic and ferulic acids in cell walls of *Oryza sativa* coleoptiles grown under water and in air. *Physiol. Plant.* 83 : 397-403.

Tan, K-S., Hoson, T., Masuda, Y. y Kamisaka, S. 1992. Involvement of cell wall-bound diferulic acid in light-induced decrease in growth rate and cell wall extensibility of *Oryza* coleoptiles. *Plant and Cell Physiol.* 33: 103-108.

Tietze, F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione : Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27 : 502-522.

Tolbert, N. 1981. Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxyxomes. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 133-157.

Valero, P., Nicolás, G. y Labrador, E. 1991. Variations of cell wall peroxidases in epicotyls of *Cicer arietinum* during growth. *Plant Science* 74 : 171-178.

van Huystee, R.B. 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38 : 205-219.

Varner, J.E. y Lin, L-S. 1989. Plant cell wall architecture. *Cell* 56: 231-239.

Vilter, H. 1984. Peroxidases from *Phaeophyceae* : a vanadium (V)-dependent peroxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* 23 : 1387-1390.

Wakabayashi, K., Hoson, T. y Kamisaka, S. 1997. Osmotic stress supresses cell wall stiffening and the increase in cell wall-bound ferulic and diferulic acids in wheat coleoptiles. *Plant Physiol.* 113 : 967-973.

Wan, L. y van Huystee, R.B. 1993. A study on glycosilation of cationic peanut peroxidase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 194 : 1398-1405.

Welinder, K.G. 1985. Plant peroxidases. Their primary, secondary and tertiary structures, and relation to cytochrome c peroxidase. *Eur. J. Biochem.* 151 : 497-450.

Welinder, K.G. 1991. The plant peroxidase superfamily. En J. Lobarzewski, H. Greppin, C. Penel y Th. Gaspar (eds.), "*Biochemical, Molecular, and Physiological aspects of plant Peroxidases*". pp : 3-13. University of Geneva, Switzerland.

Welinder, K.G., Mauro, J.M. y Norskov-Lauritsen, L. 1992. Structure of plant and fungal peroxidases. *Biochem. Soc. Transac.* 20 : 337-340.

Whetten, R. y Sederoff, R. 1995. Lignin Biosynthesis. *Plant Cell* 7 : 1001-1013.

Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W. 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *EMBO J.* 16 : 4806-4816.

Xu, Y. y van Huystee, R.B. 1993. Association of calcium and calmodulin to peroxidase secretion and activity. *J. Plant Physiol.* 141 : 141-146.

Yamazaki, I., Mason, S. y Piette, L. 1960. Identification by paramagnetic resonance spectroscopy of free radicals generated from substrates by peroxidase. *J. Biol. Chem.* 235 : 2444-2449.

Yokota, K. y Yamazaki, I. 1965. Reaction of Peroxidase with reduced nicotinamide-adenine dinucleotide and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate. *Biochim. Biophys. Acta* 105: 301-312.

Yokota, K. Yamazaki, I. 1977. Analysis and computer simulation of aerobic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide catalyzed by horseradish peroxidase.

Biochemistry 16 : 1913-1920.

Yu, Y-B. y Yang, S.F. 1979 . Auxin induced ethylene production and its inhibition by aminoethoxyglycine and cobalt ion. *Plant Physiol.* 64 : 1974-1077.

Zheng, X. y van Huystee, R.B. 1991. Oxidation of tyrosine by peroxidase isozymes derived from peanut suspension culture medium and by isolated cell walls. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 22 : 65-70.

Zheng, X. y van Huystee, R.B. 1992a. Peroxidase-regulated elongation of segments from peanut hypocotyls. *Plant Science* 81: 47-56.

Zheng, X. y van Huystee, R.B. 1992b. Anionic peroxidase catalysed ascorbic acid and IAA oxidation in the presence of hydrogen peroxide : a defence system against peroxidative stress in peanut plant. *Phytochemistry* 31 : 1895-1898.

Zopes, H., Klapheck, S. y Bergmann, L. 1993. The function of homogluthathione and hydroxymethylglutathione for the scavening of hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiol.* 34 : 515-521.