

LOCALIZACION TISULAR Y CELULAR DEL DIMBOA-GLUCOSIDO
Y DE β -GLUCOSIDASAS EN PLANTAS DE MAIZ (*Zea mays* L.)

Tesis presentada a la Universidad de Chile en
cumplimiento parcial de los requisitos para
optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

por

CRISTINA E. FRANCISCA MASSARDO VEGA

Enero de 1990

Directores de Tesis : Doctor Luis Corcuera F.
Doctora Luz María Pérez R.



Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

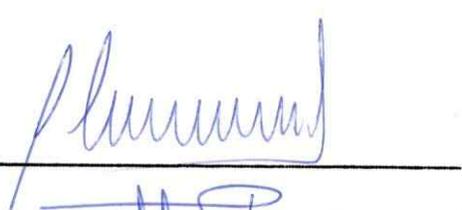
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la
Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister
presentada por la Candidata

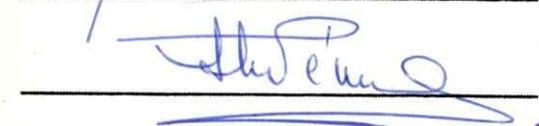
CRISTINA E. FRANCISCA MASSARDO VEGA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis
como requisito para el grado de Magister en Ciencias
Biológicas con mención en Botánica, en el exámen de Defensa de
Tesis rendido el día 11 de enero de 1990.

Director de Tesis
Doctor Luis Corcuera



Directora de Tesis
Doctora Luz María Pérez

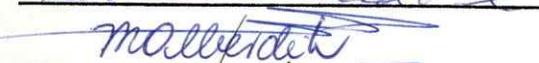


Comisión Informante de Tesis

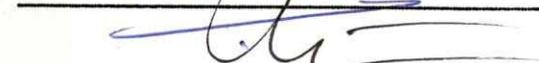
Doctora Liliana Cardemil



Doctora Miren Alberdi



Doctor Mariano Castillo



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al doctor Luis Corcuera el apoyo brindado durante mi permanencia en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, a la doctora Luz María Pérez por su participación en esta tesis y en general, a los profesores del área de la botánica por la formación científica adquirida en el curso de mi postgrado.

Quiero agradecer también la desinteresada y valiosa colaboración proporcionada por el Mag. Gustavo Zúñiga de la Universidad de Santiago.

Hago llegar mi reconocimiento al Departamento de Química de la Facultad de Ciencia de la Universidad de Santiago por el respaldo prestado desde mayo de 1989 para el término de este trabajo, como también al Departamento Técnico de Investigación de la Universidad de Chile por la beca otorgada durante 1988 a través del proyecto de investigación B2950-8813.

Por último, doy las gracias a las personas que trabajan en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad de Chile, en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad de Santiago y a toda la gente que me ha favorecido con su amistad y colaboración durante este período.



INDICE

INDICE	iii
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCION	1
1.1. Metabolismo secundario	2
1.1.1. Acidos hidroxámicos cíclicos	4
2. MATERIALES Y METODO	11
2.1. Material vegetal	11
2.1.1. Aislamiento de tejidos	11
2.1.2. Fracciones subcelulares	12
2.1.2.1. Vacuolas	12
2.1.2.2. Mitocondrias	12
2.1.2.3. Cloroplastos	13
2.2. Purificación del DIMBOA-glucósido	13
2.2.1. Caracterización	14
2.2.1.1. Análisis espectroscópicos	14
2.2.1.2. Reacciones colorimétricas	14
2.2.1.3. HPLC	14
2.3. Determinación de la acción de los ácidos hidroxámicos sobre mitocondrias y cloroplastos	15
2.4. Cuantificación del DIMBOA-glucósido y DIMBOA en el material vegetal	16



2.5.	Determinación de actividades enzimáticas	16
2.5.1.	Determinación de actividad β -glucosidásica	17
2.5.1.1.	DIMBOA-glucósido	17
2.5.1.2.	Paranitrofenil-glucósido (PNP-glucósido)	17
2.5.1.3.	Salicina	18
2.5.2.	Determinación de actividad de β -glucosidasas en fracciones obtenidas por centrifugación diferencial	19
2.5.3.	Caracterización de β -glucosidasas	21
2.5.4.	Determinación de actividad glucosa-6P-deshidrogenasa	22
2.6.	Determinación de proteínas	22
2.7.	Determinación de clorofila	22
3.	RESULTADOS	23
3.1.	Purificación y caracterización del DIMBOA-glucósido	23
3.2.	Determinación del efecto del DIMBOA y DIMBOA-glucósido sobre el transporte de electrones en mitocondrias y en cloroplastos	25
3.2.1.	Efecto sobre el transporte de electrones en mitocondrias	27
3.2.2.	Efecto sobre el transporte de electrones en cloroplastos	27
3.3.	Aislamiento de tejidos y fracciones	29
3.4.	Localización del DIMBOA-glucósido	31
3.5.	Localización enzimática	40
3.5.1.	Determinación de actividad β -glucosidásica	40
3.5.1.1.	Actividad β -glucosidásica usando DIMBOA-glucósido como sustrato	40

3.5.1.2.	Actividad β -glucosidásica usando PNP-glucósido como sustrato	41
3.5.1.3.	Actividad β -glucosidásica usando salicina como sustrato	41
3.5.2.	Localización enzimática en fracciones obtenidas por centrifugación diferencial	42
3.5.3.	Localización enzimática a niveles tisular y celular	42
3.5.4.	Caracterización de β -glucosidasas	45
4.	DISCUSION	54
4.1.	Efectos del DIMBOA-glucósido y del DIMBOA sobre la célula	54
4.2	Distribución del DIMBOA - glucósido y de β -glucosidasas	60
4.2.1.	Localización del DIMBOA-glucósido	61
4.2.2.	Localización de β -glucosidasas	63
4.2.2.1.	Caracterización	64
4.2.2.2.	Distribución	68
4.3.	Compartimentación	78
4.4.	Consideraciones generales	81
5.	CONCLUSIONES	84
6.	BIBLIOGRAFIA	85

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Rendimiento de proteína y de clorofila en hojas completas y en protoplastos de maíz	33
Tabla 2.	Localización de DIMBOA en tejidos foliares de maíz	37
Tabla 3.	Localización de DIMBOA en fracciones celulares de hojas de maíz	38
Tabla 4.	Actividad de β -glucosidasa en fracciones subcelulares de maíz obtenidas por centrifugación diferencial	43
Tabla 5.	Localización de β -glucosidasas en tejidos foliares de maíz	44
Tabla 6.	Localización de β -glucosidasas en fracciones subcelulares de hojas de maíz	46
Tabla 7.	Actividad β -glucosidasa en el medio de digestión enzimática de hojas de maíz	47
Tabla 8.	Purificación de β -glucosidasas	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura general de los ácidos hidroxámicos cíclicos 1,4-benzoxazin-3-ona, encontrados en gramíneas	5
Figura 2.	Estructuras del DIMBOA-glucósido y del DIMBOA	7
Figura 3.	Diagrama de flujo utilizado en el fraccionamiento de homogeneizado de maíz por centrifugación diferencial	20
Figura 4.	Análisis espectrales del DIMBOA-glucósido aislado de maíz	24
Figura 5.	Tiempo de retención para el DIMBOA-glucósido y para DIMBOA puros y en mezcla en HPLC	26
Figura 6.	Consumo de oxígeno en nmoles/min mg de proteína de mitocondrias aisladas de maíz	28
Figura 7.	Fotorreducción del DCFIP en cloroplastos aislados de maíz	30
Figura 8.	Preparación de protoplastos intactos por digestión enzimática de la pared celular de hojas de maíz	32
Figura 9.	Preparación de vacuolas intactas a partir de protoplastos aislados por digestión enzimática de la pared celular de hojas de maíz	34
Figura 10.	Tiempo de retención para DIMBOA en HPLC en tejidos aislados de hojas de maíz	36
Figura 11.	Tiempo de retención para DIMBOA en HPLC en preparaciones puras de protoplastos y de vacuolas aislados de hojas de maíz	39
Figura 12.	Gráficas de Lineweaver-Burk usando DIMBOA-glucósido y PNP-glucósido	49
Figura 13.	Curvas de actividad de β -glucosidasas en función de pH y temperatura	50
Figura 14.	Purificación de β -glucosidasas de maíz en filtración en Sephadex G-100 y en intercambio iónico en DEAE-Sephadex A-25	53

ABREVIATURAS

ADP -	adenosín-5'-difosfato
BSA -	seroalbúmina de bovino
CAPS -	ácido 3-ciclohexilamino-1-propano sulfónico
DCPIP -	2,6-diclorofenol-indofenol
DEAE -	dietil aminoetil
DIMBOA -	2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona
DIMBOA-glucósido -	2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona- β -D-glucopiranosido
DTT -	ditiotreitól
EDTA -	ácido etilendiamino tetracético
ϵ -	coeficiente de extinción molar
HPLC -	cromatografía líquida de alta eficacia
ID ₅₀ -	concentración necesaria para producir un 50 % de inhibición
K _m -	constante de Michaelis
MES -	ácido 2-N-morfolino etanosulfónico
MOPS -	ácido 3-N-morfolino propano sulfónico
NADH -	β -nicotinamida adenina dinucleótido reducido
PNP-glucósido -	paranitrofenil-glucósido
PF -	peso fresco
PVP -	polivinilpirrolidona
TRIS -	tris-hidroxi-metil amino etano

RESUMEN

La compartimentación de metabolitos secundarios en células vegetales, definida como el gradiente de concentración de un metabolito entre compartimientos separados por membranas, es un área poco estudiada en la fisiología vegetal. Un grupo importante de productos naturales está constituido por los ácidos hidroxámicos cíclicos (1,4-benzoxazin-3-ona) encontrados en gramíneas. De estos compuestos, el más abundante aislado de maíz y trigo es el DIMBOA (2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoxazin-3[4H]-ona) al cual se le atribuye efecto pesticida debido a la toxicidad que presenta contra pestes y sobre reacciones de transferencia de energía en vegetales y animales mediante un mecanismo aparentemente relacionado con la síntesis de ATP. Se ha informado que este compuesto se encuentra como glucósido en la planta intacta (2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoxazin-3[4H]-ona- β -D-glucopiranosido). El daño tisular provocado por pestes o por ruptura mecánica, induciría la hidrólisis del DIMBOA-glucósido generando DIMBOA y glucosa supuestamente por acción de β -glucosidasas. Este hecho permite postular que el DIMBOA-glucósido estaría físicamente aislado de las β -glucosidasas que lo hidrolizan, ya sea en distintos tejidos o bien en distintos compartimientos dentro de la misma célula. La compartimentación propuesta explicaría la existencia de este

glucósido *in vivo* en una forma que no afecta el metabolismo de la planta productora. El objetivo de esta tesis fue localizar tisular y celularmente al DIMBOA-glucósido y a las β -glucosidasas que lo hidrolizan utilizando un cultivar de maíz con alto contenido de este compuesto. Además, se estudió el efecto del glucósido y de la aglicona sobre mitocondrias y cloroplastos aislados de la misma planta.

Luego de aislar e identificar el DIMBOA-glucósido, se procedió a estudiar su efecto y el de DIMBOA sobre el transporte de electrones. Para ello, se midió el consumo de oxígeno de una preparación de mitocondrias en condiciones basales (NADH 1 mM o malato 50 mM), acopladas (ADP 2 mM) y desacopladas (2,4-dinitrofenol 50 μ M). Se midió también la fotorreducción de un aceptor artificial de electrones (2,6-diclorofenol indofenol 200 μ M) en preparaciones de cloroplastos. Tanto en mitocondrias como en cloroplastos se encontró que el DIMBOA inhibió la cadena transportadora de electrones a concentraciones muy inferiores a las potencialmente alcanzables por el cultivar utilizado. DIMBOA-glucósido en cambio, no provocó ningún efecto sobre este proceso.

Para el estudio de la compartimentación del DIMBOA-glucósido y de las β -glucosidasas, se aislaron tejidos (parénquima mesofílico y haces vasculares) y fracciones celulares (protoplastos, vacuolas, mitocondrias y

cloroplastos) en cada una de las cuales se estudió presencia de DIMBOA por HPLC y de β -glucosidasas por ensayos espectrofotométricos. Los resultados mostraron que tanto el glucósido como las β -glucosidasas se encuentran en todos los tejidos analizados. Sin embargo, se demostró que si bien ambos componentes coexisten dentro de una misma célula, DIMBOA-glucósido se localiza en el citoplasma mientras que las DIMBOA- β -glucosidasas se encuentran dentro de la vacuola practicamente en su totalidad.

Los resultados obtenidos permiten concluir que existe compartimentación celular en esta etapa del metabolismo de los ácidos hidroxámicos en maíz. Esta compartimentación regula la distribución de un compuesto potencialmente tóxico para su propio metabolismo mediante la separación del precursor glucosídico de las β -glucosidasas que lo activan.

ABSTRACT

The compartmentation of secondary metabolites, defined as concentration gradient of a metabolite between compartments separated by membranes, is an area scarcely studied in plant physiology. An important group of natural products is constituted by cyclic hydroxamic acids (1,4-benzoxazine-3-one) found in gramineae. From these compounds, the main one found in maize and wheat is DIMBOA (2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazine-3[4H]-one) which has a possible role as pesticide due to its toxicity on pests and some animal and vegetal reactions probably through ATP synthesis. It has been reported that DIMBOA exists as glucoside (2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazine-3[4H]-one- β -D-glucopyranoside) in intact plants. Tissue damage liberates DIMBOA and glucose from DIMBOA-glucoside through a hydrolytic process probably mediated by β -glucosidases. This observation may suggest that DIMBOA-glucoside should be physically isolated from hydrolytic β -glucosidases in a different compartment at tissular or cellular level. This compartmentation would explain the existence of glucoside *in vivo* without a harmful effect on plant metabolism. The aim of this work was to localize the DIMBOA-glucoside and degrading β -glucosidases at tissular and cellular levels in maize plants. In addition, the effect of glucoside and its aglycone on mitochondria and chloroplasts

isolated from the same plant was studied.

DIMBOA-glucoside was purified from maize and chemically characterized. Its effects on electron-transfer chain were studied. Oxygen consumption by mitochondrial suspension was determined in basal (NADH 1 mM or malate 50 mM), coupled (ADP 2 mM) or uncoupled (2,4-dinitrophenol 50 μ M) conditions. Photoreduction induced by a chloroplast suspension was studied by using an artificial electron acceptor (2,6-dichlorophenol indophenol 200 μ M). In both, mitochondria and chloroplasts, DIMBOA had an inhibitory effect on the electron-transfer chain at a relatively low concentration compared with that found in maize leaves. On the other hand, DIMBOA-glucoside had no effect on this process.

The compartmentation study of DIMBOA-glucoside and β -glucosidases was performed on tissues (mesophyll parenchyma and vascular cylinder) and cellular fractions (protoplasts, vacuoles, mitochondria and chloroplasts). In each fraction the content of DIMBOA was analyzed by HPLC and for β -glucosidases by spectrophotometric assays. The results showed that both components were present in all tissues studied. Nevertheless, inside the cell DIMBOA-glucoside was found in the cytoplasm and DIMBOA- β -glucosidases into vacuoles.

The distribution observed for these components, supports compartmentation in this step of hydroxamic acids metabolism in maize. This cellular compartmentation would avoid the

generation of DIMBOA and its potential toxic effect on the cell, by isolation of its glucosidic precursor from degrading DIMBOA- β -glucosidases.

1. INTRODUCCION

Los seres vivos conforman sistemas organizados y su funcionamiento comprende una serie de reacciones ordenadas que obedecen dicha organización. El marco de ordenamiento está dado por límites temporales y espaciales dentro de los cuales ocurren las reacciones bioquímicas (Hess, 1980). Estos límites son determinados a nivel celular por diferentes tipos de membranas internas que generan compartimientos celulares que mantienen diferencias de concentración, fenómeno conocido como compartimentación (Sitte, 1980). De esta manera, las transformaciones globales que ocurren dentro de una célula están localizadas en compartimientos y las interacciones entre ellos ocurren mediante transporte controlado a través de membranas (Hess, 1980).

Para que una célula mantenga sus funciones bioquímicas normales, debe poseer su arquitectura intacta (Kempner, 1980; Echeverría y Valich, 1988), ya que la alteración de su compartimentación puede significar la interrupción de su fisiología normal o la muerte celular (Echeverría y Valich, 1988). El estudio de un sistema biológico es complejo y generalmente implica ruptura de la organización inicial y por lo tanto, pueden suponerse procesos no necesariamente reales. Es entonces preciso utilizar metodologías no destructivas que mantengan la estabilidad de los compartimientos y que permitan deducir el funcionamiento de una célula intacta.

La célula vegetal, lo mismo que la animal, posee numerosos

compartimientos que regulan el metabolismo (Oaks y Bidwell, 1970; Dennis y Miernyk, 1982; Raven et al., 1986). Los estudios de compartimentación han permitido dilucidar el funcionamiento de una serie de procesos vitales para la planta como la fotosíntesis, respiración, metabolismo de la glucosa, asimilación de nitrógeno y otros (Oaks y Bidwell, 1970; Dennis y Miernyk, 1982; Salisbury y Ross, 1985). En cada uno de estos análisis se han identificado los distintos compartimientos estructurales y metabólicos que participan en el proceso general.

Una de las áreas donde el estudio de la compartimentación es escaso se refiere al metabolismo secundario.

1.1. Metabolismo secundario

Los compuestos secundarios se definen como productos naturales, generalmente de origen vegetal, que no participan directamente en actividades primarias (Conn, 1981), es decir, no cumplen un papel conocido en la mantención de procesos vitales en el organismo que los sintetiza (Bell, 1981). Esta definición explicaría la existencia de variedades de una misma especie con y sin acumulación de un compuesto en particular. De acuerdo a Bell (1981), debido a que los metabolitos secundarios se encuentran fundamentalmente en vegetales, se supone que representarían una estrategia para aumentar la sobrevivencia como una manera de superar las desventajas de la inmovilidad propia de las plantas superiores.

Los metabolitos secundarios se han clasificado de diversas formas. Entre ellas están la clasificación estructural

(Hendrickson, 1965; Mann, 1980; Robinson, 1983), la taxonómica (Seigler, 1981) y la ecológica (Mann, 1980; Bell, 1981; Harbone, 1982). La clasificación ecológica es interesante desde un punto de vista fisiológico, puesto que relaciona al metabolismo secundario con los distintos papeles que podría cumplir en el ecosistema. De acuerdo a esto último, los metabolitos vegetales se han dividido según su participación en interacciones planta-vertebrado, planta-insecto, planta-planta y planta-microorganismo (Mann, 1980; Bell, 1981).

Está claro que muchos productos secundarios de origen vegetal sirven como agentes de defensa provocando repelencia o muerte del organismo con el cual interactúan (Mann, 1980; Bell, 1981; Harbone, 1982; Rosenthal, 1986). Además, gran parte de estos metabolitos puede ser dañina para la planta que los produce, de tal manera que existen células o compartimientos subcelulares especializados que los contienen (Mann, 1980), o bien, se encuentran como moléculas de baja o ninguna reactividad que se vuelven activas por acción enzimática (Mann, 1980; Hösel, 1981).

El conocimiento de la localización de metabolitos y de sus enzimas dentro de los compartimientos celulares es crucial para la comprensión de los eventos bioquímicos de la célula (Echeverría y Valich, 1988). Se sabe que la vacuola constituye el compartimiento principal para la acumulación de compuestos secundarios en contra de un gradiente de potencial químico en células de tejidos jóvenes (Nishimura y Beevers, 1976; Matile, 1978; Saunder, 1979; Marty et al., 1980; Deus Neumann y Zenk,

1986; Boller y Wiemken, 1986); sin embargo, algunas referencias mencionan acumulación en compartimientos como las paredes celulares (Ibrahim et al., 1987). En general, se acepta que los compuestos secundarios hidrofílicos pueden localizarse en forma soluble en compartimientos tales como la pared celular, mientras que los lipofílicos se ligan a membranas o permanecen libres en el citoplasma o en la vacuola (ref. Ibrahim et al., 1987).

1.1.1. Ácidos hidroxámicos cíclicos

Uno de los grupos de metabolitos secundarios de importancia en agricultura está constituido por los ácidos hidroxámicos cíclicos, de estructura general 1,4-benzoxazin-3-ona (Figura 1). Estos compuestos se han aislado de la familia Graminae a partir de especies de gran valor agrícola como *Zea mays*, *Triticum aestivum* y *T. durum*, *Secale cereale* y de otros géneros que agrupan especies de menor importancia y silvestres (ref. Queirolo, 1983; Zúñiga et al., 1983). En estas plantas se encuentran una serie de ácidos hidroxámicos, siendo DIMBOA (2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoxazin-3[4H]-ona) el más importante cuantitativamente en trigo y maíz (Queirolo, 1983; Argandoña y Corcuera, 1985).

La importancia de los ácidos hidroxámicos en general y de DIMBOA en particular, radica en el probable papel pesticida que se les ha atribuido desde su identificación. Se sabe que aplicaciones de estos compuestos a medios de cultivo inhiben el desarrollo de bacterias y hongos parásitos de animales y vegetales (ref. Queirolo, 1983). Al mismo tiempo, se asocia la

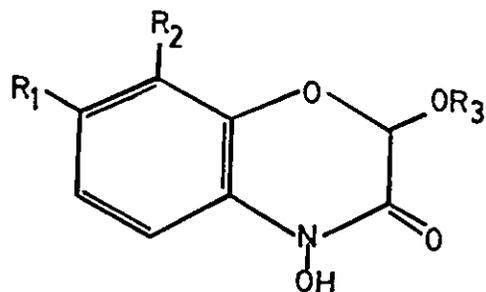


Figura 1. Estructura general de los ácidos hidroxámicos cíclicos, 1,4-benzoxazin-3-ona, encontrados en gramíneas. R₁ y R₂ pueden reemplazarse por H, y OCH₃ indistintamente y R₃ por H o por glucosa, conformando una familia de compuestos donde el grupo hidroxámico propiamente tal es el HO-N-COOH.

presencia de DIMBOA en dietas artificiales o en plantas con resistencia al ataque de insectos (Corcuera et al., 1987). También se les asigna una función alelopática (Barnes et al., 1987), mutagénica (Hashimoto et al., 1979), nutricional (Tipton y Buell, 1970; Dabed et al., 1983), destoxicante de herbicidas y pesticidas (Ioannau et al., 1980) y otras (ref. Niemeyer, 1989).

A pesar de las numerosas referencias respecto al efecto de los ácidos hidroxámicos sobre otros organismos, se desconoce la acción que ellos podrían ejercer sobre las células de las plantas que los sintetizan. Se ha informado que el mecanismo de acción de estos compuestos estaría relacionado con inhibición de enzimas que participan en reacciones de transducción de energía en otras especies vegetales (Queirolo et al., 1981) y animales (Niemeyer et al., 1986). De acuerdo a esto, podría esperarse que los ácidos hidroxámicos estuvieran compartimentados, en alguna forma estructural que impidiera su efecto nocivo o bien ambas cosas.

No obstante desconocerse los precursores que generan DIMBOA, se sabe que en el tejido intacto se encuentra como glucósido (2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoxazin-3[4H]-ona- β -D-glucopiranosido) (Virtanen y Hietala, 1960; Hofman y Hofmanova, 1969) (Figura 2). En vegetales existen numerosos compuestos secundarios que se almacenan y acumulan como glicósidos (Mann, 1980; Hösel, 1981; Bell, 1981; Harbone, 1982; Robinson, 1983; Rosenthal, 1986; Balke et al, 1987; Spencer, 1987), que se caracterizan por presentar mayor

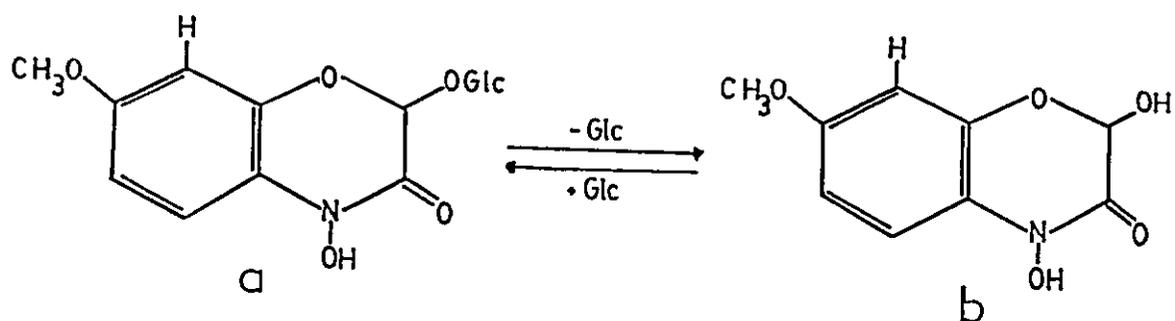


Figura 2. Estructuras del DIMBOA-glucósido (a) y de su producto de hidrólisis DIMBOA (b). La reacción es reversible según se glucosile (+ glc) o se desglucosile (- glc) el compuesto. Según la literatura, el glucósido se encuentra en el tejido intacto mientras que la aglicona se aísla luego de la homogeneización en extracto acuoso.

solubilidad y baja reactividad química respecto a la aglicona (Barbier, 1979; Hösel, 1981; Balke et al., 1987). Según Hösel (1981), estas últimas constituyen buenas razones que explicarían ecológicamente la acumulación de los glicósidos. Los glicósidos existen prácticamente en todos los grupos de metabolitos secundarios debido a que el enlace glicosídico entre átomos de oxígeno, carbono, nitrógeno o azufre de diferentes tipos de aglicona puede ocurrir con diversos azúcares (Hösel, 1981). La mayor parte de estos glicósidos secundarios tiene enlace de configuración β (Hösel, 1981) y el azúcar más comunmente encontrado es la D-glucosa aunque otros mono, di y trisacáridos también pueden esterificarse (Marty et al., 1980). De este modo, los más abundantes en la naturaleza son los β -D-glucósidos.

La literatura señala que el DIMBOA-glucósido sería hidrolizado enzimáticamente a DIMBOA (Wahlroos y Virtanen, 1959; Virtanen y Wahlroos, 1963; Hofman y Hofmanova, 1971). Según Hösel (1981), las enzimas responsables de la hidrólisis del enlace glicosídico son glicosidasas (E.C.3.2.) que actúan dentro de los tejidos intactos o bien luego de su ruptura. Debido a que la mayor parte de los glicósidos es de configuración β y ligada a glucosa, son las β -glucosidasas las enzimas más estudiadas con respecto al metabolismo secundario (Hösel, 1981; Eksittikul y Chulavatnatol, 1988).

En relación a la hidrólisis del DIMBOA-glucósido, se sabe que ésta ocurre siempre que se macere el tejido sin inactivación previa de enzimas (Hofman y Hofmanova, 1971). Por

esta razón puede suponerse que el glucósido está separado de la enzima que lo hidroliza, ya sea en distintos tejidos o bien en compartimientos diferentes dentro de la misma célula. La compartimentación de glucósidos respecto a sus β -glucosidasas ha sido poco estudiada. Los ejemplos mejor documentados se refieren a los glucósidos cianogénicos como dhurrina y linamarina que por hidrólisis liberan ácido cianhídrico (Kojima et al., 1979; Conn, 1981; Frehner y Conn, 1987; Selmar et al., 1987), de glucósidos cumarínicos que por hidrólisis generan cumarina (Oba et al., 1981) y de avenacósidos que producen desglucoavenacósidos tóxicos (Nisius, 1988). Por otra parte, se ha informado de la localización tanto de glucósidos (Marty et al., 1980; Boller y Wiemken, 1986) como de β -glucosidasas (Pierrot y Wielink, 1977; Nagahashi et al., 1985; Li et al., 1989), no obstante, en estos casos no se ha correlacionado el complejo glucósido-enzima para una especie determinada.

Los estudios de localización realizados en ácidos hidroxámicos señalan que puede aislarse DIMBOA a partir de parénquima mesofílico y haces vasculares de hojas de trigo y maíz (Corcuera et al., 1987), mientras que respecto a las DIMBOA- β -glucosidasas la literatura es prácticamente inexistente, aunque se ha intentado su localización por técnicas histoquímicas utilizando un sustrato que no corresponde al grupo hidroxámico (Mace, 1973).

Debido a que el DIMBOA-glucósido permanece intacto en la hoja y que sólo se libera DIMBOA después de la ruptura del

tejido, se puede suponer que el glucósido está localizado en un compartimiento diferente al de las β -glucosidasas que lo hidrolizan. Este mecanismo de compartimentación permitiría la protección del glucósido bajo condiciones fisiológicas normales y al mismo tiempo, evitaría el daño celular por toxicidad a la planta que lo sintetiza.

El objetivo fundamental de esta tesis fue estudiar la compartimentación tisular y celular del DIMBOA-glucósido y de sus β -glucosidasas en maíz (*Zea mays* L.). Al mismo tiempo, se analizó el efecto de ambos compuestos sobre algunas reacciones metabólicas de esta especie.

2. MATERIALES Y METODO

2.1. Material vegetal

Se trabajó con plántulas de maíz (*Zea mays* L.) cultivar Tracy T129s de alto contenido de ácidos hidroxámicos (Zúñiga et al., 1983). La siembra se realizó en invernadero o cámara de cultivo en suelo franco-arenoso utilizando semilla pre-embebida por 24 horas. Los riegos se realizaron diariamente con solución nutritiva de Phostrogen M.R. 0,47 mg/l. La germinación comenzó entre 5 y 7 días según las condiciones de temperatura imperantes y la cosecha de las plantas se realizó entre 6 y 10 días luego de la emergencia, momento en que el maíz presenta un contenido máximo de compuesto (Queirolo, 1983). Cuando las plántulas alcanzaron el estado requerido, se desecharon las raíces utilizando el brote completo o sólo tejidos y fracciones subcelulares de acuerdo a los protocolos descritos a continuación.

2.1.1. Aislamiento de tejidos

Se obtuvieron protoplastos del parénquima del mesófilo y el cilindro vascular de hojas de maíz según el protocolo diseñado por Vilches (1988). 2 a 3 g de hojas de maíz se rasparon suavemente con una hoja de afeitar por ambas caras haciendo cortes leves y se incubaron en medio de aislamiento (MES 5 mM pH 5,6-5,8, CaCl_2 5 mM, sorbitol 0,6 M y celulasa 1% p/v) durante 3 horas, a 25-28°C con agitación suave. Luego, se eliminó el medio de incubación con una pipeta Pasteur y se enjuagó el tejido 2 a 3 veces con medio de aislamiento sin

enzima. El jugo obtenido se filtró y se centrifugó a 50 x g por 5-7 minutos logrando una pella que se lavó 2 veces en el mismo medio. El número de protoplastos se cuantificó utilizando un hemocitómetro. El cilindro vascular se aisló por digestión durante 24 horas en las mismas condiciones y se consideraron sólo aquellos haces que no presentaban células del mesófilo adheridas según análisis por microscopio óptico.

2.1.2. Fracciones subcelulares

2.1.2.1. Vacuolas

Las vacuolas se obtuvieron a partir de los protoplastos por shock osmótico de acuerdo a Martinoia et al. (1985). Los protoplastos aislados según la metodología descrita se trataron con mezcla de lisis (sorbitol 0,45 M, Hepes-imidazol 30 mM pH 7,4, BSA 0,1 %, PVP 0,1 %, ficoll 18 %). Luego, las vacuolas se purificaron por flotación en un medio específico (medio de lisis con ficoll 2 %) acorde a la literatura (Martinoia et al., 1985). La integridad de las vacuolas aisladas se analizó mediante microscopía óptica y tinción con rojo neutro (Kojima et al., 1979).

2.1.2.2. Mitocondrias

Se aislaron a partir de hipocotilos etiolados picando el tejido con hoja de afeitar en medio de aislamiento (manitol 0,4 M, MOPS 0,1 M, EDTA 1 mM, BSA 2 mg/ml pH 7,6) según Aranda et al. (1983). El macerado se filtró a través de gasa, se centrifugó a 2.000 x g por 10 minutos y se sometió a 2 enjuagues con el mismo medio. La pella obtenida se disolvió y centrifugó a 12.100 x g por 10 minutos obteniéndose una pella

que se disolvió en distintas soluciones según se determinara consumo de oxígeno, presencia de ácidos hidroxámicos o actividad enzimática.

2.1.2.3. Cloroplastos

Los cloroplastos se aislaron de acuerdo a Miles (1982). A esta fracción se le determinó capacidad de reducción de aceptores artificiales de oxígeno, presencia de ácidos hidroxámicos y actividad de enzimas.

2.2. Purificación del DIMBOA-glucósido

La purificación del glucósido siguió el protocolo descrito por Queirolo (1983). 1.200 g de plántulas sin raíces se calentaron a 90°C por 15 minutos en agua destilada, se maceraron y filtraron en gasa. El filtrado se ajustó a pH 10 con NaOH y se centrifugó a 10.300 x g por 10 minutos. El sobrenadante se ajustó a pH 3,0 con HCl, se lavó 3 veces con éter llevando la fase acuosa a pH 8,0 con NaOH y concentrándola. Luego, se precipitó 2 veces con metanol y 1 vez con acetona y el sobrenadante se sembró en una columna SP-Sephadex Fe(III) equilibrada con metanol:agua en proporción 1:3. El glucósido se ligó al Fe (III) de la columna que tomó una coloración azul y se eluyó con la misma mezcla de metanol pero saturada con NaCl. Al eluido se le agregó EDTA 0,8 M y el líquido sobrenadante se filtró, se concentró y se sembró en una columna Sephadex G-10 equilibrada con agua saturada con cloroformo. El glucósido se eluyó con la misma mezcla. A las fracciones recogidas se les determinó glucosa con el reactivo de antrona midiendo absorbancia a 620 nm y se verificó la

reacción positiva al FeCl_3 registrando la absorbancia a 590 nm. Aquellas fracciones que presentaron reacción positiva a ambos análisis se reunieron, se extrajeron con butanol y se evaporaron hasta que se obtuvo un residuo de color claro.

2.2.1. Caracterización

El compuesto obtenido se caracterizó por distintos métodos.

2.2.1.1. Análisis espectroscópicos

Se realizó un espectro de absorción en la región ultravioleta, para lo cual la muestra se disolvió en agua determinando absorbancia entre 190 y 350 nm en un equipo Shimadzu 240 (Queirolo, 1983).

Para obtener el espectro de absorción infrarrojo se formó una pastilla de glucósido con KBr y se midió la transmitancia entre 4.000 y 650 cm^{-1} en un equipo Perkin-Elmer 700 (Queirolo, 1983).

2.2.1.2 Reacciones colorimétricas

La reactividad del DIMBDA-glucósido con Fe(III) se determinó mezclando la muestra con reactivo de FeCl_3 y realizando un barrido de absorbancia entre 380 y 700 nm en un espectrofotómetro Shimadzu 240 (Queirolo, 1983).

La presencia de azúcares se determinó haciendo reaccionar la muestra con reactivo de antrona y leyendo la absorbancia entre 380 y 700 nm en un equipo Shimadzu 240 (Queirolo, 1983).

2.2.1.3. HPLC

Se utilizó un equipo Merck-Hitachi 655A-12 con una columna RP-18 en fase invertida. Se inyectaron 5-10 μl de la muestra en extracto metanólico o etanólico y se eluyó con un gradiente

metanol-agua 30-70 % durante 5 minutos y luego 50-50 % hasta completar 15 minutos. La absorbancia de las fracciones eluidas se leyó a 263 nm.

2.3. Determinación de la acción de los ácidos hidroxámicos sobre mitocondrias y cloroplastos

Para este efecto se midió el consumo de oxígeno en preparaciones de mitocondrias bajo distintos tratamientos. El cambio de la concentración de oxígeno se determinó con un oxígrafo Hansatech con electrodo tipo Clarck, cámara de 2 ml con agitación continua a 25°C y registrador. Las muestras se mantuvieron en hielo previo a la lectura de actividad que se realizó utilizando un medio específico y adicionando sustratos, DIMBOA-glucósido, DIMBOA o desacoplantes para obtener información sobre transporte basal, acoplado y desacoplado.

Las mitocondrias se aislaron según lo descrito y se resuspendieron en amortiguador de actividad (manitol 0,3 M, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, KPi 10 mM, pH 6,2 a 6,5) según Aranda *et al.* (1983). De esta suspensión se agregó el equivalente a 50 µg de proteína a la cámara del oxígrafo que ya contenía 1 ml de medio de actividad y una vez estabilizada la lectura de la muestra, se adicionaron el sustrato (NADH o malato y ADP), o desacoplante (2,4-dinitrofenol) y se determinaron los efectos de distintas concentraciones de DIMBOA-glucósido o de DIMBOA. Los resultados se expresaron como tasa de consumo en nmoles de oxígeno por ml de mezcla de reacción por minuto por mg de proteína de la muestra.

El efecto de los ácidos hidroxámicos sobre cloroplastos se determinó mediante el uso de un indicador de oxidorreducción, el 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP). Los cloroplastos aislados se suspendieron en un medio de actividad (sacarosa 0,2 M, tricina 40 mM pH 7,8, KCl 30 mM, NH₄Cl 5 mM, MgCl₂ 4 mM) según Miles (1982) y se agregó la muestra en presencia de luz y se midió la velocidad de fotorreducción del aceptor de electrones frente a distintas concentraciones de DIMBOA-glucósido y de DIMBOA, siguiendo espectrofotométricamente la reducción del DCPIP 200 µM a 600 nm.

2.4. Cuantificación del DIMBOA-glucósido y DIMBOA en el material vegetal

La concentración de ambos compuestos en distintos tejidos y fracciones se obtuvo comparando el área bajo la curva de la muestra respecto al área de un estándar de DIMBOA puro en HPLC. Las curvas de calibración utilizando estándares puros alcanzaron errores inferiores al 5 %, demostrando elevada repetibilidad del método y permitiendo que las concentraciones de la muestra obtenidas por relación de áreas fueran confiables, no requiriéndose el uso de un estándar interno. La extracción se hizo congelando el tejido en nitrógeno líquido y agregando metanol si se trataba del glucósido o bien, a temperatura ambiente y en éter si era DIMBOA. En cada inyección se agregaban los estándares correspondientes, coinyectando o en inyecciones individuales, con el fin de controlar los tiempos de retención.

2.5. Determinación de actividades enzimáticas

2.5.1. Determinación de actividad β -glucosidásica

La actividad se determinó en extracto fresco para DIMBOA-glucósido, paranitrofenil-glucósido y salicina.

2.5.1.1. DIMBOA-glucósido

La actividad β -glucosidásica para el sustrato natural se obtuvo como aparición del producto DIMBOA midiendo absorbancia a 263 nm. A 200 μ l de amortiguador de actividad (acetato de sodio 50 mM pH 5,0) se agregaban 40 mM de DIMBOA-glucósido y 15-20 μ g de proteína alcanzando un volumen final de 250 μ l. Con el fin de asegurar el uso de concentraciones saturantes se determinó la K_m aparente como se define más adelante. La incubación se hacía a 30°C hasta 8 minutos. La reacción se detenía a distintos tiempos con 1 ml de éter enfriando en hielo, se agitaba y de inmediato se extraían 500 μ l. El extracto etéreo obtenido se evaporaba a sequedad, se agregaban 800 μ l de etanol al residuo y se leía inmediatamente la absorbancia en un espectrofotómetro Shimadzu 240 a 263 nm. La lectura fue rápida debido a la inestabilidad del DIMBOA en extrato acuoso, pero de acuerdo a ensayos preliminares DIMBOA se mantuvo estable durante el tiempo de la determinación. El valor del coeficiente de extinción molar (ϵ) calculado para el DIMBOA según una curva de calibración en estas condiciones fue de 8.553. La actividad se definió como μ moles de DIMBOA liberado por minuto por mg de proteína.

2.5.1.2. Paranitrofenil-glucósido (PNP-glucósido)

La actividad β -glucosidásica para este sustrato sintético se determinó mediante la cuantificación del paranitrofenolato

liberado (Walker y Axelrod, 1978; Hösel y Todenhagen, 1980; Himmel et al., 1986). Al medio de actividad (acetato de sodio 50 mM pH 5,0) se adicionaban 12,5 mM de PNP-glucósido y 10-15 µg de proteína a 30°C. La reacción se detenía a distintos tiempos agregando 2 ml de NaOH 2 N enfriando en hielo y se leía de inmediato la absorbancia a 400 nm en un espectrofotómetro Shimadzu 240. En un ensayo previo se determinó que el color amarillo desarrollado por el paranitrofenol era estable hasta 12 minutos luego de agregar la base, tiempo inferior al ensayo realizado. El ϵ calculado según una curva de calibración fue de 18.448. La actividad se expresó como µmoles de fenolato liberado por minuto por mg de proteína.

Tanto para el DIMBOA-glucósido como para PNP-glucósido, se utilizó un método de cuantificación de la glucosa liberada por la hidrólisis con un ensayo espectrofotométrico de enzimas acopladas (Merck o Sigma). En ambos casos se mantuvieron las condiciones requeridas para las β -glucosidasas luego de algunas modificaciones de las indicaciones correspondientes.

2.5.1.3. Salicina

La actividad β -glucosidasa contra este sustrato fenólico se determinó cuantificando la glucosa liberada según Somogyi (1945). Se incubaban 20 µg de proteína con 10 mM de sustrato en amortiguador acetato de sodio 50 mM pH 5,0 a 30°C. La reacción se detenía a distintos tiempos (0 a 30 minutos) agregando 1 ml de reactivo de cobre, luego se calentaba a 100°C durante 10 minutos agregando 1 ml de reactivo

arsenomolibdico y agua hasta completar 5 ml para entonces leer absorbancia en un Spectronic 21 a 600 nm.

2.5.2. Determinación de actividad de β -glucosidasas en fracciones obtenidas por centrifugación diferencial

Se realizaron experimentos de centrifugación diferencial de acuerdo al esquema de la Figura 3, basándose sobre protocolos descritos previamente (Nagahashi y Hiraike, 1982; Nagahashi y Baker, 1984; Nagahashi et al., 1985). El tejido cosechado se homogeneizó en amortiguador de extracción en la proporción tejido:amortiguador de 1:2. Se utilizaron dos amortiguadores para extraer la muestra: a) acetato de sodio 50 mM pH 5.0 y b) sacarosa 0,25 M, EDTA 5mM, Tris-MES 25 mM pH 7,2, BSA 0,1 %, β -mercaptoetanol 5 mM y FVP-40 0,2 %. El homogeneizado se filtró por gasa y se sometió a la centrifugación descrita en la Figura 3. Las fracciones particuladas fueron sedimentadas a 1.085 x g durante 3 minutos (paredes celulares crudas) y a 12.100 x g por 10 minutos (organelos crudos) utilizando un rotor Sorvall SS-34, mientras que la sedimentación a 120.000 x g durante 40 minutos (microsomos crudos) se realizó con un rotor Beckman 50 TI. El líquido sobrenadante se utilizó como fuente de enzimas solubles. Las pellas crudas obtenidas por sedimentación a 1.085 xg y a 12.100 x g fueron examinadas al microscopio óptico comprobando la presencia de fragmentos celulares y cloroplastos, respectivamente. Todas las pellas se lavaron 3 veces con el mismo amortiguador y finalmente se resuspendieron en el mismo medio con Triton X-100 0.1 %, se incubaron durante 25 minutos en hielo y luego se obtuvo el

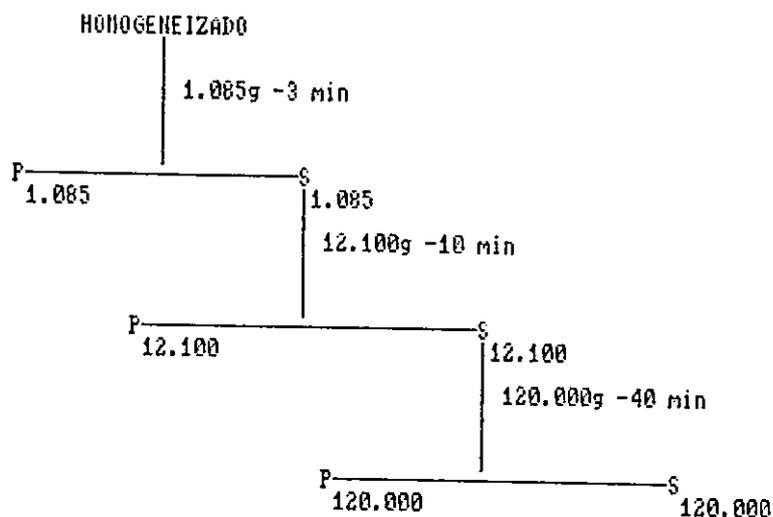


Figura 3. Diagrama de flujo utilizado en el fraccionamiento de homogeneizado de maíz por centrifugación diferencial. El tejido se homogeneizó en amortiguador de extracción (acetato de sodio 50 mM pH 5,0), se filtró y centrifugó como se describe. Cada pella (P) se lavó 3 veces con el mismo amortiguador y luego se incubó con Triton X-100 0,1 %. El líquido sobrenadante (S) en cada etapa del proceso se consideró como la fracción soluble.

sobrenadante por centrifugación a la velocidad y tiempo correspondientes. El desarrollo del protocolo completo duró alrededor de 8 horas (4°C) y todas las actividades se determinaron al finalizar la centrifugación.

2.5.3. Caracterización de β -glucosidasas

Para esta serie de experimentos se utilizó tejido extraído en amortiguador acetato de sodio 50 mM pH 5,0, homogeneizado y centrifugado a 12.100 x g durante 10 minutos. Se determinaron las K_m aparentes y se realizaron curvas de actividad en función del pH y de la temperatura, junto con diseñar una metodología preliminar de purificación. En todos los análisis se utilizaron DIMBOA-glucósido y PNP-glucósido.

Las K_m aparentes se determinaron realizando curvas de actividad entre 0 y 50 mM para DIMBOA-glucósido y entre 0 y 25 mM para PNP-glucósido. Los resultados se llevaron a una gráfica doble-recíproca de Lineweaver-Burk desde donde se obtuvieron los valores correspondientes.

Para analizar la actividad enzimática versus pH el extracto centrifugado se dializó contra un amortiguador acetato de sodio 5 mM pH 5,0. Las actividades se ensayaron en amortiguador 50 mM a pH 2,0-3,0 (glicina); 4,0-5,0 (acetato); 6,0 (MES); 7,0 (MOPS); 8,0-9,0 (Trizma Base); y 10,0 (CAPS).

El efecto de la temperatura sobre la actividad de las β -glucosidasas se midió en el extracto centrifugado ensayando entre 10 y 70°C durante 8 minutos.

Para purificar se homogeneizó el tejido en amortiguador acetato en proporción 1:1. Se filtró y centrifugó a 12.100 x g

durante 10 minutos. El líquido sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio entre 0-20, 20-40, 40-60, 60-80 y 80-100 % de saturación. El líquido sobrenadante obtenido luego de una centrifugación a 12.100 x g por 10 minutos de la fracción precipitada entre 20 y 60 % de saturación con sulfato de amonio, se filtró por una columna de Sephadex G-100 (2 x 17 cm) equilibrada con amortiguador acetato de sodio 50 mM pH 5,0 y eluida con la misma solución, colectando fracciones de 0,6 ml. La fracción activa obtenida por la filtración en gel se llevó a una columna de intercambio iónico DEAE-Sephadex A-25 (1 x 11 cm), desde donde se eluyó, luego de lavar la columna, con un gradiente de NaCl 0-500 mM en fracciones de 0,6 ml, reuniendo todas aquellas de interés para análisis posterior. Todo el protocolo descrito se desarrolló a 4°C. En cada etapa se midió la actividad enzimática usando DIMBOA- y PNF-glucósidos, estimando la concentración de proteínas a 280 nm.

2.5.4. Determinación de actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

La actividad de esta enzima se determinó de acuerdo a Li et al. (1989).

2.6. Determinación de proteínas

Se utilizó el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). La absorbancia a 595 nm se leyó en un Spectronic 21 utilizando BSA como estándar.

2.7. Determinación de clorofila

La extracción y cuantificación de clorofila se realizó según Arnon (1949).

3. RESULTADOS

3.1. Purificación y caracterización del DIMBOA-glucósido

Al utilizar el protocolo de purificación descrito (Queirolo, 1983) se obtuvo una sustancia de color pardo claro que se caracterizó mediante distintos análisis. Los espectros ultravioleta e infrarrojo y las reacciones colorimétricas con FeCl_3 y antrona para DIMBOA-glucósido han sido comunicados por Queirolo (1983), de tal manera que se compararon e interpretaron de acuerdo con los resultados obtenidos por este autor en preparaciones similares. El espectro ultravioleta (Figura 4a) mostró un máximo a los 273 nm, un hombro y un segundo máximo a los 234 nm, demostrando la presencia del anillo aromático propio del ácido y de la presencia de la glucosa que modifica el espectro si se compara con la aglicona. Con el espectro infrarrojo (Figura 4b) se definió la frecuencia de absorción del carbonilo del grupo hidroxámico en 1.660 cm^{-1} , observándose también las bandas correspondientes a los grupos OH de la glucosa entre 3.100 y 3.600 cm^{-1} . La reacción colorimétrica con FeCl_3 ocurre con todos los ácidos hidroxámicos inespecíficamente y en este caso el máximo de absorbancia fue a 590 nm (datos no mostrados). Finalmente, el análisis realizado para la detección de azúcares reductores con el reactivo de antrona tuvo un máximo a los 620 nm (datos no mostrados). Todos los análisis realizados para la muestra purificada coincidieron plenamente con lo informado por Queirolo (1983). Mediante las técnicas

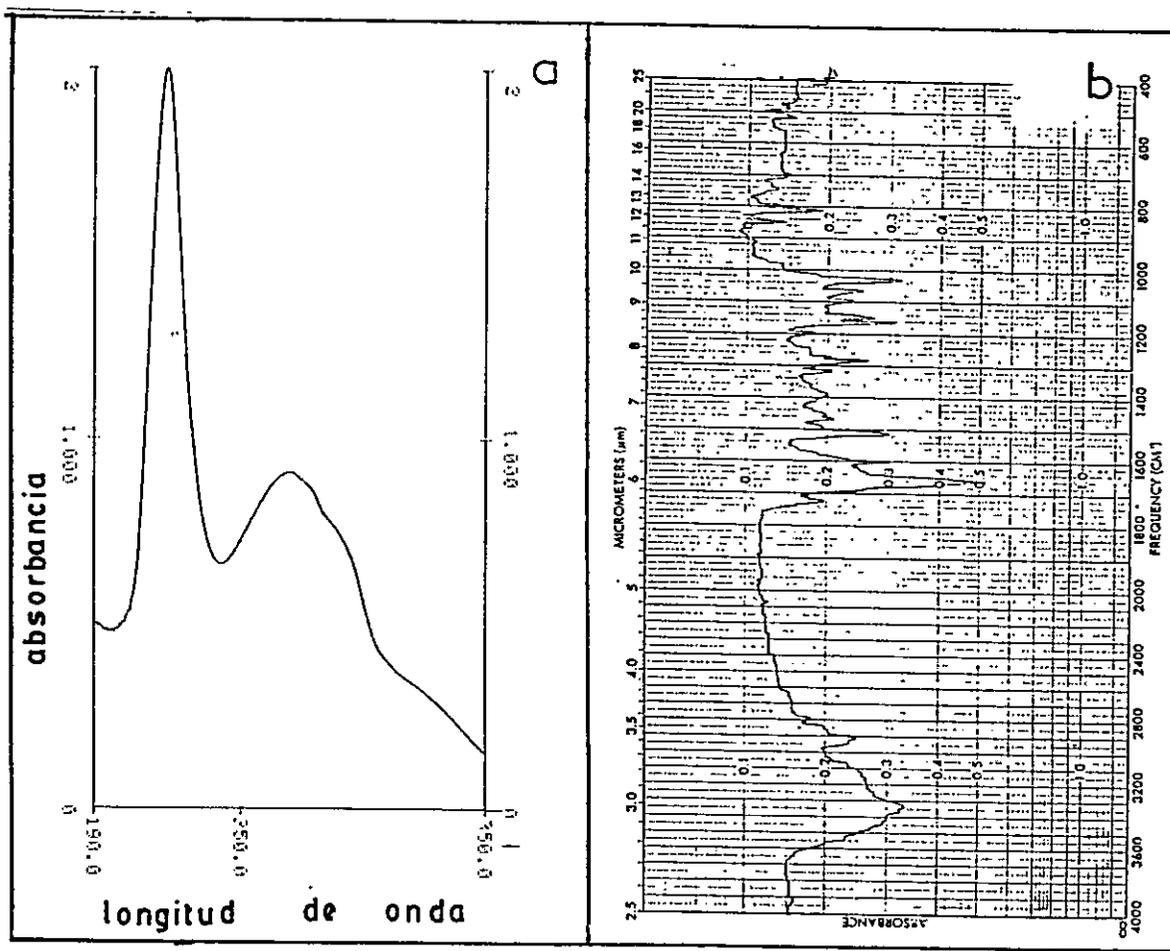


Figura 4. Análisis espectrales del DIMBOA-glucósido aislado de maíz. a) espectro ultravioleta para 10 mg de la muestra disuelta en agua destilada y b) espectro infrarrojo para 1 mg de muestra mezclada con KBr.

mencionadas se demostró que el compuesto purificado era un ácido hidroxámico (FeCl_3), presentaba una molécula de azúcar en su estructura (antrona) y que correspondía espectralmente a DIMBOA-glucósido (ultravioleta e infrarrojo).

Al mismo tiempo, utilizando la técnica de HPLC con un estándar de DIMBOA previamente aislado en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, se diseñó un protocolo de detección y cuantificación del glucósido disuelto en metanol o etanol midiendo la absorbancia a 263 nm en las condiciones ya descritas en la metodología. Los resultados se muestran en la Figura 5 y se aprecia la separación del pico del DIMBOA respecto al del glucósido. Debido a la precisión y al límite de detección (1 nmol/g PF) del método, se utilizó esta técnica para cuantificar el DIMBOA-glucósido si el tejido se extraía con metanol o etanol previa inhibición de las β -glucosidasas o bien, para cuantificar DIMBOA si se extraía con éter sin inactivación enzimática. La inyección de las muestras al cromatógrafo fue lo más rápida posible, especialmente en el caso del DIMBOA, debido a la inestabilidad que presentan estos compuestos en medio acuoso (amortiguador de extracción acetato de sodio 50 mM pH 5,0) (Woodward et al., 1978).

3.2. Determinación del efecto del DIMBOA y DIMBOA-glucósido sobre el transporte de electrones en mitocondrias y en cloroplastos

El efecto que ambos ácidos hidroxámicos pueden ejercer sobre algunas reacciones metabólicas celulares, se analizó mediante el estudio del consumo de oxígeno de suspensiones de

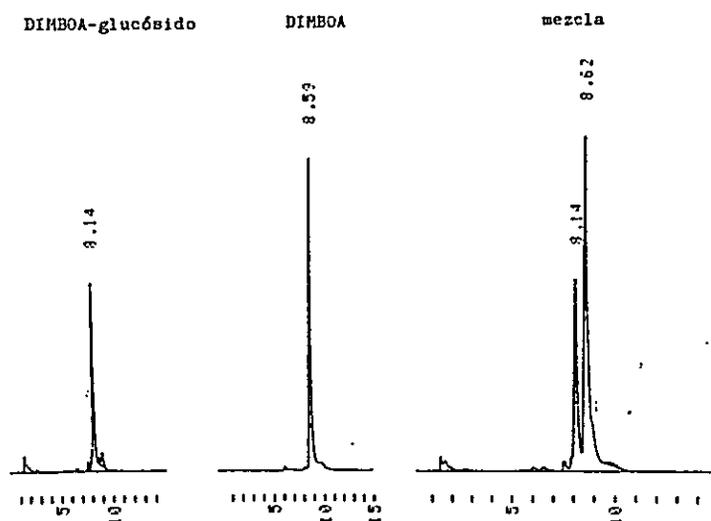


Figura 5. Tiempo de retención para DIMBOA-glucósido y para DIMBOA puros y en mezcla en HPLC. La elución se realizó en gradiente metanol:agua 30-70 % durante 5 minutos y luego 50-50 % por 10 minutos. La absorbancia del eluido se leyó a 263 nm.

mitocondrias y de reducción de un aceptor artificial en suspensiones de cloroplastos.

3.2.1. Efecto sobre el transporte de electrones en mitocondrias

A la suspensión de mitocondrias de hasta 2 horas desde el aislamiento se le analizó el transporte de electrones como se muestra en la Figura 6. Para evaluar el transporte basal de electrones se agregó como sustrato malato 50 mM o NADH 1 mM y se midió el consumo de oxígeno en un oxígrafo, expresando el efecto de los ácidos hidroxámicos como porcentaje del control. La Figura 6a muestra que el DIMBOA-glucósido no alteró el transporte basal hasta concentraciones de 6 mM, mientras que el DIMBOA lo redujo desde concentraciones inferiores a 0,5 mM alcanzando un 50% de inhibición (ID_{50}) con 1,5 mM. También se determinó el efecto sobre el transporte acoplado agregando ADP 2 mM (Figura 6b). El comportamiento de ambos compuestos fue similar al basal encontrándose ausencia de efecto del glucósido frente a la marcada inhibición por DIMBOA sobre el transporte acoplado de electrones, alcanzando esta última un ID_{50} igual a 2,0 mM. Se analizó además el efecto de un desacoplante, el 2,4-dinitrofenol 50 μ M, pero no se detectó ninguna variación en la inhibición provocada por DIMBOA respecto a los transportes basal y acoplado (Figura 6c).

3.2.2. Efecto sobre el transporte de electrones en cloroplastos

En este caso se preparó una suspensión de cloroplastos y se analizó el transporte electrónico agregando el aceptor

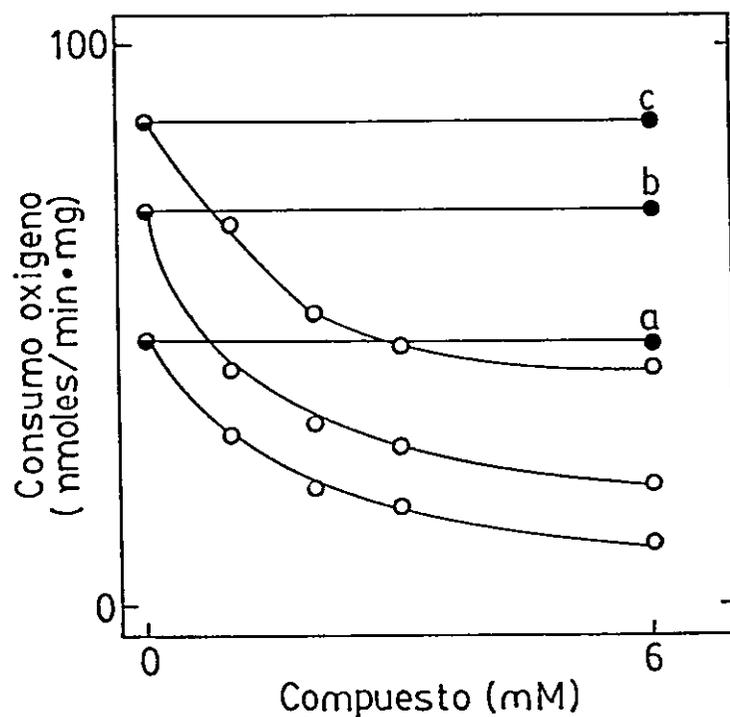


Figura 6. Consumo de oxígeno en nmoles/min mg de proteína de mitocondrias aisladas de maíz. A una suspensión de mitocondrias se le analizó a) transporte basal (NADH 1 mM o malato 50 mM), b) transporte acoplado (ADP 2 mM) y c) transporte desacoplado (2,4-dinitrofenol 50 μ M) a distintas concentraciones de DIMBOA-glucósido (●) y de DIMBOA (○).

artificial de electrones DCFIP. El experimento consistió en seguir espectrofotométricamente la reducción del DCFIP en presencia de luz y de los ácidos hidroxámicos y los resultados se expresaron como porcentaje del control. En la Figura 7 se aprecia que el glucósido no provocó ninguna alteración de la reducción del aceptor en relación al control, mientras que el DIMBOA inhibió este proceso alcanzándose un 50% de la represión a 2 mM de concentración. Si se considera que en este cultivar se encontró un contenido de DIMBOA de 30 mmoles/kg PF (alrededor de 30 mM suponiendo 95 % de agua en la célula) en el sobrenadante de 120.000 x g, el efecto tóxico potencial que alcanzaría el DIMBOA libre sobre la célula es muy elevado.

3.3. Aislamiento de tejidos y fracciones

El maíz es una planta C4 y sus hojas presentan anatomía tipo Kranz, lo cual significa que los haces vasculares están rodeados por una vaina de células cuyo comportamiento fotosintético difiere del de las células del mesófilo (Lawlor, 1987). La vaina vascular a su vez, está rodeada de una banda de esclerenquima (Raven et al., 1986), característica que la hace de difícil acceso. La digestión enzimática de la pared celular por 3 horas realizada en las hojas de plántulas de maíz liberó fundamentalmente protoplastos del parénquima del mesófilo, debido a que el aislamiento de los protoplastos de la vaina vascular requiere de pectinasa en el medio, de filtraciones específicas dado que se trata de células de mayor tamaño (Sheen y Bogorad, 1985) o de métodos que consideren la vaina vascular directamente (Spilatro y Preiss, 1987). La

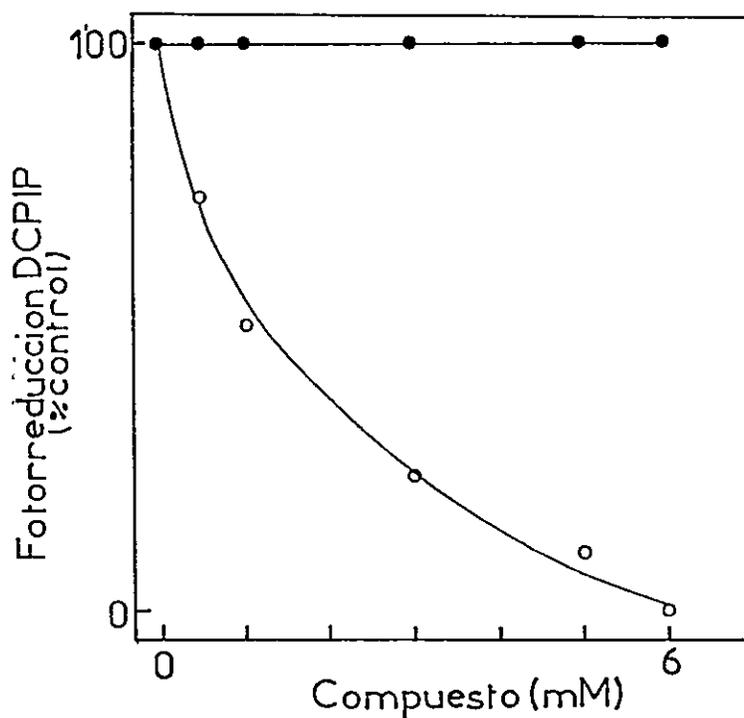


Figura 7. Fotorreducción del 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) en cloroplastos aislados de maíz. A una suspensión de cloroplastos se le agregó DCPIP 200 μ M y se siguió su reducción a 600 nm en presencia de luz a distintas concentraciones de DIMBOA-glucósido (●) y de DIMBOA (○).

suspensión final de protoplastos mostró elevada pureza, integridad de la plasmalema y gran número de células (Figura 8), sin embargo, el rendimiento en clorofila y proteínas fue bajo comparado con el homogeneizado de la hoja completa (Tabla 1). La liberación de vacuolas a partir de los protoplastos también resultó exitosa (Figura 9). Con el método utilizado se rompió la membrana plasmática de los protoplastos y las vacuolas liberadas permanecieron intactas según los análisis de microscopía óptica y de integridad por la tinción del rojo neutro (Kojima et al., 1979). Sin embargo, el rendimiento de vacuolas fue alrededor de 2/3 del número de protoplastos considerando una vacuola por protoplasto, resultado similar al encontrado por Boudet et al. (1981) que calcularon una contaminación por protoplastos inferior al 2 % con un rendimiento similar. Tanto las suspensiones de protoplastos como de vacuolas se sometieron a los distintos análisis detallados más adelante.

Por otra parte, las fracciones de mitocondrias y de cloroplastos aisladas según los métodos descritos, tuvieron una vida media no mayor a 1 hora y dentro de ese tiempo se hicieron los estudios de consumo de oxígeno y de reducción del DCPIP, determinación de actividades enzimáticas o extracción para análisis por HPLC.

3.4. Localización del DIMBOA-glucósido

Para estudiar la localización del glucósido, como primera aproximación se analizó su presencia a nivel tisular en hojas considerando que este es el órgano más frecuentemente afectado

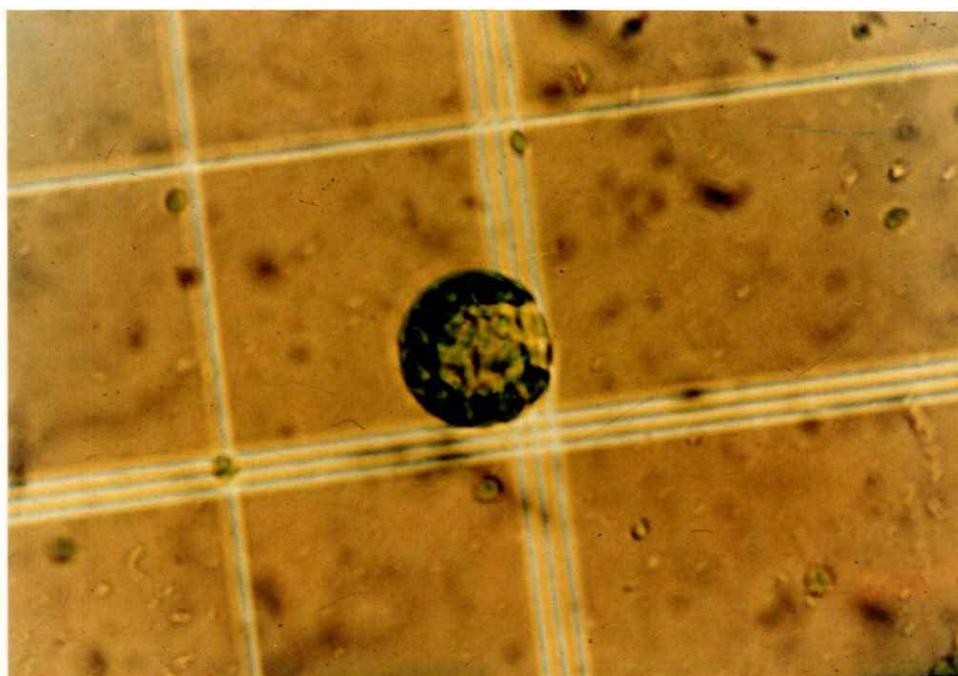


Figura 8. Preparación pura de protoplastos intactos por digestión enzimática de la pared celular de hojas de maíz. El tejido se incubó durante 3 horas en medio digestivo (MES 5 mM pH 5,6-5,8, CaCl_2 5 mM, sorbitol 0,6 M y celulasa 1 % p/v) y se purificó obteniendo una fracción de protoplastos libre de restos celulares.

Tabla 1. Rendimiento de proteína y de clorofila en hojas completas y en protoplastos de maíz. Las proteínas por el método de Bradford y la clorofila según Arnon se cuantificaron en homogeneizado de hoja (amortiguador acetato de sodio 50 mM pH 5,0) y en preparaciones de protoplastos obtenidos por digestión enzimática de la pared celular (MES 5 mM pH 5,6-5,8, CaCl₂ 5 mM, sorbitol 0,6 M y celulasa 1 % p/v). En ambos casos la cantidad inicial de tejido correspondió a 1 g.

Tejido	proteína		clorofila	
	(mg)	%	(mg)	%
homogeneizado de hoja	0,774	100	17,2	100
protoplastos	0,098	13	5,3	31

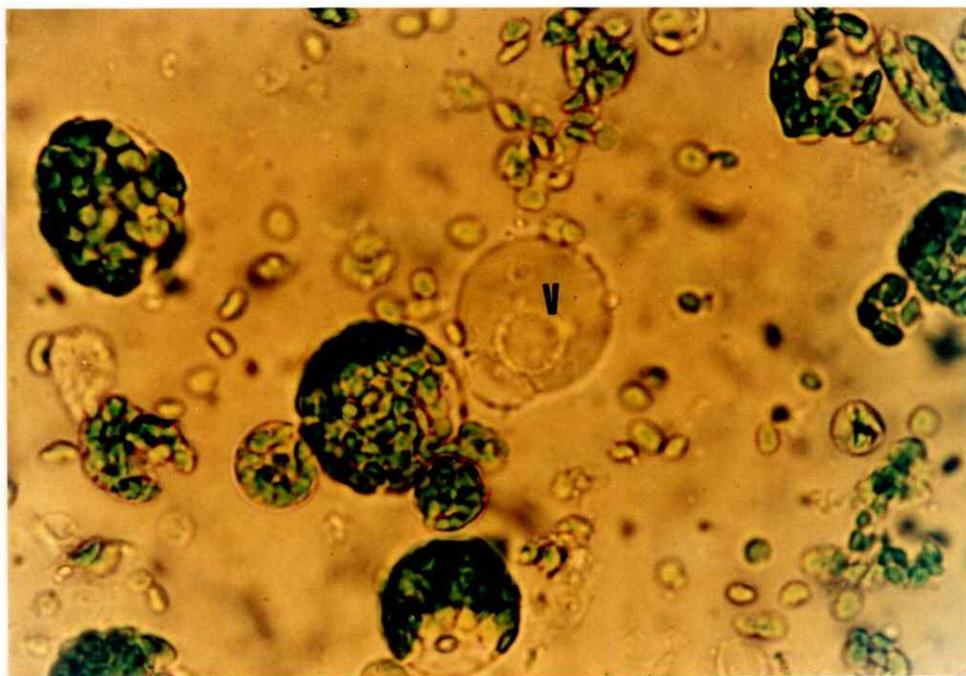


Figura 9. Liberación espontánea de una vacuola (v) intacta a partir de un protoplasto de maíz en una preparación cruda. Los protoplastos se obtuvieron por digestión enzimática de la pared celular y las vacuolas se aislaron por lisis osmótica, tratándose posteriormente para lograr fracciones puras según la metodología descrita.

por pestes. El estudio consistió en la separación de los tejidos y en la cuantificación del glucósido presente en cada uno de ellos. Debido a la dificultad de inactivar enzimas en estas condiciones, el glucósido se detectó como DIMBOA. De acuerdo a Hofman y Hofmanova (1971), el DIMBOA-glucósido se transforma rápidamente en DIMBOA al macerar tejido en extracto acuoso a temperatura ambiente. Es probable que el contenido inicial de glucósido no esté representado en su totalidad en la concentración de DIMBOA encontrada, debido a la descomposición que sufre este último a otras formas hidroxámicas (Woodward et al., 1978). No obstante, se trató de evitar la degradación extrayendo inmediatamente después de hacer el homogeneizado e inyectando la muestra al cromatógrafo lo más rápido posible luego de la extracción.

Los resultados obtenidos muestran presencia de DIMBOA en los dos tejidos ensayados (Figura 10, Tabla 2). Considerando entonces la ubicuidad del glucósido, detectado como DIMBOA, se realizó un análisis de su localización celular.

Utilizando la metodología descrita se aislaron las fracciones celulares, se extrajeron con éter y se les cuantificó la concentración de DIMBOA por HPLC debido a las razones explicadas anteriormente. Los resultados aparecen en la Tabla 3. Puede apreciarse que sólo en el protoplasto se detectó DIMBOA. En vacuolas, mitocondrias y cloroplastos no se registró presencia de este compuesto. La Figura 11 muestra un análisis por HPLC del DIMBOA en protoplastos y vacuolas obtenido a partir de la misma preparación. El medio de

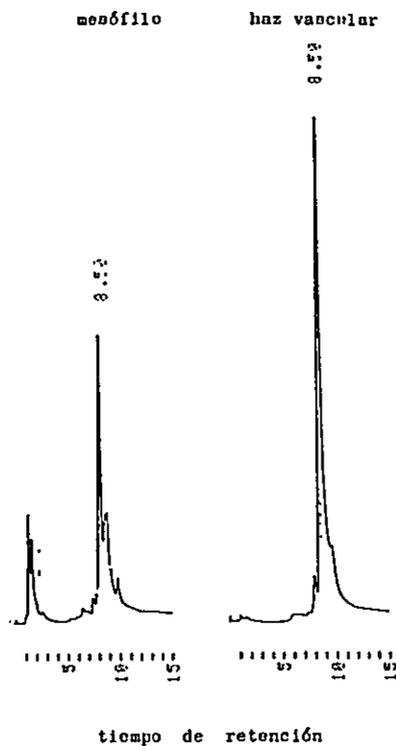


Figura 10. Tiempo de retención para DIMBOA en HPLC en tejidos aislados de hojas de maíz. Tanto los protoplastos del parénquima del mesófilo como los haces vasculares se aislaron por digestión enzimática de la pared celular durante 3 y 24 horas, respectivamente. Las fracciones puras se extrajeron con éter, se inyectaron al HPLC y se eluyeron en gradiente metanol:agua 30-70 % durante 5 minutos y luego 50-50 % por 10 minutos registrando la absorbancia a 263 nm.

Tabla 2. Localización de DIMBOA en tejidos de hoja de maíz. Los tejidos se obtuvieron luego de digestión de la pared celular (MES 5 mM pH 5,6-5,8, CaCl₂ 5 mM, sorbitol 0,6 M y celulasa 1 % p/v) durante 3 horas para aislar protoplastos y durante 24 horas para aislar haces vasculares. Ambos tejidos purificados se extrajeron con éter, se inyectaron al HPLC y se eluyeron en gradiente metanol:agua 30-70 % durante 5 minutos y luego 50-50 % por 10 minutos, leyendo absorbancia a 263 nm. La concentración de DIMBOA de la muestra se calculó comparando el área bajo la curva con una curva estándar para este compuesto puro.

Tejido	DIMBOA (μ moles/g PF)
protoplastos del mesófilo	22,6 \pm 2,00
haces vasculares	11,5 \pm 0,81

Tabla 3. Localización de DIMBOA en fracciones celulares de hojas de maíz. Las fracciones se aislaron por a) digestión enzimática de hojas para obtención de protoplastos, vacuolas y medio digestivo y por b) aislamiento directo de mitocondrias y de cloroplastos a partir de hojas completas. Las distintas fracciones se extrajeron con éter, se inyectaron al HPLC y se eluyeron en gradiente metanol:agua 30:70 % durante 5 minutos y luego 50-50 % por 10 minutos, leyendo absorbancia a 263 nm. La concentración de DIMBOA se calculó comparando el área bajo la curva con una curva estándar para el compuesto puro. Protoplastos y vacuolas provienen del mismo experimento y corresponden a $1,46 \times 10^6$ células.

Fracción	DIMBOA (μ moles/g PF)
protoplastos ^a	22,6 \pm 2,00
vacuolas ^a	N.D.
medio digestivo ^a	N.D.
mitocondrias ^b	N.D.
cloroplastos ^b	N.D.

N.D. no detectado

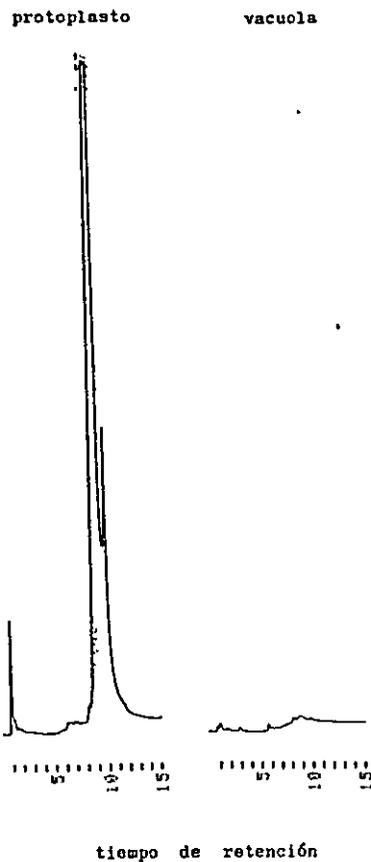


Figura 11. Tiempo de retención para DIMBOA en HPLC en preparaciones puras de protoplastos y de vacuolas aisladas de hojas de maíz. Los protoplastos se obtuvieron por digestión enzimática de la pared celular y las vacuolas se aislaron por lisis osmótica de protoplastos. Las fracciones puras se extrajeron con éter, se inyectaron al HPLC y se eluyeron en gradiente metanol:agua 30-70 % durante 5 minutos y 50-50 % por 10 minutos leyendo absorbancia a 263 nm.

digestión representa el espacio intercelular y el espacio periplásmico, por lo cual se consideró como una medida del contenido apoplástico (Salisbury y Ross, 1985) de la hoja.

3.5. Localización enzimática

El estudio de la localización de enzimas comprendió varias etapas descritas a continuación.

3.5.1. Determinación de actividad β -glucosidásica

En todos los experimentos detallados más adelante se utilizaron tres sustratos: el natural, DIMBOA-glucósido aislado de maíz, uno sintético altamente inespecífico, el PNP-glucósido y uno natural aislado de almendra, la salicina.

3.5.1.1. Actividad β -glucosidásica usando DIMBOA-glucósido como sustrato

La actividad de esta enzima se midió espectrofotométricamente como aparición de DIMBOA a 263 nm de absorbancia. Debido a que tanto el glucósido como la aglicona absorben a longitudes de onda similares y que sólo pueden diferenciarse por su solubilidad en extracto acuoso o éter, respectivamente, se comprobó la exactitud del método inyectando el DIMBOA obtenido en los experimentos de cinética a distintos tiempos (0 a 8 minutos) al HPLC (datos no mostrados). Este experimento demostró la aparición progresiva de DIMBOA respecto al blanco de DIMBOA-glucósido y por lo tanto, la hidrólisis del glucósido.

La actividad varió en un grado importante entre preparaciones provenientes de grupos distintos de plantas, a pesar de que las condiciones de crecimiento se mantuvieron lo

más homogéneas posible. En aquellos experimentos donde se promedian actividades, se utilizó el valor porcentual de ésta.

3.5.1.2. Actividad β -glucosidásica usando PNP-glucósido como sustrato

En este caso la actividad se midió espectrofotométricamente como aparición de paranitrofenol a 400 nm de absorbancia. También para esta actividad se encontró heterogeneidad de las lecturas entre extractos, de tal manera que se aplica la explicación anterior.

La utilización del ensayo de enzimas acopladas Merck o Sigma para valorar la glucosa liberada por la hidrólisis de las β -glucosidasas, tuvo resultados positivos en la evaluación de la actividad de la PNP- β -glucosidasas, pero el ϵ calculado para la glucosa fue de 1.464 frente al valor de ϵ de 18.448 obtenido para el paranitrofenol, por lo cual se prefirió este último método. Al evaluar la liberación de glucosa a partir del DIMBOA-glucósido, se observó inhibición de las enzimas acopladas a concentraciones de DIMBOA equivalentes a las potencialmente producidas durante la cinética.

3.5.1.3. Actividad β -glucosidásica usando salicina como sustrato

No se detectó hidrólisis de la salicina a partir de extractos frescos según el método de Somogyi (1945) que cuantifica la glucosa liberada. Debido a la ausencia de actividad contra salicina, se descartó el uso de este sustrato en los experimentos subsiguientes de tal manera que la exposición de resultados y posterior discusión se referirá

sólo a DIMBOA-glucósido y a PNP-glucósido.

3.5.2. Localización enzimática en fracciones obtenidas por centrifugación diferencial

En este experimento se analizó la presencia de actividad enzimática para ambos sustratos en las distintas fracciones subcelulares obtenidas por centrifugación diferencial. Al mismo tiempo, se agregó un análisis por HPLC para detectar DIMBOA en cada una de estas fracciones. Los resultados se muestran en la Tabla 4 donde se expresan como porcentaje debido a la fluctuación de valores entre repeticiones. Los datos presentados corresponden al ensayo realizado con amortiguador acetato de sodio pH 5,0, debido a que el comportamiento de las fracciones fue similar al utilizar amortiguador Tris-MES pH 7,2. Puede apreciarse que ambas enzimas presentan distribución similar de actividad con más del 90 % en la fracción citosólica y con un mínimo ligado a membranas. Por otra parte, sólo se detectó DIMBOA en la fracción soluble.

3.5.3. Localización enzimática a niveles tisular y celular

La Tabla 5 muestra la actividad β -glucosidásica en parénquima del mesófilo y en el cilindro vascular siendo en este último tejido muy inferior a la detectada en protoplastos. Como la hidrólisis del PNP-glucósido y del DIMBOA-glucósido ocurrió en ambos tejidos, se propuso ubicar la actividad a nivel celular.

La localización de la actividad β -glucosidásica en fracciones celulares aisladas de maíz aparece en la

Tabla 4. Actividad de β -glucosidasas en fracciones subcelulares de maíz obtenidas por centrifugación diferencial. El tejido se homogeneizó en amortiguador de extracción (acetato de sodio 50 mM pH 5,0) y se sometió a centrifugación. Cada pella (P) se lavó 3 veces en el mismo amortiguador y luego se incubó con Triton X-100 0,1 %, repeleteando a la velocidad y tiempo correspondientes. En cada fracción se determinó la actividad β -glucosidasa usando DIMBOA-glucósido (DIMBOA-glc) y PNP-glucósido (PNP-glc) como sustratos. Al mismo tiempo, las fracciones se extrajeron con éter y se inyectaron al HPLC para cuantificar DIMBOA según una curva estándar. La concentración de proteínas se determinó según Bradford.

Fracción	Actividad %		DIMBOA (μ moles/g PF)	Proteína (mg)
	PNP-glc	DIMBOA-glc		
P 1.085 x g	1,5 \pm 0,04	2,0 \pm 0,05	N.D.	0,027
P 12.100 x g	0,5 \pm 0,03	1,5 \pm 0,04	N.D.	0,015
P 120.000 x g	1,0 \pm 0,10	1,8 \pm 0,30	N.D.	0,010
sobrenadante 120.000 x g	97,0 \pm 4,00	94,7 \pm 0,53	30	10,770

N.D. no detectado

Tabla 5. Localización de β -glucosidasas en tejido de hojas de maíz. Los tejidos se obtuvieron por digestión enzimática de la pared celular (MES 5 mM pH 5,6-5,8, CaCl_2 5 mM, sorbitol 0,6 M y celulasa 1 % p/v) durante 3 horas para aislar protoplastos y por 24 horas para separar haces vasculares. Los tejidos purificados se ensayaron para β -glucosidasas usando DIMBOA-glucósido (DIMBOA-glc) y PNP-glucósido (PNP-glc) como sustratos. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford.

Tejido	Actividad (U/mg)		proteína (mg/ml)
	PNP-glc	DIMBOA-glc	
protoplastos del mesófilo	66,0	129,0	0,358
haces vasculares	6,8	15,9	0,010

Tabla 6. Se aprecia que en el caso del PNP-glucósido, del 100 % de actividad determinada en el protoplasto sólo un 62 % se recupera en la vacuola. El 38 % restante se supone en el espacio extravacuolar como cloroplasto donde también se detectó cierta actividad. Por otra parte, la totalidad de la actividad DIMBOA- β -glucosidásica presente en el protoplasto se localizó dentro de la vacuola, sin detectarse en cloroplastos ni en mitocondrias.

En relación a lo que representaría al apoplasto, es decir, el medio de digestión de la pared celular, puede apreciarse que éste sólo tiene actividad PNP- β -glucosidásica. La actividad del medio de digestión, que contiene una celulasa capaz de hidrolizar también el PNP-glucósido (Boller y Kende, 1979), se restó del valor final obtenido del medio más el tejido (Tabla 7), por lo que resultó claro que había actividad independiente del medio digestivo y propia del maíz contra este sustrato. Para descartar la contaminación provocada por ruptura de protoplastos, se realizó un análisis microscópico y se midió la actividad de una enzima propia del citoplasma, la glucosa-6-P-deshidrogenasa. Se determinó bajo porcentaje de contaminación, de modo que la actividad encontrada correspondería a una PNP- β -glucosidasa presente en el apoplasto.

3.5.4. Caracterización de β -glucosidasas

Debido al desconocimiento existente en relación a las β -glucosidasas contra DIMBOA-glucósido, se realizó una caracterización preliminar de estas enzimas utilizando

Tabla 6. Localización de β -glucosidasas en fracciones subcelulares de hojas de maíz. Las fracciones celulares se aislaron por a) digestión enzimática de hojas para obtención de protoplastos y de vacuolas y b) aislamiento directo de mitocondrias y de cloroplastos a partir de hojas completas. Cada una de las fracciones se ensayó para actividad β -glucosidasa usando DIMBOA-glucósido (DIMBOA-glc) y PNP-glucósido (PNP-glc) como sustratos. La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford. Los protoplastos y las vacuolas provienen del mismo experimento y corresponden a $1,46 \times 10^6$ células.

Fracción	Actividad (U totales)				proteína (mg/ml)
	PNP-glc	%	DIMBOA-glc	%	
protoplastos ^a	66	100	129	100	0,358
vacuolas ^a	41	62	140	109	0,088
mitocondrias ^b	N.D.		N.D.		
cloroplastos ^b	+		N.D.		

N.D. no detectado
+ detectable pero no cuantificable

Tabla 7. Actividad β -glucosidasa en el medio de digestión enzimática utilizado para hojas de maíz. El medio de digestión (MES 5 mM pH 5,6-5,8, CaCl_2 5 mM, sorbitol 0,6 M y celulosa 1 % p/v) se ensayó para actividad enzimática usando DIMBOA-glucósido (DIMBOA-glc) y PNP-glucósido (PNP-glc) como sustratos, antes y después de agregar el tejido para la incubación. La concentración de proteínas se midió según Bradford. La actividad y concentración de proteínas propias del apoplasto se obtuvo restando el valor inicial (antes de la digestión) al valor final (después de la digestión).

Fracción	Actividad (U/ml)		proteínas (mg/ml)
	PNP-glc	DIMBOA-glc	
medio digestivo sin tejido	556	N.D.	0,228
medio digestivo con tejido	677	N.D.	0,350
diferencia	122		0,062

N.D. no detectado

homogeneizado centrifugado a 12.100 x g durante 10 minutos.

Las K_m aparentes para el DIMBOA-glucósido y para el PNP-glucósido fueron 11,9 y 2 mM, respectivamente, como se desprende de las gráficas de Lineweaver-Burk de la Figura 12.

La Figura 13 muestra los efectos del pH y de la temperatura sobre las actividades de ambas enzimas. Las curvas de pH mostraron un rango estrecho de actividad máxima con un óptimo para la hidrólisis de los dos sustratos empleados igual a 5,0, encontrándose que la DIMBOA- β -glucosidasa fue más sensible a los pH extremos ya que no tuvo actividad a pH 3 y 8 (Figura 13a). Las temperaturas óptimas, en cambio, variaron según el glucósido utilizado en ensayos de hasta 8 minutos: para DIMBOA-glucósido fue de 30°C y para PNP-glucósido fue de 50°C (Figura 13b).

El protocolo de purificación desarrollado se muestra en la Tabla 8. Se aprecia que si bien el contenido de proteínas totales disminuyó con aumento concomitante de la actividad, tanto el grado de purificación como la recuperabilidad se consideraron bajos comparados con otros protocolos para β -glucosidasas.

En relación a las etapas usadas, resultó claro que la adición de sulfato de amonio inhibió las actividades que se ensayaron sin dializar la muestra. Es necesario mencionar que en las fracciones de precipitación con esta sal correspondientes a 20-40 % y 40-60 % de saturación, se encontró alrededor del 90 % de la actividad DIMBOA- β -glucosidasa. Por otra parte, el perfil de elución

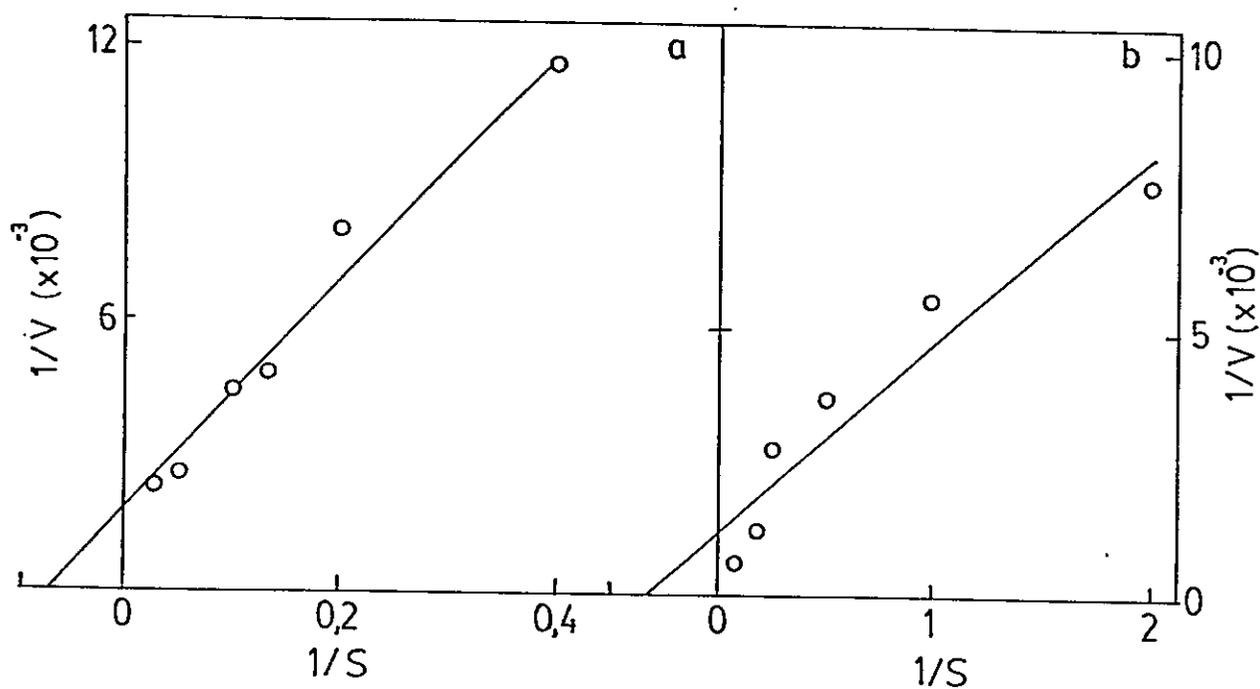


Figura 12. Gráficas de Lineweaver-Burk usando a) DIMBOA-glucósido y b) PNP-glucósido. En ambos casos la actividad β -glucosidasa se ensayó en homogeneizado en amortiguador de extracción (acetato de sodio 50 mM pH 5,0) centrifugado a 12.100 x g durante 10 minutos. La extrapolación de la recta en la abscisa se consideró como el valor de K_m aparente para cada sustrato.

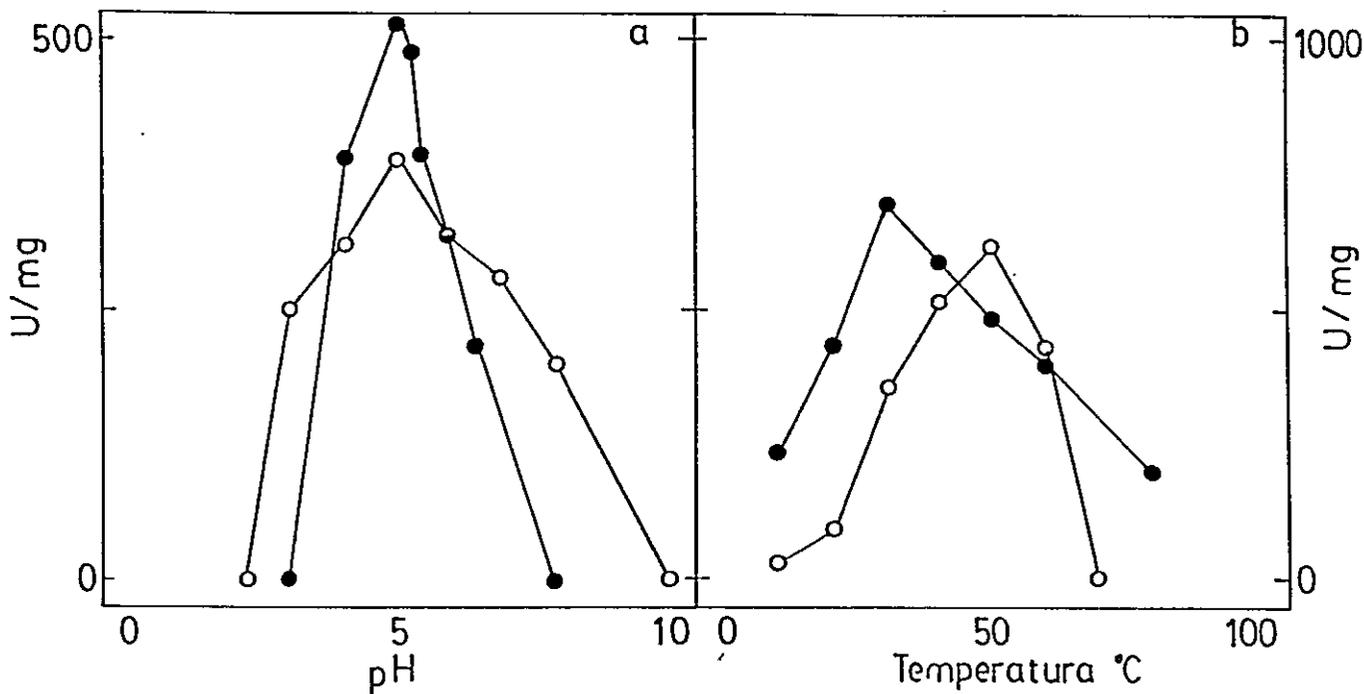


Figura 13. Curvas de actividad de β -glucosidasas en funci3n de a) pH y b) temperatura usando DIMBOA-gluc3sido (●) y PNP-gluc3sido (○) como sustratos. En ambos casos la actividad β -glucosidasa se ensay3 en homogeneizado en amortiguador de extracci3n (acetato de sodio 50 mM pH 5,0) centrifugado a 12.100 x g durante 10 minutos.

Tabla 8. Purificación de β -glucosidasas. El tejido se homogeneizó en amortiguador de extracción (acetato de sodio 50 mM pH 5,0), se precipitó con sulfato de amonio entre 20 y 60 % de saturación y se filtró por una columna Sephadex G-100 equilibrada y eluida con el mismo amortiguador. Luego, la fracción activa se llevó a una columna DEAE-Sephadex A-25 equilibrada con amortiguador de extracción y se eluyó en gradiente con la misma solución 0-500 mM de NaCl. En cada etapa de purificación se determinó actividad β -glucosidasa usando DIMBOA-glucósido (D-g) y PNF-glucósido (P-g) como sustratos. La concentración de proteínas se midió según Bradford.

Etapa	Proteína (mg)	Actividad (U/mg)		Purificación		Recuperación (%)	
		P-g	D-g	P-g	D-g	P-g	D-g
homogeneizado	74,1	293	600	1,0	1,0	100	100
sobrenadante 12.100 x g	48,2	452	987	1,5	1,6	100	100
precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄	44,1	108	178	0,4	0,3	22	18
Sephadex G-100	15,7	690	1.614	2,4	2,7	50	57
DEAE-Sephadex	0,7	1.368	3.969	4,7	6,6	4,4	6,2

correspondiente a las dos columnas utilizadas (Figura 14) mostró un solo pico correspondiente a la actividad para ambos sustratos, lo cual podría llevar a sugerir que la misma enzima o grupo de enzimas posee ambas actividades. Sin embargo, para fundamentar esta hipótesis la purificación debiera realizarse a homogeneidad.

No obstante las deficiencias del protocolo propuesto, éste puede utilizarse como una base susceptible de mejoras futuras y desde ese punto de vista, constituye y se considera un aislamiento preliminar.

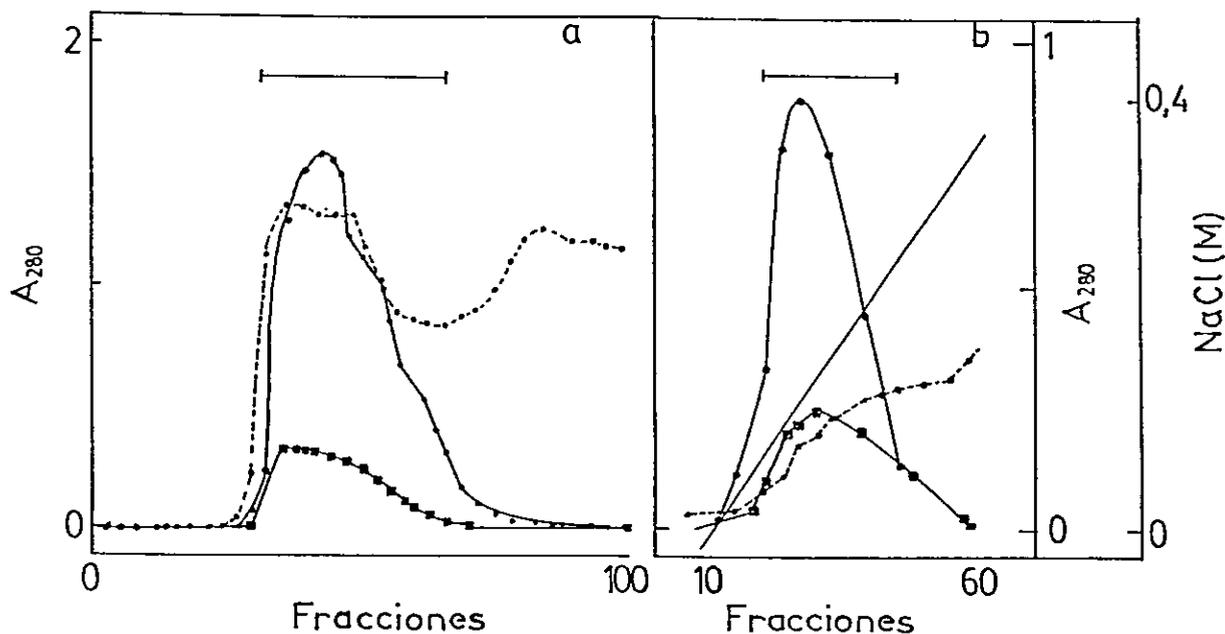


Figura 14. Purificación de β -glucosidasas de maíz en a) filtración en Sephadex G-100 y b) intercambio iónico en DEAE-Sephadex A-25. El tejido se homogeneizó en amortiguador de extracción (acetato de sodio 50 mM pH 5,0), se centrifugó a $12.100 \times g$ durante 10 minutos y se precipitó con sulfato de amonio entre 20 y 60 % de saturación. El precipitado se filtró por la columna a) equilibrada y eluida con el mismo amortiguador y la fracción activa obtenida se eluyó por b), equilibrada con la misma solución y eluida con gradiente de NaCl 0-500 mM. En cada una de las columnas se leyó absorbancia a 280 nm (•-•-•) para estimar concentración de proteínas totales, a 263 nm para determinar actividad DIMBOA- β -glucosidasa (■-■-■) y a 400 nm para detectar actividad PNP- β -glucosidasa (•).

4. DISCUSION

El propósito fundamental de esta tesis fue analizar la localización del DIMBOA-glucósido y de las DIMBOA- β -glucosidasas a niveles tisular y celular en hojas de maíz, con el fin de demostrar la existencia de compartimentación compatible con el comportamiento de estas moléculas informado en la literatura. Al mismo tiempo, se estudió el efecto de estos compuestos sobre el transporte de electrones propio de mitocondrias y de cloroplastos aislados de un cultivar con alto contenido de ácidos hidroxámicos.

En primer término se discutirá la acción de los ácidos hidroxámicos sobre la célula y posteriormente se analizará su distribución y la de β -glucosidasas en las diferentes fracciones de hoja obtenidas.

4.1. Efectos del DIMBOA-glucósido y del DIMBOA sobre la célula

Los resultados obtenidos en los experimentos destinados a investigar el efecto diferencial del DIMBOA-glucósido y del DIMBOA sobre la función de mitocondrias y de cloroplastos, mostraron que el DIMBOA inhibió la cadena transportadora de electrones en ambos organelos a concentraciones inferiores a las encontradas para este cultivar, mientras que el DIMBOA-glucósido no tuvo efectos sobre ese proceso a esas mismas concentraciones.

La cadena transportadora de electrones de la mitocondria de las células vegetales presenta algunas diferencias respecto a

las animales. La primera es la existencia de una enzima NADH-deshidrogenasa asociada a la cara externa de la membrana interna de la mitocondria, la cual permite la entrega rápida de los electrones del NADH citosólico al complejo proteico III. Esta enzima se caracteriza por su insensibilidad a la rotenona, compuesto que inhibe el flujo de electrones desde el NADH proveniente del ciclo de Krebs o el citosólico hasta el complejo proteico I (Moller, 1986; Douce et al., 1987). La segunda diferencia origina la llamada respiración insensible al cianuro, propia de algunas especies que presentan una vía alternativa de reducción del oxígeno. Cuando estas plantas tienen el citocromo a_3 inhibido por la acción del cianuro, la ubiquinona entrega los electrones directamente al oxígeno gracias a una oxidasa presente en el espacio intermembranal (Salisbury y Ross, 1985; Douce et al., 1987). El resto de los componentes de la cadena son similares en vegetales y animales en cuanto impermeabilidad al NADH externo, permeabilidad al malato y otros (Douce et al., 1987).

En una suspensión de mitocondrias vegetales o animales, puede agregarse externamente como sustrato cualquiera de los dadores de electrones a los diferentes complejos proteicos de la membrana, esto es, malato, succinato, dadores artificiales o directamente NADH, cuyos electrones pasarán sólo al complejo I si es animal o a los complejos I o III si es vegetal.

En los experimentos con mitocondrias de maíz se agregaron malato o NADH como sustratos, no detectándose ningún efecto de parte del glucósido y una fuerte inhibición del transporte

basal provocada por DIMBOA. Lo mismo ocurrió al agregar ADP al sistema para medir transporte acoplado o al adicionar un desacoplante para evaluar transporte desacoplado. Al agregar ADP a la muestra se permite la fosforilación acoplada al transporte electrónico (Stryer, 1988) y el hecho que el DIMBOA lo inhibiera en la misma proporción que al transporte basal, significa que el efecto ocurrió sobre la cadena transportadora y no sobre el mecanismo fosforilante, es decir, no hubo inhibición de la ATPasa ligada a la membrana mitocondrial. Por otra parte, se sabe que un desacoplante disipa el gradiente de protones necesario para la fosforilación del ADP (Hinckle y Mc Carty, 1978), por lo tanto, que la inhibición se mantuviera prácticamente sin modificaciones en presencia de un desacoplante demuestra, en forma categórica, el efecto nocivo de este compuesto sobre la cadena transportadora de electrones. Que el DIMBOA inhibiera la cadena transportadora no descarta la posibilidad de su acción sobre la ATPasa en concentraciones iguales o superiores. Esto podría dilucidarse aislando la enzima y ensayando actividad en presencia de DIMBOA.

Se trató de localizar el sitio de acción de DIMBOA en la cadena transportadora en forma preliminar. Para ello se midió transporte basal en presencia de NADH 1 mM, malato 50 mM o succinato 10 mM. Se encontró que el consumo de oxígeno fue similar en los tres casos, sin embargo, al agregar DIMBOA a cada uno de los sistemas, el consumo se inhibió en forma importante sólo cuando había malato o NADH en el medio, sin

alterarse en presencia del succinato (datos no mostrados). Este resultado sugiere que uno de los sitios probables de inhibición se encuentra previo a la ubiquinona, que es el primer aceptor de electrones de la succinato deshidrogenasa y de la NADH deshidrogenasa externa. Las proteínas inhibidas podrían ser las NADH deshidrogenasa internas o la externa y probablemente el complejo ferrosulfurado. Para probar esta hipótesis, deberían aislarse las tres deshidrogenasas y analizar su cinética en presencia de DIMBOA y del glucósido.

Algunos datos publicados previamente coinciden con lo encontrado en maíz. Niemeyer et al. (1986) midieron el consumo de oxígeno en partículas submitocondriales de corazón de bovino en presencia de DIMBOA aislado de extractos de maíz. Los autores informaron disminución del consumo a concentraciones superiores a 5 mM de DIMBOA, atribuyendo este efecto a inhibición de la cadena transportadora. Al mismo tiempo, según los sustratos agregados (NADH, succinato y ascorbato), sugirieron que el sitio de inhibición se encontraría después de la succinato deshidrogenasa y previo al citocromo c.

La diferencia respecto al sitio putativo de la inhibición encontrada por Niemeyer et al. (1986) respecto al maíz, puede deberse a variaciones estructurales y metabólicas propias del origen de las mitocondrias empleadas en los ensayos, que permitan mayor o menor exposición de aquellos residuos o grupos proteicos de alta reactividad con DIMBOA. Sin embargo, para aclarar el efecto de este compuesto deberían usarse

inhibidores sitio-específicos o aislar los complejos para analizar su actividad con diferentes concentraciones de DIMBOA.

Por otra parte, Schonbaum et al. (1971) analizaron el efecto de ácidos hidroxámicos no cíclicos sobre el consumo de oxígeno de mitocondrias de *Phaseolus aureus* y *Symplocarpus foetidus*. Estos autores no detectaron ningún efecto de estos compuestos sobre el consumo. Este comportamiento puede ser resultado de la diferencia en estructura química de los ácidos en cuestión, aunque Neilands (1967) señala que el grupo fundamentalmente reactivo es el hidroxámico.

En los experimentos realizados con cloroplastos de maíz se utilizó el aceptor artificial de electrones, el DCPIP. El DIMBOA-glucósido no inhibió el transporte de electrones desde el agua hasta el DCPIP, pero el DIMBOA produjo una disminución clara de la tasa de fotorreducción de este compuesto. Este resultado demuestra que DIMBOA inhibe la reacción de Hill, aún cuando no se localizó el sitio probable de inhibición.

Datos previos obtenidos en cloroplastos clase II de espinaca mostraron resultados diferentes a los determinados para maíz. Se encontró que tanto el DIMBOA-glucósido como el DIMBOA inhibieron los transportes basal y acoplado, pero al utilizar un desacoplante, la inhibición previa se liberó por completo. Este comportamiento demuestra que la acción de los ácidos hidroxámicos ocurrió sobre la ATPasa ligada y no sobre la cadena transportadora (Queirolo et al., 1981; 1983).

La falta de concordancia entre los efectos observados sobre

cloroplastos de espinaca o maíz, radica en la toxicidad del glucósido y en el proceso inhibido. Debe considerarse que la espinaca es una especie C3 y que no sintetiza este compuesto en sus células. La diferencia estructural básica entre plantas C3 y C4 se refiere a la concentración de membrana tilacoide en sus cloroplastos, a la vez que en plantas C3 ocurre etapa oscura en este organelo mientras que en plantas C4 la fase oscura está restringida a los cloroplastos de la vaina del haz (Lawlor, 1987). Esto puede significar alguna diferencia en la disposición de los complejos proteicos dentro del tilacoide o bien, que el cloroplasto de maíz posea alguna capacidad que le confiera resistencia a un compuesto que alcanza tan altas concentraciones en sus células. Esto último debería investigarse utilizando cultivares de maíz que no sinteticen ácidos hidroxámicos. Tampoco en este caso puede descartarse algún efecto del DIMBOA sobre la ATPasa, pero como ya se mencionó, sería necesario ensayar la cinética de la enzima pura.

Se ha sugerido que el DIMBOA se asocia a los grupos sulfhidrilos de los residuos cisteínas de las enzimas afectadas, lo que provocaría la inhibición de su actividad (Niemeyer et al., 1982; Pérez y Niemeyer, 1985). Son varios los complejos enzimáticos presentes tanto en mitocondrias como en cloroplastos que se sabe poseen grupos sulfhidrilos (Lawlor, 1987; Stryer, 1988), de manera que existe más de un sitio de inhibición probable para esta molécula. La ausencia de efecto del DIMBOA-glucósido no ha sido investigada, pero es

probable que la glucosa inhiba la reactividad del grupo hidroxámico.

Respecto a la inhibición de enzimas por acción del DIMBOA encontrada en este trabajo, se mencionó que aquellas del ensayo acoplado para glucosa (Merck y Sigma) fueron fuertemente inhibidas cuando se agregó DIMBOA entre 20 y 40 mM. En ensayos preliminares de inhibición de β -glucosidasas por DIMBOA, se encontró un 20 % inhibición de PNP- β -glucosidasas con 5 mM de DIMBOA en el medio de actividad, un 80 % de inhibición con 10 mM y ausencia de actividad con 40 mM de este compuesto. Por otra parte, la actividad de las DIMBOA- β -glucosidasas no pareció verse afectada por la presencia de DIMBOA en el medio de ensayo, no obstante, se detectó un retardo en la actividad que aumentó según se incrementaba la concentración de DIMBOA. Aunque estos resultados son de tipo preliminar, parece interesante que DIMBOA inhiba la acción de otras β -glucosidasas sin afectar la actividad de su propia β -glucosidasa, lo cual podría tener alguna significación en el metabolismo de esta molécula en el tejido intacto.

4.2. Distribución del DIMBOA-glucósido y de β -glucosidasas

En la introducción se señaló que el DIMBOA se encuentra en forma glucosídica en el tejido intacto (Virtanen y Hietala, 1960; Hofman y Hofmanova, 1969), el cual al romperse liberaría la aglicona y glucosa gracias a la actividad hidrolítica de las β -glucosidasas presentes en el tejido (Hofman y Hofmanova, 1971). Esta información sugiere la necesidad de compartimentación con el fin de proteger al glucósido y a la

célula, especialmente si se considera el efecto inhibitorio demostrado por DIMBOA sobre las reacciones redox de mitocondrias y cloroplastos a concentraciones muy por debajo de las potencialmente alcanzables por el cultivar utilizado.

Los resultados obtenidos mostraron que tanto el glucósido como las β -glucosidasas se encuentran en todos los tejidos analizados. No obstante, se demostró que si bien ambos componentes coexisten dentro de una misma célula, DIMBOA-glucósido se presenta en el protoplasma extravacuolar mientras que las DIMBOA- β -glucosidasas se encuentran dentro de la vacuola. Estos datos prueban que en maíz existe compartimentación subcelular al menos para esta etapa de la vía metabólica de los ácidos hidroxámicos, demostrándose la hipótesis de compartimentación propuesta.

4.2.1. Localización del DIMBOA-glucósido

Se demostró presencia de DIMBOA-glucósido tanto en parénquima como en el tejido vascular, medido como interconversión del glucósido a DIMBOA. Estos resultados coinciden con lo informado para trigo y maíz donde se encontró DIMBOA en el cilindro vascular y en el parénquima, mientras que no logró detectarse en la epidermis (Argandoña y Corcuera, 1985; Argandoña et al., 1987; Corcuera et al., 1987). Al analizar fluido xilemático proveniente de gutación de plantas de maíz y de trigo, sin embargo, no se detectó DIMBOA de acuerdo al método del FeCl_3 (Argandoña y Corcuera, 1985), de lo que podría deducirse que todo el DIMBOA encontrado corresponde al tejido floemático. Esta deducción sería

consistente con lo informado por Zúñiga (comunicación personal), quién determinó reducción de la tasa de alimentación de dos especies de áfidos que se nutren fundamentalmente del floema en condiciones normales, cuando se experimentó con cultivares de maíz de alto contenido de ácidos hidroxámicos. Se sabe que el DIMBOA produce toxicidad o repelencia a plagas de áfidos según sea la concentración de este compuesto en la hoja (Argandoña et al., 1983).

En hojas de sorgo, Kojima et al. (1979) informaron compartimentación tisular del glucósido cianogénico dhurrina que se presentó en su totalidad en la capa epidérmica de la hoja, mientras que no pudo detectarse en el mesófilo. En otros estudios en cambio, el glucósido se ha encontrado en todas las fracciones de la hoja (Oba et al., 1981).

Los resultados mostraron compartimentación celular del DIMBOA-glucósido, el que se detectó en la fracción extravacuolar de las células del parénquima. Por lo general, es la vacuola el compartimiento que almacena los glucósidos secundarios (Marty et al., 1980; Boller y Wiemken, 1986) aunque en referencias respecto al tema se mencionan glucósidos intracelulares más que asociados a una fracción específica (Oba et al., 1981; Frehner y Conn, 1987; Selmar et al., 1987). Sin embargo, en todos los casos mencionados la β -glucosidasa es extravacuolar razón por la cual puede considerarse irrelevante su localización exacta, aún cuando se desconoce el efecto que estos glucósidos pudieran tener en el metabolismo celular.

La literatura señala que el DIMBOA se encuentra como glucósido en el tejido intacto, generándose DIMBOA exclusivamente después de la hidrólisis enzimática (Hofman y Hofmanova, 1971). Aunque se desconoce la vía biosintética directa que genera DIMBOA, Niemeyer (1989) ha propuesto que éste se originaría a partir de un precursor también glucosídico, obviando el paso de DIMBOA libre. Se ha descrito la presencia mayoritaria de las agliconas DIBOA y DIMBOA en tejido indiferenciado de callos (Zúñiga et al., 1989) y de ápices meristemáticos de trigo (Zúñiga y Massardo, 1989a), mientras que en plántulas o tejido diferenciado aparecen fundamentalmente glucósidos de estos mismos compuestos (Zúñiga y Massardo, 1989a; 1989b). Esto demuestra la existencia de DIMBOA libre en tejidos indiferenciados en gran concentración relativa y en tejidos diferenciados en menor proporción. Por otra parte, Bailey y Larson (1989) han descrito una glucosiltransferasa aislada de maíz que tiene la capacidad de glucosilar DIMBOA. Todos estos resultados sugieren que DIMBOA se presenta libre en tejido intacto, hecho que podría tener significación en la génesis del glucósido por lo que deberían ser considerados en el establecimiento de una vía biosintética en el futuro.

4.2.2. Localización de β -glucosidasas

Los resultados mostraron que las DIMBOA- β -glucosidasas están presentes en todos los tejidos analizados, que son enzimas solubles y que se encuentran prácticamente en su totalidad dentro de la vacuola.

4.2.2.1. Caracterización

En relación a la caracterización preliminar de las β -glucosidasas de maíz, ambas tienen un óptimo de actividad en el rango bajo de pH, lo mismo que las β -glucosidasas informadas para esta misma planta (Reddy et al., 1973) y para muchas otras especies (Heyworth y Walker, 1962; Hösel y Barz, 1975; Marcinowski y Grisebach, 1978; Kalinowska y Wojciechowski, 1978; Cooke et al., 1978; Hösel et al., 1978; Hemscheidt y Zenk, 1980; Himmel et al., 1986; Shoseyov et al., 1988). La temperatura óptima de actividad fue de 30°C para la DIMBOA- β -glucosidasa y de 50°C para la PNP- β -glucosidasa, valores que aparentemente dependen de la especie y de la edad de la planta al momento del análisis, ya que en general estas enzimas tienen máximos entre 40 y 60°C para sustratos naturales y sintéticos (Marcinowski y Grisebach, 1978; Yoshioka y Hayashida, 1980; Himmel et al., 1986; Shoseyov et al., 1988).

Como se explicó previamente se utilizaron dos sustratos: el natural, presumiblemente específico, y uno sintético reconocidamente inespecífico (Scott et al., 1977). El uso de un sustrato sintético se consideró como una aproximación al valor de la actividad β -glucosidásica inespecífica presente en la planta y además, como un control en las experiencias de localización con el sustrato natural. El PNP-glucósido es de amplio uso en sistemas vegetales (Hösel y Barz, 1975; Himmel et al., 1986; Shoseyov et al., 1988) y animales (Pocsi y Kiss, 1988) para cuantificar β -glucosidasas que hidrolizan

glucósidos específicos. Según Hösel (1981), el empleo sólo de sustratos inespecíficos para determinar actividad β -glucosidasa contra determinados sustratos, constituye un ensayo erróneo que no permite dilucidar el papel exacto que estas enzimas tienen en el metabolismo secundario de las plantas. Debe mencionarse que debido a la ausencia de hidrólisis de la salicina, este sustrato no se considerará en la discusión posterior.

Debido a la utilización de un sustrato inespecífico y uno de elevada especificidad probable, era esperable encontrar siempre mayor actividad para el PNP-glucósido que para el DIMBOA-glucósido puesto que se suponía titular toda o casi toda la actividad del extracto. Los resultados indicaron que la actividad máxima para la PNP- β -glucosidasa siempre fue inferior a la máxima de DIMBOA- β -glucosidasa. Esto puede explicarse en parte como un efecto de la temperatura de ensayo de la PNP-glucosidasa que fue de 30°C, en circunstancias que su óptimo era de 50°C. En la literatura revisada se encontró que una misma fracción de enzima puede mostrar actividades relativas entre sustrato natural y PNP-glucósido similares (Hösel y Todenhagen, 1980), superior para el sintético (Podstolski y Lewak, 1970) o muy inferior (Hemscheidt y Zenk, 1980). Sin embargo, a medida que aumenta la purificación de las fracciones se incrementa la actividad del sustrato natural respecto al sintético (Nahrstedt et al., 1979; Hösel y Todenhagen, 1980), efecto que también se verificó para la DIMBOA- β -glucosidasa. Por otra parte, Hösel (1981) señala que

la actividad contra sustratos sintéticos puede ser baja o apenas detectable, razón por la cual siempre conviene utilizar los sustratos naturales.

Este comportamiento del extracto de maíz respecto a los distintos sustratos también se vio reflejado en los valores de K_m aparente obtenidos. Según se indicó previamente, la K_m aparente para el PNP-glucósido fue de 2 mM mientras que para el DIMBOA-glucósido alcanzó 11,9 mM. Se han informado casos en los que existe mayor afinidad hacia el PNP-glucósido que hacia el sustrato natural (Hughes y Maher, 1973; Marcinowski y Grisebach, 1978; Cooke et al., 1978; Nahrstedt et al., 1979), como también algunos con elevada afinidad por su sustrato (Podstolski y Lewak, 1970; Hösel y Barz, 1975; Hösel et al., 1978; Eksittikul y Chulavatnatol, 1988) y otros en que la inespecificidad es total (Selmar et al., 1987). La especificidad es entonces una característica relativa y parece depender de la especie más que del grupo químico al cual pertenece el glucósido.

La probabilidad de que la misma enzima tenga ambas actividades, como podría deducirse de los perfiles de elución de las columnas de purificación, sería un aspecto interesante de estudiar y que tiene relación con la especificidad contra el sustrato. Se desprende de la literatura revisada que son numerosos los casos en los que una enzima tiene dos o más actividades (Heyworth y Walker, 1962; Cooke et al., 1978; Hösel y Todenhagen, 1980; Selmar et al. 1987), razón por la cual sería esperable que así sucediera en fracciones

purificadas de maíz. Sin embargo, es necesario mencionar que en un experimento preliminar de análisis de PNP- β -glucosidasas se fraccionó un homogeneizado de maíz con sulfato de amonio entre 0 y 100 % de saturación, encontrándose 4 picos de elución para estas enzimas en Sephadex G-100 y demostrando que el pico aparecido en el ensayo mostrado en la Figura 13a y que corresponde a una precipitación entre 20 y 60 % de saturación, no representa la totalidad de PNP- β -glucosidasas existentes en maíz. Desde este último punto de vista, debe también considerarse la posibilidad de más de una β -glucosidasa presente en el tejido, como se ha sugerido para una serie de especies (Podstolski y Lewak, 1970; Hemscheidt y Zenk, 1980; Kakes, 1985) o bien, formas isoenzimáticas que hidrolizan el mismo glucósido con distinta afinidad según se ha informado en numerosos casos (Hughes y Maher, 1973; Hösel y Barz, 1975; Scott y Wan, 1977; Marcinowski y Grisebach, 1978; Hösel et al., 1978; Kalinowska y Wojciechowski, 1978). Para definir la presencia de una β -glucosidasa inespecífica, más de una con actividades diferentes o isoenzimas con especificidad diferencial para un mismo sustrato, debiera purificarse la actividad para entonces realizar los análisis de rutina correspondientes a cada posibilidad.

Se ha tratado de explicar el amplio espectro de acción de las β -glucosidasas, concluyéndose que poseen un solo centro activo con un sitio catalítico y uno de ligamiento de la glucosa (Walker y Axelrod, 1978; Pocsi y Kiss, 1988) con la posible participación de un grupo sulfhidrilo (Eksittikul y

Chulavatnatol, 1988). Sin embargo, como la determinante del ligamiento del glicósido es la estructura de la aglicona (Pocsi y Kiss, 1988), sería ésta la que delimitaría el grado de especificidad de la enzima.

4.2.2.2. Distribución

Lo mismo que el DIMBOA-glicósido, las DIMBOA- β -glucosidasas se encontraron tanto en el parénquima como en el cilindro vascular. Son escasas las referencias respecto a este grupo de enzimas en relación a los ácidos hidroxámicos. Mace (1973) localizó histoquímicamente β -glucosidasas en maíz tratando de relacionarlas con estos compuestos, sin embargo, no utilizó el sustrato natural sino que el 6-bromo-2-naftil- β -glicósido e identificó su ubicación mediante una reacción colorimétrica de la aglicona en cortes de tejido radicular. Con esta técnica, de escasa precisión comparada con la inmunofluorescencia o con el fraccionamiento tisular o celular, este autor reveló actividad β -glucosidasa visible al microscopio óptico a nivel de vaina vascular y de citoplasma, la que podría considerarse inespecífica debido al sustrato utilizado.. En *Lotus corniculatus* se ha encontrado actividad β -glucosidasa contra glicósidos cianogénicos a nivel de floema y de citoplasma parenquimático (ref. Kakes, 1985). Probablemente las β -glucosidasas dentro del cilindro vascular encontradas en maíz estén en el floema, al igual que el glicósido, generando el DIMBOA responsable de la toxicidad o repelencia contra las plagas de áfidos observadas por Zúñiga (comunicación personal).

En el análisis de compartimentación celular de β -glucosidasas se comparó el contenido de estas enzimas en el protoplasto con el de vacuolas aisladas. Según Marty et al. (1980), al considerar el porcentaje de actividad en la vacuola o en el protoplasto debe considerarse la presencia de inhibidores o activadores que enmascaren la actividad real de las fracciones. Tomando en cuenta este aspecto, en una etapa inicial se utilizó también otro amortiguador que contenía estabilizadores como β -mercaptoetanol o BSA y un inhibidor de proteasas (PMSF 0,5 mM). Sin embargo, no se detectaron mayores diferencias con el amortiguador acetato pH 5,0 recomendado en la literatura para distintos tipos vegetales y que se utilizó para todo el desarrollo del trabajo. Es necesario mencionar que la actividad contra FNP-glucósido medida en este amortiguador se mantuvo estable por más de 72 horas a 4°C luego de la extracción, pero que la actividad contra DIMBOA-glucósido comenzó a reducirse alrededor de las 35 horas desde la extracción, encontrándose por lo general oxidación del preparado a pesar de la utilización de antioxidantes. Este comportamiento obligó a trabajar siempre con preparaciones frescas.

La primera aproximación para analizar la vacuola como posible compartimiento enzimático fue la entregada por los experimentos de centrifugación diferencial. En este análisis se trabajó con preparaciones crudas de membrana a las cuales se les agregó Triton X-100 además de otros detergentes que no alteraron la lectura de actividad lograda con Triton (Nonidet

P-40 y Tween-20, datos no mostrados). El objetivo de utilizar Triton X-100 fue el de solubilizar enzima que pudiera estar asociada con la fracción membranosa.

El protocolo de centrifugación se basó sobre literatura referente a gramíneas y en especial para maíz. El amortiguador de extracción acetato mostró resultados similares a los obtenidos con amortiguador fosfato.

La pella obtenida por centrifugación a 1.085 x g contiene núcleo, fragmentos grandes de pared y de membrana y almidón (Leonard y van der Woude, 1976; Dohrman et al., 1978). En esta fracción la actividad para β -glucosidasas contra los dos sustratos fue baja y se puede atribuir más bien a la presencia de restos de tejido que a una actividad propia ligada a la pared celular. Existen sin embargo, referencias que señalan presencia de β -glucosidasas de alta especificidad asociadas a paredes a partir de preparaciones crudas precipitadas a 20.000 x g de células de *Cicer arietinum* (Hösel et al., 1978) y de *Picea abies* (Marcinowski y Grisebach, 1978), desde donde se liberaron luego de un tratamiento con NaCl 0,5-0,6 M. En ambos casos las β -glucosidasas encontradas hidrolizaron preferentemente la coniferina, un glucósido precursor de la lignina. Tanto *C. arietinum* como *P. abies* sufren lignificación de las células originales de vasos y traqueidas y por lo tanto, desde el punto de vista de la utilización del glucósido en el metabolismo, la localización de las β -glucosidasas en las paredes es consistente con su participación en la lignificación de los tejidos.

De acuerdo a una revisión de Pierrot y Wielink (1977), la aparición de enzimas en residuos insolubles como la pared celular puede ser errónea con respecto a su localización *in vivo*, debido a artefactos durante la preparación como ligamiento de enzimas intracelulares por adsorción o por enlace iónico o por precipitación con otras moléculas. Estos autores trabajaron con células completas en cultivo de *Convolvulus arvensis* encontrando un número alto de β -glucosidasas intra y extracelulares.

En plántulas de maíz de tres días de edad, Nagahashi *et al.* (1985) detectaron que la actividad de PNP- β -glucosidasas asociadas a fracciones crudas de paredes obtenidas por centrifugación del homogeneizado a 1.000 x g, dependía fuertemente del pH del medio de extracción. Estos autores encontraron un 3,3 % de actividad a pH 6,0 y 18,7 % a pH 7,7, lo que implica presencia de enzima ligada solubilizable al reducir el pH. Nagahashi *et al.* (1985) concluyeron que la ausencia de actividad para esta fracción en maíz correspondía a un lavado excesivo de la pella o a un amortiguador de extracción de pH bajo. Sin embargo, encontraron que por centrifugación en gradiente de sacarosa esta actividad aparecía ligada a una fracción de densidad diferente a la de la pared, sugiriendo finalmente que podría corresponder a la red microtrabecular del citoplasma o a la membrana plasmática. En definitiva, podría interpretarse como una contaminación citoplasmática.

En este trabajo se utilizó un amortiguador a pH 5,0, además

de lavar 3 veces la pella. Considerando la hipótesis de Nagahashi et al. (1985), en la pella 1.085 no se habría detectado actividad por estas razones, a pesar de usar Triton. Sin embargo, al analizar esta pella extraída con Triton en amortiguador pH 7,2 no se observaron diferencias con el análisis a pH 5,0. Es probable que esta desigualdad se deba a la edad de las plantas a la cual se hizo el experimento, que en este caso fue de 10 días luego de la emergencia. Se sabe que la edad de las plantas y el órgano utilizado alteran la distribución de las β -glucosidasas en centrifugación (Marcinowski y Grisebach, 1978).

Otras glicosidasas también se han encontrado ligadas a la pared celular. En *Oriza sativa* se informó de una α -glucosidasa fuertemente retenida y no soluble con detergentes, urea o NaCl, concluyéndose que se trata de una enzima propia de la pared y no del metabolismo citoplasmático (Yamasaki y Konno, 1987). Bolwell (1988) menciona una serie de glicosidasas presentes en la pared y provenientes, probablemente de excreción interna, del citoplasma y que participan en el metabolismo de la pared celular.

La pella obtenida por sedimentación a 12.100 x g corresponde a la fracción cruda mitocondrial o de organelos (Leonard y Hotchkiss, 1976; Nagahashi et al., 1978; Nagahashi y Hiraike, 1982; Nagahashi et al., 1985; Mandala y Taiz, 1985; Cooper y Ho, 1987). En esta fracción la actividad también fue baja coincidiendo con los datos obtenidos para compartimentación celular que mostró que las mitocondrias no presentaron

actividad β -glucosidásica, mientras que en el cloroplasto la actividad fue apenas detectable para PNP- β -glucosidasa, como se ha determinado también en otras especies (Nisius, 1988).

La pella sedimentada por centrifugación a 120.000 x g corresponde a una preparación cruda de membrana microsomal que incluye plasmalema y tonoplasto entre otras fracciones (Nagahashi et al., 1978; Nagahashi y Hiraike, 1982; Nagahashi et al., 1985; Mandala y Taiz, 1985; Larson y Bussard, 1986; Gallagher y Leonard, 1987; Cooper y Ho, 1987). En esta pella se detectó un aumento en la actividad enzimática la que, sin embargo, resultó no ser significativa frente al alto porcentaje obtenido en el líquido sobrenadante. Se sabe de hidrolasas que sedimentan con el tonoplasto durante la centrifugación (Guy y Kende, 1984) desde donde son liberadas por altas concentraciones de NaCl (Kaiser et al., 1986).

En maíz, Nagahashi y Baker (1984) determinaron un 5 % de actividad PNP- β -glucosidásica ligada a fracciones crudas de mitocondrias y microsomal, presumiblemente asociada con membranas subcelulares o con organelos. Al realizar un experimento de centrifugación en gradiente de sacarosa se encontró que esta actividad no permaneció asociada a ninguna enzima marcadora, concluyéndose que se trataba de una PNP- β -glucosidasa soluble citosólica adherida a membranas o perteneciente a un compartimiento de estructura frágil.

Finalmente, en el líquido sobrenadante de 120.000 x g se recuperó prácticamente la totalidad de la actividad β -glucosidásica. Se ha informado de β -glucosidasas solubles. Por

ejemplo, en *Melilotus alba* un 85 % de la β -glucosidasa que hidroliza el glucósido de cumarina permaneció en el líquido sobrenadante de 10.000 x g (Oba et al., 1981). En *Hevea brasiliensis* se recuperó un 97 % de la linamarasa que degrada al glucósido cianogénico linamarina en el líquido sobrenadante de 30.000 x g, no alterándose esta distribución por la adición de Triton X-100 1% (Selmar et al., 1987). En maíz se encontró la mayor parte de la PNP- β -glucosidasa soluble considerada citosólica (Nagahashi y Baker, 1984).

Por otra parte, el análisis por HPLC de cada una de las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial demostró que el DIMBOA-glucósido es también un compuesto soluble aparentemente no asociado a membranas, lo cual es esperable dada su naturaleza hidrofílica. Al respecto sin embargo, sería de interés conocer la forma en la cual este compuesto se encuentra en el citoplasma. Experimentos preliminares mostraron asociación de DIMBOA a fracciones microsomales crudas, lo cual podría ser indicativo de su existencia dentro de un compartimiento membranoso más que libre en el citoplasma. No obstante, es necesario repetir dichos experimentos utilizando el glucósido.

El análisis de compartimentación se enfocó hacia el aislamiento de vacuolas en primera instancia, debido a que la mayor parte de la enzima demostró ser soluble y porque la separación de vacuolas es menos compleja que el aislamiento de otras fracciones.

Los resultados mostraron que la DIMBOA- β -glucosidasa estaba

en su totalidad dentro de la vacuola, mientras que la PNP- β -glucosidasa se presentaba en este compartimiento sólo en un 62%. Numerosas publicaciones mencionan que la vacuola tiene un carácter fundamentalmente hidrolítico (Matile, 1978; Marty et al., 1980; Boller y Wiemken, 1986) con alto porcentaje de glicosidasas (Boller y Kende, 1979).

De acuerdo a la literatura revisada, las β -glucosidasas se encuentran restringidas más bien a un solo compartimiento ya sea intra o extracelular que presentes en varias fracciones. Según esto, sería esperable entonces encontrar enzimas con actividad aparentemente específica para el glucósido sólo dentro de la vacuola. Por otra parte, se mencionó la posibilidad de que esta enzima tuviera actividad para los dos sustratos utilizados, lo cual no invalida el encontrar PNP- β -glucosidasas fuera de la vacuola en un 38 %. Esto último debido a que, como se explicó, las PNP- β -glucosidasas purificadas no corresponderían a todas las enzimas capaces de hidrolizar este sustrato presentes en la célula. En *Ricinus communis* se encontró sólo un 64 % de actividad PNP- β -glucosidásica en la vacuola (Nishimura y Beevers, 1978; 1979), suponiéndose el resto en alguna fracción extravacuolar. Se sabe de actividad β -glucosidásica en citoplasma de *Avena* (Nisius, 1988), *Hippeastrum* (Butcher et al., 1977) y de varias β -glicosidasas en *Phaseolus vulgaris* (Sturm et al., 1987).

Al analizar el medio de digestión de la hoja pudo observarse ausencia total de actividad DIMBOA- β -glucosidásica mientras que la hidrólisis del PNP-glucósido fue elevada, resultado que

permite sugerir importante actividad PNP- β -glucosidásica que no corresponde a ruptura de protoplastos, sino más bien a enzima presente en las paredes o espacios intercelulares del maíz, es decir, en el apoplasto.

La actividad enzimática a partir de fluidos del apoplasto se ha informado en algunas especies. En *Lupinus albus*, maíz y *Cucurbita pepo* se encontraron isoperoxidasas ácidas liberadas por medio neutro a partir de paredes y espacios intercelulares donde cumplirían algún papel en el metabolismo de la pared (Ros Barceló et al., 1988). En fluido apoplástico de trigo Holden y Rohringer (1985) detectaron diferentes glicosidasas, entre ellas una PNP- β -glucosidasa que no correspondía a contaminación citoplasmática sino a una enzima extracelular. También en *Hordeum vulgare* y *Avena sativa* se han detectado diversas enzimas apoplásticas como peroxidasas, PNP- β -glucosidasas y arilesterasas (Li et al., 1989). Se mencionaron en una discusión previa (4.2.2.2.) una serie de especies que contenían β -glucosidasas ligadas a sus paredes celulares, lo cual también se considera de origen apoplástico.

Se ha informado de β -glucosidasas extracelulares en aquellos casos donde existe incompatibilidad con un glucósido dentro del mismo compartimiento. En especies que contienen glucósidos cianogénicos como *Trifolium repens* (Kakes, 1985), y *Phaseolus lunatus* (Frehner y Conn, 1987) y glucósidos cumarínicos como *Melilotus alba* (Oba et al., 1981), las β -glucosidasas están restringidas prácticamente en su totalidad al espacio apoplástico.

En maíz también se ha detectado liberación de enzimas hacia el espacio extracelular. Miernyk (1987) trabajó con cultivos *in vitro* de células de endosperma y encontró una serie de hidrolasas excretadas al medio, entre ellas varias glicosidasas y una PNP- β -glucosidasa, mientras que las enzimas del metabolismo intermedio o de reserva no fueron liberadas. Según el autor, esto refleja un patrón ordenado de excreción que obedece a la necesidad de un compartimiento lítico análogo a la vacuola.

En este trabajo se detectó presencia de PNP- β -glucosidasas apoplásticas, mientras que no lograron detectarse DIMBOA- β -glucosidasas, pudiendo deberse esto último a una dilución excesiva del medio de digestión examinado. Al respecto, en *Avena sativa* se encontró una concentración mucho mayor de PNP- β -glucosidasas apoplásticas que en *Hordeum vulgare* (Li et al., 1989), siendo ambas especies que carecen de ácidos hidroxámicos (ref. Queirolo, 1983). Sin embargo, *A. sativa* presenta glucósidos de saponinas de gran toxicidad contra patógenos que también actúan por acción de PNP- β -glucosidasas (Nisius, 1988), mientras que *H. vulgare* contiene el alcaloide gramina (Zúñiga, 1987) que no requiere hidrólisis para gatillar su actividad. Según Li et al. (1989), la diferencia en actividad β -glucosidásica interespecífica puede tener importancia de acuerdo a la fisiología de cada especie y, de acuerdo a esto, la relevancia fisiológica de PNP- β -glucosidasas presentes en el apoplasto requiere una revisión cuidadosa.

4.3. Compartimentación

La compartimentación tisular o celular de metabolitos potencialmente tóxicos tiene importancia fundamental para la estabilidad de las funciones metabólicas de la planta. Aún cuando el conocimiento de compartimentación de glucósidos secundarios es escaso, existen algunas referencias interesantes de exponer.

Los casos mejor ejemplificados se refieren a la compartimentación de glucósidos cianogénicos. La cianogénesis ocurre cuando el glucósido precursor es hidrolizado por una β -glucosidasa y por una reacción posterior de la aglicona se produce HCN (Conn, 1981), compuesto que inhibe la respiración en animales y vegetales (Stryer, 1988). Esta transformación sucede sólo cuando se ha producido ruptura de los tejidos, de manera que la compartimentación es evidente. Los estudios realizados en *Sorghum bicolor* por Kojima et al. (1979) concluyeron que el glucósido dhurrina se encontraba exclusivamente en la vacuola de las células epidérmicas de la hoja, mientras que la dhurrina- β -glucosidasa se detectaba en más de un 95% en las células del mesófilo, aparentemente asociadas a cloroplastos (Thayer y Conn, 1981), sosteniendo entonces un modelo de compartimentación tisular. La linamarina es otro glucósido cianogénico presente en *Phaseolus lunatus* y *Hevea brasiliensis* donde el modelo de compartimentación propuesto es celular, ya que en ambas especies el glucósido es intracelular y la linamarina- β -glucosidasa es apoplástica (Frehner y Conn, 1987; ref. Selmar et al., 1988). En este

último caso también se ha sugerido un modelo de transporte apoplástico del glucósido, que se sabe se mueve desde los cotiledones hacia otros puntos de la planta vía xilema (Selmar et al., 1988).

Otra de las plantas analizadas respecto a la compartimentación es *Melilotus alba* (Oba et al., 1981). Esta especie contiene cumaril- y cumarinil-glucósidos que al hidrolizarse por β -glucosidasas liberan ácido cumárico que se lactoniza a cumarina, compuesto de conocido poder anticoagulante (Brown, 1981). Se encontró que todos los tejidos contenían tanto el glucósido como las β -glucosidasas. Al comparar las actividades del homogeneizado versus protoplastos, se encontró entre 1-2 % de ésta en protoplastos deduciéndose que se trataba de una enzima extracelular. Se determinó también que el glucósido se presentaba en la vacuola y las glucosil-transferasas en el citoplasma, de manera que propusieron la glicosilación citoplasmática de los glucósidos y su posterior transporte hacia la vacuola, donde estarían separados de las β -glucosidasas apoplásticas.

En algunas especies del género *Avena* se ha estudiado la compartimentación de glucósidos de saponina y de PNP- β -glucosidasas. Nisius (1988) encontró en especies de *Avena* que presentaban avenacósidos con actividad β -glucosidasa detectable con fuerte actividad para PNP-glucósido, una correlación positiva con la presencia de avenacósidos. Este autor demostró compartimentación celular dirigida hacia la

protección contra microorganismos fitotóxicos, postulando que las β -glucosidasas se encuentran como agregados solubles en los etioplastos, mientras que los avenacósidos se presentan dentro de la vacuola.

En relación al DIMBOA-glucósido originario del maíz, en este trabajo se determinó que su hidrólisis genera un compuesto altamente tóxico que inhibe la fotosíntesis y la respiración, hecho que constituye una razón que avala la existencia de compartimentación.

Según los resultados encontrados se puede proponer un modelo intracelular de compartimentación. Como se desconoce la vía y lugar de síntesis de DIMBOA, el modelo se considera válido sólo para aquellas células vacuoladas propias de tejido adulto. En estas células el DIMBOA-glucósido se encontraría localizado en el citoplasma aparentemente libre aunque no se descarta la posibilidad de su asociación a membranas. Es necesario considerar que también en esta fracción se encontrarían FNP- β -glucosidasas que según los resultados no hidrolizarían el glucósido. Las DIMBOA- β -glucosidasas, por otra parte, se encontrarían en la vacuola desde donde se liberarían al existir ruptura de la compartimentación, ya sea provocada por daño mecánico o por pestes. En este momento, el contenido vacuolar difundiría hacia el citoplasma existiendo contacto enzima-glucósido con liberación posterior de DIMBOA. Se desconoce el efecto que produciría DIMBOA en las células cercanas al área dañada, pero dependerá de su capacidad de movimiento dentro del tejido. Desde este punto de vista, sería

interesante medir la permeabilidad de la membrana plasmática al paso del DIMBOA, que si es alta, debería ser glucosilado en forma inmediata.

Este trabajo demuestra la existencia de la compartimentación como un mecanismo que regula la distribución de un compuesto potencialmente tóxico, a través de la separación de su precursor glucosídico desde las β -glucosidasas que lo activan. Esto hace referencia al grado de organización de la célula vegetal superior, cuya complejidad necesita estudiarse utilizando metodologías no destructivas que permitan simular o interpretar su comportamiento *in vivo*.

4.4. Consideraciones generales

Como ya se mencionó en la introducción, los ácidos hidroxámicos parecen cumplir una función protectora importante en aquellas plantas que los sintetizan. En este trabajo se analizó la acción y distribución a nivel celular del glucósido que por hidrólisis genera DIMBOA, una molécula nociva tanto para la peste atacante como para la propia planta. Sin embargo, aún cuando no es de interés directo en esta tesis, es necesario mencionar que al proponer una molécula como deseable en otras especies o géneros de importancia agrícola, debe considerarse por una parte, la paridad de resultados laboratorio-terreno y por otra, las consecuencias indirectas que su presencia pudiera acarrear a la planta en cuestión.

Desde este último punto de vista y aunque la mayor parte de la literatura revisada concuerda con la hipótesis de que los metabolitos secundarios constituyen mecanismos de defensa

útiles, algunas evidencias ponen en duda la función protectora que se les ha asignado.

Se sabe de la existencia de pestes capaces de destoxificar glucósidos cianogénicos que se supone han tenido una interacción coevolutiva estrecha (Spencer, 1987). Este hecho implica una defensa eficiente sólo contra aquellas pestes que ocasionalmente se alimenten de sus hojas, permitiendo el ataque permanente de herbívoros resistentes.

Un efecto contraproducente de los metabolitos secundarios está ejemplificado en *Hevea brasiliensis*. En esta especie Lieberei et al. (1989) estudiaron el efecto de la cianogénesis gatillada por un patógeno sobre la resistencia de la planta. Se encontró que si bien la cianogénesis impidió el avance del hongo, también inhibió la formación de la fitoalexina escopoletina, activa defensa metabólica de esta especie. Debe considerarse sin embargo, la difusión que el compuesto en particular tenga en el tejido.

La función defensiva propuesta para el DIMBOA en vegetales requiere de revisión en algunos casos particulares. Se sabe que el DIMBOA protege a los cereales trigo y maíz contra el ataque de áfidos, cuya importancia radica en el daño mecánico que producen y en que portan e inoculan el virus del enanismo amarillo de la cebada (Tollenar y Hepp, 1982) cada vez que inyectan el estilete en el floema para alimentarse (Montlor y Gildow, 1986). Los áfidos tienen distintos hábitos de alimentación pero se caracterizan por "probar" el alimento antes de ingerirlo (Zúñiga, 1987). Por otra parte, se sabe que

un cultivar provoca toxicidad o repelencia a los áfidos si su contenido de ácidos hidroxámicos es medio (<1 mM) o alto (>1 mM), respectivamente (Argandoña et al., 1983). Antes de ser repelido desde un cultivar con alta concentración de compuesto, un áfido inyecta el tejido muchas más veces comparado con cultivares de menor contenido (Zúñiga et al., 1988). Se deduce entonces que el daño mecánico aumenta y que la probabilidad de transmisión del virus se eleva si el áfido inyecta el floema, cuando se trata de cultivares con alta concentración de ácidos hidroxámicos. Esto, además del radio de daño producido por la liberación del DIMBOA al tejido que dependerá de su tasa de difusión en el área junto con su capacidad de penetración a las células vecinas intactas. Por lo tanto, lo que se considera como factor de resistencia a nivel de plaga, puede constituir un factor de susceptibilidad a nivel de productividad debido a la reducción de la superficie fotosintética y/o a nivel viral por la transmisión acrecentada del patógeno

De lo anterior puede deducirse que la evaluación de una molécula hipotéticamente protectora debe ser cuidadosa, ya que su función defensiva puede ser relativa y estar sujeta a factores bióticos y abióticos ajenos a su reactividad química.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo en las condiciones mencionadas, puede concluirse que:

- DIMBOA-glucósido es un compuesto inocuo para el proceso de transporte de electrones en mitocondrias y cloroplastos de maíz. DIMBOA en cambio, produjo inhibición de las cadenas transportadoras de electrones en ambos organelos. No se descarta la acción de DIMBOA sobre la ATPasa a concentraciones iguales o superiores a las utilizadas en este trabajo.
- En maíz (*Zea mays* L.) cv. T129s existe compartimentación subcelular de DIMBOA-glucósido respecto a las DIMBOA- β -glucosidasas. El glucósido se encuentra en el espacio extravacuolar mientras que las β -glucosidasas se detectan sólo intravacuolarmente.

6. BIBLIOGRAFIA

- Aranda G., Gauvrit C., Cesario M., Guilhem J., Pascard C. y Tran Huu Dau M.E. 1983. Biological activity of the two geometrical isomers of methomyl on maize mitochondria. *Phytochemistry* 22:2431-2435.
- Argandoña V.H., Corcuera L.J., Niemeyer H.M. y Campbell B.C. 1983. Toxicity and feeding deterrence of hydroxamic acids from gramineae in synthetic diets against the greenbug, *Schizaphis graminum*. *Ent. exp. & appl.* 34:134-138.
- Argandoña V.H. y Corcuera L.J. 1985. Distribution of hydroxamic acids in *Zea mays* tissues. *Phytochemistry* 24:177-178.
- Argandoña V.H., Zúñiga G.E. y Corcuera L.J. 1987. Distribution of gramine and hydroxamic acids in barley and wheat leaves. *Phytochemistry* 26:1917-1918.
- Arnon D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* 24:1-15.
- Bailey B.A. y Larson R.L. 1989. Hydroxamic acid glucosyltransferases from maize seedlings. *Plant Physiol.* 90:1071-1076.
- Balke N.E., Davis M.P. y Lee C.C. 1987. Conjugation of allelochemicals by plants: enzymatic glucosylation of salicylic acid by *Avena sativa*. En *Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry*. Ed. Waller G.R. American Chemical Society, Washington. 214-227.
- Barbier M. 1979. *Introduction to Chemical Ecology*. Longman Group Limited, London.
- Barnes J.P., Putman A.R., Burke B.A. y Aasen J.P. 1987. Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage. *Phytochemistry* 26:1385-1390.
- Bell E.A. 1981. Physiological role(s) of secondary (natural) products. En *The Biochemistry of Plants*. Ed. Conn E.E. Vol. 7. Academic Press. 1-19.
- Boller T. y Kende H. 1979. Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. *Plant Physiol.* 63:1123-1132.
- Boller T. y Wiemken A. 1986. Dynamics of vacuolar compartmentation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37:137-164.

- Bolwell G.F. 1988. Synthesis of cell wall components: aspects of control. *Phytochemistry* 27:1235-1253.
- Boudet A.M., Canut H. y Olibert G. 1981. Isolation and characterization of vacuoles from *Melilotus alba* mesophyll. *Plant Physiol.* 68:1354-1358.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brown S.A. 1981. Coumarins. **En** *The Biochemistry of Plants*. Ed. Conn E.E. Vol. 7. Academic Press. 269-300.
- Butcher H., Wagner G.F. y Siegelman H.W. 1977. Localization of acid hydrolases in protoplasts. Examination of the proposed lysosomal function of the mature vacuole. *Plant Physiol.* 59:1098-1103.
- Conn E.E. 1981. Cyanogenic glycosides. **En** *The Biochemistry of Plants*. Ed. Conn E.E. Vol. 7. Academic Press. 479-500.
- Cooke R.D., Blake G.G. y Battershill J.M. 1978. Purification of cassava linamarase. *Phytochemistry* 17:381-383.
- Cooper F. y Ho T-H.D. 1987. Intracellular localization of heat shock proteins in maize. *Plant Physiol.* 84:1197-1203.
- Corcuera L.J., Argandoña V.H. y Zúñiga G.E. 1987. Resistance of cereals crops to aphids: role of allelochemicals. **En** *Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry*. Ed. Waller G.R. American Chemical Society, Washington. 129-135.
- Dabed R.G., Toral M.I., Corcuera L.J. y Niemeyer H.M. 1983. Complexes of bivalent cations with a hydroxamic acid from maize extracts. *Polyhedron* 2:106-108.
- Dennis D.T. y Myernick J.A. 1982. Compartmentation of nonphotosynthetic carbohydrate metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33:27-50.
- Deus-Neumann B. y Zenk M.H. 1986. Accumulation of alkaloids in plant vacuoles does not involve an ion-trap mechanism. *Planta* 167:44-53.
- Dohrmann U., Hertel R. y Kowalik H. 1978. Properties of auxin binding sites in different subcellular fractions from maize coleoptiles. *Planta* 140:97-106.

- Douce R., Brouquisse R. y Journet E-P. 1987. Electron transfer and oxidative phosphorylation in plant mitochondria. En *The Biochemistry of Plants*. Ed. Davies D.D. Vol. 11. Academic Press Inc. 177-210.
- Echeverría E. y Valich J. 1988. Carbohydrate and enzyme distribution in protoplasts from valencia orange juice sacs. *Phytochemistry* 27:73-76.
- Eksittikul T. y Chulavatnatol M. 1988. Characterization of cyanogenic β -glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Arch. Biochem. Biophys.* 266:263-269.
- Frehner M. y Conn E. 1987. The linamarin β -glucosidase in Costa Rica wild lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) is apoplasmic. *Plant Physiol.* 84:1296-1300.
- Gallagher S.R. y Leonard R.T. 1987. Electrophoretic characterization of a detergent-treated plasma membrane fraction from corn roots. *Plant Physiol.* 83:265-271.
- Guy M. y Kende H. 1984. Conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by isolated vacuoles of *Pisum sativum* L. *Planta* 160:281-287.
- Harbone J.B. 1982. *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press.
- Hashimoto Y., Shudo K., Okamoto T., Nagao M., Takahashi Y. y Sugimura T. 1979. Mutagenicities of 4-hydroxy-1,4-benzoxazinones naturally occurring in maize plants and of related compounds. *Mutation Res.* 66:191-194.
- Hemscheidt T. y Zenk M.H. 1980. Glucosidases involved in indole alkaloid biosynthesis of *Catharanthus* cell cultures. *FEBS Letters* 110:187-191.
- Hendrickson J.B. 1965. *The Molecules of Nature*. W.A. Benjamin, Inc. New York.
- Hess B. 1980. Organization of biochemical reactions: from microspace to macroscopic structures. En *Cell Compartmentation and Metabolic Channeling*. Ed. Nover L., Lynen F. y Mothes K. Veb Gustav Fischer Verlag Jena. Elsevier/North Holland Biomedical Press. 75-92.
- Heyworth R. y Walker P.G. 1962. Almond-emulsin β -D-glucosidase and β -D-galactosidase. *Biochem. J.* 83:331-335.

- Himmel M.E., Tucker M.P., Lastick S.M., Oh K.K., Fox J.W., Spindler D.D. y Grohmann K. 1986. Isolation and characterization of a 1,4- β -glucan glucohydrolase from the yeast, *Torulopsis wickerhamii*. *J. Biol. Chem.* 28:12948-12955.
- Hinkle P.C. y McCarty R.E. 1978. How cells make ATP. *Sci. Amer.* 238:104-123.
- Hofman J. y Hofmanova O. 1969. 1,4-benzoxazine derivatives in plants. Sephadex fractionation and identification of a new glucoside. *Eur. J. Biochem.* 8:109
- Hofman J. y Hofmanova O. 1971. 1,4-benzoxazine derivatives in plants. Absence of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3(4H)-one from uninjured *Zea mays* plants. *Phytochemistry* 10:1441-1444.
- Holden D.W. y Rohringer R. 1985. Peroxidases and glycosidases in intercellular fluids from noninoculated and rust-affected wheat leaves. *Plant Physiol.* 79:820-824.
- Hösel W. 1981. Glycosylation and glycosidases. En *The Biochemistry of Plants*. Ed. Conn E.E. Vol. 7. Academic Press. 725-753.
- Hösel W. y Barz W. 1975. β -glucosidases from *Cicer arietinum* L. *Eur. J. Biochem.* 57:607-616.
- Hösel W., Surholt E. y Borgmann E. 1978. Characterization of β -glucosidase isoenzymes possibly involved in lignification from chick pea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures. *Eur. J. Biochem.* 84:487-492.
- Hösel W. y Todenhagen R. 1980. Characterization of a β -glucosidase from *Glycine max* which hydrolases coniferin and syringin. *Phytochemistry* 19:1349-1353.
- Hughes M.A. y Maher E.P. 1973. Studies on the nature of the Li locus in *Trifolium repens* L. *Biochem. Genetics.* 8:1-12.
- Ibrahim R.K., De Luca V., Khouri H., Latchinian L., Brisson L. y Charest P.M. 1987. Enzymology and compartmentation of polymethylated flavonol glucosides in *Chrysosplenium americanum*. *Phytochemistry* 26:1237-1245.
- Ionnau Y.M., Dauterman W.C. y Tucker W.P. 1980. Degradation of Diazinon by 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one in maize. *Phytochemistry* 19:1607-1612.

- Kaiser G., Martinoia E., Schmitt J.M., Hinch D.K. y Heber U. 1986. Polypeptide pattern and enzymatic character of vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts. *Planta* 169:345-355.
- Kakes P. 1985. Linamarase and other β -glucosidases are present in the cell walls of *Trifolium repens* L. leaves. *Planta* 166:156-160.
- Kalinowska M. y Wojciechowski Z.A. 1978. Purification and some properties of steryl β -D-glucoside hydrolase from *Sinapis alba* seedlings. *Phytochemistry* 17:1533-1537.
- Kempner E.S. 1980. Metabolic compartments and their interactions. En Cell Compartmentation and Metabolic Channeling. Ed. Nover L., Lynen F. y Mothes K. Veb Gustav Fischer Verlag Jena. Elsevier/North Holland Biomedical Press. 217-224.
- Kojima M., Poulton J.E., Thayer S.S. y Conn E.E. 1979. Tissue distribution of dhurrin and of enzymes involved in its metabolism in leaves of *Sorghum bicolor*. *Plant Physiol.* 63:1022-1028.
- Larson R.L. y Bussard J.B. 1986. Microsomal flavonoid 3'-monooxygenase from maize seedlings. *Plant Physiol.* 80:483-486.
- Lawlor D.W. 1987. Photosynthesis: Metabolism, Control and Physiology. Longman Scientific & Technical- John Wiley & Sons.
- Leonard R.T. y Hotchkiss C.W. 1976. Cation stimulated adenosine triphosphatase activity and cation transport in corn roots. *Plant Physiol.* 58:331-335.
- Leonard R.T. y Van der Woude W.J. 1976. Isolation of plasma membranes from corn roots by sucrose density gradient centrifugation. *Plant Physiol.* 57:105-114.
- Li Z-Ch., McClure J.W. y 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.
- Lieberer R., Biehl B., Giesemann A. y Junqueira N.T.V. 1989. Cyanogenesis inhibits active defense reactions in plants. *Plant Physiol.* 90:33-36.
- Mace M.E. 1973. Histochemistry of beta-glucosidase in isolines of *Zea mays* susceptible or resistant to northern corn leaf blight. *Phytopathology* 63:243-245.

- Mandala S. y Taiz L. 1985. Proton transport in isolated vacuoles from corn coleoptiles. *Plant Physiol.* 78:104-109.
- Mann J. 1980. Secondary Metabolism. Clarendon Press, London.
- Marcinowski S. y Grisebach H. 1978. Enzymology of lignification. *Eur. J. Biochem.* 87:37-44.
- Martinoia E., FLügge V.I., Kaiser G., Heber U. y Heldt H.W. 1985. Energy dependent uptake of malate into vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts. *Biochem. Biophys. Acta* 806:311-319.
- Marty F., Branton D. y Leigh R.A. 1980. Plant vacuoles. *En The Biochemistry of Plants.* Ed. Tolbert N.E. Academic Press. 625-658.
- Matile P. 1978. Biochemistry and function of vacuoles. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29:193-213.
- Miernyk J.A. 1987. Extracellular secretion of acid hydrolases by maize endosperm cells grown in liquid medium. *J. Plant Physiol.* 129:19-32.
- Miles D. 1982. The use of mutations to probe photosynthesis in higher plants. *En Methods in Chloroplasts Molecular Biology.* Ed. Edelman et al. Elsevier Biomedical Press.
- Moller I.M. 1986. NADH dehydrogenases in plant mitochondria. *Physiol. Plant.* 67:517-520.
- Montlor C.B. y Gildow F.E. 1986. Feeding responses of two grain aphids to barley yellow dwarf virus in infected oats. *Entomol. exp. & app.* 42:63-69.
- Nagahashi G., Leonard R.T. y Thompson W.W. 1978. Purification of plasma membranes from roots of barley. *Plant Physiol.* 61:993-999.
- Nagahashi J. y Hiraike K. 1982. Effects of centrifugal force and centrifugation time on the sedimentation of plant organelles. *Plant Physiol.* 69:546-548.
- Nagahashi G. y Baker A. 1984. β -glucosidase activity in corn roots. *Plant Physiol.* 76:861-864.
- Nagahashi G., Seibles T.S. y Tu S-I. 1985. The pH dependent distribution of β -glucosidase activity in isolated particulated fractions. *Plant Sci.* 38:173-178.

- Nahrstedt A., Hösel W. y Walther A. 1979. Characterization of cyanogenic glucosides and β -glucosidases in *Triglochin maritima* seedlings. *Phytochemistry* 18:1137-1141.
- Neilands J.B. 1967. Hydroxamic acids in nature. *Science* 156:1443-1447.
- Niemeyer H.M. 1989. Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the gramineae. *Phytochemistry* 27:3349-3358.
- 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., Calcaterra N.B. y Roveri O.A. 1986. Inhibition of mitochondrial energy-linked reactions by 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA), a hydroxamic acid from gramineae. *Biochem. Pharmac.* 35:3909-3914.
- Nishimura M. y Beevers H. 1978. Hydrolases in vacuoles from castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 62:44-48.
- Nishimura M. y Beevers H. 1979. Hydrolysis of protein in vacuoles isolated from higher plant tissue. *Nature* 227:412-413.
- Nisius A. 1988. The stromacentre in *Avena* plastids: an aggregation of β -glucosidase responsible for the activation of oat-leaf saponins. *Planta* 173:474-481.
- Oaks A. y Bidwell R.G.S. 1970. Compartmentation of intermediary metabolites. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21:43-66.
- Oba K., Conn E.E., Canut H. y Boudet A.M. 1981. Subcellular localization of 2-(β -D-glucosyloxy)-cinnamic acids and the related β -glucosidase in leaves of *Melilotus alba* Desr. *Plant Physiol.* 68:1359-1363.
- Pérez F.J. y Niemeyer H.M. 1985. The reduction of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one by thiols. *Phytochemistry* 24:2963-2966.
- Pierrot H. y van Wielink J.E. 1977. Localization of glycosidases in the wall of living cells from cultured *Convolvulus arvensis* tissue. *Planta* 137:235-242.
- Focsi I. y Kiss L. 1988. Kinetic studies on the broad-specificity β -D-glucosidase from pig kidney. *Biochem. J.* 256:139-146.

- Podstolski A. y Lewak S. 1970. Specific phloridzin glucosidases from seeds and leaves of apple tree. *Phytochemistry* 9:289-296.
- Queirolo C. 1983. Acidos hidroxámicos cíclicos de gramíneas: distribución en la planta y efectos sobre la síntesis de adenosín-5'-trifosfato en cloroplastos. Tesis Licenciatura en Ciencias, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- Queirolo C.B., Andreo C.S., Vallejos R.H., Niemeyer H.M. y Corcuera L.J. 1981. Effects of hydroxamic acids isolated from graminæ on adenosine 5'triphosphate synthesis in chloroplasts. *Plant Physiol.* 68:941-943.
- Queirolo C.B., Andreo C.S., Niemeyer H.M. y Corcuera L.J. 1983. Inhibition of ATPase from chloroplasts by a hydroxamic acid from the graminæ. *Phytochemistry* 22:2455-2458.
- Raven P.H., Evert R.F y Eichhorn S.E. 1986. *Biology of Plants*. Worth Publishers, New York.
- Reddy M.N., Peterson P.A. y Tipton C.L. 1973. Activity of some hydrolytic enzymes in maize during development of southern leaf blight disease caused by *Helminthosporium maydis* race T. *Phytopathol.* 78:264-273.
- Robinson T. 1983. *The Organic Constituents of Higher Plants*. Cordus Press, North Amherst MA 01059.
- Ros Barceló A., Pedreño M.A., Muñoz R. y Sabater F. 1988. Lupin peroxidases. II. Binding of acidic isoperoxidases to cell walls. *Physiol. Plant.* 73:238-244.
- Rosenthal G.A. 1986. Defensa química de las plantas superiores. *Investigación y Ciencia* 114:70-76.
- Salisbury F.B. y Ross C.W. 1985. *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Company, California.
- Saunders J.A. 1979. Investigation of vacuoles isolated from tobacco. *Plant Physiol.* 64:74-78.
- Scott A.I., Lee S.L. y Wan W. 1977. Indole alkaloid biosynthesis: partial purification of aljmalicine synthetase from *Catharanthus roseus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75:1004-1009.

- Seigler D.S. 1981. Secondary metabolites and plant systematics. En *The Biochemistry of Plants*. Ed. Conn E.E. Vol. 7. Academic Press. 139-176.
- Selmar D., Lieberei R., Biehl B. y Voigt J. 1987. *Hevea* linamarase. A nonspecific β -glycosidase. *Plant Physiol.* 83:557-563.
- Selmar D., Lieberei R. y Biehl B. 1988. Mobilization and utilization of cyanogenic glycosides. *Plant Physiol.* 86:711-716.
- Schonbaum G.R., Bonner W.D., Storey B.T. y Bahr J.T. 1971. Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. *Plant Physiol.* 47:124-128.
- Sheen J-Y. y Bogorad L. 1985. Differential expression of the ribulose biphosphate carboxylase large subunit gene in bundle sheath and mesophyll cells of developing maize is influenced by light. *Plant Physiol.* 79:1072-1076.
- Shoseyov O., Bravdo B-A., Ikan R. y Chet I. 1988. Endo- β -glucosidase from *Aspergillus niger* grown on a monoterpene glycoside-containing medium. *Phytochemistry* 27:1973-1976.
- Sitte P. 1980. General principles of cellular compartmentation. En *Cell Compartmentation and Metabolic Channeling*. Ed. Nover L., Lynen F. y Mothes K. Veb Gustav Fischer Verlag Jena. Elsevier/North Holland Biomedical Press. 17-32.
- Somogyi M.A. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* 160:61.
- Spencer K. 1987. Specificity of action of allelochemicals: diversification of glycosides. En *Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry*. Ed. American Chemical Society. 275-288.
- Spilatro S.R. y Freiss J. 1987. Regulation of starch synthesis in the bundle sheath and mesophyll of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* 83:621-627.
- Stryer L. 1988. *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, New York.
- Sturm A., Johnson K.D., Szumilo T., Elbein A.D. y Chrispeels M.J. 1987. Subcellular localization of glycosidases and glycosyltransferases involved in the processing of N-linked oligosaccharides. *Plant Physiol.* 85:741-745.

- Thayer S.S. y Conn E.E. 1981. Subcellular localization of dhurrin- β -glucosidase and hydroxynitrile lyase in the mesophyll cells of *Sorghum* leaf blades. *Plant Physiol.* 67:617-622.
- Tipton C.L. y Buell E.L. 1970. Ferric iron complexes of hydroxamic acids from maize. *Phytochemistry* 9:1215-1217.
- Tollenar H. y Hepp R. 1972. Presencia del virus causante del enanismo amarillo de la cebada (Barley Yellow Dwarf Virus) en Chile. *Agric. Tec.* 32:137-142.
- Vilches S. 1988. Cultivo de protoplastos de trigo. Tesis Licenciatura en Educación. Facultad de Ciencia. Universidad de Santiago de Chile.
- Virtanen A.I. y Hietala P.K. 1960. Precursors of benzoxazolinone in rye plants. *Acta Chem. Scand.* 14:499-502.
- Virtanen A.I. y Wahlroos O. 1963. Absence of 6-methoxy-benzoxazolinone in uninjured maize tissue. *J. Pharm. Sci.* 52:713-714.
- Wahlroos O. y Virtanen A.I. 1959. On the formation of 6-methoxy-benzoxazolinone in maize and wheat plants. *Suomen Kemistilehti* 32:139-140.
- Walker D.E. y Axelrod B. 1978. Evidence for a single catalytic site on the β -D-glucosidase- β -D-galactosidase of almond emulsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 187:102-107.
- Woodward M.D., Corcuera L.J., Helgeson J.P. y Upper C.D. 1978. Decomposition of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one in aqueous solutions. *Plant Physiol.* 61:796-802.
- Yamasaki Y. y Konno H. 1987. Wall-bound α -glucosidase of suspension-cultured rice cells. *Phytochemistry* 26:711-713.
- Yoshioka H. y Hayashida S. 1980. Production and purification of thermostable β -glucosidase from *Mucor miehei* YH-10. *Agric. Biol. Chem.* 44:2817-2824.
- Zúñiga G. 1987. Papel de los alcaloides indólicos en la resistencia de la cebada a áfidos. Tesis Magister Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Zúñiga G.E., Argandoña V.H., Niemeyer H.M. y Corcuera L.J. 1983. Hydroxamic acid content in wild and cultivated gramineae. *Phytochemistry* 22:2665-2668.

- Zúñiga G.E., Argandoña V.H. y Corcuera L.J. 1988. Relación entre el contenido de ácidos hidroxámicos y el daño inducido por *Schizaphis graminum* en trigo. VII Reunión Nacional de Botánica. Sociedad de Biología de Chile. Universidad de Valparaíso. 67.
- Zúñiga G.E., Copaja S.V., Bravo H.R. Argandoña V.H. 1989. Hydroxamic accumulation by wheat callus. *Phytochemistry* (enviado).
- Zúñiga G.E. y Massardo F. 1989a. Detección de glucósidos y agluconas de ácidos hidroxámicos en cultivo de tejidos de trigo. I Congreso de Biotecnología. CONICYT. Universidad de Talca. R341.
- Zúñiga G.E. y Massardo F. 1989b. Producción de ácidos hidroxámicos en tejidos diferenciados e indiferenciados de trigo. XVIII Jornadas Chilenas de Química. Sociedad Chilena de Química. Universidad de Santiago de Chile. 124-126.