

UCH-FC
MAB-B
LSZ

**GLUCOSILACION DE LOS ACIDOS HIDROXAMICOS DURANTE SU
BIOSINTESIS, EN GRAMINEAS.**

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Magister en Ciencias con mención en Biología.

Facultad de Ciencias

por

Victoria de los Angeles Leighton Méndez
Abril, 1995

Director de Tesis: Dr. Hermann Niemeyer M.

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

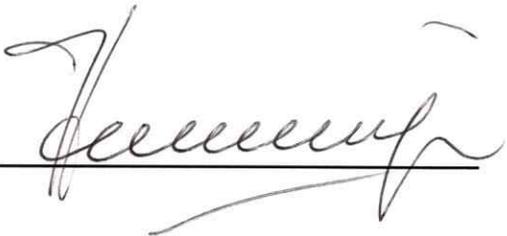
**INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Comisión de Postgrado de la facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato

Victoria de los Angeles Leighton Méndez

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Biología, en el exámen de defensa de Tesis rendido el Día 20 de Enero de 1995.

Director de Tesis:
Dr. Hermann Niemeyer M.



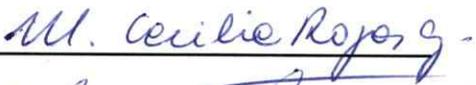
Comisión de evaluación de la Tesis:

Dr. Luz María Pérez



Dr. Bruce Cassels

Dr. Cecilia Rojas



Dr. Liliana Cardemil



Para tí Gaspar, hijito mío, quien se merece esto y mucho más.

Indice de materias

	Pág.
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
<i>Metabolismo secundario en plantas.</i>	3
Regulación de la síntesis y almacenamiento de metabolitos secundarios.	
Biosíntesis de metabolitos secundarios y organización de las rutas biosintéticas.	3
<i>Acidos Hidroxámicos.</i>	4
Características generales.	4
Acumulación de los Hx en plantas	4
Rol de los Hx en la planta	6
Regulación de la síntesis de los Hx.	7
Biosíntesis de los Hx.	7
Glucosilación de los Hx.	8
<i>Actividad glucosiltransferásica en plantas</i>	11
Presentación del problema	13
Materiales y Métodos	15
1. <i>Material vegetal</i>	15
2. <i>Material químico</i>	15
3. <i>Material bioquímico</i>	16
Obtención de extractos para la actividad Hx-GT.	16
Ensayo para determinar la actividad Hx-GT.	17

Cuantificación de las proteínas en los extractos.	17
4. <i>Variación en el tiempo de la actividad Hx-GT y del contenido de Hx en plántulas y en diversas porciones de hojas y raíces de centeno.</i>	18
5. <i>Solubilidad de la Hx-GT de centeno.</i>	18
6. <i>Enriquecimiento y caracterización de la Hx-GT de centeno.</i>	19
7. Determinación de las características cinéticas de las Hx-GTs de Tetra y <u>H. lechleri</u> .	20
<i>Hx-GT de Tetra.</i>	20
<i>Hx-GT de H. lechleri.</i>	21
HBOA-GT y HMBOA-GT en extractos de SNA 3 y Tracy T 555.	21
8. Actividad β -glucosidásica en extractos de centeno.	21
Actividad con Hx-GT.	21
Actividad con pNPG.	21
Resultados	22
Obtención de los Hx, los glucósidos y lactamas glucosiladas.	22
Adecuación de los ensayos enzimáticos desde extractos de maíz a extractos de otras gramíneas.	22
Estabilidad de los Hx y HBOA bajo las condiciones de ensayo para la Hx-GT.	24
Ensayo para la Hx-GT presente en la fracción 60/30% sulfato de amonio de extractos de centeno.	24
Enriquecimiento de la Hx-GT de centeno.	29
Caracterización general de la Hx-GT de centeno.	32

Caracterización cinética de la Hx GTde centeno.	32
Actividad Hx-GT en extractos proteicos provenientes de diversas gramíneas.	32
Variación del contenido de Hx en plántulas de centeno. Cambio de la actividad Hx-GT en el tiempo y localización tisular de la enzima en plántulas de centeno.	41
Discusión	49
Bibliografía	55

Lista de figuras

	Pág.	
Fig. 1	Acidos hidrxámicos y sus derivados.	5
Fig. 2	Rutas biosintéticas putativas para la formación del DIMBOA en maíz.	9
Fig. 3	Metabolización del ¹⁴ C-HBOA en plántulas de maíz.	10
Fig. 4	Análisis en HPLC de la purificación del DIBOA-Glc.	23
Fig. 5	Análisis en HPLC de los ensayos para la Hx-GT.	25
Fig. 6	Estabilidad de los Hx y HBOA en las condiciones de ensayo para la Hx-GT.	26
Fig. 7	Actividad en el tiempo de la Hx-GT de centeno.	27
Fig. 8	Efecto del BSA en la actividad de la Hx-GT de centeno.	28
Fig. 9	Cromatografía en Mono Q de la proteína de centeno obtenida por fraccionamiento con sulfato de amonio.	31
Fig. 10	Variación de la actividad específica de la Hx-GT de centeno con el pH.	33
Fig. 11	Variación de la actividad de la Hx-GT de centeno con la temperatura.	34
Fig. 12	Isocromatoenfoco de la Hx-GT de centeno en la columna Mono P.	36
Fig. 13	Filtración en Superdex 75 de la Hx-GT de centeno.	37
Fig. 14	Gráfico de Eadie-Hofstee para la determinación de la Km para DIMBOA de la Hx-GT semipurificada de centeno.	39

Fig. 15	Gráfico de Eadie-Hofstee para la determinación de la Km para DIBOA de la Hx-GT semipurificada de centeno.	40
Fig. 16	Gráfico de Eadie-Hofstee para la determinación de la Km para DIBOA de la Hx-GT de H.lechleri.	42
Fig. 17	Gráfico de Eadie-Hofstee para la determinación de la Km para DIMBOA de la Hx-GT de H.lechleri.	43
Fig. 18	Gráfico de Eadie-Hofstee para la determinación de la Km para DIBOA de la Hx-GT de extracto de centeno.	44
Fig. 19	Gráfico de Eadie-Hofstee para la determinación de la Km para DIMBOA de la Hx-GT de extracto de centeno.	45
Fig. 20	Variación en el tiempo del contenido de Hx y de la actividad total de la Hx-GT en plántulas de centeno.	47
Fig. 21	Ruta putativa para la biosíntesis y degradación de los Hx en maíz.	54

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Enriquecimiento de la Hx-GT de plántulas de centeno por cromatografía de intercambio iónico y exclusión.	30
Tabla 2. Solubilidad de la Hx-GT de centeno.	35
Tabla 3. Características cinéticas de la Hx-GT semipurificada de centeno.	38
Tabla 4. Propiedades cinéticas aparentes de las Hx-GT presente en extractos proteicos de diversas gramíneas.	46
Tabla 5. Variación de la actividad total de la Hx-GT presente en hojas y radículas de plántulas de centeno de diversas edades.	48

Resumen

Los extractos proteicos provenientes de plántulas de centeno presentan una actividad glucosiltransferásica (Hx-GT) capaz de reconocer a los ácidos hidroxámicos cíclicos presentes en la planta como sustrato. La actividad se encuentra en hojas y raíces y se expresó durante todo el período de crecimiento estudiado en las plántulas (4 a 20 días de edad). La actividad total en las hojas y las raíces incrementa y disminuye con la edad de las plántulas, pero las variaciones no presentan un patrón definido. La actividad total es homogénea a lo largo de las hojas y es mayor que en las raíces. Los patrones de variación de la actividad total de la Hx-GT en hojas y raíces no se correlacionan con los patrones de variación del contenido de Hx en ambos tejidos. Los patrones de variación de la actividad total en hojas y raíces son coincidentes. Estas observaciones sugieren que la expresión de la Hx-GT es constitutiva, no se relaciona con los procesos que regulan la expresión de la ruta biosintética, es ubicua, y que la enzima se expresa simultáneamente en hojas y raíces.

La mayor parte de la actividad Hx-GT en extractos proteicos de centeno se encuentra en el sobrenadante de una centrifugación a 130.000 xg, junto con el pico de actividad de la α -manosidasa, que es una enzima soluble. La Hx-GT de centeno se enriqueció 35 veces al cromatografiarla en diversas resinas de intercambio iónico y de exclusión molecular. Durante el proceso de purificación se observó sólo un pico de actividad. La enzima parcialmente pura presenta un máximo de actividad a pH 8,5 y a 41°C. La cromatografía de exclusión indicó un peso molecular de 43.000 daltons y el isocromatofoco un punto isoeléctrico a pH 4,4. La caracterización cinética indica una K_m para ambos Hx (73 μ M para DIBOA y 82 μ M para DIMBOA) y una actividad catalítica 3,3 veces mayor con DIMBOA. La enzima no reconoce las respectivas lactamas, HBOA y HMBOA, ni a la esculetina como sustratos. Estas observaciones indican que la Hx-GT de centeno es específica para los Hx. También sugieren que la enzima requiere del grupo N-OH del DIMBOA para su actividad y que el grupo metoxilo del C7 del anillo aromático favorece la orientación del sustrato en el sitio activo de la enzima.

En extractos proteicos de centeno, maíz y trigo no se encuentra una actividad glucosiltransferásica que reconozca a las lactamas como sustrato, indicando que la glucosilación es posterior a la formación de los Hx en estas gramíneas. Los extractos proteicos de gramíneas que no contienen ácidos hidroxámicos no presentan una actividad Hx-GT indicando que esta enzima pertenece a la ruta de los Hx.

Abstract

Protein extracts from rye seedlings present a glucosyltransferase activity that use the cyclic hydroxamic acids (Hx) present in the plant as substrate (Hx-GT). The enzyme is present both in roots and leaves during all the developmental period studied (2 to 20 days). The total Hx-GT activity in roots and leaves increase and decrease during seedling growth in an undefined pattern. Total activity is homogenous along the leaves and greater than the root activity. The total-activity-variation pattern in both tissues does no correlate with the respective Hx-content-variation pattern. Leaves and roots have a coincident total-activity-variation pattern during seedling growth.

The observations described above suggest that the expression of the enzyme is synchronical in leaves and roots, constitutive, obiquitous and not related to the processes that regulate the expression of the route.

The supernatant obtained after a 130.000 xg centrifugation contains most of the Hx-GT and the α -mannosidase activities. The latter is a known soluble enzyme. The Hx-GT activity present in rye extracts was enriched 35 times after a combination of ion exchange and exclusion chromatography. Throughout the whole procedure only one Hx-GT peak was observed. The enriched enzyme has optimum activity at pH 8.5 and at 41°C. Exclusion chromatography showed a molecular weight of 43,000 daltons and isochromatofocussing an isoelectric point at pH 4.4. The kinetic characterization indicated similar K_m values for both substrates (73 μ M for DIBOA and 82 μ M for DIMBOA) and a catalytic activity 3.3 times greater for DIMBOA. The enriched enzyme does not use both lactams (HBOA and HMBOA) nor the structure related coumarin esculetin as substrates.

The observations described above indicate that the Hx-GT is specific for the Hx, strictly requires the N-OH group of the Hx for its catalytic activity, and also suggest that the methoxyle group in the aromatic ring participates in the orientation process of the substrate in active site.

No lactam glucosylating activity is found in protein extracts from rye, wheat and maize seedlings indicating that the glucosylating step comes after the Hx have been formed in these plants. Protein extracts from plants lacking Hx do not contain an Hx-GT activity, indicating that the Hx-GT activity found in maize, wheat and rye belongs to the Hx biosynthetic route.

Introducción

Metabolismo secundario en plantas

Las plantas forman una miríada de metabolitos, que por una aparente inutilidad para la sobrevivencia del organismo, se han denominado secundarios, e incluyen, entre otros, los alcaloides, flavonoides, ácidos hidroxámicos, etc. Se ha postulado que cumplen funciones de interacción con su entorno biótico y abiótico (Bell, 1981; Luckner, 1989; Waterman, 1992)

Regulación de la síntesis y almacenamiento de metabolitos secundarios.

La biosíntesis generalmente ocurre durante períodos particulares del desarrollo de la planta, y el proceso generalmente involucra la transcripción de genes y síntesis *de novo* de las enzimas de la ruta biosintética activada. La síntesis además puede ser regulada por factores exógenos como la luz, temperatura y daño tisular (Wiermann, 1981; Luckner, 1989).

Los metabolitos secundarios son almacenados en las vacuolas, plastidios, la pared celular, pared del polen, espacio subcuticular o superficie cuticular, siendo la vacuola el organelo que más frecuentemente cumple la función de almacenamiento. La localización física de las rutas biosintéticas dentro de la célula se conoce en relativamente pocos casos (Wiermann 1981).

Biosíntesis de metabolitos secundarios y organización de las rutas biosintéticas

Las reacciones que producen metabolitos secundarios, son catalizadas enzimáticamente y las monooxigenasas, metiltransferasas y glucosiltransferasas asociadas a las rutas pueden presentar baja especificidad de sustrato (Luckner, 1981). Se ha postulado que las enzimas que forman parte de las rutas biosintéticas forman complejos multienzimáticos constituidos por varias cadenas peptídicas unidas por fuerzas no covalentes o bien están incluidas en una sola cadena que tiene varias actividades (Stafford, 1981; Luckner, 1989; Hrazdina, 1992). El estudio de las rutas biosintéticas se vuelve complejo por la copurificación de las enzimas pertenecientes a un mismo complejo multienzimático, lo que dificulta la caracterización apropiada de cada una de ellas por separado, y la canalización de los intermediarios, que puede llegar a esconder algunas actividades enzimáticas intermedias debido a la difícil aceptación, por parte de los complejos, de los intermediarios adicionados exógenamente (Stafford, 1981).

Acidos hidroxámicos

Características generales

En las hojas, tallos y raíces de diferentes cultivares de trigo, maíz y centeno se encuentran los ácidos hidroxámicos cíclicos (Hx) derivados de la 1,4-benzoxazin-3-ona (Copaja y col., 1991; Barría y col., 1992; Niemeyer y col., 1992). El trigo y el maíz acumulan principalmente dos formas de Hx, una metoxilada en la posición 7, DIMBOA (Fig.1) y otra no metoxilada, DIBOA (Fig.1). Ambos se encuentran en la forma de 2-O- β -D-glucopiranosidos (Hofman y Hofmanová, 1969a), siendo mayoritario el DIMBOA-Glc. Las plantas de centeno acumulan sólo DIBOA-Glc en las hojas y ambos Hx en las raíces (Copaja, S. V., comunicación personal). La presencia de estos Hx se detectó originalmente en 1955, cuando Virtanen y Hietala aislaron desde plántulas de centeno, un compuesto capaz de inhibir el crecimiento de hongos y que originalmente describieron como una 2(3)benzoxazolinona (BOA) (Fig.1) (Virtanen y Hietala, 1955a,b). Posteriormente Virtanen y col. en 1956 aislaron desde maíz y trigo el derivado metoxilado, la 6-metoxi-2(3)benzoxazolinona (MBOA) (Fig.1). Buscando el precursor de las benzoxazolinonas, encontraron los glucósidos de las 2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-onas (Virtanen y Hietala, 1959; Wahlroos y Virtanen, 1959 a,b), que son hidrolizados por acción de β -glucosidasas a agluconas, las que se descomponen por un proceso no enzimático a las respectivas benzoxazolinonas (Virtanen y Hietala, 1959, Hietala y Virtanen, 1960; Hofman y Hofmanová 1969 a, b).

Acumulación de los Hx en plantas.

Los Hx no han sido detectados en las semillas de los cereales (Argandoña y col., 1980), pero aparecen durante la germinación (Klun y Robinson, 1969; Argandoña y col., 1980). En el trigo y el maíz la concentración del DIMBOA varía con la edad, aumentando durante los primeros estadios de desarrollo y luego bajando y manteniéndose en cantidades residuales a lo largo del crecimiento (Klun y Robinson, 1969; Argandoña y col., 1981; Guthrie y col., 1986 Gutierrez y col., 1988; Copaja, S.V., comunicación personal). En trigo, durante las primeras horas de germinación, la formación de DIBOA precede a la del DIMBOA (Copaja,S.V., comunicación personal). La concentración de Hx varía dentro de una misma hoja (Niemeyer y col., 1989) y las hojas más nuevas, así como el tejido meristemático tienen una concentración mayor (Epstein y col., 1986; Morse y col., 1991). A nivel de tejidos foliares, se ha detectado la presencia de Hx en protoplastos del mesófilo y en los haces vasculares, pero no en la epidermis ni en la savia xilemática (Argandoña y Corcuera, 1985; Argandoña y col., 1987). Los Hx se encuentran en la savia floemática y sus niveles no se correlacionan con la concentración de los

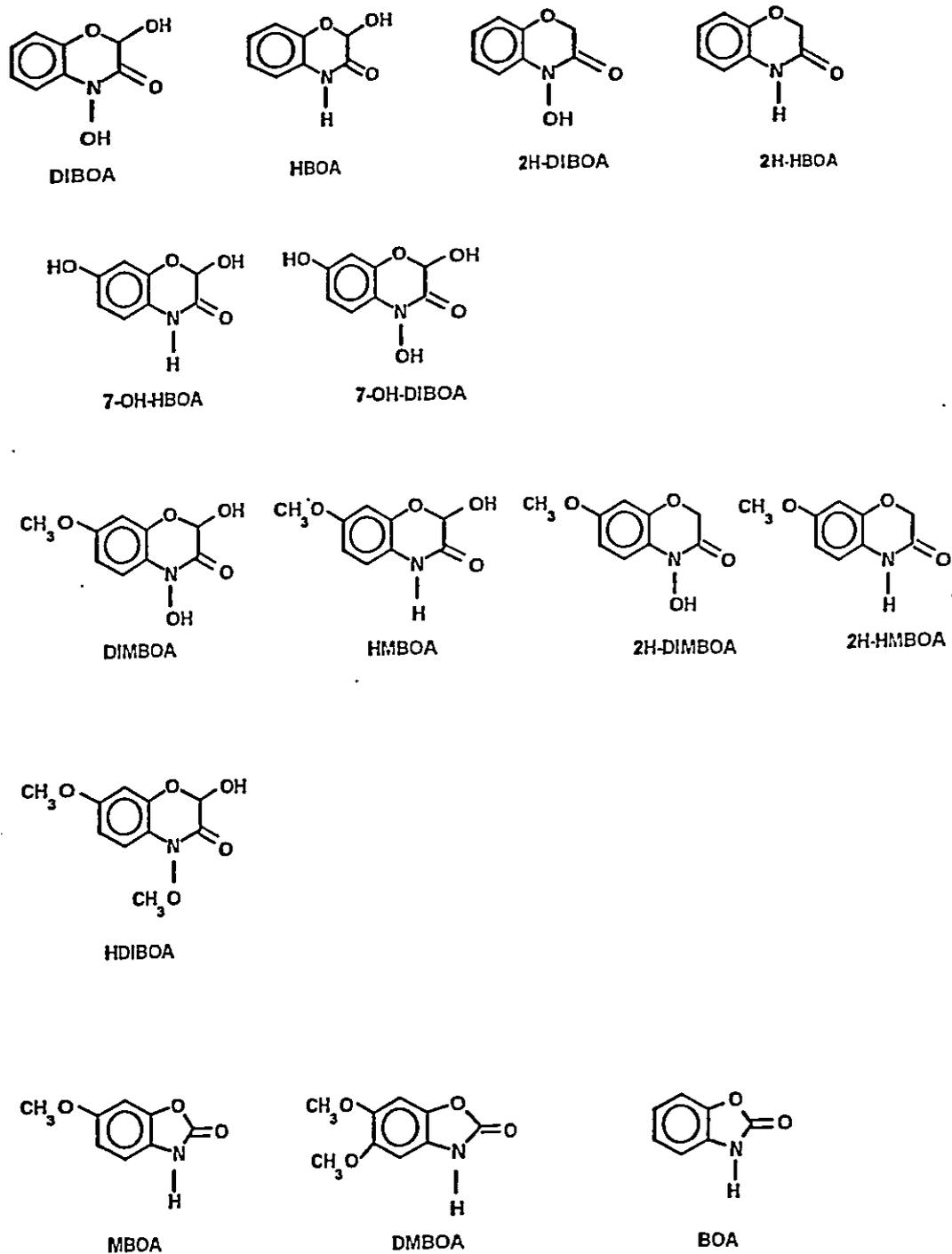


Fig. 1 Ácidos hidroxámicos y sus derivados.

Hx en los tejidos (Givovich, 1993) Los contenidos de Hx en las hojas son disminuídos por el ácido abscísico (Morse y col., 1991). Las raíces de maíz y centeno exudan DIMBOA y DIBOA respectivamente (Pérez y Ormeño, 1991; Pethó, 1992); este dato indica que los Hx son movilizados en la planta y fuera de ella y se podría especular que la biosíntesis de los Hx ocurre en los tejidos meristemáticos, desde donde son transportados para ser almacenados principalmente en los haces vasculares del tallo y el mesófilo de las hojas, y ser exudados por las raíces.

Los Hx se sintetizan en callos de trigo y maíz, y el Hx producido por los callos es exportado al medio de cultivo (Bailey y Larson, 1988; Zúñiga y col., 1990, Zúñiga y Massardo, 1991). La concentración de los Hx en callos de trigo varía con el tiempo, y la capacidad de síntesis se relaciona inversamente con la concentración de Hx en el medio (Zúñiga y col., 1990), indicando algún tipo de regulación negativa por parte de los Hx.

Rol de los Hx en la planta.

Los Hx parecieran estar relacionados con la defensa de la planta. Su presencia confiere a las plantas resistencia hacia hongos, bacterias e insectos (Virtanen y col., 1957, Klun y col., 1967; Long y col., 1975; Beck y col., 1983; Niemeyer, 1988; Sahi y col., 1990 Givovich y Niemeyer, 1991). La HDIBOA-Glc (Fig.1) ha sido propuesta como una fitoalexina (Bücker y Grambow, 1990). Los Hx han sido propuestos como factores alelopáticos en centeno y maíz (Barnes y Putnam, 1987; Barnes y col., 1987; Pérez, 1990; Pérez y Ormeño, 1991; Pérez y Ormeño, 1993). Los Hx inactivan enzimas proteolíticas tales como la quimotripsina y la papaína (Pérez y Niemeyer, 1989; Cuevas y col., 1990), inhiben la síntesis de ATP, el intercambio Pi-ATP y la actividad ATPásica en mitocondrias y cloroplastos (Queirolo y col., 1983; Niemeyer y col., 1986) e interaccionan de forma covalente con el ADN (Ishizaki, 1982). En insectos se ha observado que interfieren con la actividad de la glutatión S-transferasa (Leszczynski y col., 1992), UDP-glucosa transferasa (Leszczynski y Dixon, 1992) y la colinesterasa de áfidos (Cuevas y Niemeyer, 1993), y también con proteasas y enzimas destoxicantes de *Ostrinia nubilalis* (Houseman y col., 1992, Feng y col., 1992). Estos antecedentes indican que el modo de acción de los Hx sobre los insectos, hongos y bacterias es de carácter pleiotrópico, que en su conjunto causa un efecto antibiótico o antialimentario.

El rol fisiológico de los Hx en la planta es prácticamente desconocido. Al respecto, se encontró que el DIMBOA y el MBOA interaccionan con el receptor de auxina (Venis y Watson, 1978). Pethó y Dinya (1992) encuentran que el MBOA tiene actividad del tipo de la citoquinina y, de forma similar a lo descrito para algunos microorganismos, los Hx parecieran tener una actividad tipo fitosiderofórica (Neilands, 1967; Tipton y Buell, 1970; Fekete y col., 1989; Pethó, 1992).

Regulación de la síntesis de los Hx.

Los niveles de Hx son afectados por estímulos externos como la naturaleza del sustrato donde crece la planta, la temperatura y el fotoperíodo. En maíz, los niveles de Hx son afectados negativamente por la proporción de luz en su fotoperíodo (Epstein, 1986). Incrementan con el contenido de nitrógeno del sustrato, y su incremento depende de la fuente de nitrógeno (Tang y Ge, 1981; Manuwoto y Scriber, 1985 a,b). El nivel de los Hx también es afectado por daño causado por herbívoros y por daño artificial. Sin embargo, los niveles de respuesta son bajos y difieren intraespecíficamente, dificultando la comprensión de los factores que están afectando el fenómeno (Gutierrez y col., 1988; Niemeyer y col., 1989; Morse y col., 1991). Genéticamente, la capacidad de sintetizar los Hx en el maíz pareciera depender de un gen cuya expresión tiene carácter dominante y que está localizado en el cromosoma 4. Los niveles alcanzados en la planta parecieran ser de carácter aditivo, dependiendo entonces del número de copias de los genes estructurales en el genoma (Hamilton, 1964; Klun y col., 1970; Dunn y col., 1981; Simcox y Weber, 1985).

Biosíntesis de los Hx.

La información disponible sobre la biosíntesis de los Hx es escasa, y sólo se relaciona con su origen y con las etapas finales de la formación del DIMBOA en maíz. Esta última información, como se discute más adelante, lleva a diferentes conclusiones respecto de la formación del DIMBOA, dificultando la postulación de una ruta biogénica para la formación del DIMBOA-Glc.

En estudios realizados en maíz se ha determinado que el anillo aromático de los Hx deriva del antranilato, el grupo metilo es donado por L-metionina, los carbonos 2 y 3 del anillo heterocíclico derivan de la ribosa y se ha postulado al N-(5-fosforibosil)antranilato como intermediario (Reimann y Byerrum, 1964a,b; Tipton y col., 1973; Kumar y col., 1994).

En extractos de maíz se encuentran las lactamas, HBOA (Fig.1) y HMBOA (Fig.1), a concentraciones menores que los respectivos hidroxamatos (Gahagan, 1967; Tipton y col., 1967; Hofman y Hofmanová, 1969a) y, a concentraciones aún más bajas, el 7-OH-HBOA (Fig.1). Las razones entre las lactamas y los hidroxamatos varían en los distintos tejidos de una planta de maíz, pero las sumatorias de las respectivas concentraciones permanecen constantes, lo que llevó a postular que constituyen pares redox (Hofman y Hofmanová, 1969a). Esta hipótesis presenta las lactamas de los Hx como sus precursores inmediatos, indicando que los Hx se formarían por la N-hidroxilación de las lactamas correspondientes y, al respecto, una HBOA-N-hidroxilasa ha sido descrita en maíz (Bailey y Larson, 1991). Por otra parte, en callos y semillas germinadas de trigo, la formación de DIBOA precede la formación del DIMBOA (Zúñiga y col.,

1991; Copaja, S.V. comunicación personal). Una planta mutante de maíz, deficiente en la formación de DIMBOA, acumula el 7-OH-DIBOA (Fig. 1) (Kumar y col., 1993). Esta información permite postular al DIBOA y el 7-OH-DIBOA como precursores del DIMBOA.

La información descrita más arriba sugiere que en maíz el DIMBOA se formaría a partir de su lactama (HMBOA) o a partir del DIBOA, como se describe en la figura 2.

En plántulas de maíz alimentadas con HBOA marcado se observó la aparición de DIBOA marcado, seguido de HMBOA y finalmente DIMBOA (Tipton y col., 1973; Fig.3). La formación de DIBOA es expedita y es coherente con la N-hidroxilación requerida. El HMBOA y el DIMBOA se forman más lentamente. La formación de HMBOA requiere de la hidroxilación del carbono 7 y su posterior metilación. La formación del DIMBOA requiere de las reacciones mencionadas más una N-hidroxilación, esperándose una mayor lentitud para la formación de estos dos metabolitos, HMBOA y DIMBOA. El HMBOA se forma al mismo tiempo que el DIBOA, y para la formación del DIMBOA es posible observar un pequeño retraso. Ello puede indicar que el DIMBOA se está formando a partir del DIBOA o del HMBOA. Con estas observaciones, se puede postular que en maíz se encuentran al menos dos rutas que dan origen a los Hx, una que forma DIBOA rápidamente por medio de la N-hidroxilación del HBOA, otra que incluye las interconversiones de HBOA a HMBOA y HMBOA a DIMBOA, y que el HBOA es intermediario común para las dos rutas (Fig.2).

Glucosilación de los Hx.

La glucosilación de los intermediarios de la ruta es otro punto controversial en la literatura disponible y, como se desprende de la discusión que sigue, no es posible saber si la glucosilación es previa o posterior a la formación del Hx.

En maíz, tanto los Hx como las respectivas lactamas y el 7OH-HBOA han sido detectados como glucósidos (Virtanen y Wahlroos, 1963; Tipton y col., 1967; Gahagan y Mumma, 1967; Hofman y Hofmanová, 1969 a,b). La concentración de agluconas en la muestra incrementa con la manipulación de ella (Hofman y Hofmanová, 1971), y sólo aparecerían al ponerse en contacto con β -glucosidasas al ser dañados los tejidos (Cuevas y col., 1992). Esta información indicaría que la glucosilación ocurre antes que los Hx se formen.

Bailey y Larson (1989) describieron en maíz dos glucosiltransferasas capaces de reconocer ambos Hx (Hx-GT). Zúñiga y Massardo (1991) encontraron que en callos y tejido meristemático de trigo, sólo se producen las agluconas de los respectivos Hx. Las agluconas del 2H-HBOA (Fig.1) y del HBOA son reconocidas como sustratos por monooxigenasas de extractos de maíz (Bailey y Larson, 1991; Kumar y col., 1993). Estas observaciones permiten postular que en la ruta de los Hx la glucosilación ocurre luego que los Hx se han formado y el 7-OH-HBOA,

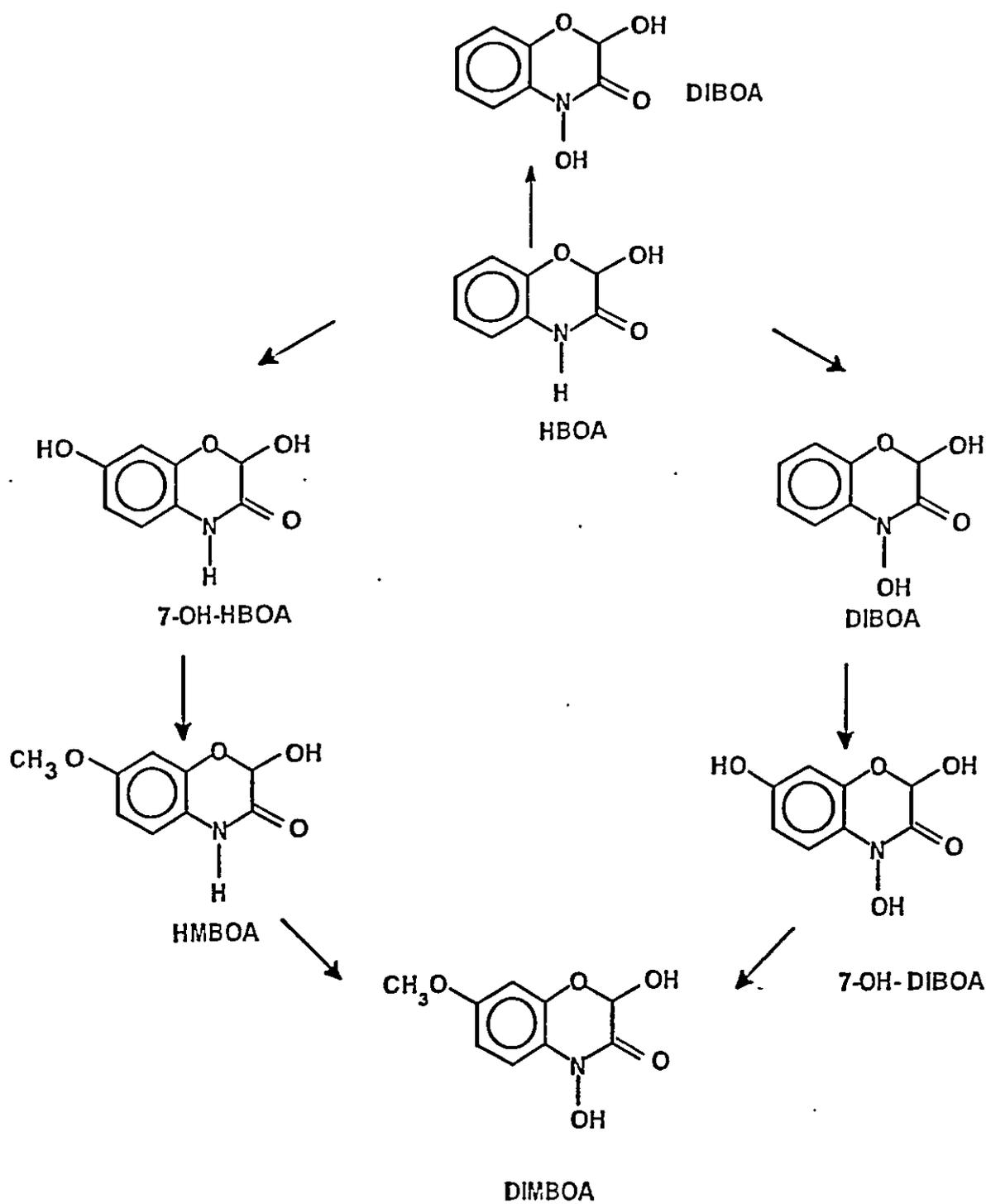


Fig. 2. Rutas biosintéticas putativas para la formación de DIMBOA en maíz.

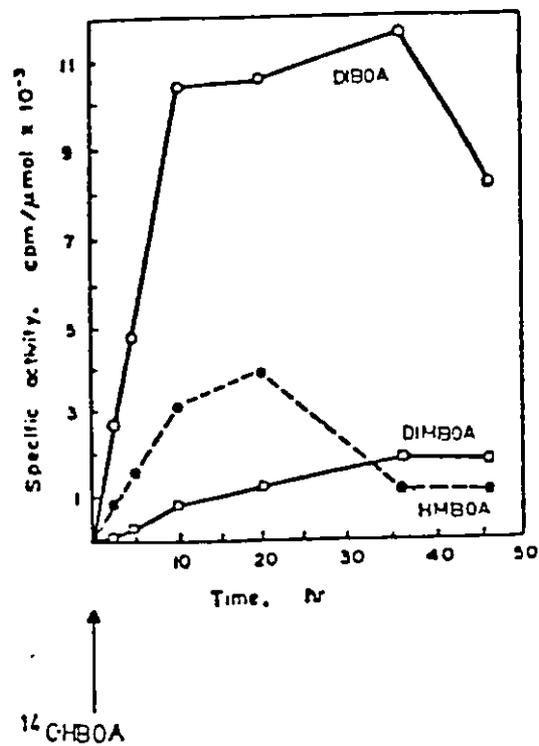


Fig. 3. Metabolización del ^{14}C -HBOA en plántulas de maíz (Tipton y col., 1973).

HMBOA, HBOA son glucosilados por otras GTs, no relacionadas a la ruta de los Hx.

Tipton y col. (1973) alimentaron plántulas con la aglucona del ^{14}C -HBOA y recuperaron DIMBOA-Glc y HMBOA-Glc marcados. Esta observación no permite discernir si el HBOA primero se glucosiló y luego fué transformado a DIMBOA-Glc y HMBOA-Glc, o si la glucosilación ocurrió como etapa final. El trabajo de cinética de metabolización de ^{14}C -HBOA (Fig.3) también indica que la aglucona es reconocida como intermediario, pero no indica el momento de glucosilación de los productos.

En resumen, las pruebas disponibles permiten visualizar la formación del DIMBOA-Glc al menos de dos formas, como se describe en la Fig. 2, pudiendo intervenir, en las rutas propuestas, tanto los glucósidos como las agluconas.

Actividad glucosiltransferásica en plantas.

En plantas, las GT relacionadas con metabolitos secundarios, generalmente son solubles y se encontrarían asociadas por interacciones iónicas o hidrofóbicas a los demás integrantes de los complejos multienzimáticos de los cuales forman parte (Ibrahim y Boulay, 1980; Schmid y Greiseback, 1982; Bajaj y col., 1983; Gross, 1983; Leznicki y Bandurski, 1988; Keil y Schreier, 1989; McIntosh y Mansell, 1990; Bechthold y col., 1991; Sun y Hrazdina, 1991; Bergenstråhle y col., 1992). Existen en formas monoméricas (Bajaj y col., 1983; Leznicki y Bandurski, 1988; Bechthold y col., 1991; Stapleton y col., 1991; Drake y col., 1991; Ardila y Tandecarz, 1992) y multiméricas (Su y Preiss, 1978; Morell y Copeland, 1985; Keil y Schreier, 1989; Sun y Hrazdina, 1991). La masa molecular relativa de las monoméricas varía entre 29.000 y 48.000 Dalton (Schmid y Greisenbach, 1982; Latchinian e Ibrahim, 1991) y las multiméricas llegan a los 400.000 Dalton (Morell y Copeland, 1985). Todas utilizan UDPG como donante del glucosilo y presentan puntos isoeléctricos más bien ácidos, en el intervalo de 3,9 - 5,5 (Bajaj y col., 1983; Leznicki y Bandurski, 1988; McIntosh y Mansell, 1990; Sun y Hrazdina, 1991; Bergenstråhle y col., 1992), y valores de pH óptimo entre 5,8 y 9,5 (Morell y Copeland, 1985; Sun y Hrazdina, 1991) y temperaturas óptimas para la actividad, entre 30°C y 50°C (Keil y Schreier, 1989; Lawson y col., 1989). Estas enzimas incrementan su actividad en presencia de cationes divalentes (Mg^{+2} , Ca^{+2}) y agentes reductores (β -mercaptoetanol, DTT y DTE) y son inactivadas por metales pesados (Cu^{+2}) (Bajaj y col., 1983; Morell y Copeland, 1985). Algunas son inhibidas por el producto UDP (Bajaj y col., 1983).

Las GT en general no regulan la actividad de las rutas en las que participan. Es así como las GT relacionadas con la ruta biosintética de las antocianinas forman parte de un conjunto enzimático, cuyos genes estructurales son regulados por genes reguladores que modulan su

transcripción. Los genes reguladores a su vez, se expresan sólo en estadios específicos del desarrollo de la planta (Quattrocchio, 1993). Por otra parte, también se ha observado que la actividad de algunas GT son inducidas por metabolitos endógenos que pueden guardar relación directa con la ruta de la cual forman parte (Yalpani y col., 1992) o ser de carácter ubicuo (Ohana y col., 1992).

Presentación del problema.

La estrategia de exacerbar los mecanismos naturales de defensa en plantas de cultivo es interesante porque representa una alternativa al uso de plaguicidas sintéticos, evitando así la acumulación de residuos tóxicos en el medio ambiente. Los metabolitos secundarios de plantas han sido vinculados a la interacción de ellas con el medio ambiente que las rodea, y aquellos cuya acción es deletérea sobre pestes y plagas adquieren entonces un especial interés.

El fitomejoramiento clásico a través de programas de cruzamiento y selección, a pesar de que en general ha dado excelentes resultados en la obtención de cultivares con características de rendimiento y resistencias deseadas para las plantas de relevancia agronómica, adolece de ser lento y laborioso. El probable carácter aditivo de los genes que determinan los niveles de Hx en las plantas hace que los programas de mejora por cruzamiento y selección sean más complejos, largos y se incremente la probabilidad de producir homocigocis de caracteres recesivos no deseados, bajando la capacidad de respuesta de la planta frente a otros factores del medio ambiente o perdiendo características agronómicas deseadas, tales como rendimiento o tamaño y calidad de la semilla. El desarrollo de la ingeniería genética representa hoy día un modo adicional de mejora génica. Esta estrategia descansa en un conocimiento acabado de la fisiología génica del carácter escogido y requiere de la dilucidación de su ruta biosintética y de la caracterización de las actividades enzimáticas involucradas.

Los ácidos hidroxámicos se perfilan como objetivos interesantes para el desarrollo de estrategias de mejora en cereales, que son plantas de importancia agronómica tanto a nivel nacional como mundial. El papel de los Hx en el sistema de defensa de los cereales los señala como insecticidas naturales, su papel en las interacciones alelopáticas los señala como herbicidas naturales, y su posible interacción con el hierro, los señala como compuestos para la respuesta de estas plantas a condiciones de estrés nutricional. La dilucidación de la ruta biosintética de los Hx hace factible el eventual desarrollo de programas de mejora génica basados en la ingeniería génica teniendo estos metabolitos como compuestos de interés.

Como se discutió previamente, pese a que existe información relacionada con las etapas finales de la biosíntesis de los Hx, no es claro el orden de las reacciones. En relación a la glucosilación, si la formación de las lactamas precede a la formación de los Hx y la glucosilación es previa a la formación de los Hx, se esperaría que la glucosilación ocurriera en una etapa muy temprana en la ruta, puesto que es difícil visualizar glucosilaciones y desglucosilaciones sucesivas, y se esperaría que el sustrato para la actividad glucolidásica se asemejara más al antranilato que a los Hx. Ello hace esperar que las GT que reconocen a los Hx como sustrato no sean específicas de la ruta de los Hx y que presenten afinidad similar por las lactamas. Si la

glucosilación es posterior a la formación de los Hx, la Hx-GT debería formar parte de la ruta biosintética y debería presentar una afinidad mayor por los Hx. Por lo tanto, a través de una caracterización cinética de las Hx-GT involucradas en la ruta biosintética de los Hx se podría obtener información que nos permita sugerir el momento en que ocurre la glucosilación durante la biosíntesis de los Hx.

El trigo y el maíz acumulan DIMBOA y DIBOA, mientras que el centeno acumula solamente el segundo. El análisis de los antecedentes de que se dispone respecto de la biogénesis y biosíntesis de estos Hx, hace esperar que la dilucidación de su biosíntesis sea un problema de alta complejidad, y la elección de un modelo biológico sencillo aparece como aconsejable. Al respecto, el centeno parecería ser más conveniente que el maíz o trigo, ya que sólo produce DIBOA.

En esta tesis se planteó como objetivo general la dilucidación del momento en que ocurre la glucosilación durante la biosíntesis de los Hx, usando principalmente al centeno como modelo. Como objetivos específicos se planteó:

a) Caracterizar cinéticamente la(s) glucosil transferasa(s) dependiente(s) de Hx de centeno, respecto de su afinidad hacia los Hx y las lactamas. Para ello primariamente se determinó el número de Hx-GT de centeno por medio de diversos métodos de separación, y posteriormente se determinó las afinidades respectivas tanto con la enzima enriquecida como con el extracto proteico total.

b) Determinar si las GTs que reconocen a los Hx como sustrato pertenecen a la ruta biosintética de los Hx y su posible rol en la regulación de la ruta biosintética. Lo primero se estudió determinando su afinidad respecto de sustratos alternativos a los Hx y su presencia o ausencia en extractos provenientes de gramíneas que contienen o no contienen Hx. Lo segundo se estudió correlacionando el contenido de Hx y los cambios de actividad total de la Hx-GT de centeno a lo largo del desarrollo de la planta.

Materiales y Métodos

1.- Material Vegetal.

Las especies usadas en el desarrollo de esta tesis son las siguientes: *Zea mays* L. cvs. T555, T 25 S; *Secale cereale* L. cvs. Tetra Baer, Rogo y Petkus II; *Triticum aestivum* L. cvs. Millaleu y Kadett, *Triticum durum* L. cv. SNA 3, *Hordeum vulgare* L. cv. Libra; *Hordeum lechleri* PI H1310, *Avena sativa* L. cv. Nahuén, *Avena fatua* L. y *Elymus canadiensis* PI 372539. Todo el trabajo referido a centeno es en el cultivar Tetra, salvo cuando se especifica lo contrario.

2.- Material químico

Todo el material químico usado en el desarrollo de esta tesis es comercial, SIGMA o Merck, con la excepción de los Hx, las lactamas, y los respectivos glucósidos los cuales se purificaron o se sintetizaron de acuerdo a los protocolos descritos más adelante.

Para la purificación de DIMBOA, DIBOA y sus respectivos glucósidos se sembraron 0,8 - 1 kg de semillas de maíz o centeno, en tierra contenida en bandejas de aluminio. Las plantas se cultivaron en cuartos de cultivo, a 25° C y luz continua, por 7 días para aumentar el rendimiento de obtención de los Hx.

El DIMBOA y el DIBOA fueron purificados a partir de extractos etéreos de hojas de maíz y centeno, respectivamente, siguiendo una metodología descrita previamente (Queirolo y col., 1983). Los respectivos glucósidos fueron extraídos por medio de la metodología descrita por Lyons y col. (1988). Posteriormente, hasta 1 g de los respectivos extractos se aplicaron a una columna de Fractogel HW-40(S) (Merck), de 5 x 25 cm, equilibrada y eluída con agua destilada a razón de 1 ml/min. Las fracciones provenientes de la columna que reaccionaban con FeCl₃ fueron agrupadas, liofilizadas y separadas por HPLC (Varian modelo 5000), premunido de una columna semipreparativa LiChrospher, 100 RP-18 (Merck), unido a un detector de índice de refracción (KNAUER). Las muestras fueron eluídas en condiciones isocráticas, 30% metanol:70% agua (v/v), con un flujo de 10ml/min.

Los glucósidos puros se obtuvieron al separar hasta 10 g del extracto acuoso por una columna de 44 ml de lecho de DEAE Sephadex A 25, equilibrada y eluída con agua destilada, a flujo de 1 ml/min, seguida de filtración por Fractogel TSK HW-40(S).

Las lactamas de DIMBOA y DIBOA fueron gentilmente donadas por el Profesor Héctor Bravo, de esta Facultad. Las lactamas glucosiladas se obtuvieron por reducción de los respectivos Hx-Glc con Zn en ácido acético glacial a 60°C, con agitación fuerte, controlando el avance de la

reducción con FeCl_3 . Una vez que la reducción se completó, la mezcla se filtró, se lavó con agua y finalmente, se concentró por liofilización. El liofilizado se lavó con acetona y los glucósidos fueron purificados por filtración en Fractogel TSK HW-40(S).

La estructura de los compuestos extraídos y la de los reducidos se verificó por espectrometría de RMN en un instrumento Bruker AMX-300. La pureza de los compuestos se determinó por HPLC en un cromatógrafo KNAUER provisto de una columna analítica C18, LiChroChart 125-4 (Merck) acoplado a un detector de ultravioleta-visible KNAUER. Las muestras, en solución acuosa, se eluyeron con mezclas de metanol y 0,04% H_3PO_4 , v/v (agua ácida) en los siguientes gradientes lineales (muestras analíticas): 0-3,5 min: 10-50% metanol; 3,5-7 min: 50-10% metanol; 7-10 min: 10% metanol a una velocidad de 1 ml/min. Los compuestos se detectaron por absorbancia a 263 nm y se cuantificaron por medio de curvas estándar hechas con soluciones de concentración conocida.

La mezcla de incubación con esculetina se analizó por HPLC, eluyéndola isocráticamente con metanol 10% en agua ácida y determinando la absorbancia a 340 nm (Bailey y Larson, 1989).

3.-Material bioquímico

Obtención de extractos para la actividad Hx-glucosiltransferásica.

30-40g de semillas de las diversas gramíneas se sembraron en maceteros con tierra y se cultivaron a 25-30°C, en pieza de cultivo con un fotoperíodo de 12 h. Las muestras de tejido aéreo del cultivar Tetra de centeno se cosecharon 12 días luego de sembradas. Las extracciones preparativas se realizaron con cerca de 300 g de tejido aéreo. Las extracciones analíticas se realizaron con 15 g de tejido aéreo de las diversas gramíneas, tomados 6 a 14 días luego de sembradas, dependiendo del desarrollo de la planta. El tejido se maceró en mortero, usando arena como abrasivo, en presencia de amortiguador de homogeneizado (0,1M Tris HCl, pH 7,5, 5mM β -mercaptoetanol, 1mM MgCl_2) (amortiguador A) y 30% de PVPP(p/p) a una razón de 2,5 ml/g de tejido fresco (Bailey y Larson, 1989). El homogeneizado, filtrado por gasa, se centrifugó a 40.000 x g por 20 min. Las proteínas presentes en el sobrenadante se precipitaron saturando la solución con sulfato de amonio. Primero el sobrenadante se saturó hasta un 30% (p/v) con sulfato de amonio. El precipitado se centrifugó a 26.000 x g por 15min. Al sobrenadante se le adicionó sulfato de amonio hasta completar 60% y se procedió de la forma descrita. El sedimento se resuspendió en amortiguador B (50 mM Tris-HCl, pH 7, 10% glicerol) y se filtró por Sephadex G-25 (PD 10, Pharmacia) equilibrado en el mismo amortiguador (fracción 60/30% sulfato de amonio o pp. de sulfato de amonio). Las preparaciones se ensayaron de inmediato o luego de almacenaje a -20°C.

Ensayo para determinar la actividad de la Hx-GT

Los ensayos se realizaron en presencia de UDPG 1 mM, sustrato 0,5 mM (DIBOA, DIMBOA, HBOA y HMBOA) solubilizado en agua ácida, $MgCl_2$ 1mM, β -mercaptoetanol 5mM, Tris-HCl pH 8,5 50 mM (amortiguador D) y 0.05 a 0,1 mg de proteína en un volumen final de 0,1 ml, incubando a 37°C. A los preparados enzimáticos de centeno analizados a pH menor que 8,5 y a los de las otras gramíneas, se les adicionó castanospermina 0,1 mM final para inhibir las glucosidasas presentes (Durham y Poulton, 1989). Todos los ensayos se repitieron 2 a 3 veces, además se hicieron controles sin UDPG o con proteína desnaturalada a baño maría a 100°C por 15 min. Los ensayos en los cuales se utilizó Hx como sustrato se incubaron durante 20 min y los realizados con las lactamas se incubaron durante 60 min. Los ensayos de los extractos de *Avena sativa* y de *Hordeum vulgare*, realizados en el mismo volumen final, contenían 0,2 mg de proteína y se incubaron por 105 min. Los ensayos con esculetina se incubaron 40 min, con 0,6mM de sustrato solubilizado en agua, y 0,6 mg de proteína.

Todos los ensayos se detuvieron extrayendo las soluciones con 3 volúmenes de una mezcla de cloroformo: metanol 2: 1 y ácido acético 1%, agitando vigorosamente la mezcla y luego centrifugándola a 13.000 x g por 3 min a temperatura ambiente (extracción Folch). Parte de la fase acuosa se analizó por HPLC tal como se describió en la sección 2, para muestras analíticas.

La actividad Hx-GT presente en los eluidos de las diversas columnas cromatográficas se determinó ensayando 50 μ l de una de cada 2 fracciones con DIBOA e incubando durante el tiempo necesario para observar la actividad (30 a 60 min), según se describió previamente. Todos los ensayos se hicieron en presencia de 0,1mM castanospermina.

La estabilidad de DIMBOA, DIBOA y HBOA se determinó incubando por diversos tiempos en las condiciones descritas más arriba para la actividad Hx-GT y determinando el porcentaje remanente de ellos por cromatografía HPLC empleando la gradiente de metanol en agua ácida para muestras analíticas descrita en la sección 2.

Cuantificación de las proteínas en los extractos.

La concentración de las proteínas en los extractos se determinó usando la metodología de Bradford (Bradford, 1976) o con ácido bicinconínico, siguiendo la metodología descrita por los proveedores, Pierce (Pierce BCA), y albúmina de suero de bovino como estándar.

4.- Variación en el tiempo de la actividad Hx-GT y del contenido de Hx en plántulas y en diferentes porciones de hojas y raíces de centeno Tetra.

5-10 semillas se sembraron en vermiculita, en vasos desechables de 7cm de diámetro por 5,5 cm de alto. Se cultivaron a una temperatura de 22-24° C y un fotoperíodo de 12h.

Hasta 1,5 g de tejido aéreo o radicular proveniente de plántulas de 4 a 20 días de edad, se maceró en mortero según se describe en la sección 3. El macerado se filtró con gasa y posteriormente se centrifugó a 19.000 g por 45 min. El sobrenadante se filtró por Sephadex G25, equilibrado con Tris-HCl 20 mM, pH 7, 10% glicerol v/v (Tampón B).

La variación de la actividad en distintos sectores de la hoja y en las distintas radículas se determinó dividiendo la hoja bandera en 3 fracciones: apical, media y basal y haciendo extractos, según se describe más arriba, de al menos 1,5 g de tejido proveniente de cada uno de los sectores de ella. Las radículas se separaron en largas, intermedias y cortas y se hizo un extracto proteico de cada tipo, según se describe previamente. Ese protocolo se repitió con plántulas de 4, 12 y 16 días.

La variación del contenido de Hx en el tiempo se determinó macerando y extrayendo 0,2-0,4g de tejido radicular o aéreo, siguiendo una metodología descrita previamente (Niemeyer y col., 1989). El contenido se analizó y cuantificó por cromatografías HPLC en fase reversa y la gradiente de metanol en agua ácida para muestras analíticas descritas en la sección 2.

5.- Solubilidad de la Hx-GT de centeno.

Las semillas se sembraron y crecieron según se describe en la sección 3. Cincuenta y dos gramos de hojas de plántulas de 6 días de edad se molieron con 3 golpes de Ultra Turrax de 10 segundos, 0,5 min entre cada golpe, y con 3,5 ml/gr de tejido fresco de Tris HCl 0,1M pH 7,5; 5 mM β -mercaptoetanol; 1mM $MgCl_2$ y 0,33M sacarosa. (amortiguador C). El macerado se centrifugó a 1.200 g por 5 min (sobrenadante 1.200) y se descartó el sedimento. El sobrenadante se centrifugó a 13.000 g por 20 min (Sobrenadante 13.000), se guardó el sedimento (pellet 13.000) y se separó una alícuota de sobrenadante. En seguida el sobrenadante se recentrifugó a 130.000 g por 60 min y se guardaron el sedimento (pellet 130.000) y el sobrenadante (sobrenadante 130.000). Los sedimentos se resuspendieron en un homogenizador de vidrio con amortiguador C (Bergenstråle y col., 1992).

La actividad Hx-GT en las diversas fracciones celulares se determinó como se describió más arriba. La actividad α -manosidásica que se usó como una enzima soluble de referencia, se determinó ensayando las fracciones con 0,6 mM p-nitrofenil- β -D-manopiranosido, 70 mM succinato, pH 5, 200 μ g de enzima en un volumen final de 0,4 ml. Los ensayos se detuvieron con 600 μ l de Na_2CO_3 y la actividad se determinó por absorbancia a 410 nm (Bergenstråle y col., 1992)

6.- Enriquecimiento y caracterización de la Hx-GT de centeno.

0,5 kg de semillas se sembraron en bandejas con tierra y fueron cultivadas en pieza de cultivo a 22-24°C y un fotoperíodo de 12 h. Las fracciones 60/30% sulfato de amonio utilizadas para la purificación de la Hx-GT se obtuvieron según se describe en 3.

En todas las cromatografías el perfil proteico de elución se obtuvo a través de un detector uv monocromático acoplado a la salida de cada columna. Las condiciones de carga y elución de cada columna son las indicadas por los respectivos proveedores. La GT se detectó según se describe en la sección 3.

DEAE celulosa: Hasta 0,6g de proteína proveniente de la fracción 60%30% sulfato de amonio, se cargaron en una columna de 60 ml de cama, equilibrada en tampón B. Las proteínas se eluyeron con 320 ml de una gradiente lineal de KCl, 0 a 0,3M en amortiguador B, a una velocidad de 0,5 ml/min.

Mono Q HR 5/5 (Pharmacia): Hasta 50 mg de proteína se cargaron en una columna de 1 ml de lecho de intercambio aniónico fuerte, con un tamaño de partícula de 10 µm, equilibrada con 20 ml de amortiguador E (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10% glicerol) y se eluyeron con 20 ml de una gradiente lineal de KCl en tampón E, 0 a 280mM KCl, corrida a una velocidad de 0,5 ml/min.

Mono P HR 5/5 (Pharmacia): Hasta 50 mg de proteína se cargaron en una columna de 1 ml de lecho de intercambio aniónico débil, tamaño de partícula de 10 µm, equilibrada con 20 ml de 25mM Bis-Tris-iminodiacetato pH 7,1, 10% glicerol; y se eluyeron con 20 ml de una gradiente lineal de pH (pH7 a pH4) obtenida con Polybuffer 74 (Pharmacia) ajustado a pH 4 con iminodiacetato. Cada fracción se recibió en Tris-HCl pH 8, a una concentración final de 0,1mM.

Hidroxiapatita (Bio-Gel HT, BioRad): Hasta 140 mg de proteína se cargaron en una columna de 21 ml de cama equilibrada con 120 ml de fosfato de potasio 5mM pH 6,8, y se eluyeron con 200 ml de una gradiente lineal de fosfato de potasio (5 a 60 mM) pH 6,8, a una velocidad de 0,5 ml/min.

Superdex 75 HR 10/30 grado preparativa (Pharmacia): Hasta 2 mg (1 mg/ml) de proteína se filtraron por una columna de 100 ml de lecho, de 22 - 44µm de partícula, equilibrada con 600 ml de 20mM Tris-HCl pH7, 250mM NaCl, 10% glicerol y eluidas a una velocidad de 0.4 ml/min.

Resinas coloreadas de SIGMA (Cibacrome Blue, Reactive Yellow 3 y 86, Reactive Blue 4 y 72,

Reactive Red 120, Reactive Green 19 y 5 y Reactive Brown 10): Hasta 2,5 mg se cargaron en columnas analíticas de 2,5 ml de cama equilibradas con 10 volúmenes de Tris-HCl 20mM pH 8,5, 10% glicerol. Las proteínas se eluyeron en 4 etapas con 10 ml de 0,25 , 0,5, 1 y 1,5M KCl en amortiguador de equilibrio.

Columna de Afinidad de Metales Inmovilizados (IMAC) HITrap (Pharmacia) Sepharosa quelante activada con ácido iminodiacético: La columna de 1 ml de lecho y un tamaño de partícula de 34µm, primero se cargó con Cu^{+2} lavándola con 5 ml de CuSO_4 0,1 M. Luego se lavó con 5 ml de agua y se equilibró con 5 volúmenes de una solución de fosfato de sodio 20mM pH7,2 y NaCl 1M.. Posteriormente la columna se cargó con 2,7 mg de proteína que se eluyeron con una gradiente de 20 volúmenes de imidazol (0 a 90mM) en fosfato de sodio 20 mM pH 7,2 o cloruro de amonio (0 a 90mM) en el mismo amortiguador.

Columna de afinidad agarosa-UDP-ácido glucorónico (SIGMA): La columna de 1 ml de lecho se equilibró y se agregó Tris-HCl 7mM pH 7; 7,5; 8 y 8,5.

7.- Determinación de características cinéticas de las Hx-GTs de *Tetra* y *H.lechleri*.

Hx-GT de Tetra.

Los parametros cinéticos de K_m y V_{max} fueron determinados utilizando 2,5 µg de enzima enriquecida por el fraccionamiento cromatográfico descrito en la Tabla 1 (fracción post Superdex 75), Hx en un rango de 0,0625 a 1 mM y UDPG 1 mM bajo las condiciones descritas en la sección 3, determinando las distintas curvas de velocidad para cada concentración de sustrato. El valor de K_m y V_{max} fue obtenido a partir de los gráficos de Eadie-Hofstee para los respectivos Hx . Para estudiar la especificidad de la enzima con sustratos alternativos a los Hx y sus derivados, esta fracción se ensayó con esculetina bajo las condiciones descritas previamente. Las características cinéticas de la Hx-GT presente en la fracción 60/30% sulfato de amonio se realizaron con 100 µg de proteína, siguiendo el protocolo descrito más arriba.

Seiscientos microgramos de la fracción 60/30% sulfato de amonio y 5 µg de la fracción Superdex 75 de centeno se ensayaron con las lactamas bajo las condiciones descritas más arriba y con 50mM Bis-Tris pH 6,5 y Tris HCl pH 7,5.

El pH óptimo para la actividad Hx-GT 2,5 µg de la fracción Superdex 75 en 50mM Tris.HCl pHs 7; 7,5; 8; 8,5 y 9 según se describió previamente en la sección 3.

La temperatura óptima se determinó con 50 µg de la fracción 60/30% sulfato de amonio, incubada bajo las condiciones de ensayo usuales entre 20°C y 45°C.

Hx-GT de H.lechleri.

La caracterización cinética de la Hx-GT se realizó con 100 µg de la fracción 60/30% sulfato de amonio, siguiendo los protocolos descrito más arriba.

HBOA-GT y HMBOA-GT en extractos de SNA3 y Tracy T555.

Los estudios de actividad glucosiltransferásica con las respectivas lactamas se realizaron con 400 µg de cada una de las fracciones 60/30% sulfato de amonio, obtenidas según se describe en la sección 3. Las soluciones se incubaron hasta 3 h en Bis-Tris 75 mM, pH 6,5; Tris-HCl 75 mM, pH 7,5 y Tris-HCl 75 mM, pH 8,5 manteniendo el resto de las condiciones como en el ensayo para GT descrito en la sección 3. La actividad Hx-GT se determinó para cada extracto según se describe en la sección 3.

8.- Actividad β-glucosidásica en extractos de centeno.***Actividad con Hx-Glc:***

Se determinó la actividad glucosidásica presente en el eluido de las columnas cromatográficas de intercambio iónico en Bis-Tris-HCl 40mM, pH 6; DIMBOA-Glc 0,3 mM; proteína 0,1 mg, en un volumen final de 0,1 ml (Cuevas y col., 1992). Las soluciones se incubaron 10 min a 30°C y se detuvieron las reacciones enzimáticas con extracción Folch. La fase acuosa se analizó por cromatografía de fase reversa en LiChroChart C18 de Merck, eluyendo los Hx isocráticamente con metanol 38% en agua ácida.

Actividad con p-nitrofenil-β-D-glucopiranosido (pNPG).

Este sustrato sintético para β-glucosidasas se ensayó en Bis-Tris 78mM, pH 6, pNPG 0,083mM con 0,1 mg de proteína en un volumen final de 0,4 ml. Los ensayos se detuvieron con 1,5 volúmenes de Na₂CO₃ 1M, y la actividad se determinó por absorbancia a 410 nm (Cuevas y col., 1992).

Resultados

Obtención de los Hx, los glucósidos y las lactamas glucosiladas.

Los sustratos para las actividades enzimáticas propuestas para este estudio no se producen por laboratorios industriales, y fué necesaria su purificación desde tejido vegetal. A través de los protocolos descritos por Queirolo y col. (1983) y Lyons y col. (1988) se obtienen extractos etéreos o acuosos de color marrón, enriquecidos en los respectivos Hx o sus glucósidos (Fig.4a). Hofman y Hofmanová (1969a) describieron la separación de los Hx y sus respectivas lactamas por filtración de los extractos acetónicos a través de Sephadex G 10 equilibrada con agua saturada con CHCl_3 y por ello se decidió ensayar la resina Fractogel TSK HW 40-S de Merck de característica cromatográficas similares a la Sephadex G 10. Esta resina condujo a una purificación parcial de los compuestos deseados, y la mezcla quedó de color rojo oscuro, de consistencia chiclosa y no solidificaba a -20°C . El HPLC y gradientes de metanol apropiadas, resuelven los diversos componentes de la mezcla. Los Hx son retenidos por columnas de fase reversa, eliminándose así los compuestos más hidrofílicos de la mezcla, y se obtienen los productos deseados como cristales rosados que dan origen a un sólo pico en los cromatogramas de HPLC (Fig.4c). Pese a que esta técnica al comienzo dió el resultado esperado, el pigmento rojo de la mezcla es fuertemente retenido por la columna de fase reversa y contamina las corridas posteriores, al ser eluido lentamente. Fue necesario entonces purificar los Hx de un modo alternativo, encontrándose que una columna de intercambio aniónico no retiene a los Hx, pero retiene gran parte de los compuestos del extracto crudo original. Al filtrar por Fractogel el eluido de una columna de DEAE celulosa se obtienen los cristales deseados con un rendimiento aproximado de 0,07% respecto del peso fresco del material de partida. Esta combinación cromatográfica de DEAE seguida de Fractogel se adoptó como rutinaria para la obtención de los Hx y sus glucósidos.

Las lactamas glucosiladas de DIBOA y DIMBOA se obtuvieron por reducción de los respectivos Hx-Glc, purificados según se describió previamente. El rendimiento de las reducciones fué cercano al 30% y los productos se separaban fácilmente por filtración en gel.

Adecuación de los ensayos enzimáticos de extractos de maíz a extractos de otras gramíneas.

La actividad Hx-GT en centeno no había sido descrita con anterioridad, y se juzgó prudente el repetir los protocolos de preparación de los extractos y de ensayo descritos previamente para maíz. Bailey y Larson (1989) prepararon extractos en Hepes 50 mM pH 7,5 y luego realizaron el ensayo

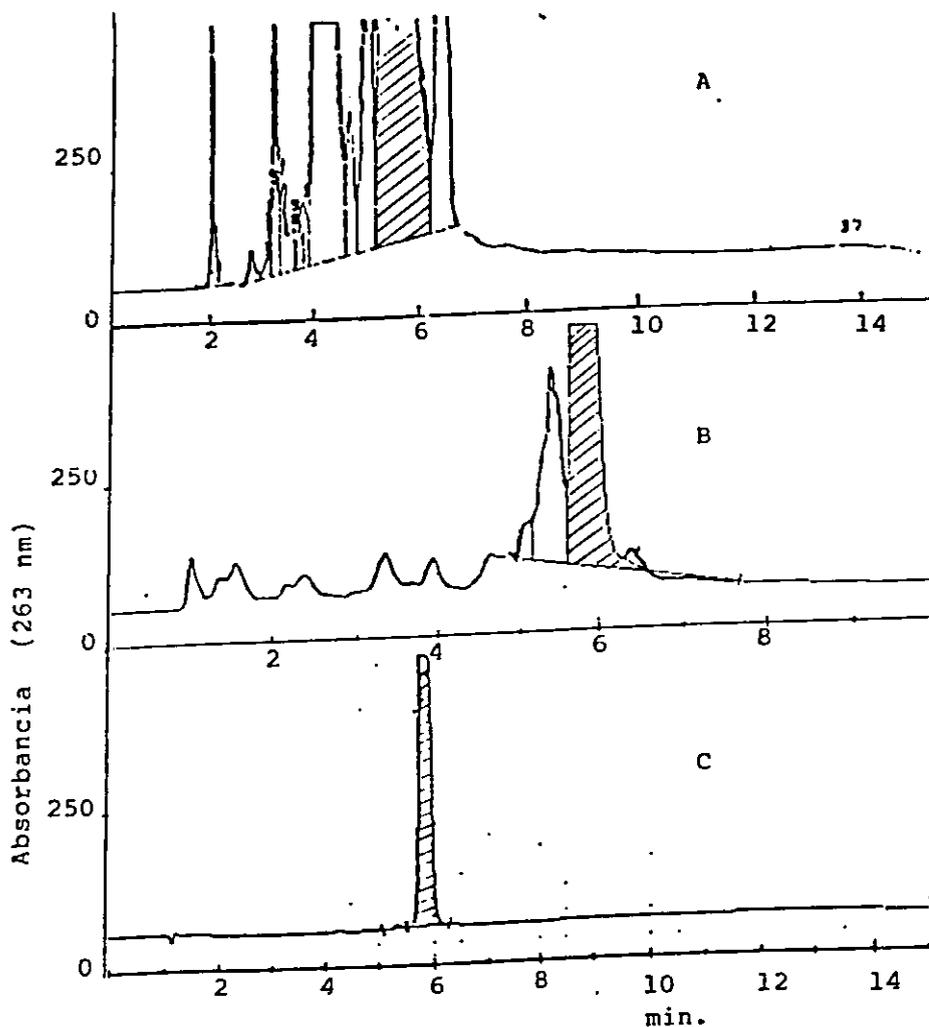


Fig. 4. Análisis en HPLC de la purificación del DIBOA-Glc (área achurada). El Hx-Glc se purificó por cromatografía de intercambio iónico y exclusión. El extracto acuoso de la fracción aérea de plántulas de centeno se obtuvo según se describe en la sección métodos 2. Las muestras se eluyeron con un gradiente de metanol en agua ácida según se describe en la sección métodos 2. A) Extracto crudo. B) Extracto cromatografiado en DEAE celulosa. C) Extracto cromatografiado en DEAE celulosa seguida de exclusión molecular (Fractogel TSK Hw 40-S).

en Hepes 50 mM, pH 8,2. El pH final de la mezcla es cercano a 7,9. Bajo estas condiciones los extractos hidrolizaban los Hx-Glc, indicando la presencia de una glucosidasa activa. La β -glucosidasa de maíz que reconoce los Hx-Glc tiene actividad óptima a pH 6 (Cuevas y col., 1992), por lo tanto se cambió el pH al cual se hacían los extractos y los ensayos. Por otra parte, la Hx-GT descrita en maíz tiene un óptimo de actividad a pH 8,5 (Bailey y Larson, 1989). Al preparar los extractos y hacer los ensayos a pH 8,5 y separar los productos por HPLC, fué posible observar la aparición de un pico con un tiempo de retención idéntico al del Hx-Glc esperado, y que faltaba al incubar el extracto sin UDPG o al ensayar el extracto calentado a 100°C. Este protocolo permitió determinar que en centeno Tetra también se encuentra una GT capaz de reconocer los Hx como sustratos (Fig.5). Posteriormente se observó que la enzima de centeno era más activa y más estable al extraerla y almacenarla a pH 7 (luego de 3 meses a -20°C retiene 70% de la actividad inicial) adoptándose el protocolo descrito en la sección 3 como rutina para las extracciones, almacenamiento y ensayos.

La determinación de la actividad DIMBOA-GT contempla la velocidad de descomposición del DIMBOA.

Estabilidad de los Hx y lactamas en las condiciones de ensayo.

Los Hx son inestables en solución acuosa y su velocidad de descomposición guarda una relación directa con el incremento del pH de la solución entre pH 3 y 9 (Bravo y Niemeyer, 1986). Fue necesario entonces determinar la estabilidad de estos compuestos en las condiciones de ensayo descritas y así saber los tiempos máximos aceptables de incubación. En las condiciones del ensayo, que son aquellas descritas para la Hx-GT, DIMBOA presenta un semiperíodo cercano a los 18 min en tanto que HBOA se descompone un 25% a los 45 min y DIBOA sigue siendo estable a los 45 min (Fig.6).

Ensayo de la Hx-GT presente en la fracción 60/30% de sulfato de amonio proveniente de plántulas de centeno.

Al ensayar 50 μ g de proteína en las condiciones descritas en métodos, sección 3, se observa que la concentración de productos incrementa en forma lineal en el tiempo, por 40 min al menos (Fig.7). La Fig. 8 muestra el extracto suplementado con BSA indicando que la estabilidad de la enzima no cambia durante el desarrollo del ensayo. Por tanto, al hacer los ensayos por tiempos menores o iguales a 20 min, se está en condiciones de velocidad inicial. La actividad DIBOA-GT se estimuló 4 y 1,5 veces al adicionar a los ensayos β -mercaptoetanol 5 mM y $MgCl_2$ 1mM respectivamente, los cuales se correlacionan con los resultados obtenidos por Bailey y Larson (1989).

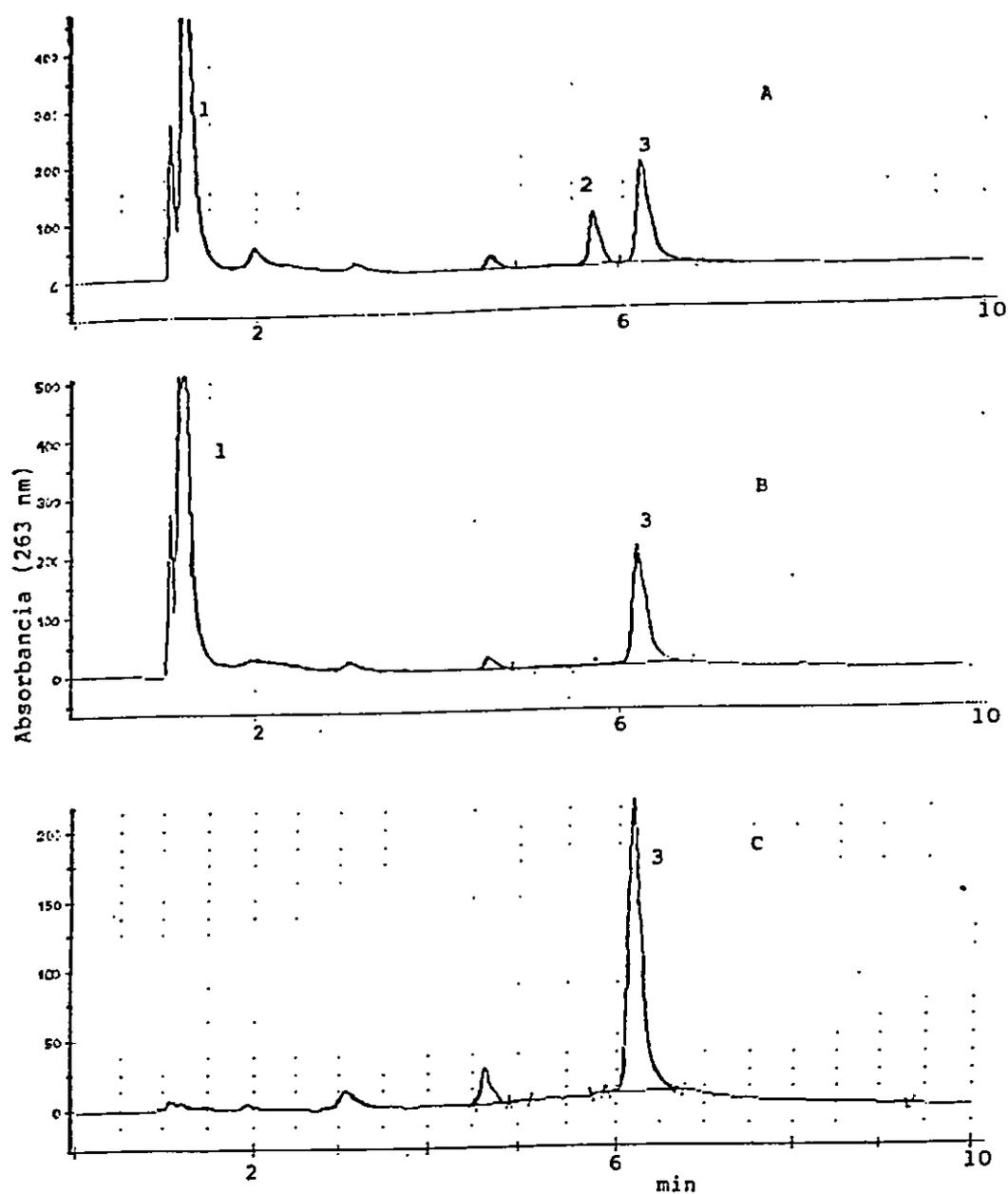


Fig. 5. Análisis en HPLC de los ensayos para la Hx-GT de la fracción 60/30% sulfato de amonio de centeno. Los análisis en HPLC se realizaron en una gradiente de metanol en agua ácida según se describe en la sección métodos 3. Las condiciones de ensayo y obtención de los extractos proteicos se describen en la sección métodos 3. A) 100 μ g de proteína ensayadas 20 min en presencia de 0,5 mM DIBOA, 1mM UDPG. B) 100 μ g de proteína calentada a 100°C por 15 min, ensayadas con 0,5 mM DIBOA, 1mM UDPG por 20 min. C) 100 μ g de proteína ensayada por 20 min. con 0,5 mM DIBOA, en ausencia de UDPG.

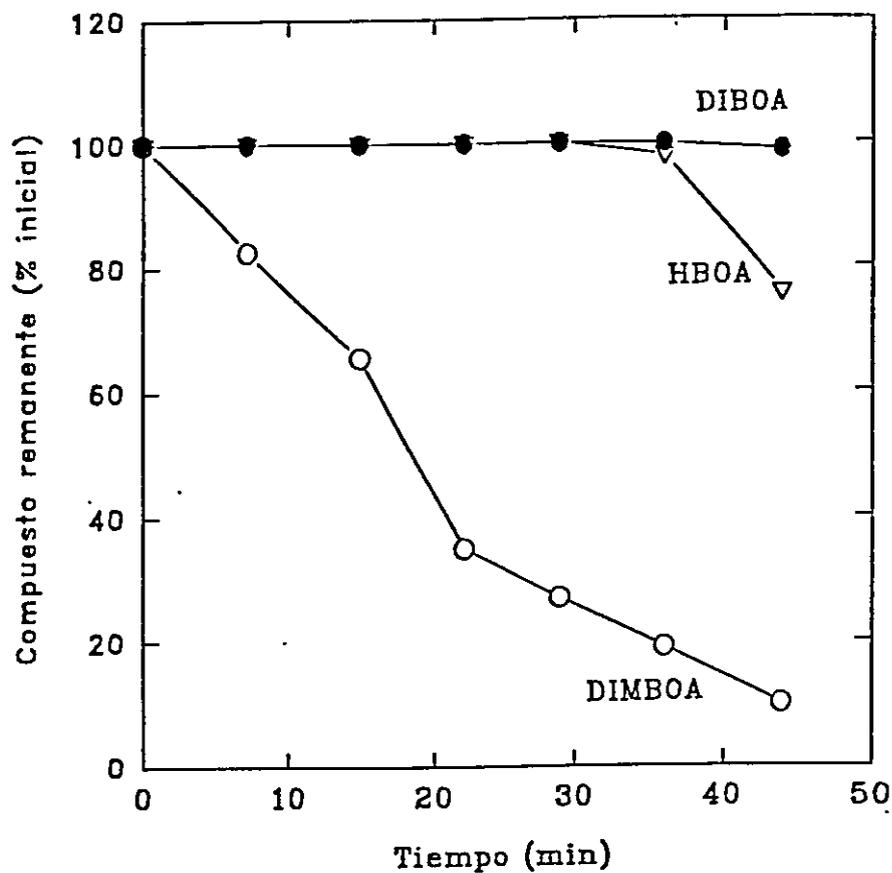


Fig. 6. Estabilidad de los Hx y HBOA en las condiciones de ensayo para la Hx-GT. 0,5 μg de cada compuesto se incubó por diversos tiempos en 50 mM Tris -HCl pH 8,5, 1 mM UDPG, 5mM β -mercaptoetanol, 1mM MgCl_2 , a 37°C en ausencia de proteína. El análisis de los ensayos se realizó en HPLC.

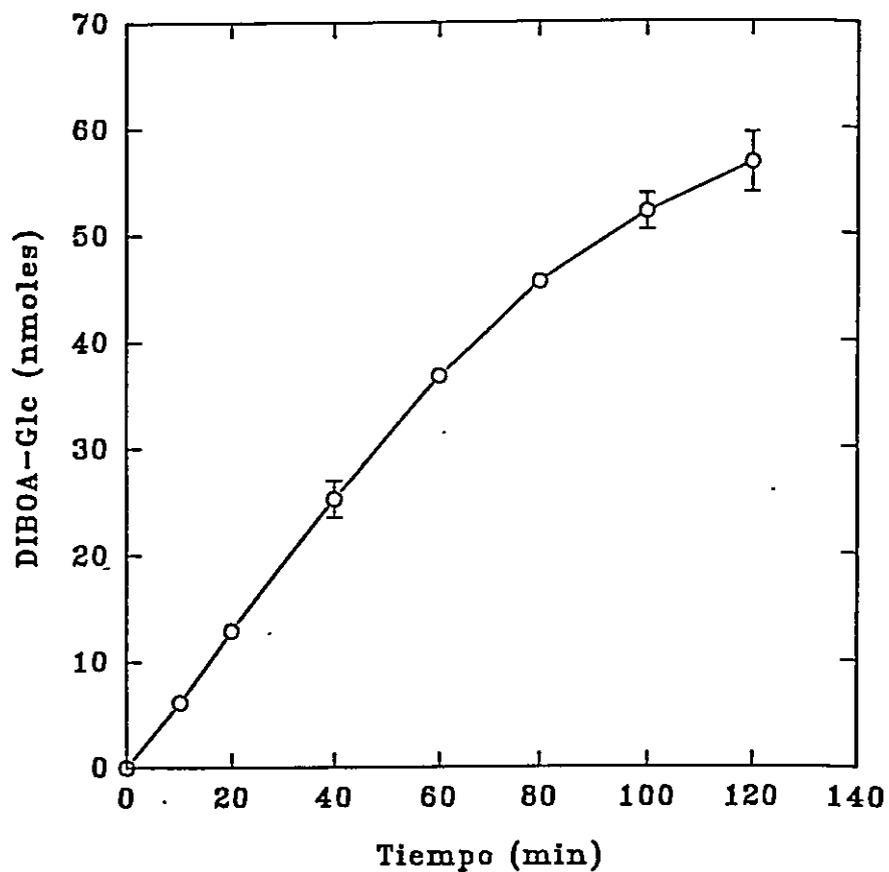


Fig. 7 Actividad en el tiempo de la Hx-GT de centeno.
50 μg de la fracción 30/60% sulfato de amonio se ensayaron
con DIBOA según se describe en la sección métodos 3.

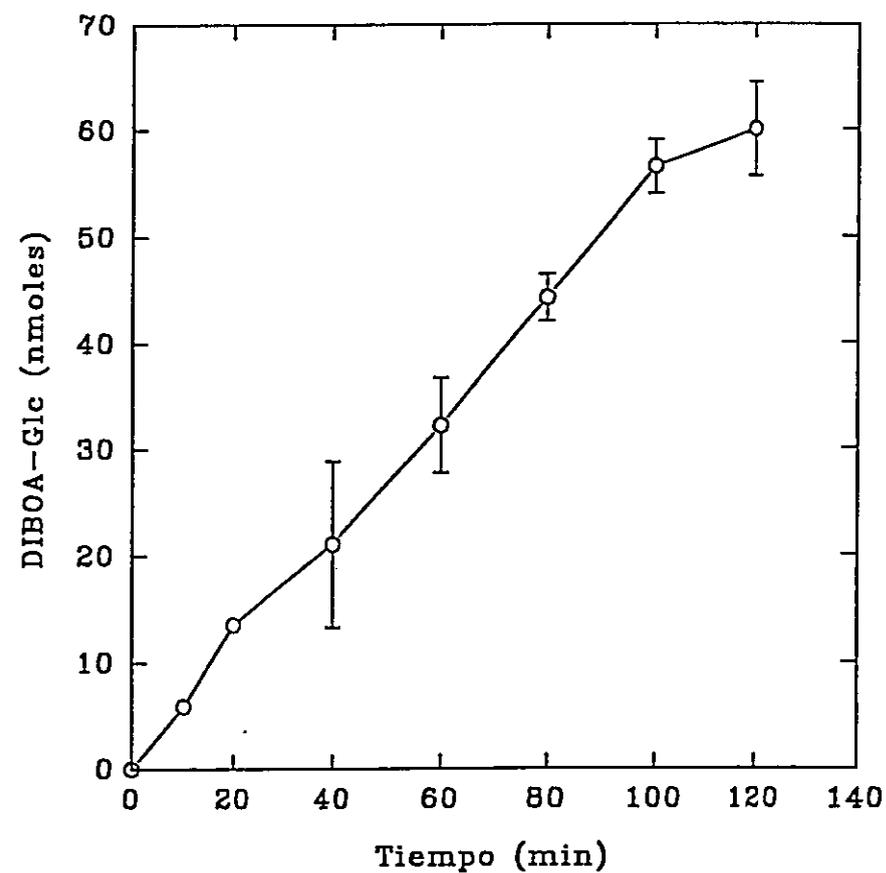


Fig. 8 Efecto del BSA en la actividad de la Hx-GT de centeno. 50 μg de la fracción 30/60% sulfato de amonio se ensayaron según se describe en la sección métodos 3 en presencia de 200 μg de BSA.

Enriquecimiento de la Hx-GT presente en hojas de plántulas de centeno.

La precipitación de 0,6g de proteína con sulfato de amonio en un rango de 30 a 60% de saturación incrementó la actividad en 1,3 veces respecto al extracto proteico original, con un rendimiento del 90%. Por lo tanto, el cálculo de rendimiento y enriquecimiento de las cromatografías posteriores se refirió a la actividad total presente en la fracción 60/30% (Tabla 1). El precipitado resuspendido fué aplicado sobre celulosa DEAE que retiene cerca del 40% de las proteínas cargadas, rinde un 75% de la actividad aplicada, y la actividad Hx-GT eluyó a lo largo de toda las gradientes intentadas, enriqueciéndose la muestra sólo 2 veces (Tabla 1). Todas las fracciones provenientes de esta columna, conteniendo un total de 0,4 g de proteína se aplicaron sobre hidroxapatita. La actividad específica posterior a la cromatografía por hidroxapatita fué 6 veces mayor que la fracción eluida en DEAE celulosa y 12 veces respecto de la actividad específica de la fracción 60/30% sulfato de amonio (Tabla 1). Todas las fracciones provenientes de la elución por hidroxapatita, conteniendo un total de 40 mg de proteína se aplicaron sobre la columna Mono Q, que incrementó la actividad específica 1,6 veces respecto de la fracción eluida de hidroxapatita y 17 veces respecto del precipitado con sulfato de amonio, recuperándose cerca de un 60% de la actividad total (Tabla 1, Fig. 9). Las fracciones obtenidas en el volumen de elución de 15 a 23 ml conteniendo 2 mg de proteína se aplicaron a una columna de filtración en gel Superdex 75, que incrementó la actividad específica de la muestra 35 veces respecto de la actividad original y 2 veces respecto de la muestra eluida desde Mono Q y se recupera un 27% de la actividad cargada (Tabla 1).

El enriquecimiento de la Hx-GT demostró ser un procedimiento difícil. Además del protocolo de purificación descrito se probaron otras metódicas que no dieron resultados positivos, entre ellos, la cromatografía IMAC, que pese a que la enzima se unió a la resina cargada con cobre, no permitió resolver las proteínas durante la elución con diversas gradientes de imidazol. La enzima tampoco se unió a las resinas coloreadas a diversos pH de ensayo ni a la UDP-ácido glucurónico. Las resinas coloreadas, son resinas de afinidad de espectro amplio, y han sido utilizadas previamente en la purificación de otras glucosil transferasas (Schmid y Grisebach, 1982; Latchinian e Ibrahim, 1991). La agarosa-ácido glucurónico, que puede constituir una matriz afinidad de espectro limitado, también ha sido usada exitosamente en la purificación de otras GT (McIntosh, 1990).

La unión de las proteínas a las resinas de intercambio iónico dependía de la cromatografía previa, sugiriendo la formación de complejos multiproteicos, de propiedades diferentes a la proteína buscada y que serían los que interactúan con las resinas.

El perfil de elución en la columna Mono Q muestra además una separación significativa entre las Hx-GT y DIBOA- β -glucosidasa (Fig. 9). A través del procedimiento de purificación se

Tabla 1. Enriquecimiento de la Hx-GT presente en plántulas de centeno, cultivar Tetra

Etapa de purificac.	Act. total pkat	Proteína mg	a.e. pka/mg prot.	Rendimiento %	Enriquec. x-veces
Frac.60/30% sulf.de am.	83000	1245	67	100	1
DEAE celulosa	62433	464	135	75	2
Hidroxiapat.	29917	40	748	36	12
Mono Q	17617	15	1174	21	17
Superdex 75	4750	0,54	2375	1,6	35

Los amortiguadores en que se aplicaron las proteínas y las condiciones en que se eluyeron y monitorearon cada una de las columnas cromatográficas se describen en la sección métodos 6. La proteína proveniente del pp. de sulfato de amonio, resuspendida en el amortiguador para DEAE celulosa se dividió en tres fracciones que se cromatografiaron separadamente por DEAE celulosa. Los eluidos de cada cromatografía se unieron y las proteínas se dializaron en el amortiguador apropiado para la cromatografía en hidroxapatita. El extracto dializado se dividió en 3, y cada fracción se recromatografió por hidroxapatita. Estos eluidos a su vez, se unieron y el pool se dializó en el amortiguador apropiado para la cromatografía en Mono Q y en seguida la muestra completa se aplicó en la Mono Q. Las fracciones positivas para Hx-GT se unieron y, se concentraron, dializándolas en el amortiguador para la cromatografía de exclusión adicionado con PEG al 20% p/v. Las fracciones proteicas no retenidas por las columnas de intercambio iónico no presentaron actividad Hx-GT.

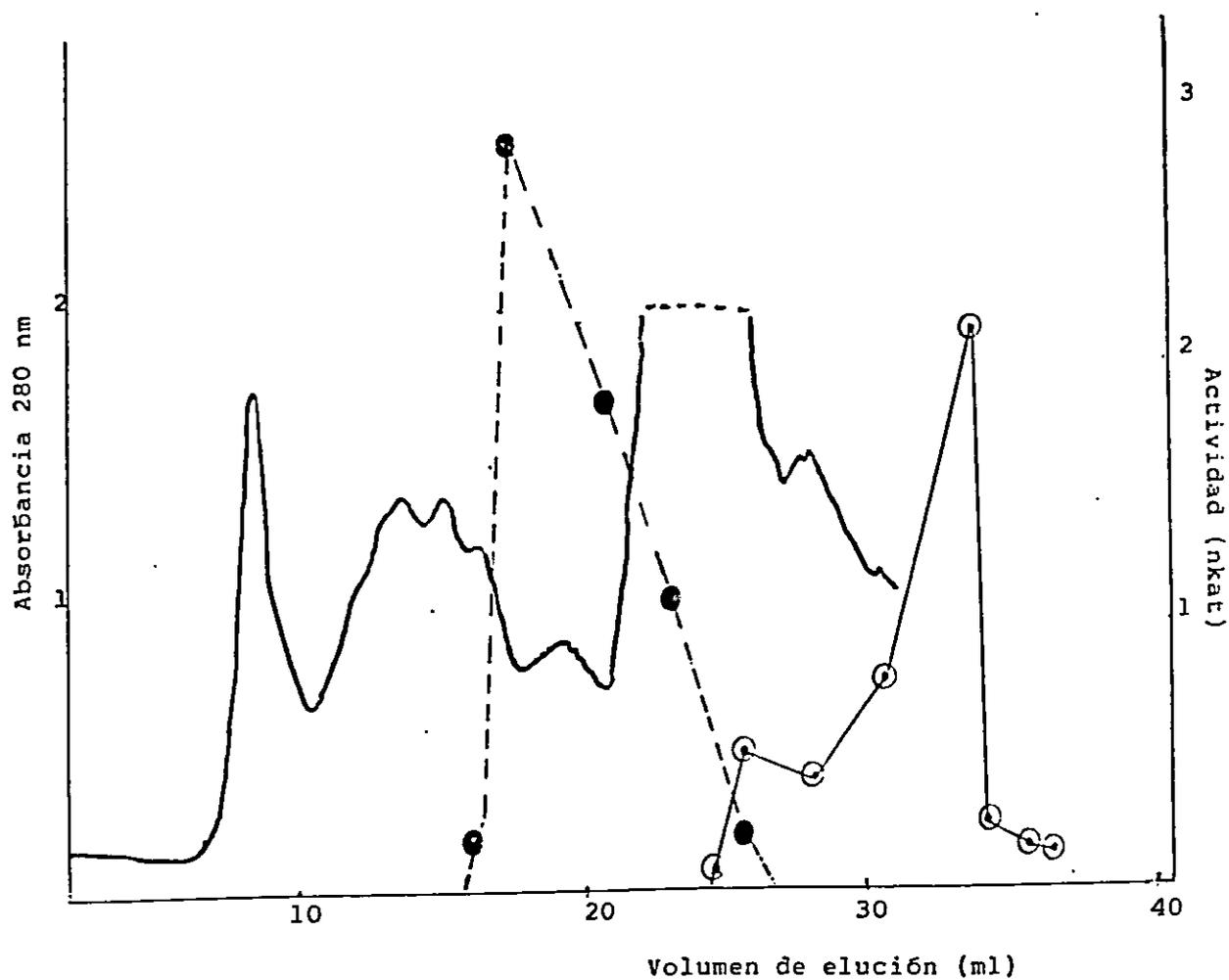


Fig. 9 Cromatografía por Mono Q (Pharmacia) de la fracción proteica 30/60% sulfato de amonio de centeno. — A_{280} ; —●— Hx-GT ; —○— β -glucosidasa. Las condiciones de carga y de elución de la columna se realizaron según se describe en la sección métodos 6.

observó que las cromatografías en Mono Q y Superdex 75 mostraron sólo un pico de actividad Hx-GT (Figs. 9 y 13). La cromatografía de los pp. de los extractos en Mono P y Mono Q también mostraron sólo un pico de actividad Hx-GT (Fig. 12).

Caracterización general de la Hx-GT de centeno.

En las distintas centrifugaciones se observó que toda la actividad total se recupera en los respectivos sobrenadantes (Tabla 2) y coincide con la localización de la α -manosidasa, que es una enzima soluble (Boller y Kende, 1979, Bergenstråhle y col., 1992). La enzima eluida desde Superdex 75 (parcialmente pura) presenta un máximo de actividad a pH 8,5 y 41°C (Fig. 10 y 11). El isocromatofoco con Mono P muestra un pico de actividad que eluye a pH 4,4 (Fig 12) y la filtración por Superdex 75 también muestra un sólo pico de actividad, que eluye a un volumen correspondiente a 43.000 daltons (Fig 13) según la calibración de la columna. Considerando que se usó NaCl para la elución, la proteína no debería formar parte de un complejo multiproteico.

Caracterización cinética de la Hx-GT de centeno.

La enzima proveniente de la fracción Superdex 75 tiene más actividad con DIMBOA aunque también reconoce DIBOA con la misma facilidad (Tabla 3, Figs. 14 y 15). La misma fracción no afectó las lactamas, aún cuando los ensayos se realizaron por tiempos mayores y a distintos pH. La enzima parcialmente pura tampoco reconoce como sustrato la esculetina, una cumarina común de plantas, de estructura análoga a DIMBOA y que se acumula como glucósido (Ibrahim y Boulay, 1980).

La fracción 60/30% sulfato de amonio de centeno tampoco contiene una GT capaz de reconocer al HBOA y al HMBOA como sustratos, tanto bajo las condiciones rutinarias de ensayo como al ensayarla a otros pH y tiempos de incubación mayores.

Actividad Hx-GT en extractos proteicos provenientes de diversas gramíneas.

Los extractos provenientes de *Z.mays*, *E.canadiensis*, *T.durum*, *T.aestivum* cv. Millaleu, y *H.lechleri* tienen una actividad GT capaz de reconocer a los Hx como sustratos. Sin embargo, los extractos provenientes de *H.vulgare*, *A.sativa* y *A.fatua*, que son gramíneas que no sintetizan Hx, no contienen actividad Hx-GT, aún después de agregar castanospermina e incubarlos por tiempos mayores descartando la posibilidad de hidrolización de los glucósidos por la presencia de β -glucosidasas en los extractos. Estos mismos extractos hidrolizaban pNP-Glc, indicando que ellos contenían enzimas activas. Todos estos resultados indican que la Hx-GT presente en las gramíneas que sintetizan Hx pertenece a la ruta de los Hx, puesto que ella está ausente en las gramíneas que

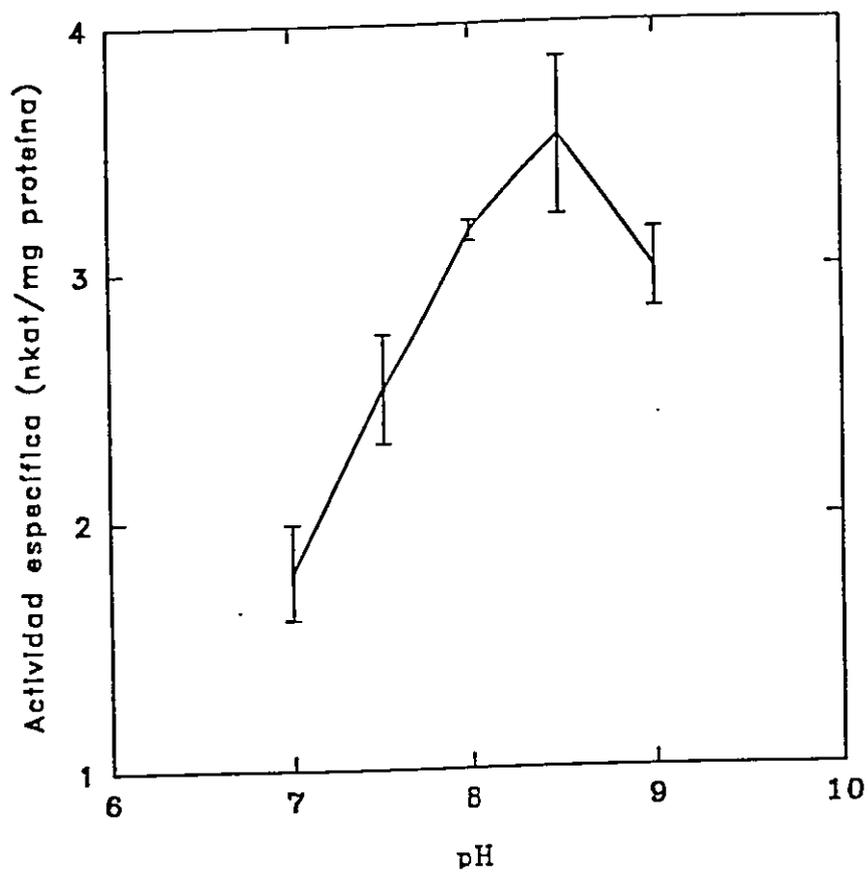


Fig. 10. Variación de la actividad específica de la Hx-GT de centeno con el pH. 2,5 μ g de la fracción Superdex 75 se ensayaron con DIBOA por 15 min a 37°C según se describe en la sección métodos 3 en 50 mM Tris-HCl pHs 7; 7,5; 8; 8,5 y 9.

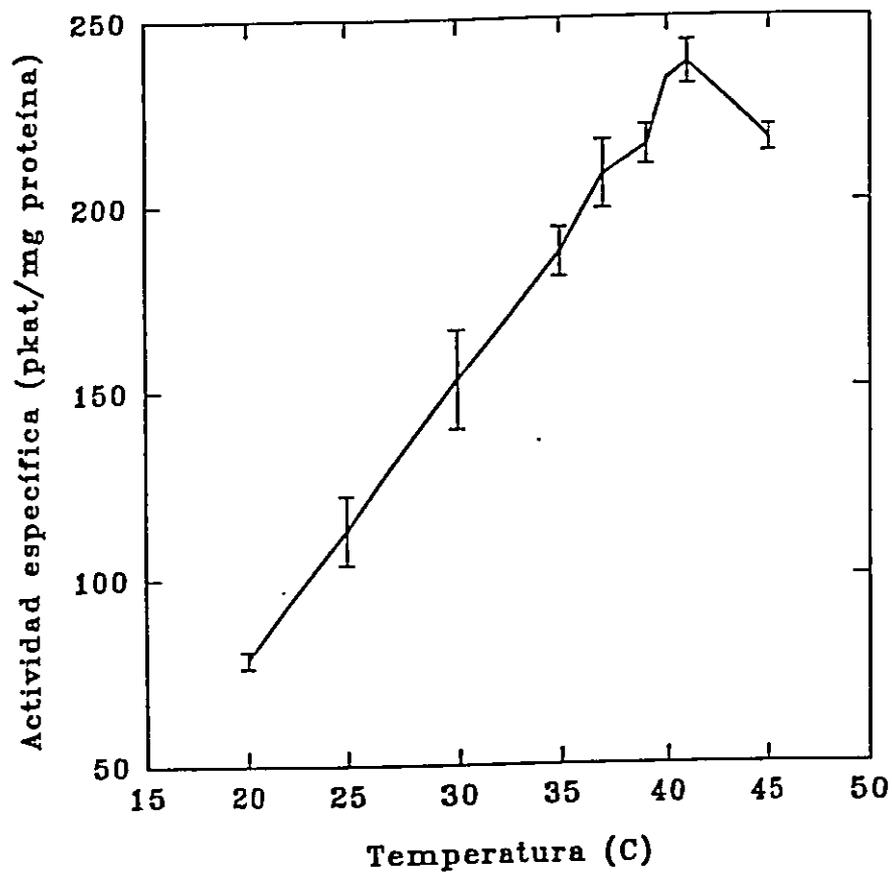


Fig. 11. Variación de la actividad de la Hx-GT de centeno con la temperatura. 50 μ g de la fracción 60/30% sulfato de amonio se ensayaron con DIBOA por 30 min. según se describe en la sección métodos 3, a diversas temperaturas.

Tabla 2. Solubilidad de la Hx-GT de extractos proteicos de hojas de 6 días de plántulas de centeno, cultivar Tetra.

Fracción	Actividad total/fracción (nkat)	
	Hx-GT	α -manosidasa
Sobrenadante 1.200 xg	2,06	11,7
Sobrenadante 13.000 xg	2,57	11,8
Sobrenadante 130.000 xg	2,53	7,93
Pella 13.000 xg	0,11	0,083
Pella 130.000 xg	0,038	0,034

Los protocolos de fraccionamiento se describen en la sección métodos 5. *Hx-GT*: Cerca de 200 μ g de proteína proveniente de cada sobrenadante y 400 μ g de proteína proveniente de las pellas respectivas se incubaron con DIBOA por 120 min en las condiciones de ensayo descritas previamente. *α -manosidasa*: Cerca de 30 μ g de proteína proveniente de cada sobrenadante y 400 μ g de cada pella se incubaron por 70 min según se describe en la sección métodos 5.

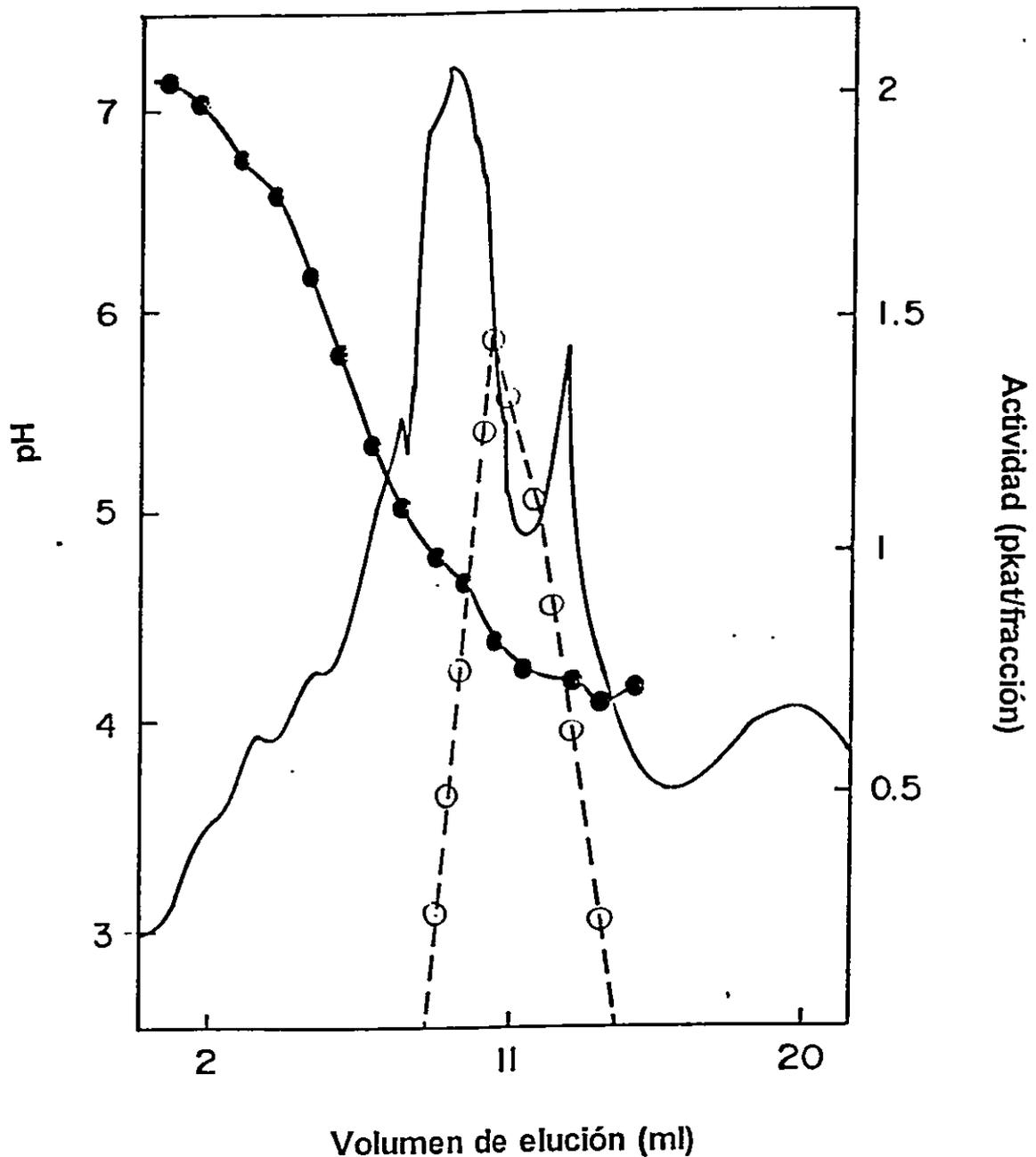


Fig. 12. Isocromatografía de la Hx-GT de centeno en la columna Mono P de 20mg de proteína provenientes del fraccionamiento por Mono Q. Las condiciones de aplicación y elución de la muestra se realizaron según se describe la sección métodos 6. Este mismo análisis se repitió al menos 4 veces, tanto con alícuotas de proteínas enriquecidas como con proteínas del extracto original.

— A₂₈₀ ; —○— Hx-GT ; —●— pH

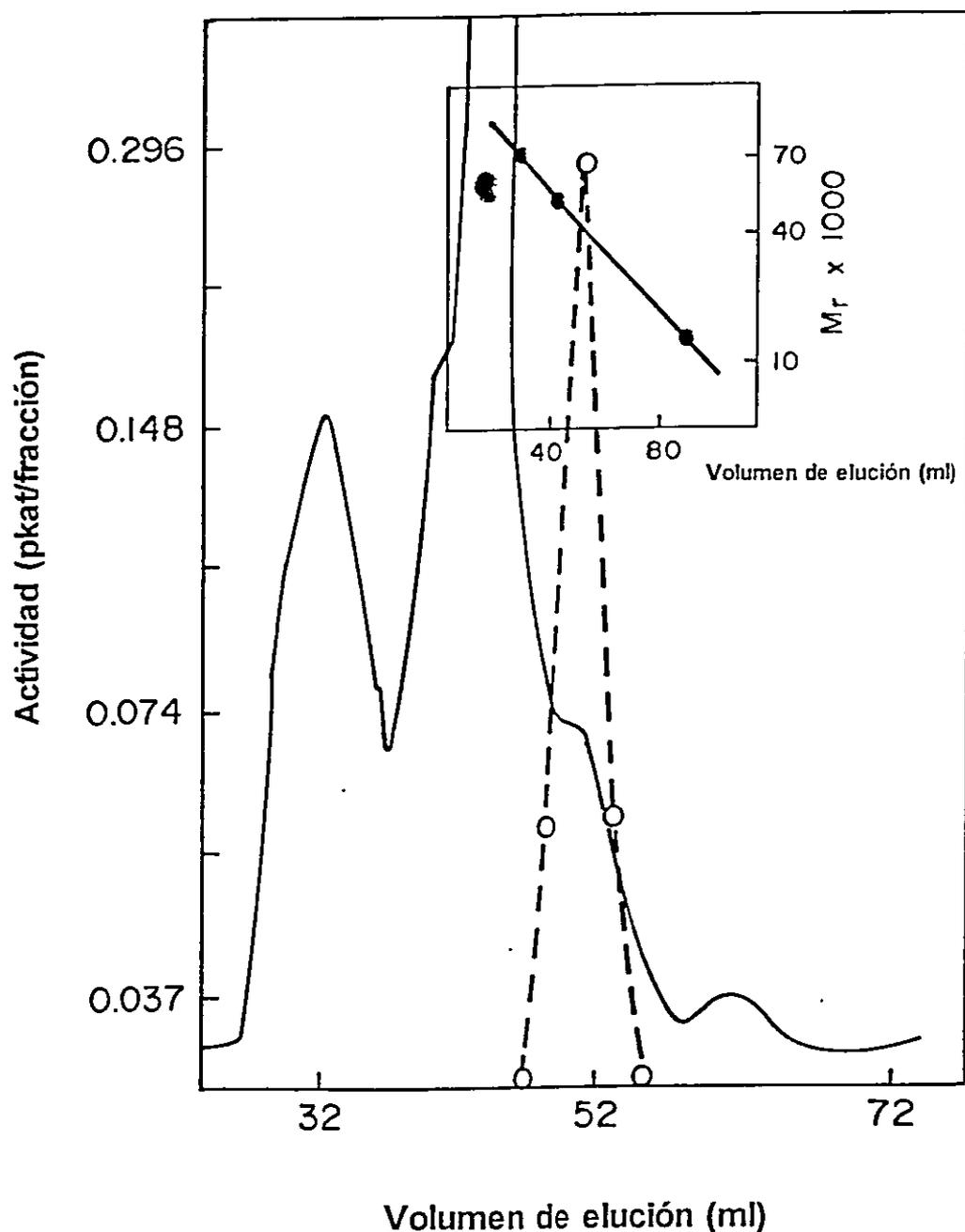


Fig. 13. Filtración en Superdex 75 de la Hx-GT presente en la fracción proteica proveniente de la cromatografía en Mono Q. 2 mg de proteína se aplicaron y eluyeron según se describe en la sección métodos 6. El gráfico del recuadro indica el peso molecular y el volumen de elución de las proteínas de referencia: BSA (67.000), ovalbúmina (43.000) y ribonucleasa A (13.700). --- A_{280}

Tabla 3. Características cinéticas de la Hx-GT presente de plántulas de centeno, cultivar Tetra.

Sustrato	K_{mapp} (μ M)	$V_{m\acute{a}x}$ (pkat)
DIBOA (a)	73	8,2
DIMBOA (a)	65	15,6
HMBOA (b)	n.d.	n.d.
HBOA (b)	n.d.	n.d.
Esculetina (c)	n.d.	n.d.

n.d. : actividad no detectada (menor de 0,2 pkat)

a : 5 μ g de la fracción Superdex 75 se ensayaron con las respectivas benzoxazinonas según se describe en la sección métodos 7.

b : 5 μ g de la fracción Superdex 75 o 600 μ g de la fracción 60/30% sulfato de amonio, se ensayaron hasta 70 min, a pH 6,5; 7,5 y 8,5, según se describe en la sección métodos 7.

c : 2,25 μ g de la fracción Superdex 75 o 600 μ g de la fracción 60/30% sulfato de amonio se ensayaron 40 min bajo las condiciones de ensayo para la Hx-GT, según se describe en la sección métodos 7.

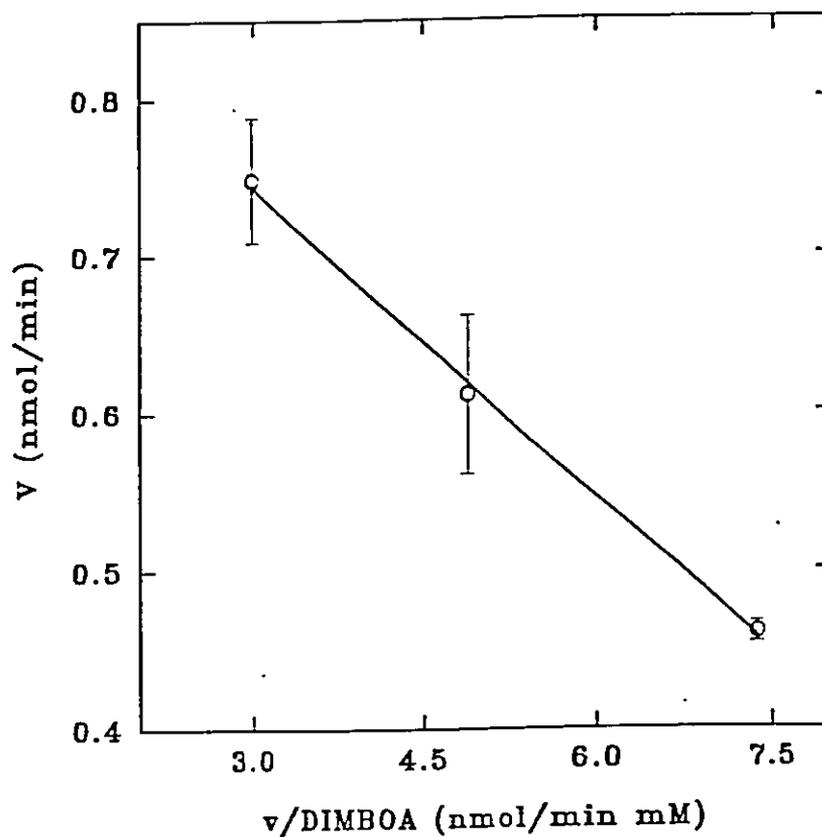


Fig. 14. Gráfico de Eadie-Hofstee para la determinación de la K_m para DIMBOA de la Hx-GT de centeno. Las determinaciones se realizaron con $2,5\mu\text{g}$ proteína proveniente de la fracción Superdex 75, Hx en un rango de $0,0625$ a $0,25\text{mM}$ y UDPG 1mM , determinando las distintas curvas de velocidad para cada concentración de sustrato bajo las condiciones descritas en la sección métodos 3. Las desviaciones estándar corresponden a 3 determinaciones independientes.

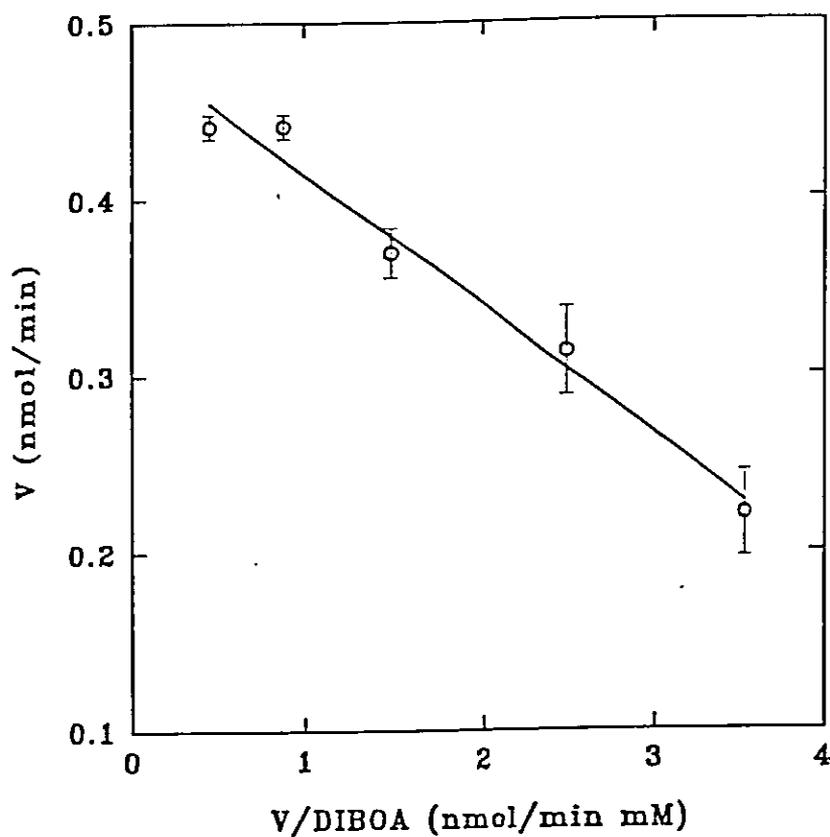


Fig. 15. Gráfico de Eadie-Hofstee para la determinación de la K_m para DIBOA de la Hx-GT de centeno. Las determinaciones se realizaron, por triplicado, con $2,5\mu\text{g}$ proteína proveniente de la fracción Superdex 75, Hx en un rango de $0,0625$ a $0,5\text{mM}$ y UDPG 1mM , determinando las distintas curvas de velocidad para cada concentración de sustrato bajo las condiciones descritas en la sección métodos 3.

no los sintetizan.

El extracto proteico de *H. Lechleri*, al cuál se determinó $K_{m\text{ app}}$ y V_{max} para la Hx-GT con ambos Hx en presencia de castanospermina, presentó mayor V_{max} y afinidad por DIMBOA (Figs 16 y 17 y Tabla 4). El extracto de centeno presentó valores mayores con respecto a ambos Hx (Figs. 18 y 19, Tablas 3 y 4) en comparación con aquellos obtenidos con la enzima semipurificada.

Los extractos provenientes de *Z.mays* y *T.durum* no presentaron actividad GT con las lactamas HBOA y HMBOA.

Variación del contenido de Hx en centeno, cambio en la actividad de la Hx-GT en el tiempo y localización tisular de la Hx-GT de centeno.

Los Hx se encontraron tanto en hojas como en raíces. En ambos tejidos incrementa y disminuye a lo largo del tiempo de forma no bien definida. La enzima Hx-GT se expresó tanto en hojas como en raíces y la actividad total también incrementa y disminuye lo largo del desarrollo de la plántula de forma indefinida. Los patrones de variación del contenido de Hx y actividad total de la Hx-GT no se correlacionan. La actividad en las hojas es mayor que en las raíces, y en hojas pareciera incrementar a los tiempos más tardíos. La variación de la expresión de la actividad Hx-GT en hojas y raíces en el tiempo pareciera seguir patrones similares (Fig 20).

La Hx-GT se encuentra a lo largo de toda la hoja y la actividad incrementa ligeramente en el extremo basal. Esta distribución de la actividad no varía significativamente con el crecimiento de la plántula (Tabla 5), aunque la actividad es claramente mayor a los 12 días. En raíces pareciera expresarse más homogéneamente que en la hoja y los niveles de expresión tienden a disminuir con el crecimiento (Tabla 5).

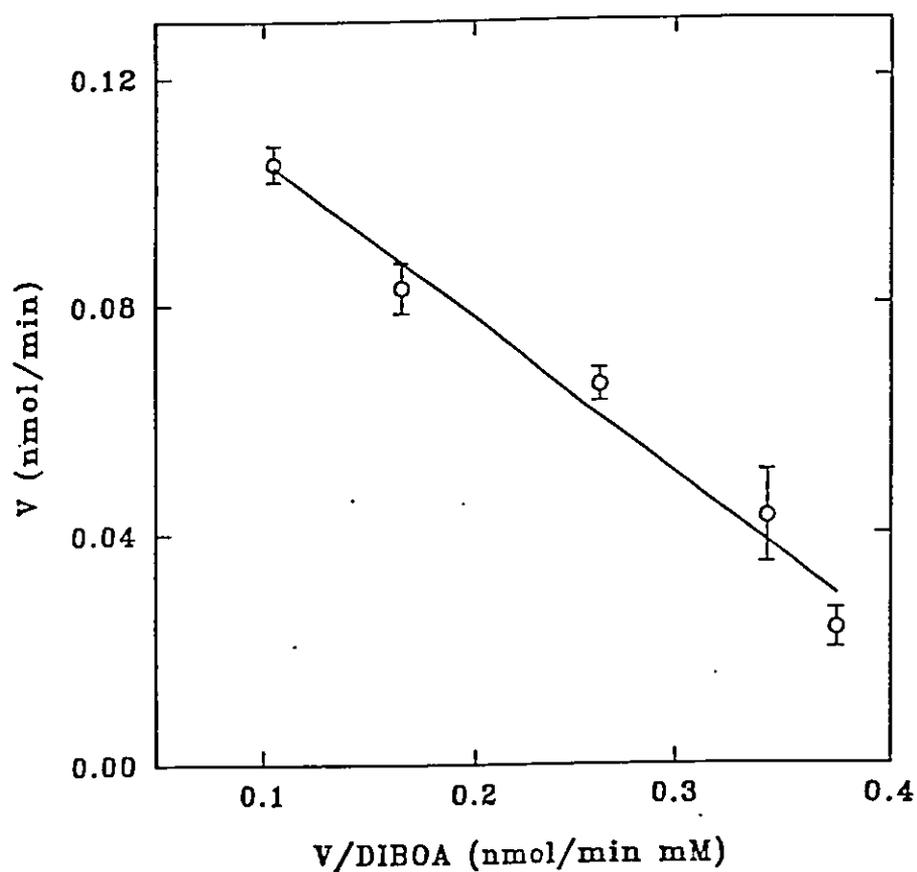


Fig. 16. Gráfico de Eadie-Hofstee para la determinación de la K_m para DIBOA de la Hx-GT de *H. lechleri*. Las determinaciones se realizaron con 100 μ g proteína proveniente de la fracción 60/30% sulfato de amonio, Hx en un rango de 0,0625 a 0,1mM y UDPG 1mM, determinando las distintas curvas de velocidad para cada concentración de sustrato bajo las condiciones descritas en la sección métodos 3. Las desviaciones estándar corresponden a 3 determinaciones independientes.

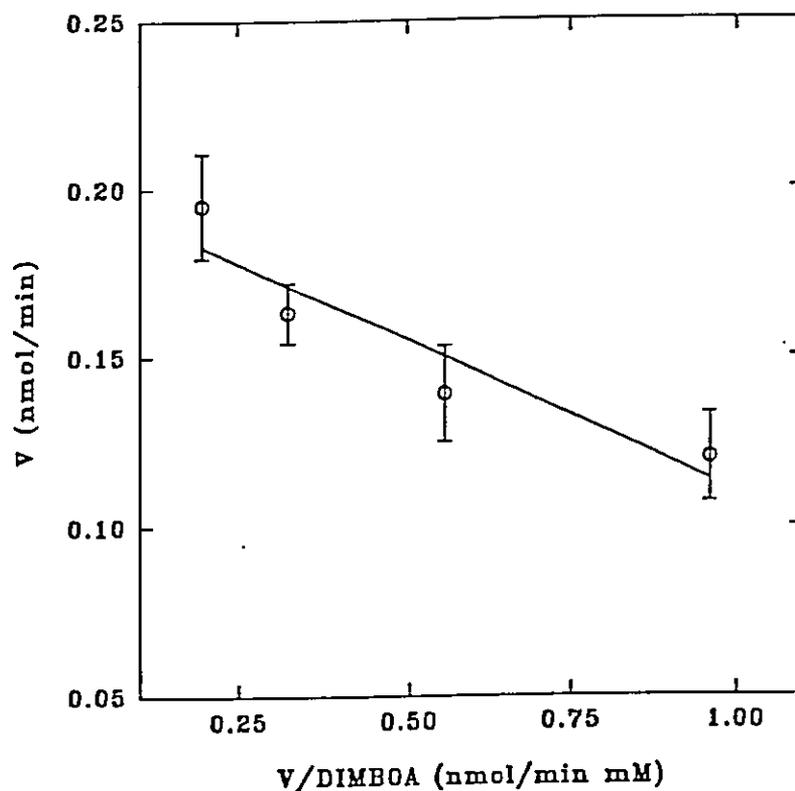


Fig. 17. Gráfico de Eadie-Hofstee para la determinación de la K_m para DIMBOA de la Hx-GT de *H. lechleri*. Las determinaciones se realizaron con 100 μ g proteína proveniente de la fracción 60/30% sulfato de amonio, Hx en un rango de 0,0625 a 0,1mM y UDPG 1mM, determinando las distintas curvas de velocidad para cada concentración de sustrato bajo las condiciones descritas en la sección métodos 3. Las desviaciones estándar corresponden a 3 determinaciones independientes.

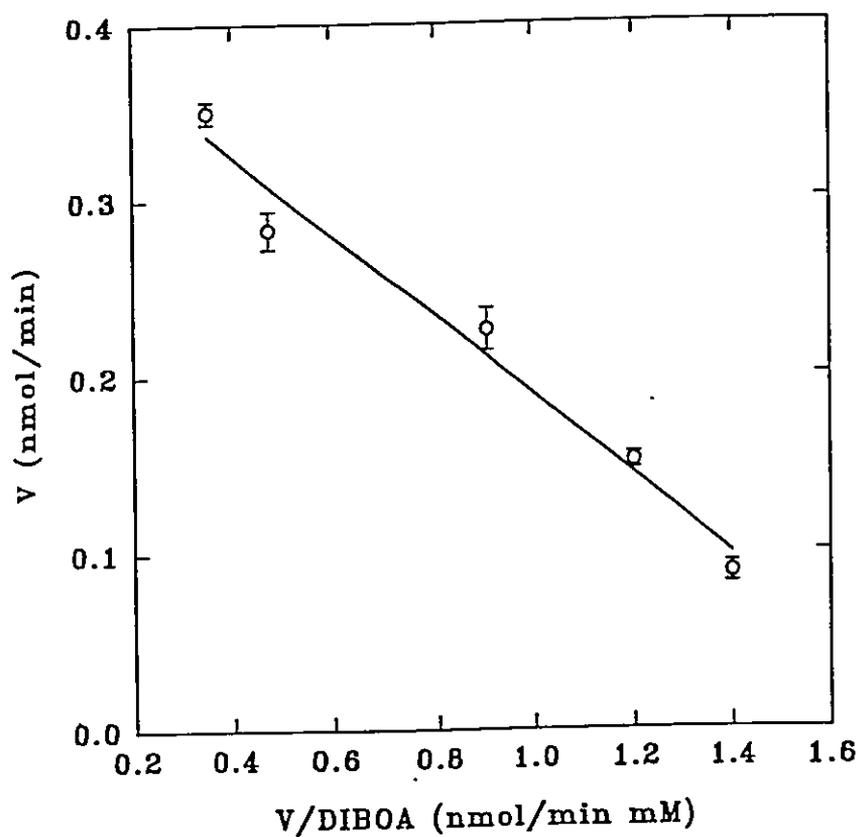


Fig. 18. Gráfico de Eadie-Hofstee para la determinación de la K_m para DIBOA de la Hx-GT de centeno Tetra. Las determinaciones se realizaron con 100 μ g proteína proveniente de la fracción 60/30% sulfato de amonio, Hx en un rango de 0,0625 a 0,1mM y UDPG 1mM, determinando las distintas curvas de velocidad para cada concentración de sustrato bajo las condiciones descritas en la sección métodos 3. Las desviaciones estándar corresponden a 3 determinaciones independientes.

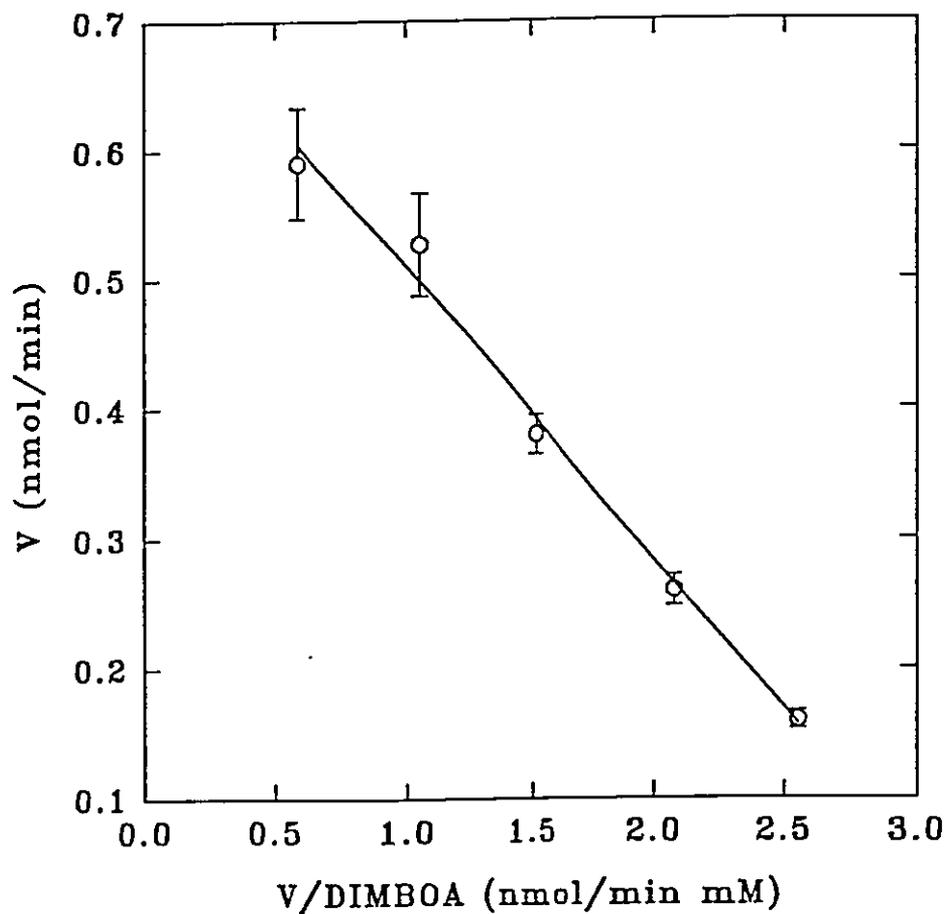


Fig. 19. Gráfico de Eadie-Hofstee para la determinación de la K_m para DIMBOA de la Hx-GT de centeno Tetra. Las determinaciones se realizaron con $100\mu\text{g}$ proteína proveniente de la fracción 60/30% sulfato de amonio, Hx en un rango de $0,0625$ a $0,1\text{mM}$ y UDPG 1mM , determinando las distintas curvas de velocidad para cada concentración de sustrato bajo las condiciones descritas en la sección métodos 3. Las desviaciones estándar corresponden a 3 determinaciones independientes.

Tabla 4. Propiedades cinéticas aparentes de las Hx-GT presentes en los extractos proteicos provenientes de diversas gramíneas.

Gramínea	Hx dominante	V_{max} (pkat)		$K_{m\ app}$ (μ M)	
		DIBOA	DIMBOA	DIBOA	DIMBOA
<i>S.cereale</i> cv. <i>Tetra Baer</i>	DIBOA	7,2	12	233	221
<i>H.lechleri</i> H 1310	DIBOA	2,2	3,3	264	90
<i>H.vulgare</i> cv. <i>Libra</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>A.satíva</i> cv. <i>Nahuén</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. = no detectable (menor de 0,2 pkat). Las condiciones de obtención de cada una de las fracciones proteicas 60/30% sulfato de amonio se describen en la sección métodos 7. Los ensayos enzimáticos se realizaron con 100 μ g de cada uno de los extractos, determinando las distintas curvas de velocidad para cada sustrato (DIBOA y DIMBOA) en un rango de 0,0625 a 1mM en presencia de 1mM UDPG y las condiciones de ensayo para Hx-GT descritas previamente.

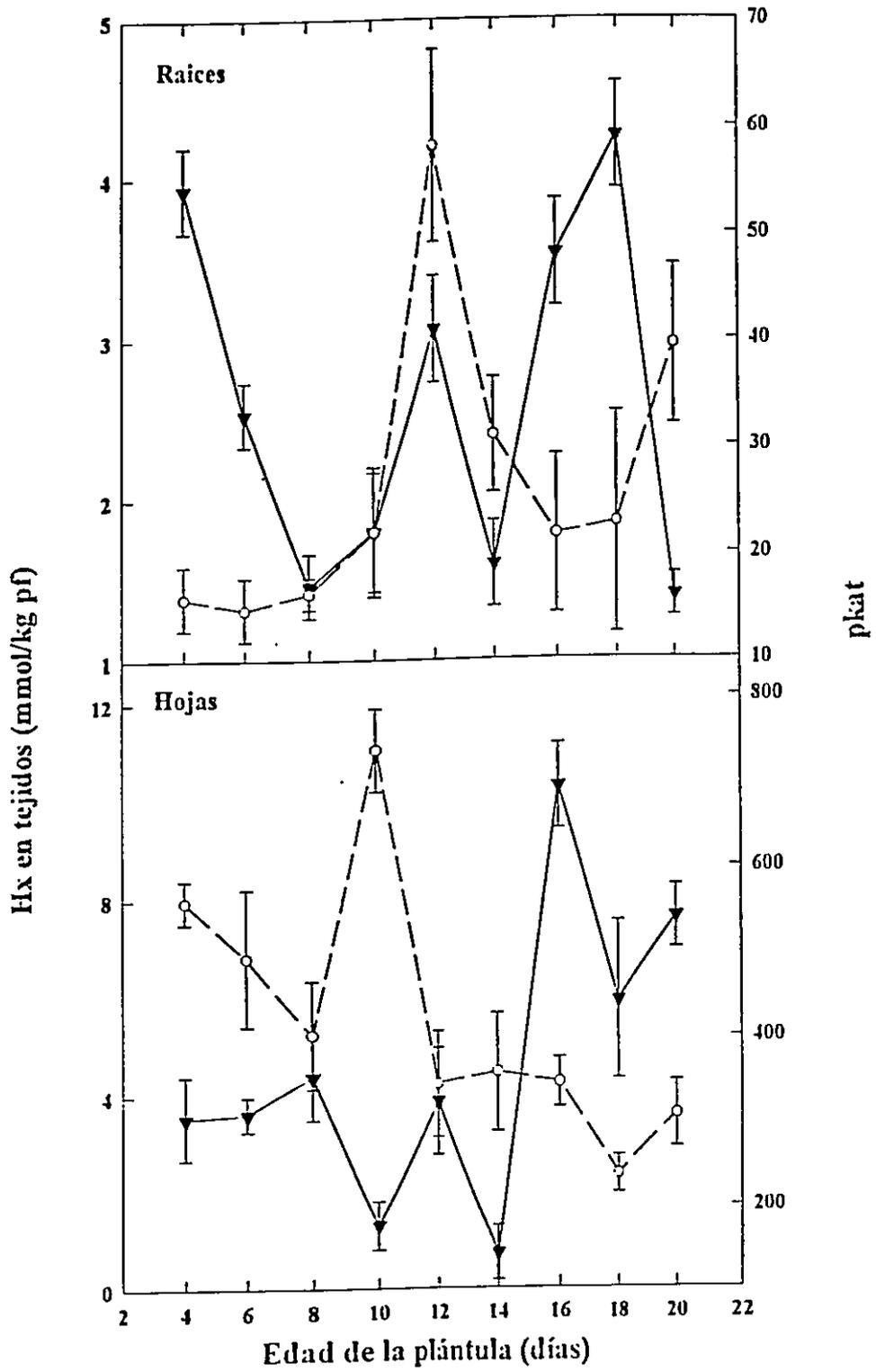


Fig. 20 Variación del contenido de Hx y de la actividad total en hojas y radículas de plántulas de centeno de diversas edades. La determinación se hizo por triplicado según se describe en la sección métodos 4. —o— Hx ——— Hx-GT

Tabla 5. Actividad total (pkat.) de la DIBOA-GT de extractos de centeno, cultivar Tetra, provenientes de de radículas de diversos tamaños y diversas porciones de la hoja bandera.

Edad	Hoja (región)			Radícula		
	1	2	3	1	2	3
6	273 (68)	167 (43)	614 (166)	85(11)	79(1)	97 (8)
12	802(160)	720(18)	846 (43)	40 (1)	20(0,5)	24(1)
16	509(12)	301 (12)	442 (12)	45 (9)	45 (9)	34 (1)

Los valores en paréntesis indican las desviaciones estándar de 3 determinaciones independientes.

Hoja, región: 1 = apical, 2 = media, 3 = basal.

Radícula: 1 = corta, 2 = media, 3 = larga.

El protocolo de obtención de los extractos proteicos se describe en la sección métodos 4. 100µg de proteína proveniente de cada extracto se ensayó con DIBOA según se describe en la sección métodos 3.

Discusión

El conocimiento de la biosíntesis de un metabolito comprende la identificación y caracterización de las enzimas que participan en la ruta. Para los metabolitos secundarios de plantas este problema es complejo debido a que cada uno de ellos no representa un porcentaje significativo de los productos de una planta, los niveles de enzimas relacionadas son bajos y la obtención de plantas mutantes que carezcan del metabolito en estudio es difícil (Zenk, 1991). Las rutas biogénicas generalmente se proponen a través del laborioso estudio de alimentación de plántulas con precursores marcados y la posterior identificación o determinación de la estructura y la marcación específica de los intermediarios. Estos estudios pueden arrojar resultados negativos debido a que generalmente es difícil llegar con el precursor al sitio de biosíntesis, el intermediario putativo puede no estar relacionado con la biosíntesis del metabolito de interés, el intermediario putativo puede ser transformado más eficientemente por otra ruta, o las plantas en estudio pueden no estar formando el metabolito cuando se realizan los experimentos (Herbert, 1989). La identificación de actividades enzimáticas putativas, en general, se ha realizado en extractos proteicos cuya obtención se dificulta por la gran cantidad de productos fenólicos que las plantas sintetizan y que se asocian a las proteínas. La introducción de cultivos celulares ha permitido establecer de una manera más concluyente las rutas biosintéticas de algunos de los metabolitos secundarios y clonar algunos de los genes que participan en ellas (Zenk, 1991), pero estos casos son la excepción más que la norma, y su utilidad potencial depende de que los cultivos efectivamente sinteticen el metabolito deseado. En el caso de las GT de plantas, pese a tener una gran participación en las rutas biosintéticas de metabolitos secundarios y existir gran cantidad de antecedentes bibliográficos, ellos provienen de estudios realizados en extractos proteicos y, no se ha determinado la estructura primaria de ninguna de ellas. Sólo es posible contar con la secuencia aminoacídica de una GT relacionada a la ruta de los flavonoides, deducida desde un cADN, que a su vez se aisló por inactivación del gen por un transposón (Ralston y col., 1988, Walbot, 1992).

En este trabajo se planteó estudiar, en extractos proteicos provenientes principalmente de plántulas de centeno la participación de la Hx-GT en la formación de Hx-Glc, en especial determinar si la glucosilación es previa o posterior a la formación de los Hx en la ruta biosintética.

Determinación del número de Hx-GT en centeno.

La metodología usualmente empleada para determinar el número de isoenzimas en un organismo es la cromatografía, ya que se ha observado que ciertas resinas son capaces de

separarlas (Bailey y Larson, 1989). Una combinación de métodos cromatográficos que utilicen diversos principios de interacción (intercambio iónico, afinidad, filtración en gel) puede conducir a la purificación de la(s) proteína(s) deseada(s), permitiendo la caracterización cinética de ella(s). La Hx-GT de centeno pareciera ser única puesto que las cromatografías de intercambio iónico (Mono P y Mono Q) y de filtración en gel (Superdex 75) mostraron sólo un pico de actividad Hx-GT. Esto además, podría indicar la presencia de sólo una ruta que biosintetiza al DIBOA-Glc en centeno.

Determinación de la etapa de glucosilación.

Como se discutió previamente, no es posible decir si en la planta la glucosilación es previa o posterior a la formación de los Hx, y tampoco se puede descartar la presencia en la planta de otras GT que reconozcan como sustrato tanto los Hx como sus precursores, y que expliquen la presencia del HBOA-Glc, HMBOA-Glc y el 7-OH-HBOA-Glc en maíz. Los resultados de este trabajo indican que en centeno existe solo una glucosiltransferasa que reconoce ambos Hx. Por lo tanto, se podrían postular las alternativas: a) que sea de afinidad mayor por el Hx respecto de la lactama, si es cierto que la glucosilación ocurre luego que el Hx se ha formado; b) que presente afinidad comparable por los Hx y las lactamas, si la glucosilación es previa a la formación de los Hx; c) en la planta se encuentren otras GT, no relacionadas directamente con los Hx, que reconozcan las lactamas como sustrato. Por lo tanto, se estudió la etapa de glucosilación en la ruta de centeno ensayando la Hx-GT parcialmente purificada y el extracto 60/30% sulfato de amonio, con las lactamas y los Hx. La etapa de glucosilación en la ruta de maíz y trigo se estudió ensayando los extractos 60/30% sulfato de amonio con las respectivas lactamas y Hx.

En centeno, la enzima parcialmente pura sólo reconoce los Hx como sustratos, y en el extracto 60/30% sulfato de amonio tampoco se observa actividad GT con las lactamas, pese a haber ensayado los sustratos a diversos pH y tiempos de incubación. Las fracciones 60/30% sulfato de amonio provenientes de maíz y trigo tampoco contenían una actividad GT capaz de reconocer a las lactamas como sustrato pese a haber hecho los ensayos a diversos pH y tiempos de incubación. Estos resultados indican a la glucosilación como paso posterior a la formación de los Hx en todas las gramíneas estudiadas.

La glucosilación como paso final de la ruta biosintética es un fenómeno generalizado en la biosíntesis de los metabolitos secundarios (Stapleton y col., 1991; Quatrocchio y col., 1993, McIntosh y Mansell, 1990; Bechthold y col., 1991; Hösel y Schiel, 1984) relacionado probablemente con los hechos de que el almacenamiento en la vacuola requiere de

características hidrofílicas, y que frecuentemente la glucosilación baja la reactividad de los metabolitos, permitiéndole a la planta almacenarlos sin dañarse a sí misma (Møller y Conn, 1979; Niemeyer, 1988; Koch y col., 1992). Por otra parte, se ha descrito que en callos de maíz se encuentra MBOA en mayor cantidad que DIMBOA pese a que la Hx-GT se expresa (Bailey y Larson, 1988), y que no se detectan los glucósidos de Hx y actividad β -glucosidásica en callos y tejido meristemático de trigo (Zúñiga y Massardo, 1991), indicando que en estos tejidos la formación del Hx ocurre de forma independiente de la participación de la Hx-GT, apoyando la idea de una glucosilación terminal.

Especificidad de las Hx-GT de gramíneas y su participación en la ruta.

La Hx-GT de centeno no reconoce la esculetina como sustrato, que sumado a que no reconocen a las lactamas como sustrato, las señala como específicas para los Hx. Las gramíneas que no contienen Hx tampoco expresan una actividad glucosiltransferásica que reconozca los Hx como sustratos. Esto indica que la Hx-GT descrita efectivamente pertenece a la ruta de los Hx.

Pese a que generalmente las glucosiltransferasas tienen un rango de especificidad variable, pero generalmente relacionada con una familia de moléculas, se han descrito algunas que, al igual que la Hx-GT, son específicas para el sustrato que reconocen, como la o-dihidroxicumarin-GT, y la GT del anillo B de flavonoides (Ibrahim y Boulay, 1980; Bajaj y col., 1983). Por otra parte, también se observó que pese a que la Hx-GT semi purificada es capaz de reconocer a ambos Hx con la misma facilidad, tiene mayor actividad con DIMBOA, sugiriendo al grupo metoxilo como relevante para la actividad de la enzima. Probablemente el grupo metoxilo del carbono 7 orienta al sustrato de forma óptima en el sitio activo de la enzima, que requiere estrictamente del grupo N-OH para su actividad.

Un estudio de las características generales de la enzima de centeno que nos indique su grado de homología con otras GTs descritas en la literatura, junto con un estudio de la correlación entre los patrones de expresión enzimática y de acumulación de su producto en el tiempo, puede arrojar alguna evidencia que indique(n) si esta enzima se relaciona o no con los procesos que regulan la actividad de la ruta. La Hx-GT de centeno presentó características similares al resto de las GT descritas en plantas. No se observaron correlaciones entre los patrones de acumulación de Hx, en el tiempo y en las diversas regiones de las plántulas, y el patrón equivalente de actividad Hx-GT. El patrón de la variación de la actividad de la Hx-GT en el tiempo, tanto en hojas como en raíces, no presenta tendencias claras, encontrándose expresión de la enzima durante todo el período estudiado y en toda la planta. Su actividad es homogénea tanto en las

hojas como en las radículas y la variación de la actividad en el tiempo no se correlaciona con el de acumulación de Hx. Estos resultados inducen a pensar que la Hx-GT se diferencia de otras GT en que su expresión no está restringida a ciertos períodos del desarrollo, o a ciertos tejidos de la planta, sino que tendría una expresión constitutiva y ubicua en la planta. Los patrones de variación de la actividad de la enzima en el tiempo, son similares en hojas y raíces sugiriendo que la enzima se expresa en ambos tejidos y que la glucosilación, si es que no la biosíntesis completa, se lleva a cabo en ambos tejidos. Estos resultados, apuntan a que la Hx-GT de centeno no está involucrada en la regulación de la formación de DIBOA-Glc en centeno.

Características cinéticas de las Hx-GT de diversas gramíneas

En maíz, y como se dijo previamente, se encontraron dos GT capaces de reconocer el DIMBOA como sustrato, una de ellas con una afinidad menor por DIBOA. Si cada especie de gramínea hubiera desarrollado una ruta para la biosíntesis de los Hx en forma independiente, se podría esperar que en cada especie una Hx-GT específica para el Hx preponderante en la planta: la Hx-GT de centeno debería tener mayor afinidad por DIBOA, las Hx-GT presentes en trigos mayor afinidad por DIMBOA, y las de *H. lechleri*, una gramínea silvestre que acumula DIBOA, mayor afinidad por DIBOA. Sin embargo, todas las Hx-GT estudiadas presentaron afinidades similares por ambos Hx.

Orden putativo para los pasos finales de la ruta biosintética.

En relación al orden en que ocurren las reacciones durante las etapas finales de la ruta biosintética, se observó que los extractos de trigo y maíz tampoco mostraron actividad GT con las lactamas, a diversos pH y luego de incubaciones prolongadas, indicando que en todas las gramíneas estudiadas la glucosilación es el paso terminal de la ruta biosintética. Kumar y col. (1993) describen la acumulación de 7-OH-DIBOA en un mutante de maíz que no produce DIMBOA, y la cinética de acumulación del DIBOA y el DIMBOA en semillas germinadas y callos de trigo apuntan hacia la interconversión DIBOA→DIMBOA (Copaja, S.V., comunicación personal, Zúñiga y col., 1990). Ello sugiere que el orden de las reacciones para la formación del DIMBOA-Glc en maíz sería el siguiente: hidroxilación del carbono 2 del 2H-HBOA seguida de la N-hidroxilación del HBOA, metoxilación (hidroxilación más metilación) del carbono 7 del DIBOA y glucosilación del DIMBOA (Fig.23).

Metabolización de los Hx.

La ruta biosintética originalmente propuesta para maíz (Fig. 2, Introducción), predecía la existencia de 7-OH-HBOA-Glc, HBOA-Glc y HMBOA-Glc como intermediarios de la biosíntesis. Sin embargo, las pruebas aportadas por este trabajo indican que ninguno de los intermediarios de la biosíntesis en centeno y maíz es glucosilado.

En general se ha observado que los metabolitos secundarios son estructuras dinámicas que sufren cambios constantes en su estructura. Pueden ser sintetizados y luego degradados a metabolitos primarios; ser estables durante ciertos períodos del desarrollo o, ser estables en el tiempo y metabólicamente inertes (Barz y Köster, 1981; Luckner, 1990). La degradación de los Hx no ha sido estudiada. Hasta el momento sólo se ha descrito una β -glucosidasa que reconoce sus glucósidos como sustrato, y Cuevas y col. (1991) han propuesto que es la primera reacción en la degradación de los Hx. Sin embargo, este orden de eventos, glucosilación seguida por desglucosilación, no pareciera ser universal. Es así como en la formación de ácido vanílico en cultivos celulares de *Vanilla planifolia* la desmetoxilación de 4-metoxicinamato ocurre luego de la glucosilación del grupo carboxilo (Funk y Brodelius, 1990). De la misma manera, es factible que el proceso degradativo de los Hx incluya a los productos glucosilados. Por otra parte, se ha postulado que los Hx son vacuolizados para su almacenaje (Niemeyer, 1988), indicando que los procesos degradativos deberían ocurrir en un medio hidrofílico, requiriendo entonces de metabolitos glucosilados para su procesamiento. Desde este contexto, se podría especular que las lactamas glucosiladas como el 7-OH-HBOA-Glc son intermediarios de la ruta degradativa de los Hx (Fig. 21), explicando así su presencia en la planta a bajas concentraciones. Al respecto, cabe hacer notar que Tipton y col. (1973) encontraron que, en maíz *in vivo*, el DIMBOA-Glc da origen al HMBOA-Glc, con relativa facilidad. La hidrólisis del glucósido por parte de las β -glucosidasas sería entonces el resultado de un proceso ajeno al de la degradación de los Hx, más bien relacionado con los eventos desencadenados por el rompimiento del tejido, proceso que se ha conservado en el tiempo puesto que la desglucosilación hace más reactivos a los Hx, realizando su actividad protectora (Niemeyer, 1988).

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo indican que en el centeno, maíz y trigo la glucosilación es el paso final de la ruta de los Hx, la enzima es específica para los ácidos hidroxámicos y pertenece a su ruta biosintética. Ellos también sugieren que la Hx-GT no juega roles regulatorios en la expresión de la ruta, es de expresión ubicua, constitutiva y simultánea en hojas y raíces.

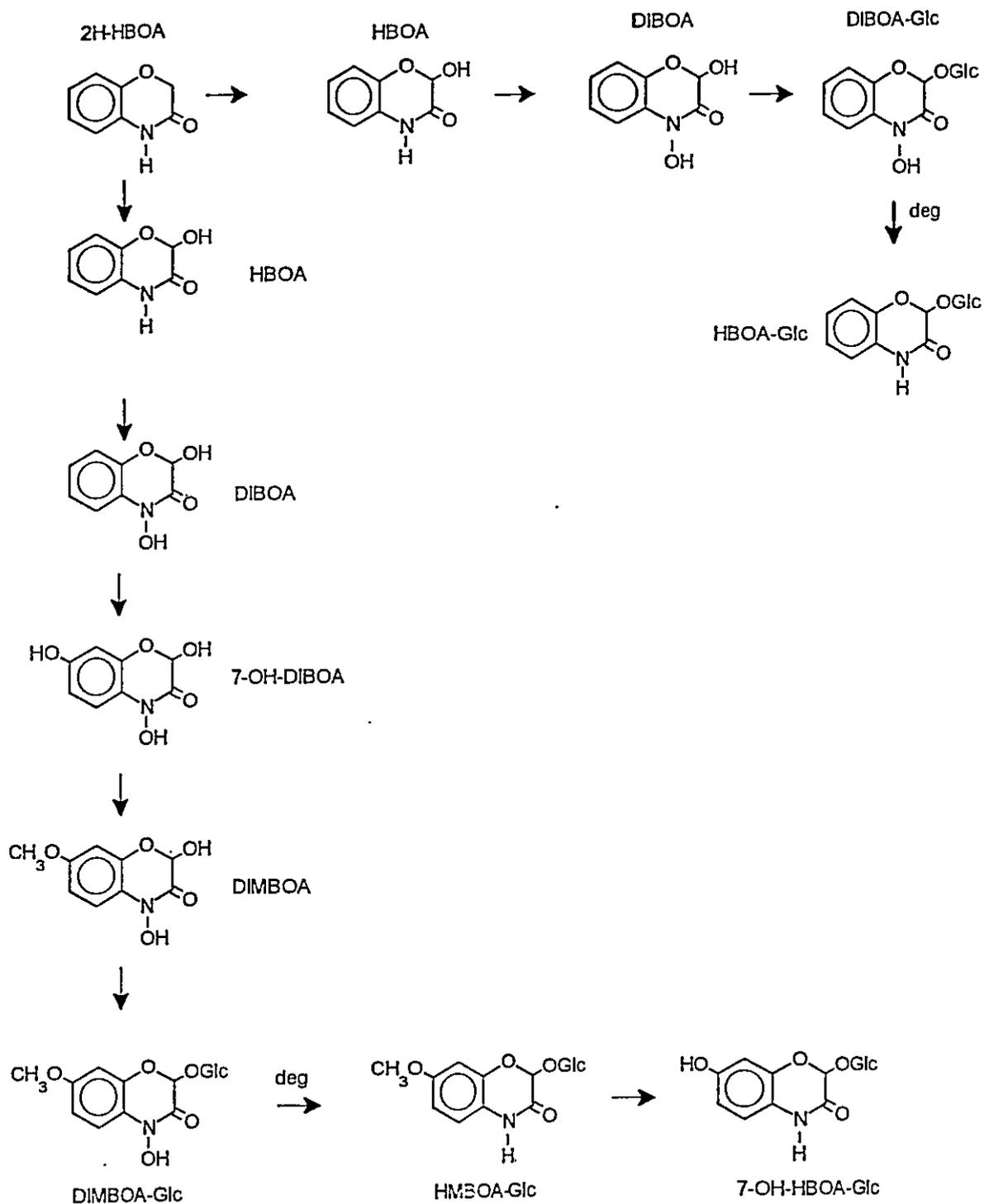


Fig. 21. Ruta putativa para la síntesis de DIBOA-Glc y DIMBOA-Glc en maíz.

Bibliografía

Ardila, F.J. y J. S. Tandecarz (1992) Potato tuber UDP-glucose : protein transglucosylase catalyzes its own glucosylation. **Plant. Physiol.** 99 : 1342 - 1347.

Argandoña, V.H., J.G. Luza, H.M. Niemeyer, y L.J. Corcuera (1980) Role of hydroxamic acids in the resistance of cereals to aphids. **Phytochem.** 19 : 1665 - 1668.

Argandoña, V.H., H.M. Niemeyer y L.J. Corcuera (1981) Effect of content and distribution of hydroxamic acids in wheat on infestation by *Schizaphis graminum*. **Phytochem.** 20 : 673 - 676.

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

Argandoña, V.H., Zúñiga, G.E. y L.J. Corcuera (1987) Distribution of gramine and hydroxamic acids in barley and wheat leaves. **Phytochemistry** 26 : 1917 - 1918.

Bailey, B.A. y R.L. Larson (1988) DIMBOA production in tissue culture. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, March 31, 62 : 50.

Bailey, B.A. y R.L. Larson (1989) Hydroxamic acid glucosyltransferase from maize seedlings. **Plant Physiol.** 90: 1071-1076.

Bailey, B.A. y R.L. Larson (1991) Maize microsomal benzoxazinone N-monooxygenase. **Plant Physiol.** 95: 792

Bajaj, K.L.; V. Luka; H. Khouri y R. Ibrahim (1983) Purification and properties of flavonol-ring B glucosyltransferase from *Chrysosplenium americanum*. **Plant Physiol.** 72 : 891 - 896.

Barnes, J.P. y A.R. Putnam (1987) Role of benzoxazinones in allelopathy by rye (*Secale cereale* L.) **J. Chem. Ecol.** 13 (4) : 889 - 906.

Barnes, J.P.; A.R. Putnam; B.A. Burke y A.J. Asen (1987) Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage. **Phytochemistry** 26 (5) : 1385 - 1390.

Barría, B.N., S.V. Copaja y H.M. Niemeyer (1992) Occurrence of DIBOA in wild *Hordeum* species and its relation to aphid resistance. **Phytochemistry** 31: 89 - 91.

Barz, W. y J. Köster (1981) Turnover and degradation of secondary (natural) products **The Biochemistry of Plants** E.E. Conn editors, Academic Press Inc. 7 : 35 - 83.

Bechthold, A; U. Berger y L. Heide (1991) Partial purification, properties, and kinetic studies of UDP-Glucose:*p*-hydroxybenzoate glucosyltransferase from cell cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. **Arch. Biochem. Biophys.** 288 (1) : 39 - 47.

Beck, D.L.; G.M. Dunn; D.G. Routley y J.S. Bowman (1983) Biochemical basis of resistance in corn to the corn leaf aphid. **Crop Science** 23 : 995 - 998.

Bell, E.A. (1981) The physiological role(s) of secondary (natural) products. **The Biochemistry of Plants**. Secondary plant products, E. E. Conn Editors, Academic Press. 7: 1-19.

Bergensträhle, A., E. Tillberg y L. Jonsson (1992) Characterization of UDP-glucose:solanidine glucosyltransferase and UDP- galactose: solanidine galactosyltransferase from potato tuber. **Plant Sci.** 84: 35-44.

Boller, T. y H. Kende (1979) Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. **Plant Physiol.** 63: 1123-1132.

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.

Bravo H.R. y H.M.Niemeyer (1986) A new product from the decomposition of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) a hydroxamic acid from cereals. **Heterocycles** 24:335-337

Bücker, C. y H.J. Grambow (1990) Alterations in 1,4-benzoxazinone levels following inoculation with Stem Rust in wheat leaves carrying various alleles for resistance and their possible role as phytoalexins in moderately resistant leaves. **Z. Naturforsch** 45C : 1151 - 1155.

Copaja, S.V., B.N. Barría y H. M. Niemeyer (1991) Hydroxamic acid content of perennial Triticeae. **Phytochem.** 30: 1531 - 1534.

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

Cuevas L., H.M. Niemeyer y L. Jonsson (1992) Partial purification and characterization of a hydroxamic acid glucoside- β -D-glucosidase from maize. **Phytochemistry** 31 : 2609-2612.

Cuevas, L. y H.M. Niemeyer (1993) Effect of hydroxamic acids from cereals on aphid cholinesterases. **Phytochemistry** 34 (4) : 983 - 985.

Drake, R.R., G.P. Kaushal, I. Pastuszek y A.D. Elbein (1991) Partial purification, photoaffinity labeling, and properties of Mung bean UDP-glucose : dolicholphosphate glucosyltransferase. **Plant Physiol.** 97 : 396 - 401.

Dunn, G. M.; B.J. Long y D. G. Routley (1981) Inheritance of cyclic hydroxamates in *Zea mays* L. **Can. J. Plant Sci.** 61 : 583 - 593.

Durham L.P. y J.E. Poulton (1989) Effect of castanospermine and related polyhydroxyalkaloids on purified myrosinase from *Lepidium sativum* seedlings. **Plant Physiol.** 90: 48-52

Epstein, W.W., C.N. Rowsemit, P.J. Berger y N.C. Negus (1986) Dynamics of 6-methoxybenzoxazolinone in winter wheat. **J. Chem. Ecol.** 12 : 2011 - 2020.

Fekete, F. A.; R. A. Lanzi; J.B. Beaulieu; D.C. Longcope; A.W. Sulya; R. N. Hayes y G.A. Mabbott (1989) Isolation and preliminary characterization of hydroxamic acids formed by nitrogen-fixing *Azotobacter chroococcum* B-8. **Appl. Environ. Microbiol.** 55 (2) : 298 - 305.

Feng, R.; J.G. Houseman; A.E.R. Downe; J. Atkinson y J.T. Arnason (1992) Effects of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) and 6-methoxybenzoxazolinone (MBOA) on the detoxification processes in the larval midgut of the European Corn Borer. **Pestic. Biochem. Physiol.** 44 : 147 - 154.

Funk, C. y P. Brodelius (1990) Phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia* Andr. III Conversion of 4-methoxycinnamic acids into 4-hydroxy benzoicacids. **Plant Physiol.** 94 : 102 - 108.

Gahagan, H.E. y R.O. Mumma (1967) The isolation of 2-(2-hydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one)- β -D-glucopyranoside from *Zea mays*. **Phytochemistry** 6 : 1441 - 1448.

Givovich, A. y H.M. Niemeyer (1991) Hydroxamic acids affecting barley yellow dwarf virus transmission by the aphid *Ropalosiphum padi*. **Entomol. exp.appl.** 59: 79 -85.

Givovich, A. (1993) Efecto de los ácidos hidroxámicos del trigo sobre la alimentación de áfidos de los cereales. Tesis de Doctorado en Ciencias, mención Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Gross, G.G. (1983) Partial purification and properties of UDP-Glucose : vanillate 1-O-glucosyltransferase from oak leaves. **Phytochemistry** 22 (10) : 2179 - 2182.

Gutierrez, C.; P.Castañera y V. Torres (1988) Wound induced changes in DIMBOA (2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one) concentration in maize plants caused by *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). **Ann. Appl. Biol.** 113 : 447 - 454.

Guthrie, W.D., C.T. Tseng, W.A. Russel, J.R. Coats, J.C. Robbins y J.J. Tollefson (1986) DIMBOA content at seven stages of plant development in a maize synthetic cultivar. **J. Kans. Entomol. Soc.** 59 : 356 - 360.

Hamilton, R.H. (1964) A corn mutant deficient in 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one with an altered tolerance of atrazine. **Weeds** 12 : 27 - 30.

Herbert, R.B. (1989) The biosynthesis of secondary metabolites. Chapman and Hall. Second edition : 16 - 30.

Hietala , P.K. y A.I. Virtanen (1960) Precursors of benzoxazolinone in rye plants. II Precursor I, the glucoside. **Acta Chem. Scand.** 14 :502 - 504.

Hofman, J. y O. Hofmanová (1969a) 1,4-Benzoxazine derivatives in plants. Sephadex fractionation and identification of a new glucoside. *Eur. J. Biochem.* 8: 109 - 112.

Hofman, J. y O. Hofmanová (1969 b) 1,4-benzoxazine derivatives in plants. A new glucosidic derivative from *Zea mays* plants. *Tetrahedron Lett.* 5001 - 5002.

Hofman, J. y O. Hofmanová (1971) 1,4-benzoxazine derivatives in plants : absence of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one from uninjured *Zea mays* plants. *Phytochemistry* 10 : 1441 - 144.

Houseman, G.J.; F. Campos; N.M.R. Yhie; B.J.R. Philogène; J. Atkinson; P. Morand y J.T. Arnason (1992) Effect of the maize-derived compounds DIMBOA and MBOA on growth and digestive processes of European Corn Borer (Lepidoptera : Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 85 (3) : 669 - 674.

Hrazdina, G. (1992) Spatial organization of enzymes in plant metabolic pathways. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.Biol.* 43: 241-267.

Ibrahim, R.K. y B.Boulay (1980) Purification and some properties of UDP-Glucose: o-dihydroxycoumarin 7-O-Glucosyltransferase from tobacco cell cultures. *Plant Sci. Lett.* 18 : 177 - 184.

Ishizaki, T.; Y. Hashimoto; K. Shudo y T. Okamoto (1982) Reaction of 4-acetoxy-1,4-benzoxazin-3-one with DNA. A possible chemical mechanism for the antifungal and mutagenic activities. *Tetrahedron Letters* 23 (39) : 4055 - 4056.

Keil, U. y P. Schreier (1989) Purification and partial characterization of UDP-Glucose : phenol- β -D-glucosyltransferase from papaya fruit. *Phytochemistry* 28 (9) : 2281 - 2284.

Klun, J.A.; C.L. Tipton y T.A. Brindley (1967) 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA), an active agent in the resistance of maize to the European Corn Borer. *J. Econ. Entomol.* 60 : 1529 - 1533.

Klun, J.A. y J.F. Robinson (1969) Concentration of two 1,4-benzoxazinones in dent corn at various stages of development of the plant and its relation to the resistance of the host to the European corn borer. **J. Econ. Entomol.** 62 : 214 - 220.

Klun, J.A.; W.D. Guthrie; A.R. Hallauer y W.A. Russell (1970) Genetic nature of the concentration of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one and resistance to the European Corn Borer. **Crop Sci.** 10 : 87 - 90.

Koch, Birgit; V.S. Nielsen, B.A. Halkier y C.E. Olsen (1992) The biosynthesis of cyanogenic glucosides in seedlings of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Arch. Biochem. Biophys.** 292 (1) : 141 - 150.

Kumar, P.; S. Peng; K. Pratt; D. Moreland; M.G. Neuffer y W.S. Chilton (1993) The biosynthesis of DIMBOA in maize. The past, present and future of Plant Biology. A symposium to honour Professor Joseph E. Varnes. Dpt. of Biology, Washington University, St. Louis, Missouri, May 27 - 29 : 33.

Kumar, P. y W.S. Chilton (1994) Incorporation of anthranilate- d_4 into DIMBOA in maize. **Tetrahedron Lett.** 35 (20) : 3247 - 3250.

Latchinian-Sadek, L y R.K. Ibrahim (1991). Partial purification and some properties of a ring B-O-glucosyltransferase from onion bulbs. **Phytochemistry** 30 (6) : 1767 - 1771.

Lawson, S.G.; T.L. Mason, R.D. Sabin, M.E. Sloan, R.R. Drake, B. E. Haley y B.P. Wasserman (1989) UDP-Glucose : (1,3)- β -glucan synthase from *Daucus carota* L. **Plant Physiol.** 90 : 101 - 108.

Lyons, P.C.; J.D. Hipskind; K.V. Wood y R.L. Nicholson (1988) Separation and quantification of cyclic hydroxamic acids and related compounds by high pressure liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.** 36 : 57 - 60.

Leszczynski, B.; H. Matok y A.F.G. Dixon (1992) Resistance of cereals to aphids: the interaction between hydroxamic acids and UDP-Glucose Transferase in the aphid *Sitobion avenae* (Homoptera : Aphididae). **J. Chem. Ecol.** 18 (7) : 1189 - 1200.

Leszczynski, B y A.F.G. Dixon (1992) Resistance of cereals to aphids : the interaction between hydroxamic acids and the glutathione S-transferases in the grain aphid *Sitobion avenae* (Homoptera : Aphididae. **J. Appl. Entomol.** 113 : 61 - 67.

Leznicki, A.J. y R.S. Bandurski (1988) Enzymic synthesis of indole-3-acetyl-1-O- β -D-Glucose. I. Partial purification and characterization of the enzyme from *Zea mays*. **Plant Physiol.** 88 : 1474 - 1480.

Long, B.J.; G.M. Dunny D.G. Routley (1975) Relationship of hydroxamic acid content in maize and resistance to Northern Corn Leaf Blight. **Crop Science** 15 : 333 - 335.

Luckner, M. (1990) Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals. Springer-Verlag.

Lyons, P.C., J.D. Hipskid, K.V. Wood y R.L. Nin (1988) Separation and quantification of cyclic hydroxamic acids and related compounds by highpressure liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.** 36: 57-60.

Manuwoto, S. y J.M. Scriber (1985a) Differential effects of nitrogen fertilization of three corn genotypes on biomass and nitrogen utilization by the Southern Armyworm, *Spodoptera eridania*. **Agric. Ecosyst. Environ.** 14 : 25 - 40.

Manuwoto, S. y J.M. Scriber (1985b) Consumption and utilization of experimentally altered corn by Southern Armyworm : iron, nitrogen and cyclic hydroxamates. **J. Chem. Ecol.** 11 (11) : 1469 - 1481.

McIntosh, C.A. y R.L. Manssel (1990) Biosynthesis of naringin in *Citrus paradisi* : UDP-Glucosyltransferase activity in grapefruit seedlings. **Phytochemistry** 29 (5) : 1533 - 1538.

Morell, M. L. Copeland (1985) Sucrose synthase of Soybean nodules. **Plant Physiol.** 78 : 149 - 154.

Møller, B.L. y E.E. Conn (1979) The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. N-hydroxytyrosine as an intermediate in the biosynthesis of dhurrin by *Sorgum bicolor* (Linn) Moench. **J.Biol. Chem.** 254 (17) : 8575-8583.

Morse, S., S.D. Wratten, P.J. Edwards y H.M. Niemeyer (1991) Changes in the hydroxamic acid content of maize leaves with time and after artificial damage; implications for insect attack. **Ann. Appl. Biol.** 119 : 239 - 249.

Neilands, J. B. (1967) Hydroxamic acids in nature. **Science** 156 : 1443 - 1447.

Niemeyer, H.M.; N.B. Calcaterra y O.Roveri (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. Pharmacol.** 35 (22) : 3909 - 3914.

Niemeyer, H.M. (1988) Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the Gramineae. **Phytochemistry**. 27 (11) : 3349 - 3358.

Niemeyer, H.M., E. Pesel, S.V. Copaja, H.R. Bravo, S. Franke y Francke W. (1989) Changes in hydroxamic acid levels of wheat plants induced by aphid feeding. **Phytochemistry** 28: 447.

Niemeyer, H.M., S.V. Copaja y B.N. Barría (1992) The Triticeae as sources of hydroxamic acids, secondary metabolites in wheat conferring resistance against aphids. **Hereditas** 116 : 295 - 299.

Ohana, P.; D. P. Delmer, G. Volman, J.C. Steffens, D.E. Mathews y M. Benziman (1992) β -Furfuryl- β -glucoside: an endogenous activator of higher plant UDP-glucose: (1-3)- β -glucan synthase. **Plant Physiol.** 98 : 708 - 715.

Pérez, F.J. y H.M. Niemeyer (1989) Reaction of DIMBOA, a resistance factor from cereals, with papain. **Phytochemistry** 28 : 1597 - 1600.

Pérez, F.J. (1990) Allelopathic effect of hydroxamic acids from cereals on *Avena sativa* and *A.fatua*. **Phytochemistry** 29 : 773 - 776.

Pérez, F.J. y J. Ormeño-Núñez (1991) Differences in hydroxamic acid content in roots and root exudates of wheat (*Triticum aestivum* L.) : possible role in allelopathy. **J. Chem. Ecol.** 17(6) : 1037 - 1043.

Pérez, F.J. y J. Ormeño-Núñez (1993) Weed growth interference from temperate cereals : the effect of hydroxamic-acids-exuding rye (*Secale cereale* L.) cultivar. **Weed Research** 33 : 115 - 119.

Pethó, M. (1992) Occurrence and physiological role of benzoxazinones and their derivatives. III. Possible role of 7-methoxy-benzoxazinone in the iron uptake of maize. *Acta. Agron. Hung.* 44 (1-2) : 57 - 64.

Pethó, M. y Z. Dinya (1992) Occurrence and physiological role of benzoxazinones and their derivatives. I. Cytokinin activity of 6-methoxy-benzoxazinone. *Acta Agron. Hung.* 41 (1 - 2) : 39 -48.

PIERCE BCA Protein Assay Reagent Instructions.

Quattrocchio, F.; J.F. Wing, H.T.C. Leppen, J.N.M.Mol y R.E. Koes (1993) Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes. *The Plant Cell* 5 : 1497 - 1512.

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

Ralston, E. J.; J.J. English y H.K. Dooner (1988) Sequence of three *bronze* alleles of maize and correlation with the genetic fine structure. *Genetics* 119 : 185 - 197.

Reimann, J. y R.U. Byerrum (1964a) Studies on the biosynthesis of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one. *Biochemistry* 3 : 847 - 851.

Reimann, J. y R.U. Byerrum (1964) Studies on the biosynthesis of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3-one. *Tetrahedron Lett.*: 211 - 215.

Riedell, W.E. y J.A. Miernyk (1988) Glycoprotein synthesis in maize endosperm cells. The nucleotide diphosphate-sugar : dolichol-phosphate glycosyltransferases. *Plant Physiol.* 87 : 420 - 426.

Sahi, V.S.; M.D. Chilton y W.S. Chilton (1990) Corn metabolites affect growth and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3879 - 3883.

Schmid, G. y H. Grisebach (1982). Enzymic synthesis of lignin precursors. Purification and properties of UDPglucose : coniferyl-alcohol glucosyltransferase from cambial sap of spruce (*Picea abies* L.). **Eur. J. Biochem.** 123 : 363 - 370.

Simcox, K.D. y D.F. Weber (1985) Location of the benzoxazinless (bx) locus in maize by monosomic and B-A translocational analyses. **Crop Science** 25 : 827 - 830.

Stafford, H.A. (1981) Compartmentation in natural products biosynthesis by multienzyme complexes. **The Biochemistry of Plants, Secondary Plant Products**, E.E. Conn editors, Academic Press, 7:117-137.

Stapleton, A.; P.V. Allen, M.Friedman y W. Belknap (1991) Purification and characterization of solanidine glucosyltransferase from the potato (*Solanum tuberosum*). **J. Agric. Food Chem.** 39 : 1187 - 1193.

Su, J.C. y J. Preiss (1978) Purification and properties of sucrose synthase from maize kernels. **Plant Physiol.** 61 : 389 - 393.

Sun, Y. y G. Hrazdina (1991) Isolation and characterization of a UDPGlucose:flavonol-O³-glucosyltransferase from illuminated red cabbage (*Brassica oleracea* cv. Red Danish) seedlings. **Plant Physiol.** 95 : 570 - 576.

Tang, D.Z. y Y.H. Ge (1981) A study of DIMBOA from maize - factors influencing contents and its detection techniques. **Plant Protection (Zhiwu Baohu)** 7 (4) 2 - 4.

Tipton, C.L.; J.A. Klun; R.R. Husted y M.D. Pierson (1967) Cyclic hydroxamic acids and related compounds from maize. Isolation and characterization. **Biochemistry** 6 : 2866 - 2870.

Tipton, C.L. y E.L. Buell (1970) Ferric iron complexes of hydroxamic acids from maize. **Phytochemistry** 9 : 1215 - 1217.

Tipton, C. L.; M.C. Wang; F. H.C.Tsao; C-C.L. Tu y R.R. Husted (1973) Biosynthesis of 1,4-benzoxazin-3-ones in *Zea mays*. **Phytochemistry** 12 : 347 - 352.

Venis, M. A. y P.J. Watson (1978) Naturally occurring modifiers of auxin-receptor interaction in corn: identification as benzoxazolinones. **Planta** 142 : 103 - 107.

Virtanen, A.I. y P.K. Hietala (1955a) An anti-fungi factor in rye seedlings. **Suomen Kemistilehti B28**: 165 - 166.

Virtanen, A.I. y P.K. Hietala (1955b) 2(3)-Benzoxazolinone, an antifusarium factor in rye seedlings. **Acta Chem. Scand.** 9 : 1543 - 1544.

Virtanen, A.I., P.K. Hietala y O. Walroos (1956) An antifungal factor in maize and wheat plants. **Suomen Kimistilehti B29** : 143.

Virtanen, A.I.; P.K. Hietala y O. Wahlroos (1957) Antimicrobial substances in cereals and fodder plants. **Arch. Biochem. Biophys.** 69 : 486 - 500.

Virtanen, A.I. y P.K. Hietala (1959) On the formation of benzoxazolinone in rye seedlings. Isolation of the precursor. **Suomen Kimistilehti B32** :38.

Virtanen, A.I. y P.K. Hietala (1960) Precursors of benzoxazolinone in rye plants. I. Precursor II, the aglucone. **Acta Chem. Scand.** 14 : 499 - 502.

Virtanen, A. y O. Wahlroos (1963) Absence of 6-methoxybenzoxazolinone in uninjured maize tissue. **J. Pharmacol. Sci.** 52 (7) : 713 - 714.

Walbot, V. (1992) Strategies for mutagenesis and gene cloning using transposon tagging and T-DNA insertional mutagenesis. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 43 : 49 - 82.

Walroos, O. y A.I. Virtanen (1959 a) On the formation of 6-methoxy-benzoxazolinone in maize and wheat plants. **Suomen Kimistilehti B32** : 139 - 140.

Walroos, O. y A.I. Virtanen (1959 b) The precursors of 6-methoxy benzoxazolinone in maize and wheat plants, their isolation and some of their properties. **Acta Chem. Scand.** 13 : 1906 - 1908.

Waterman, P.G. (1992) Roles for secondary metabolites in plants. **Secondary metabolites: their function and evolution**. CIBA Foundation Symposium 171, Wiley-Interscience Publication.: 255 - 304.

Wiermann, R. (1981) Secondary plant products and cell and tissue differentiation. **The Biochemistry of Plants, Secondary Plant Products**, E.E. Conn editors, Academic Press, 7: 85-116.

Yalpani, N.; N.E. Balke y M. Schulz (1992) Induction of UDP-glucose: salicylic acid glucosyltransferase in oat roots. **Plant Physiol.** 100 : 1114 - 1119.

Zenk, M.H. (1991) Chasing the enzymes of secondary metabolism: plant cell cultures as a pot of gold. **Phytochemistry** 30 (12) : 3861 - 3863.

Zúñiga, G.E.; S.V. Copaja; H.R. Bravo y V.H. Argandoña (1990) Hydroxamic acid accumulation by wheat callus. **Phytochem.** 29(7) : 2139 -2141.

Zúñiga, G.E. y F. Massardo (1991) Hydroxamic acid content in undifferentiated and differentiated tissues of wheat. **Phytochem.** 30(10) : 3281 - 3283.