

03088  
1  
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD PEROXIDÁSICA EN  
HOJAS DE MEZQUITE  
(*Prosopis articulata*)

T E S I S

Que para optar por el grado de

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA.

presenta:

FERNANDO LUIS GARCÍA-CARREÑO.

1991.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Tabla de contenido.

0.0. PREFACIO.

1.0. INTRODUCCION.

1.1. Biomarcadores.

1.1.1. Peroxidasas como biomarcador.

1.1.2. Isoperoxidasas.

1.1.3. Peroxidasas vegetales como marcador  
de estrés salino.

2.0. OBJETIVO DEL ESTUDIO.

3.0. MODELO DE ESTUDIO.

4.0. HIPOTESIS DE TRABAJO.

5.0. EXPERIMENTACION.

5.1. Area de estudio.

5.2. Identificación de las plantas.

5.3. Toma de muestras.

5.4. Cuantificación de masa seca.

5.5. Obtención del extracto enzimático.

5.6. Cuantificación de concentración de proteína.

5.6.1. Mezcla de reacción.

5.7. Composición química de folíolos, agua y suelo.

5.8. Cuantificación de actividad peroxidásica.

5.8.1. Reproducibilidad del ensayo.

5.9. Cuantificación de actividad  
peroxidásica en presencia de NaCl.

5.10. Separación de isoperoxidasas.

5.11. Extracción de clorofilas.

5.12. Cuantificación de metabolitos de bajo peso molecular.

5.13. Inducción de callos a partir de folíolos.

5.13.1. Obtención de células en suspensión.

5.14. Análisis estadístico.

Tabla de contenido.....2.

6.0. RESULTADOS.  
7.0. DISCUSION.  
8.0. CONCLUSIONES.  
9.0. PERSPECTIVAS.  
10.0. REFERENCIAS.  
11.0. ANEXOS.

11.1. Manuscrito I.

García-Carreño, F.L. 1991. Peroxidases as biochemical markers of environmental stress and physiological status of plants.

11.2. Manuscrito II.

García-Carreño, F.L. y Ochoa, J.L. 1991 The effect of saline stress on peroxidase activity in the mezquite (*Prosopis articulata*) leaf. *Journal of Arid Environments*. 20, en prensa.

#### O.O. PREFACIO.

El trabajo de investigación descrito en este documento fue realizado en la División de Biología Experimental, Centro de Investigaciones Biológicas de Baja California Sur, La Paz, BCS, México. Resume la información contenida en los siguientes manuscritos:

a) revisión bibliográfica sobre el empleo de peroxidasas vegetales como biomarcadores del estado fisiológico de las plantas; "Peroxidasas as biochemical markers of environmental stress and physiological status of plants", por García-Carreño, F.L.

b) reporte experimental: "The effect of saline stress on peroxidase activity in the mezquite (*Prosopis articulata*) leaf", por García-Carreño, F.L. y Ochoa, J.L. (1991). *Journal of Arid Environments*. 20, en prensa.

c) análisis del trabajo experimental.

## 1.0. INTRODUCCION.

Baja California Sur es el Estado más seco de la República Mexicana. Su promedio anual de precipitación es de 150 mm, por lo que desde el punto de vista biogeográfico pertenece al "Desierto de Sonora" (Schmidt, 1988). La escasez de agua dulce superficial ha limitado el desarrollo agrícola, industrial y demográfico de "la media península" y la que se consigue para consumo general es suministrada por acuíferos subterráneos de diferente composición química, a veces con características salobres.

La localización de mantos acuíferos se realiza casi siempre con métodos físicos y geológicos. Dos de las técnicas indirectas más usuales para la identificación de áreas con probabilidad de presentar mantos subterráneos son: "resistividad eléctrica" y "refracción sísmica" (Todd, 1980). El método de la resistividad eléctrica calcula, a partir de un campo eléctrico generado por dos electrodos conectados a una fuente de energía, las resistividades aparentes entre dos electrodos de respuesta colocados a diferentes distancias en la superficie del suelo. Si la resistividad del suelo es uniforme, entre los electrodos generadores se forma una trama ortogonal de arcos circulares. A mayor distancia entre los electrodos de respuesta, mayor será la penetración del campo eléctrico. La forma de la curva obtenida al graficar la resistividad contra la distancia es interpretada en relación con parámetros geológicos, climáticos y biológicos para poder inferir si existe o no el manto acuífero.

El método de refracción sísmica mide el tiempo que tarda una onda de propagación, generada por una pequeña explosión, en recorrer una distancia conocida. Las ondas sísmicas siguen la misma ley de propagación de los haces luminosos por lo que son refractados y reflejados. El método de reflexión provee información de la estructura geológica a cientos de metros de profundidad, mientras que el de refracción solo a unas decenas de

metros de profundidad. El tiempo que tarda en propagarse la onda sísmica depende de la composición del medio de propagación y es mayor en cuerpos sólidos que en los no consolidados, lo que podría sugerir la presencia de un manto.

La interpretación de los datos de resistividad eléctrica y refracción sísmica requieren de una gran habilidad por parte del hidrogeólogo en el análisis de los datos y exige un amplio conocimiento sobre las características de los materiales, profundidades e irregularidades geológicas, así como de clima y vegetación de la zona a explorar (Davis y Wiest, 1971). La información obtenida por cualquiera de los métodos señalados permite seleccionar las áreas con alta probabilidad de contener mantos acuíferos, sin embargo no ofrece ningún dato sobre la calidad del agua de los mantos subterráneos, por lo que es conveniente desarrollar técnicas que permitan estimar también la calidad de los mantos, sin tener que realizar perforaciones costosas.

#### 1.1. Biomarcadores.

El concepto de organismo indicador o marcador es aplicado cuando se desea conocer el efecto que los factores físicos, químicos o biológicos ejercen sobre organismos, o un grupo de ellos, como representantes de una comunidad o ecosistema (Reish, 1988). El empleo de marcadores biológicos para la evaluación de parámetros ambientales tiene varias ventajas ya que son sensibles a diferentes niveles y periodos de exposición y frecuentemente los costos de operación son bajos (Rawson y col., 1989).

La detección y evaluación cuantitativa de compuestos químicos presentes en el ambiente utilizando organismos vivos es particularmente atractiva, desde el punto de vista ecológico, y es posible si el ser vivo seleccionado es capaz de tener una respuesta fisiológica proporcional a la intensidad del estímulo. El empleo de organismos o sus metabolitos como indicadores de

parámetros ambientales requiere de conocer el efecto que el factor bajo estudio tiene sobre la fisiología del organismo seleccionado. Se ha reportado la influencia de un estímulo ambiental sobre: a) los procesos metabólicos de diferentes organismos (Rawson, y col., 1989; De Felipe y col., 1988), b) la composición y proporción relativa de metabolitos intracelulares (Hirayama y Mihara, 1987; Nieman y col., 1988; Vazquez-Duhalt y Arredondo, 1991), y c) los cambios cuantitativos en la actividad de enzimas (Kalir y Poljakoff, 1981; Lickl y col., 1987). En este último punto, es particularmente abundante la bibliografía que reporta el empleo de la actividad de las peroxidasas en los tejidos vegetales como indicador de un cambio en las condiciones fisiológicas normales de las plantas producido por un factor externo (Castillo y col., 1984; Castillo, 1985; Castillo y col., 1987; Endreva y col., 1989; Gaspar y col., 1982; García-Carreño y Ochoa, 1991). Ello se debe a que la detección de la actividad enzimática es técnicamente sencilla y a que este grupo de enzimas está involucrado en una variedad de eventos fisiológicos de las plantas (Gaspar y col., 1986).

#### 1.1.1. Las peroxidasas como biomarcadores.

Las peroxidasas (PO); EC 1.11.1.7; donador: H<sub>2</sub>Q oxidoreductasa (Barman, 1985), son enzimas presentes en los organismos aeróbios, catalizan un gran número de reacciones y están involucradas en diversos procesos fisiológicos. El registro de las propiedades fisicoquímicas y cinéticas de las peroxidasas vegetales ha sido empleado como indicador bioquímico, debido a que su actividad y composición varía con el estado fisiológico del organismo (Gaspar y col., 1985; Siegel y Siegel, 1986; Kay y Basile, 1987; Mato y col., 1988). Por ejemplo, en la organogénesis y crecimiento de las plantas (Kay y Basile, 1987; Gaspar y col., 1985).

Las peroxidasas vegetales (PO) han sido empleadas también como marcadores o indicadores de factores ambientales, sin embargo la forma en que las plantas responden a estímulos ambientales en el



medio natural no está bien caracterizada. La mayoría de los estudios relacionados con la respuesta en actividad PO de plantas han sido realizados en medios ambientes controlados. Por ejemplo Castillo (1985) y Castillo y col. (1987) encontraron un aumento en la actividad peroxidásica de plantas seleccionadas de *Sedum album* y *Picea abies* tratada con altas concentraciones de ozono en cámaras de crecimiento. Guderian y col. (1989) y Kuppers y Klumpp (1988) estudiaron la respuesta peroxidásica a varios gases contaminantes de la atmósfera en plantas de *Picea abies* crecidas y tratadas en invernadero. Por su parte Miller y Kelley (1989) demostraron la estimulación de PO por estrés mecánico. Li y col. (1990), cuantificaron la variación en la actividad peroxidásica en cultivo de células en suspensión de *Acer pseudoplatanus* expuestas a estrés mecánico.

#### 1.1.2. Isoperoxidasas.

Las isoenzimas son diferentes formas de una enzima que catalizan una misma reacción química y pueden estar presentes en un mismo organismo o incluso en una misma célula. Son, en general, estructuras poliméricas formadas por unidades análogas en diferentes proporciones (ej: glutatión reductasa) u homólogas codificadas por diferentes genes (ej: lactato deshidrogenasa). También pueden ser moléculas análogas que difieren en el grado de glicosilación, lo que provoca diferencias en su peso molecular o punto isoeléctrico. En el caso de las isoperoxidasas, éstas difieren tanto en composición de aminoácidos como en composición de carbohidratos (Gaspar y col., 1986). Cada isoPO está codificada generalmente por un solo gen (Morikawa, 1988) y por lo tanto pueden ser empleadas como marcadores genéticos; Morikawa (1988) detectó dos loci independientes (Px0 y Px9) localizados en los cromosomas 18 y 6 de un híbrido de la progenie F<sub>2</sub> de dos variedades de avena, responsables de la variación en la expresión fenotípica de isoperoxidasas.

La actividad PO. enzimática cuantificada en un extracto crudo

es de hecho la suma de las actividades de las diferentes isoenzimas y, como ya se mencionó, las isoenzimas pueden tener diferentes propiedades fisicoquímicas, cinéticas e inmunológicas (Palmer, 1981; Lehninger, 1981; Hendriks, 1990), así como la capacidad de catalizar otras reacciones enzimáticas. Por ejemplo: las peroxidasas catiónicas están directamente relacionadas con la lignificación, mientras que las aniónicas con la degradación de auxinas (Gaspar y col., 1982).

Las peroxidasas vegetales se presentan generalmente como una mezcla de isoenzimas. El número de isoenzimas recuperadas de un tejido depende de la técnica de extracción empleada (Gaspar y col., 1982; Kay y Basile, 1987) y su visualización en geles de electroforesis de la concentración del sustrato, el pH de incubación y el donador de hidrógenos utilizado (Kay y Basile, 1987).

Hendriks y col. (1990) demostraron que el suero de conejo altamente específico contra PO de petunia (*Petunia hybrida*) solamente reacciona con algunas isoPO de *Datura stramonium*, *Nicotiana tabacum*, *Capsicum annum*, *Solanum tuberosum* y *Lycopersicon esculentum* y prácticamente con ninguna de las isoPO de *Armoracea rusticana*, *Brassica napus*, *Tagetes cresta*, *Zea mayz*, y *Avena sativa*, por lo que concluyeron que probablemente las diferentes familias contengan genes que codifican para epítopes homólogos presentes en algunas isoPO, pero no comunes a las PO de todas las plantas.

### 1.1.3. Las peroxidasas vegetales como marcador de estrés salino.

Los mecanismos de respuesta de las plantas a la salinidad son complejos (Greenway y Munns, 1980). Algunos se reflejan como cambios cualitativos o cuantitativos en la actividad de las enzimas. La cuantificación de actividad peroxidásica ha sido descrita como marcador de la intensidad del estímulo, como en el caso de lechugas (*Brassica sp*), plantas halotolerantes irrigadas

con agua de mar diluida en diferentes proporciones con agua dulce (Stevens y cols., 1978), o en el de *Halimione portulacoides* y *Suaeda maritima*, plantas halófilas (Kalir y col., 1984; Hagege y cols., 1988). Los datos reportados sugieren que existe una respuesta diferente al estrés debido a que los mecanismos de adaptación a la salinidad de cada caso son distintos: Mientras que las plantas halotolerantes muestran una disminución en la actividad peroxidásica, las halofilas parecen responden con un aumento en la actividad PO al estrés salino.

## 2.0. OBJETIVO DEL ESTUDIO.

El objetivo de este trabajo es investigar la respuesta peroxidásica en plantas freatófilas que se han desarrollado expuestas a diferentes condiciones ambientales. Debido a que las plantas responden a un estímulo ambiental cuando las condiciones fisiológicas lo permiten, es necesario tener una forma de evaluar el estado general de las plantas. Para este fin se cuantificará el contenido de clorofilas de cada mezquite muestreado.

Una de las formas como las plantas toleran diferentes concentraciones de sales en el medio es produciendo osmoreguladores, por lo que se cuantificará la concentración foliar de osmoreguladores, principalmente los conocidos como "metabolitos de bajo peso molecular". Una forma de determinar la influencia de un solo factor ambiental en la respuesta de plantas es el ensayo en condiciones controladas. Dada la gran variabilidad fenotípica reportada para el Género *Prosopis* el ensayo controlado idóneo es en cultivo de células en suspensión. Para lo cual será necesario obtener callos a partir de tejido de mezquite y las células individuales. La intención ulterior del estudio es llegar a implementar un método predictivo o indicativo de la calidad del agua del manto freático, relacionando la actividad de la enzima peroxidasa de la planta con la salinidad del agua. Ello ayudará a la detección de mantos acuíferos de calidad aceptable para el consumo o las actividades humanas, sin necesidad de realizar la perforación de pozos.

### 3.0. MODELO DE ESTUDIO.

Los mezquites son plantas del género *Prosopis*, Sección *Algarobia* pertenecientes a la Familia *Leguminosae*, termo-xerófilas (Rzedowski, 1988) ampliamente distribuidos en norteamérica (Sharifi y col., 1983) y abundantes en las regiones áridas del continente Americano (Rzedowski, 1988). Frecuentemente forman la vegetación predominante en desiertos cálidos (Virginia y Jarrel, 1983). Los mezquites han sido de gran interés para el hombre primitivo, entre otras razones, por que han proporcionado combustible y material para construcción, alimento y protección contra ciertas enfermedades (Felger, 1985 y Cowen, 1990).

La agricultura tradicional despreció a los mezquites durante la primera parte del siglo por considerarlos maleza, fuertes competidores de pasturas y consumidores de aguas freáticas (Dahl, 1982) y solo recientemente se ha hecho énfasis en el potencial agrícola de los mezquites para la recuperación de zonas áridas (Felger, 1985 y Figueiredo, 1990).

Los mezquites se desarrollan y reproducen en zonas áridas con promedios anuales de precipitación tan bajos como 63 mm, gracias a que producen raíces profundas que alcanzan la zona capilar y manto freático, de los que toman el agua para desarrollar (Sharifi y col., 1982). Además, fijan nitrógeno en nódulos de las raíces profundas (Virginia y col., 1986).

En regiones áridas, principalmente durante la temporada de sequía, prácticamente toda el agua transpirada por estas plantas es obtenida por las raíces profundas (Nilsen y col., 1983). La disponibilidad de agua durante todo el año permite a los mezquites sostener una productividad que está desacoplada de los dos principales factores limitantes en los ambientes desérticos: la lluvia y la disponibilidad de nitrógeno (Nilsen y col., 1987). Permitiendo altas velocidades de producción neta primaria

aérea (hasta 3.6 Mg/ha/año) en comparación con otros sistemas desérticos (Sharifi y col., 1982).

Plantas del mismo Género (*Prosopis pallida* y *P articulata*) han sido encontradas creciendo en salinidades equivalentes a la de agua de mar (Rhodes y Felker, 1988).

Los mezquites presentan una fenología particular debido a su adaptación al medio. La producción de hojas y el crecimiento de las ramas es rápido; de hasta 28 hojas por semana, pero de corta duración. Dos periodos de producción de hojas ocurren durante el año, siendo el segundo solo una pequeña proporción del primero. El primer periodo ocurre entre marzo y abril y el segundo en agosto. La mayoría de la producción de hojas, entre 80 y 90 %, se localiza en nódulos de más de un año (Nilsen y col., 1987).

En la cuenca de La Paz-El Carrizal en el Municipio de La Paz, BCS, México, predomina la especie *Prosopis articulata* (León de la Luz, 1981; Redowski, 1988; y García-Carreño y Ochoa, 1991). Las plantas bajo estudio tienen la capacidad de utilizar aguas subterráneas lo que les permite desarrollar aún en tiempo de sequía.

#### 4.0. HIPOTESIS DE TRABAJO.

Si... la respuesta peroxidásica de plantas, se relaciona con la salinidad de los mantos freáticos.

Entonces... la actividad peroxidásica de mezquites, será un indicador de la calidad salina de las aguas subterráneas.

## 5.0. EXPERIMENTACION.

### 5.1. Area de estudio.

El muestreo fue realizado en la cuenca pluvial de La Paz-El Carrizal en Baja California Sur,  $24^{\circ}00' - 24^{\circ}10'N$ ;  $110^{\circ}20' - 110^{\circ}30'W$ . El clima es seco o desértico (Hammond, 1954). El promedio anual de temperatura del aire es de  $23.5^{\circ}C$  con un mínimo de  $6^{\circ}C$  en el invierno y un máximo de  $42^{\circ}C$  en el verano. El promedio anual de precipitación pluvial es de 150 mm concentrado principalmente en el verano. Los vientos dominantes en otoño e invierno son del noroeste y del sur en la primavera y verano (Salinas-Zavala, 1986). La comunidad biótica corresponde a matorrales sarcocauléscentes (Shreve y Wiggins, 1937, y León de la Luz, 1981).

La Cuenca de La Paz-El Carrizal, al igual que la mayoría de las cuencas áridas del mundo (FitzPatrick, 1980; Stanley, 1989) está formada por sedimentos acarreados hacia el valle, por las lluvias ocasionales (García-Monarez, 1986), quedando las rocas de mayor tamaño en la base de las montañas, formando una estructura cónica de partículas sedimentarias con arreglo irregular y de poca pendiente. Hacia el centro de la cuenca se encuentran sedimentos de tamaño de partícula menor, principalmente arenas, en donde se acumulan minerales evaporíticos, tanto en la superficie como en aquellos estratos del suelo en donde el agua subterránea se evapora. Formando, eventualmente zonas impermeables a la percolación, que pueden permitir la acumulación de cierta humedad entre la superficie del suelo y la capa impermeable después de las lluvias. El área de estudio se caracteriza por presentar una variedad de mantos freáticos, con profundidad desde los tres hasta varios cientos de metros al espejo de agua. García-Monarez y col. (1986) describen varias familias de aguas en la cuenca, en función de su contenido de sales; desde 0.09 hasta 1.8 S/m.



La temperatura ambiente para cada muestreo se tomó de los datos obtenidos por la SARH de una estación meteorológica localizada en la zona de estudio y se comprobó con la medición directa al momento del muestreo.

### 5.2. Identificación de las plantas.

Los mezquites estudiados fueron identificados en el campo hasta nivel de especie por el MC José Luis León de la Luz, botánico de la División de Biología Terrestre, CIB.

### 5.3. Toma de muestras.

Los muestreos de campo tuvieron lugar de noviembre de 1988 a junio de 1990. Se seleccionaron ocho áreas de estudio que presentaban mantos freáticos, perforados con fines agrícolas, en un rango de conductividad del agua de 0.09 a 1.8 S/m. Los pozos se localizaron con ayuda de un registro realizado por geólogos de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (García-Monarez y col., 1986). La selección de las áreas de muestreo se realizó empleando los siguientes criterios: a) calidad de agua conocida y diferente para su manto, b) presencia de pozos para muestreo de agua, c) presencia de mezquites en un radio no mayor de 50 metros a partir del tiro del pozo y d) espejo del agua a no más de 30 metros de profundidad.

En cada muestreo se tomó agua del pozo empleando las bombas instaladas para fines agrícolas, en recipientes de 1000 ml con tapa de rosca. Se cuantificó la conductividad eléctrica en mmhos/cm, empleando un conductímetro (EMH) con electrodo de un cm de paso de corriente. Los mmhos/cm se convirtieron a la unidad internacional; S/m, multiplicando los datos por 0.1 (Instrucciones para autores, Agronomy Journal). Se determinó el pH y la concentración de los iones  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Cl}^-$  siguiendo las técnicas descritas por Richards (1973).

Se tomaron muestras de suelo a 60 cm de profundidad bajo el dosel de las plantas y en espacios libres de mezquites. Las muestras fueron procesadas para determinar el contenido de los iones  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Cl}^-$  y se le determinó el pH y la cantidad de materia orgánica, nitrógeno total y nitratos (Richards, 1973).

De cada área de estudio se seleccionaron en forma aleatoria, cuatro plantas. De cada planta se tomaron en forma estratificada ramas localizadas con orientación norte y sur, a una altura de 2 metros del suelo y que presentaban hojas adultas. Las ramas fueron transportadas inmediatamente al laboratorio (dentro de las dos primeras horas de haber sido tomadas). Ya en el laboratorio se tomaron hojas adultas partiendo del extremo apical. De las hojas se separaron manualmente los folíolos y sólo se trabajó con ellos.

#### 5.4. Cuantificación de masa seca (MS).

Muestras de un gramo de folíolos (por triplicado) fueron colocados en pesafiltros de vidrio, llevados previamente a peso constante. Los folíolos fueron secados a  $70^\circ\text{C}$  hasta peso constante (aproximadamente 24 h). El porcentaje de MS fue calculado por la diferencia entre la "pesada" inicial y la final.

#### 5.5. Obtención del extracto enzimático.

Dos gramos de folíolos (por triplicado), se lavaron con agua destilada sobre un embudo Buchner acoplado a un matraz Kitazato y bomba de vacío. Se homogenizaron en 10 ml de una solución amortiguadora de acetatos 50 mM, pH 5.1 a  $10^\circ\text{C}$ , empleando un homogenizador de tejidos "Polytron" con flecha de 8 mm de diámetro. El extracto acuoso fue recuperado por centrifugación a 5000 g, 10 min.

#### 5.6. Cuantificación del contenido de proteínas en los extractos enzimáticos.

Se empleó el método de Bradford (1976) modificado, que consiste en el cambio de color del reactivo "Coomassie Brilliant Blue G 250" al formar un complejo con las proteínas en medio ácido, determinando la absorbancia a 595 nm. La técnica de Bradford, como la mayoría de los métodos empleados para cuantificar proteínas, presenta interferencias con algunos compuestos. En el caso de los extractos vegetales, uno de los principales compuestos que interfieren con la cuantificación de proteínas son los polifenoles. Robinson (1979) demostró que la técnica para la cuantificación de proteína más apropiada para extractos vegetales es el descrito por Bradford (1976) con ciertas modificaciones. Para nuestro caso se tomaron alícuotas de 0.03 ml de muestra y se mezclaron con 2 ml de reactivo de Bradford. Se agitó vigorosamente y después de dos minutos se registró la absorbancia a 595 nm. Se preparó una curva de calibración con BSA Cohn V (Sigma Chem Co). Para el cálculo de la regresión lineal de los datos obtenidos en el espectrofotómetro se utilizó un programa para PC en lenguaje "GWBasic" que muestra el coeficiente de correlación. sólo se trabajó con curvas de calibración que presentaran un coeficiente de correlación  $> 0.99$ . Los datos de contenido de proteína fueron calculados a partir de la absorbancia de cada muestra aplicando la ecuación generada en el cálculo de regresión lineal.

#### 5.7. Composición química de folíolos, agua, y suelo.

Los análisis se realizaron de acuerdo a los métodos descritos por Richards (1973).

### 5.8. Cuantificación de actividad peroxidásica.

Se empleó guaiacol y orto-feniléndiamina (OPD) como donador de electrones. La actividad de guaiacol peroxidasa fue cuantificada calculando la velocidad inicial de reacción midiendo el cambio de absorbancia por minuto. Para la reacción se utilizó 1.9 ml de guaiacol 16 mM en amortiguador de acetatos 50 mM, pH 5.1, en una celda de espectrofotómetro de 3 ml, 0.005 ml de peróxido de hidrógeno 30% y una alícuota de 0.01 ml del extracto enzimático. La celda se tapó con "parafilm" y por inversión se mezclaron los reactivos. La celda fue inmediatamente colocada en un espectrofotómetro "Spectronic 2000" con graficador y temperatura controlada a 25°C, registrándose el cambio de absorbancia (470 nm) en función del tiempo.

La actividad OPD peroxidasa fue cuantificada de igual manera que la guaiacol peroxidasa, empleando OPD 5.5 mM y registrando el cambio de absorbancia a 444 nm.

Por un método similar de cuantificación de actividad peroxidásica, Castillo (1985) reportó una respuesta lineal de hasta por 30 minutos cuando cuantificó la actividad de guaiacol peroxidasa de un extracto de una crasulácea; *Sedum album*. Dado que nuestros resultados preliminares mostraron una respuesta sigmoideal, se determinó en la curva de cambio de absorbancia en función del tiempo la región cuya tangente correlaciona con la cantidad de actividad enzimática. Peroxidasa de rábano largo (HRPO; Sigma, St. Lois MO, USA) se empleó como control interno del ensayo.

### 5.9. Cuantificación de actividad peroxidásica en presencia de NaCl.

Se cuantificó la actividad de guaiacol peroxidasa de extractos de folíolos de mezquites en presencia de 0 a 2M de NaCl tomando

las recomendaciones de Kalir y col. (1984).

#### 5.10. Separación de isoPO por enfoque isoelectrico.

La separación de isoenzimas fue realizada en geles de agarosa, siguiendo el método de LKB (Application Notes 317). Se mezcló agarosa ( $-m_p < 0.02$ ) al 0.8%, sorbitol al 10% y se le adicionó una mezcla de amfolinas de pH 3-10 al 2% a 70° C. La muestra (0.010 ml) desalada por diálisis contra agua destilada fue aplicada en papel filtro. La separación electroforética se realizó a potencia constante (5W) durante 90 min. Inmediatamente después, los geles fueron sumergidos en una solución fresca de guaiacol (16 mM) en amortiguador de acetatos 50 mM, pH 5.1. Después de cinco minutos, la solución de guaiacol fue decantada y el gel lavado con agua destilada y sumergido en peróxido de hidrógeno (0.03%), hasta que las bandas de isoperoxidasas fueron visibles (aproximadamente 5 min). El orden de aplicación de las soluciones de tinción es importante para el desarrollo de un número máximo de bandas (Kay y Basile, 1987).

#### 5.11. Extracción de clorofilas.

Muestras de 0.2 g de foliolos fueron homogenizados en 10 ml de acetona al 80% empleando un homogenizador de tejidos "Polytron" con flecha de 8 mm de diámetro. Un ml de homogenado se diluyó (1:4) con acetona, evitando en todo momento la fotoxidación de la clorofila. Se registró la absorbancia del extracto a 645 y 663 nm (Arnon, 1945).

#### 5.12. Metabolitos de bajo peso molecular.

Se preparó un extracto en metanol-cloroformo de un homogenado mecánico de foliolos, siguiendo el método de Kates (1982).

### 5.13. Inducción de callos a partir de foliolos de mezquite.

Foliolos de un mezquite localizado cerca de la playa fueron separados e inmediatamente tratados con hipoclorito de sodio 5% durante 5 min y lavados con agua destilada estéril. Los foliolos desinfectados se colocaron en frascos tipo "Gerber" de 120 ml conteniendo 10 ml de medio MS sólido adicionado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2, 4-D)  $10^{-6}$ M y benciladenina (BA)  $0, 10^{-8}, 10^{-7}$  y  $10^{-6}$ M respectivamente. Los explantes fueron incubados a  $27-28^{\circ}$  C con fotoperiodo de 12 hs de luz fluorescente.

#### 5.13.1. Obtención de células en suspensión.

Callos obtenidos en 2, 4-D  $10^{-6}$ M y BA  $10^{-7}$ M fueron disgregados asépticamente e inoculados en medio MS líquido, conteniendo la misma proporción de hormonas e incubados como se indica en el párrafo anterior.

### 5.14. Análisis estadístico.

Los estudios de correlación de los resultados obtenidos fueron analizados por medio de regresión lineal. La comparación entre las medias de los diferentes grupos, para determinar la significancia de la diferencia entre medias, se efectuó por análisis de varianza, empleando un nivel de confianza de 95%. Los análisis se realizaron con el paquete estadístico para PC "Statgraphics". La comparación entre diferentes unidades y de variaciones entre los diferentes parámetros en un mismo grupo y fecha de muestreo se realizó empleando un análisis de residuos de cada valor, por medio de un programa para PC de hoja de cálculo (Quattro). Los residuos se calcularon de la siguiente manera  $r = (X - X_{pro})/ds$ , donde X es el valor individual de cada análisis,  $X_{pro}$  el promedio de los valores para cada parámetro y ds la desviación estándar. Con lo que fue posible homogenizar los

valores de parámetros diferentes y comparar comportamientos en una gráfica.

## 6.0. RESULTADOS.

En la Figura 6.1 (a-c) se muestra la temperatura media, máxima y mínima de las fechas de muestreo, así como un análisis de residuos de la temperatura y precipitación pluvial registrada en la estación meteorológica "La Paz" de 1965 a 1989 y de la estación "Lagunillas" de 1965 a 1986, localizada a 12 Km hacia el sur de la primera. En estas gráficas se observan las variaciones en temperatura y precipitación durante el periodo registrado, así como la gran diferencia entre las dos regiones.

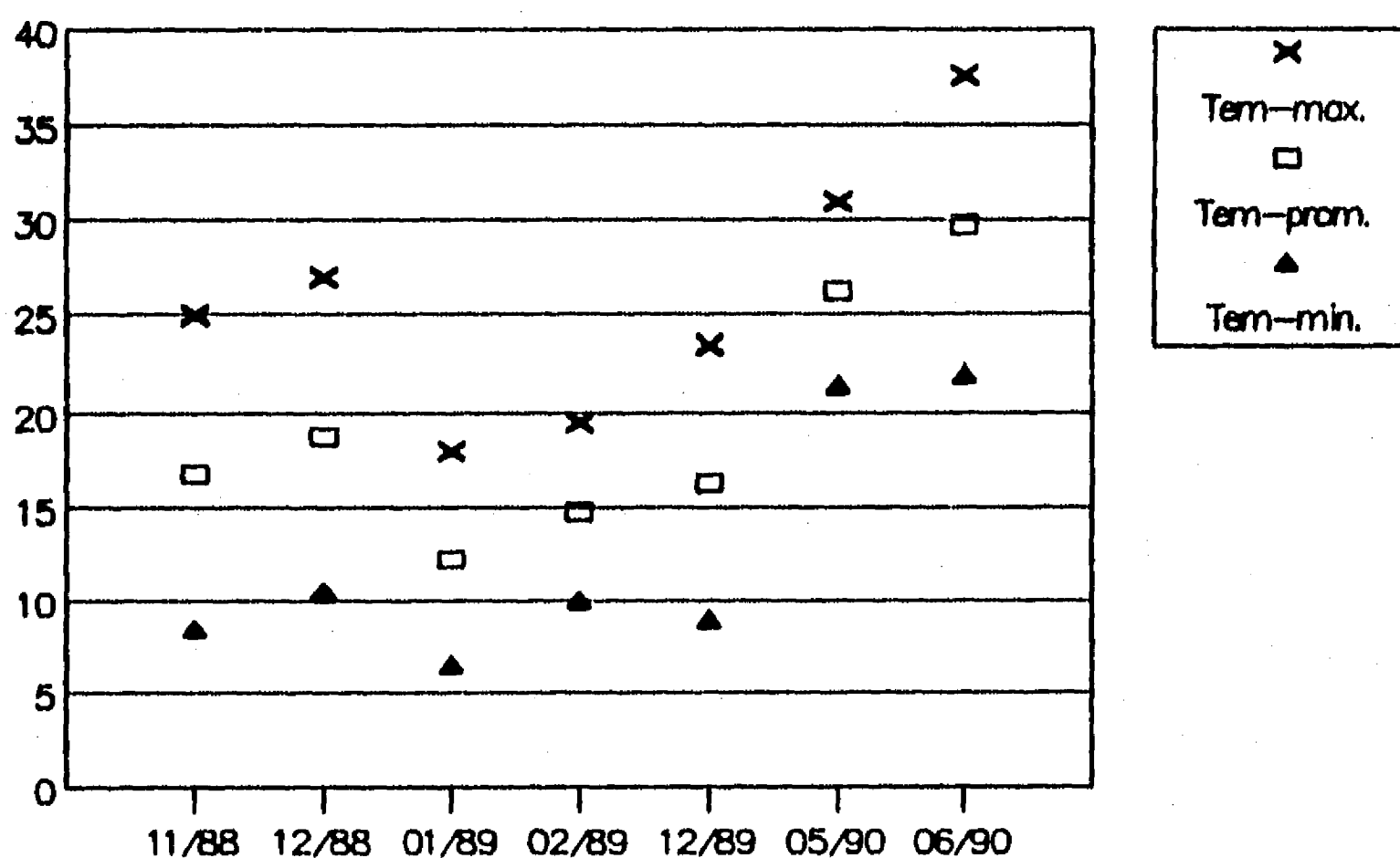


Figura 6.1.a. Temperatura máxima, promedio y mínima registrada en la estación "La Paz", BCS, en las fechas de muestreo. [x = Fecha de Muestreo; y = Temperatura (grados centígrados)]



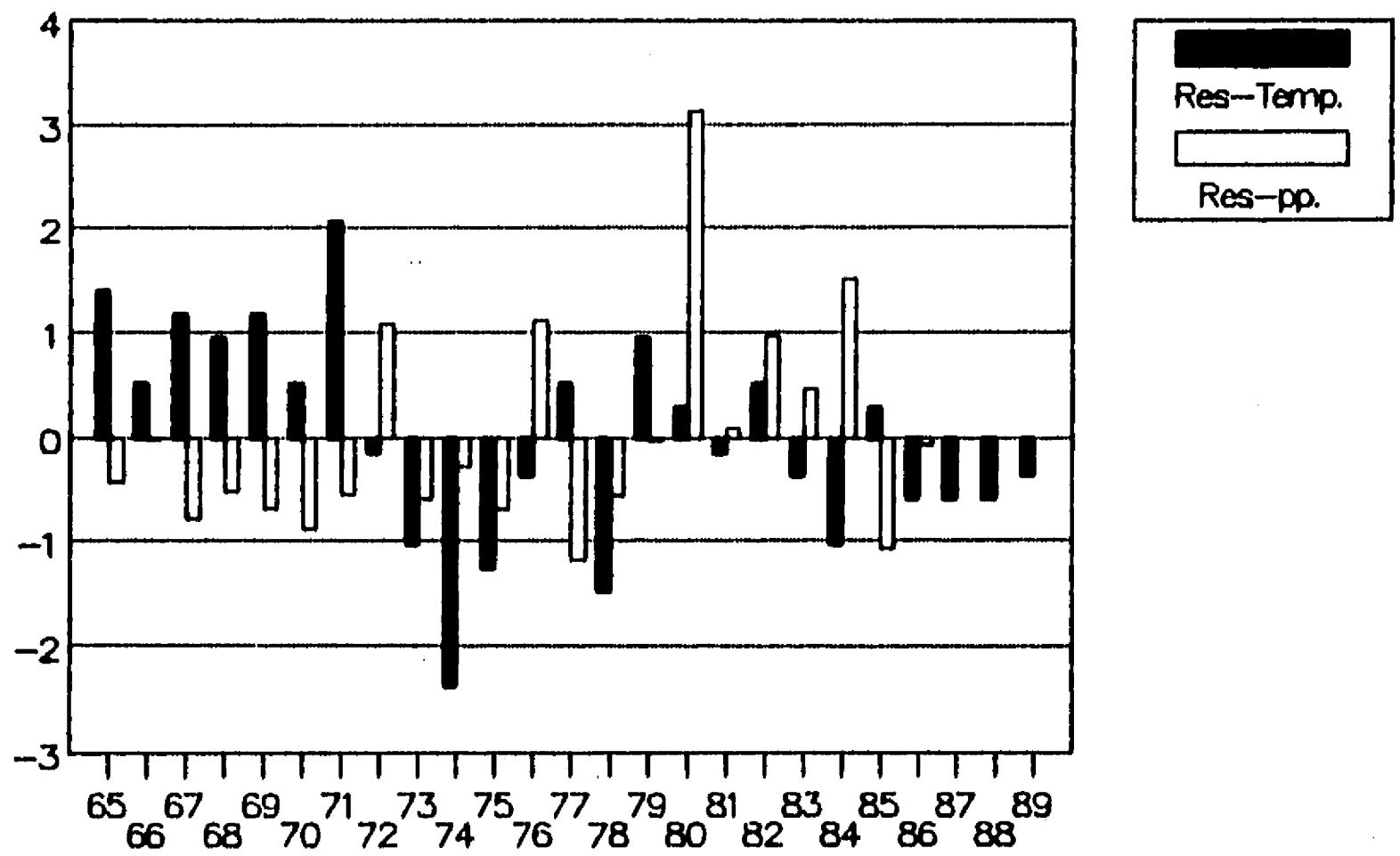


Figura 6.1.b. Análisis longitudinal de residuos de la temperatura y precipitación en la estación "La Paz", BCS. [x = Período (1965-1989); y = Residuos (X-Xprom/ds)].

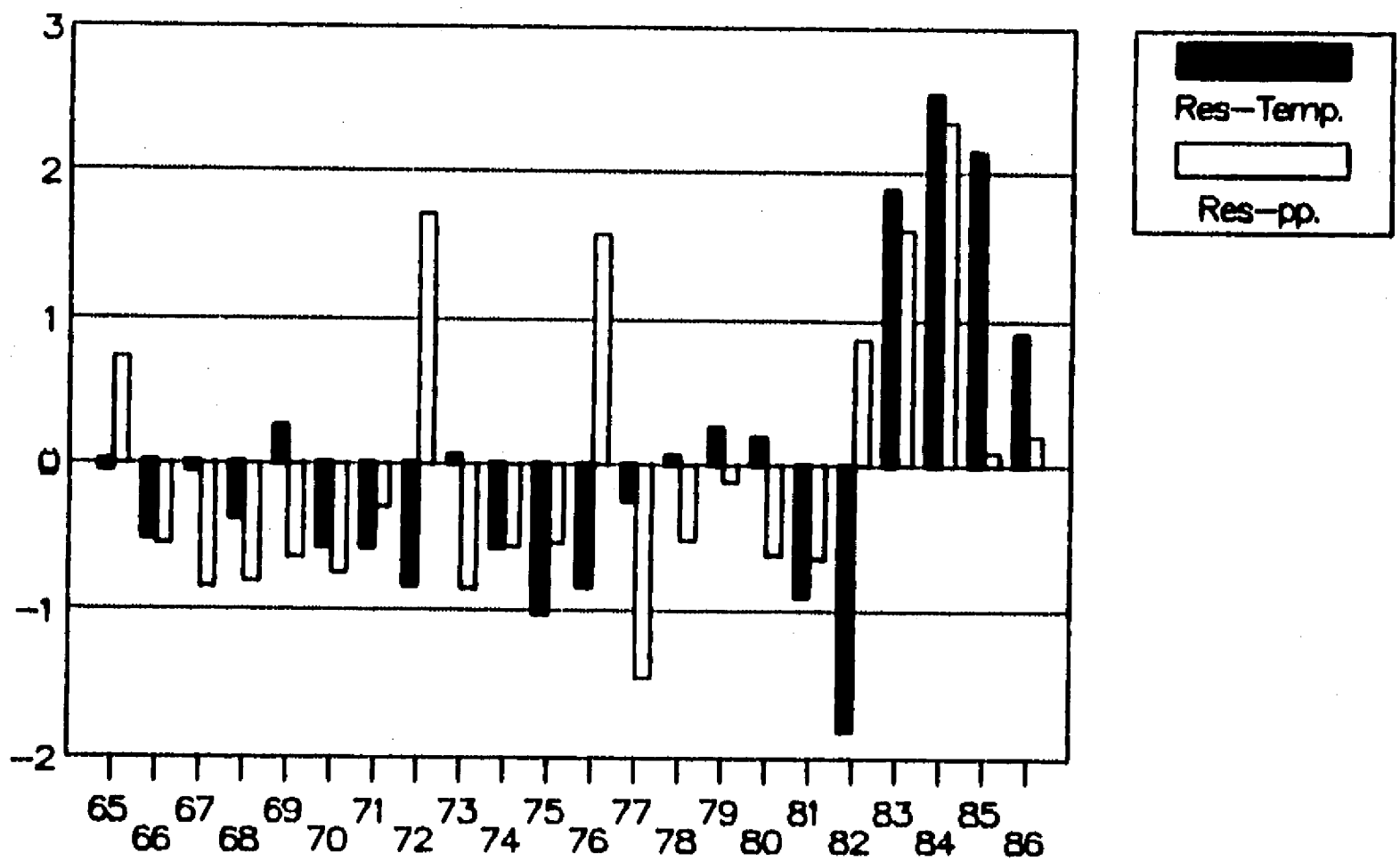


Figura 6.1.c. Análisis longitudinal de residuos de la temperatura y precipitación en la estación "Lagunillas", BCS. [x = Período (1965-1986); y = Residuos (X-Xprom/ds)].

En la Figura 6.2 se muestra el comportamiento de la conductividad de los mantos freáticos en un análisis longitudinal (nov 88 a jun 90) y se puede observar la variación en la conductividad eléctrica del agua de los acuíferos.

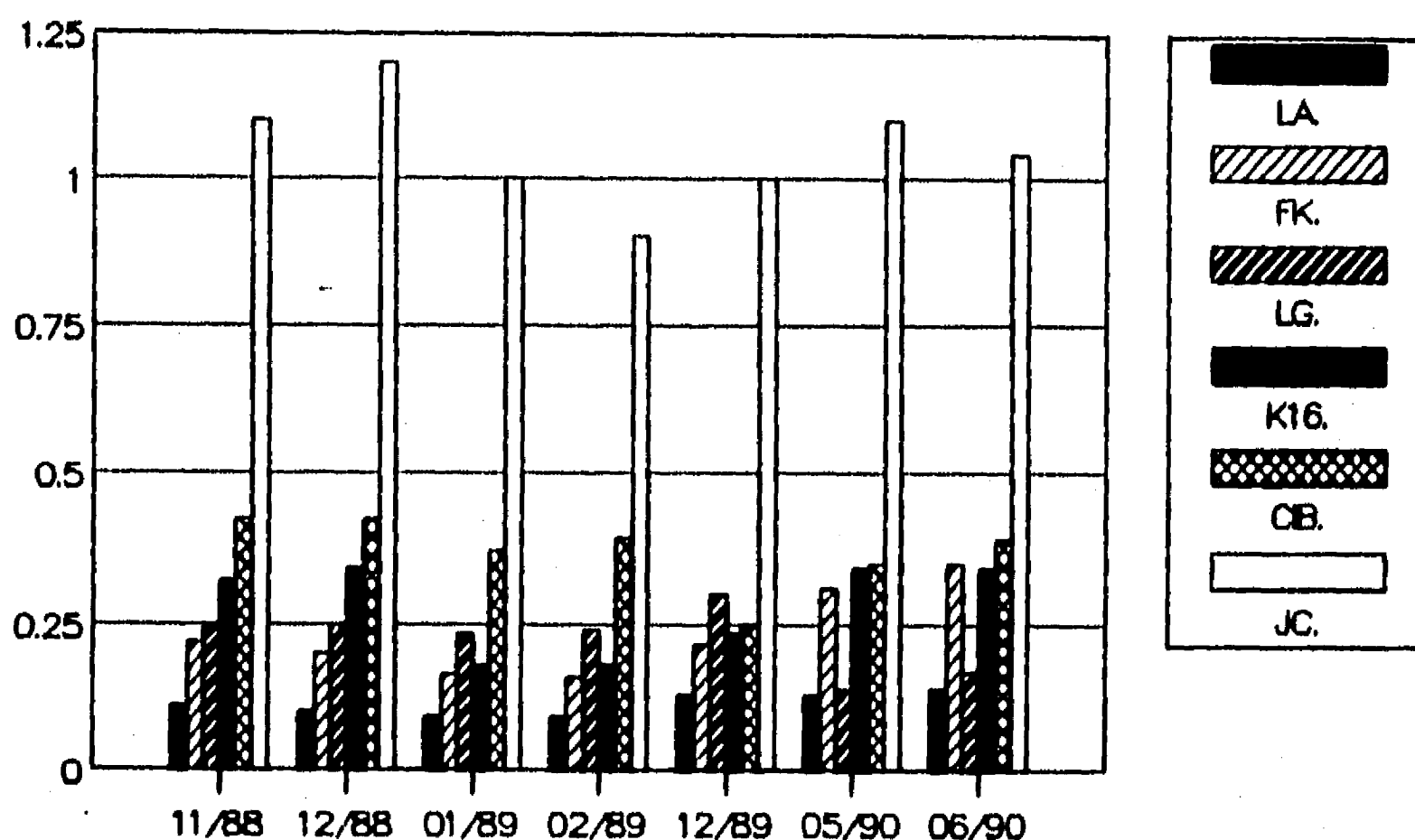


Figura 6.2. Análisis longitudinal de la conductividad de las aguas freáticas de las áreas de muestreo. [x = Fecha de muestreo; y = Siemens/m (S/m)].

La Figura 6.3. muestra el porcentaje de masa seca de los folíolos de cada rama muestreada. El porcentaje de masa seca de las ramas de los arbustos muestreados es muy heterogéneo. La MS más alta registrada (91%) corresponde a la rama sur de la planta 21 del pozo LG, mientras que la más baja (38%) correspondió a una rama norte de la planta 4 del pozo CIB. A pesar de la gran variabilidad encontrada entre las masas secas de las plantas de cada grupo, el análisis de variancia mostró un nivel de significancia de 0.66; no encontrándose diferencias

significativas entre los grupos.

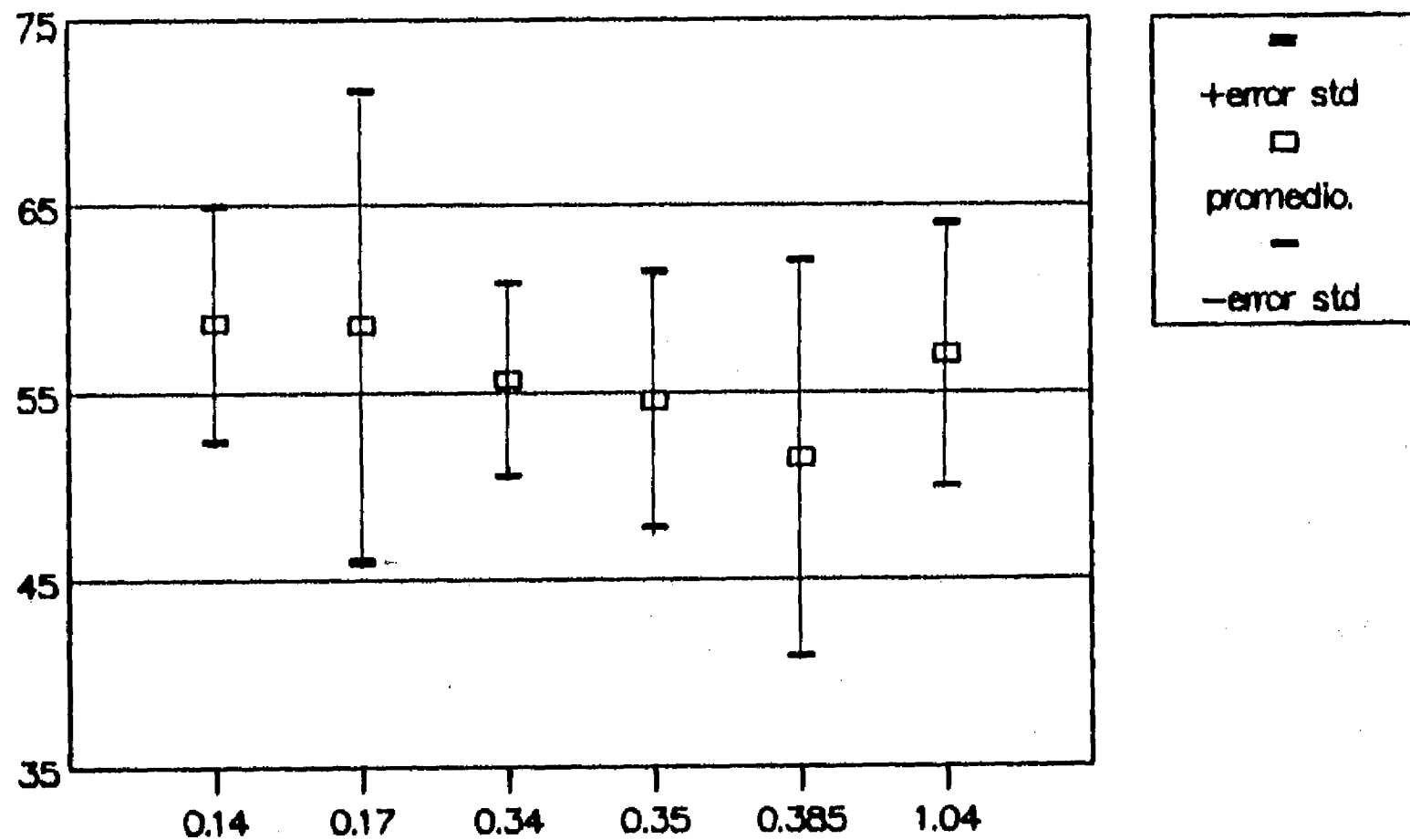


Figura 6.3. Masa seca de los foliolos de mezquites.  
[x =Area de muestreo; y = Masa seca (%)].

Dado que la MS de los foliolos es muy variable y de que la cantidad de PO pudiera estar variando por la diferente cantidad de agua en los foliolos, se realizó un análisis de residuos de la MS vs la actividad PO para determinar las variaciones de la masa seca y las de la actividad peroxidásica. La Figura 6.4 muestra que las variaciones de la actividad PO no se ajustan a las del contenido de agua de los foliolos.

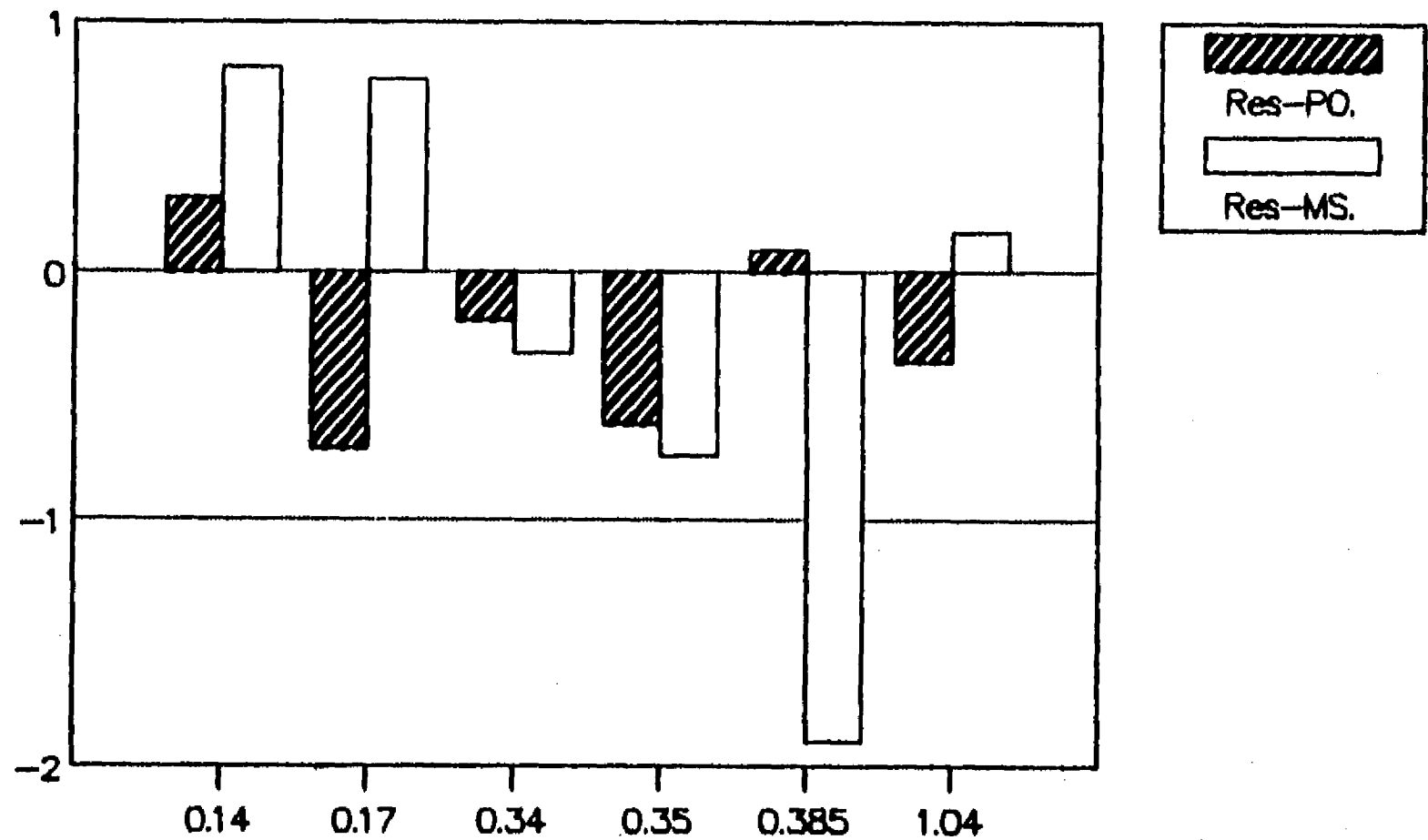


Figura 6.4. Comparación de las variaciones en masa seca en folíolos y actividad peroxidásica de sus extractos empleando los residuos de cada parámetro. [ $x$  = Área de muestreo;  $y$  = Residuos ( $X - X_{prom}/ds$ )].

Los resultados que se presentan en la Figura 6.5. muestra los datos obtenidos en la cuantificación de pH,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$ ,  $HCO_3^-$  y  $Cl^-$  de los folíolos. Se observó una ligera variabilidad en la composición química de los folíolos de los individuos de un mismo grupo. No se encontró correlación entre la composición química de los folíolos y la de las aguas freáticas.

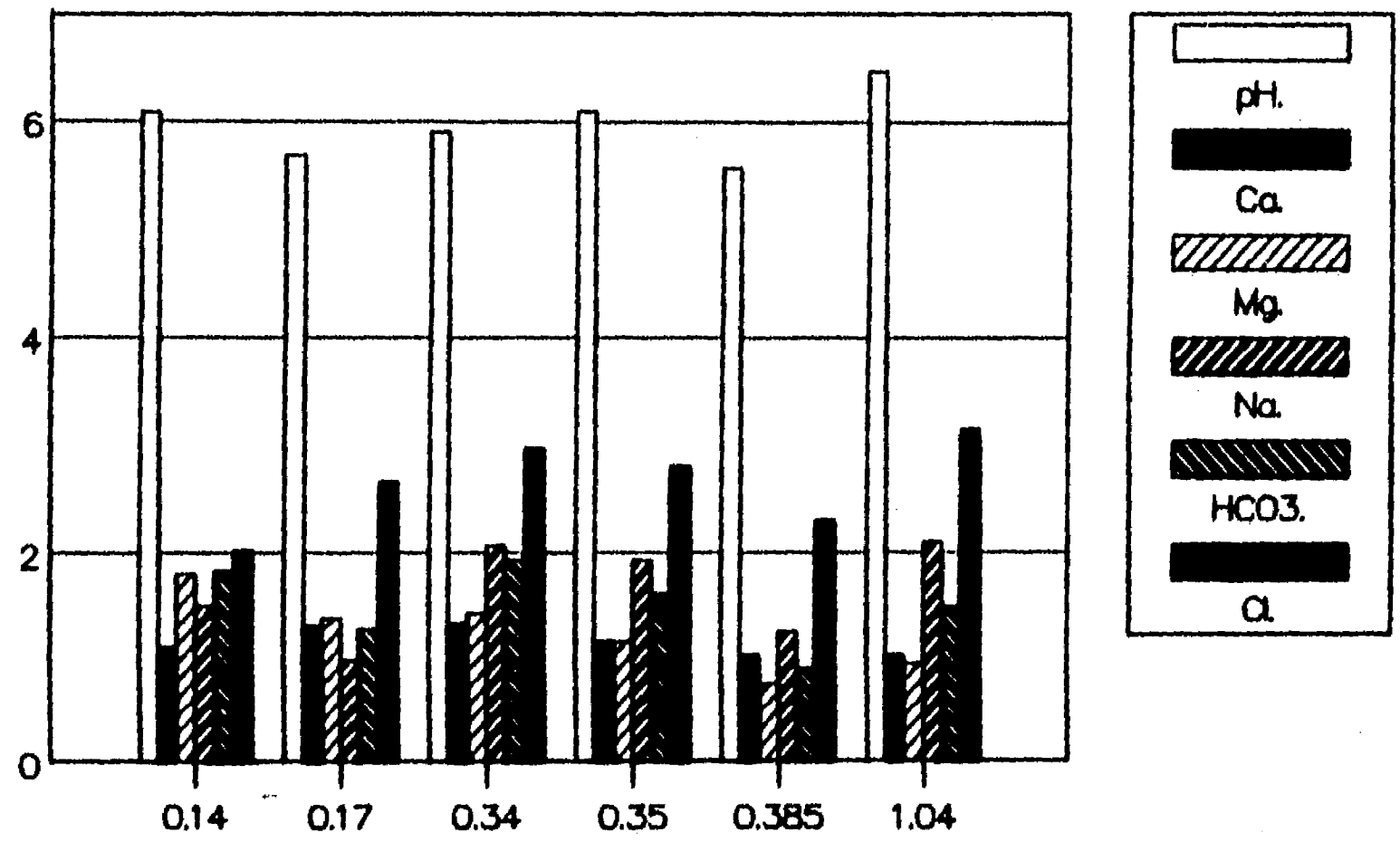


Figura 6.5. Composición química de extractos de folíolos de mezquites. [x = Conductividad del agua freática (S/m); y = pH y mEq/l].

La Figura 6.6 (a-c) muestra la correlación encontrada entre la máxima pendiente (tangente) de las curvas de oxidación de guaiacol y OPD por un extracto de folíolos de mezquite y una solución de HRPO empleada como control interno. El análisis de regresión lineal entre pendiente y cantidad de proteína en el ensayo mostró un coeficiente de correlación  $> 0.99$ . Los resultados obtenidos validan al método de ensayo de la actividad PO. Se seleccionó al guaiacol para los ensayos rutinarios por ser más sensible (cambios de absorbancia mayores) y estable al almacenamiento.

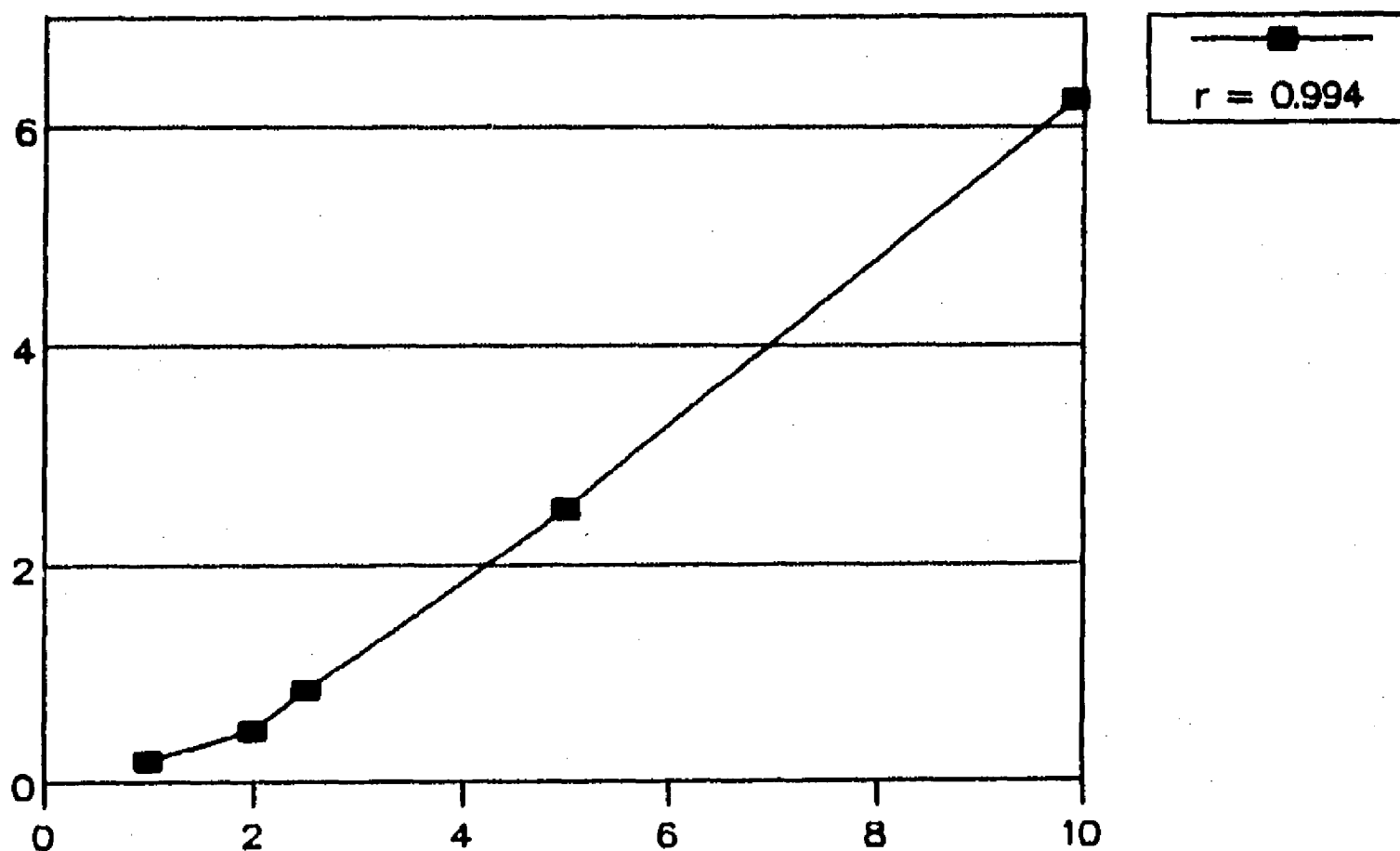


Figura 6.6.a. Cinética de oxidación de guaiacol por un extracto enzimático de folíolos de mezquite. [x = Extracto enzimático (mg de proteína); y = Actividad peroxidásica (abs/min)].

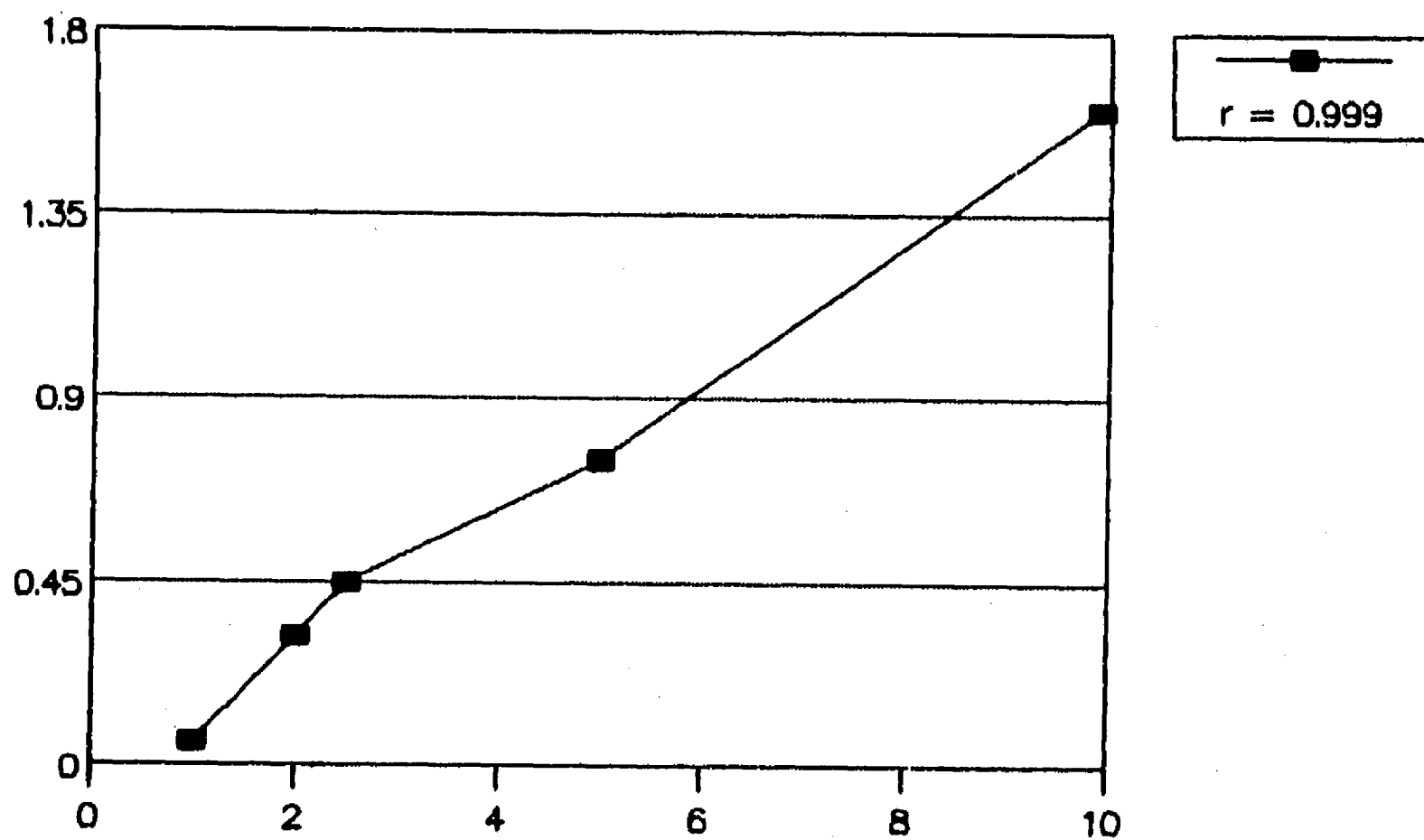


Figura 6.6.b. Cinética de oxidación de OPD (orto-fenilendiamina) por un extracto enzimático de folíolos de mezquite. [x = Extracto enzimático (mg de proteína); y = Actividad peroxidásica (abs/min)].

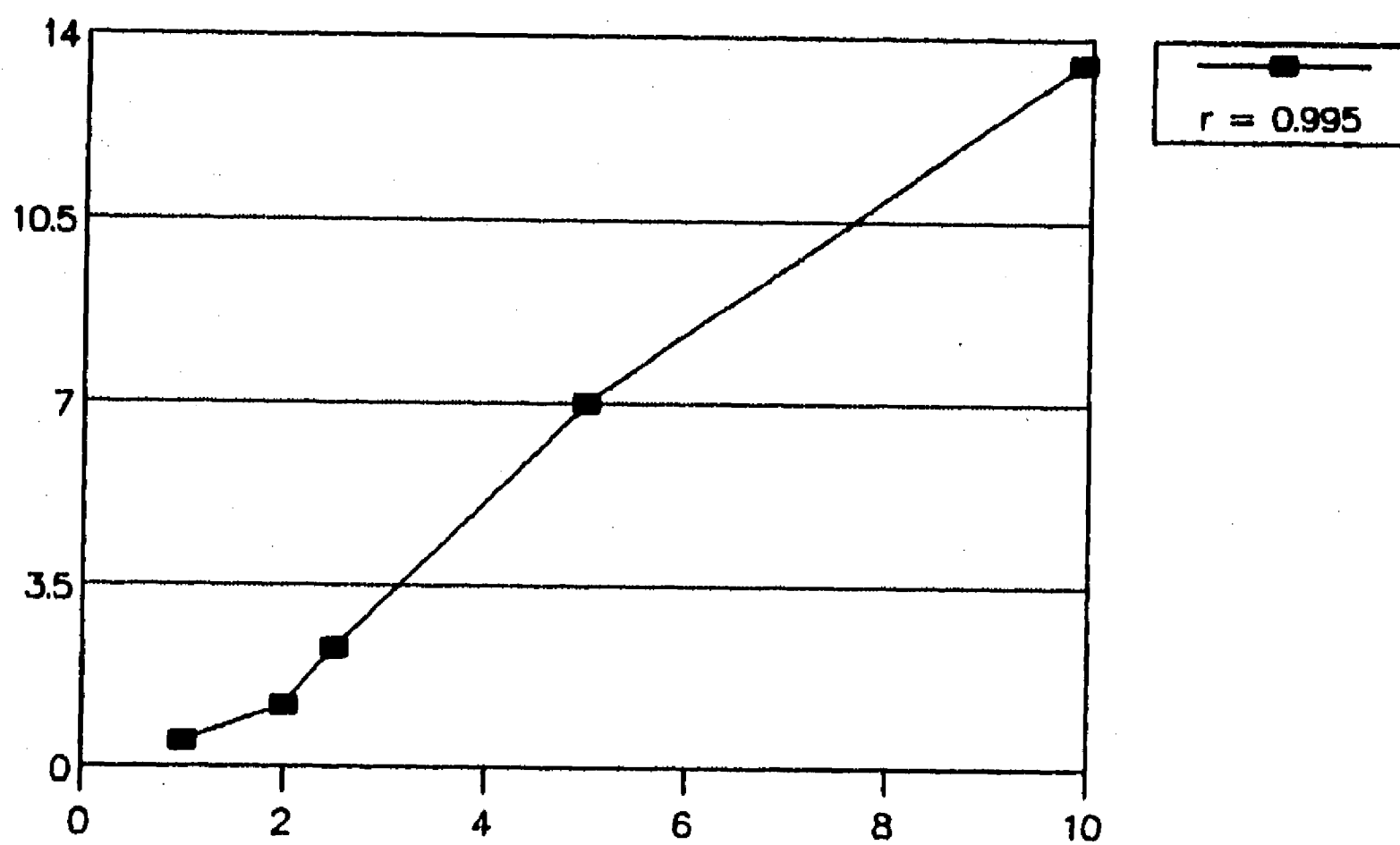


Figura 6.6.c. Cinética de oxidación de guaiacol por HRPO. [x = Solución enzimática (mg de proteína); y = Actividad (abs/min)].

Las Figuras 6.7.a-c. muestran la actividad PO en extractos de foliolos de mezquites en un estudio longitudinal, así como la actividad encontrada en dos muestreos: febrero y diciembre de 1989 (Figuras 6.7.a y b). El análisis de correlación entre la actividad de guaiacol peroxidasa y la conductividad de los mantos freáticos presenta un  $r$  que va de  $-0.22$  a  $-0.95$  para los muestreos del 12 de junio de 1990 y del 2 de diciembre de 1989. Estos resultados fueron obtenidos cuando las temperaturas medias del día de muestreo fueron  $29.75$  (máxima  $37.5$  y mínima  $22.0$ ), y  $16.25$  (máxima  $23.5$  y mínima  $9.0$ ), respectivamente.

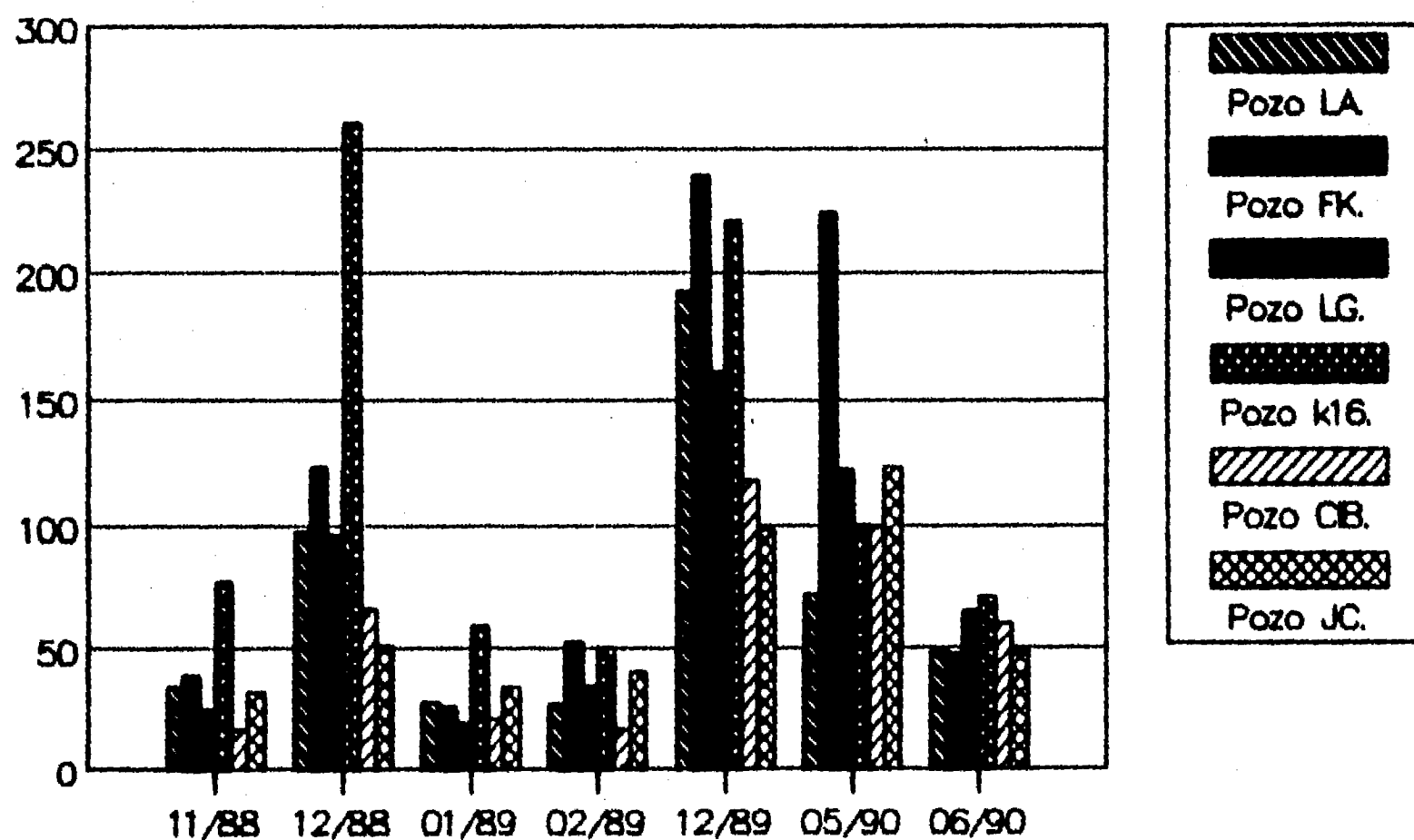


Figura 6.7.a. Actividad peroxidásica de extractos de mezquites en un análisis longitudinal. [x = Fecha de muestreo; y = Actividad peroxidásica].



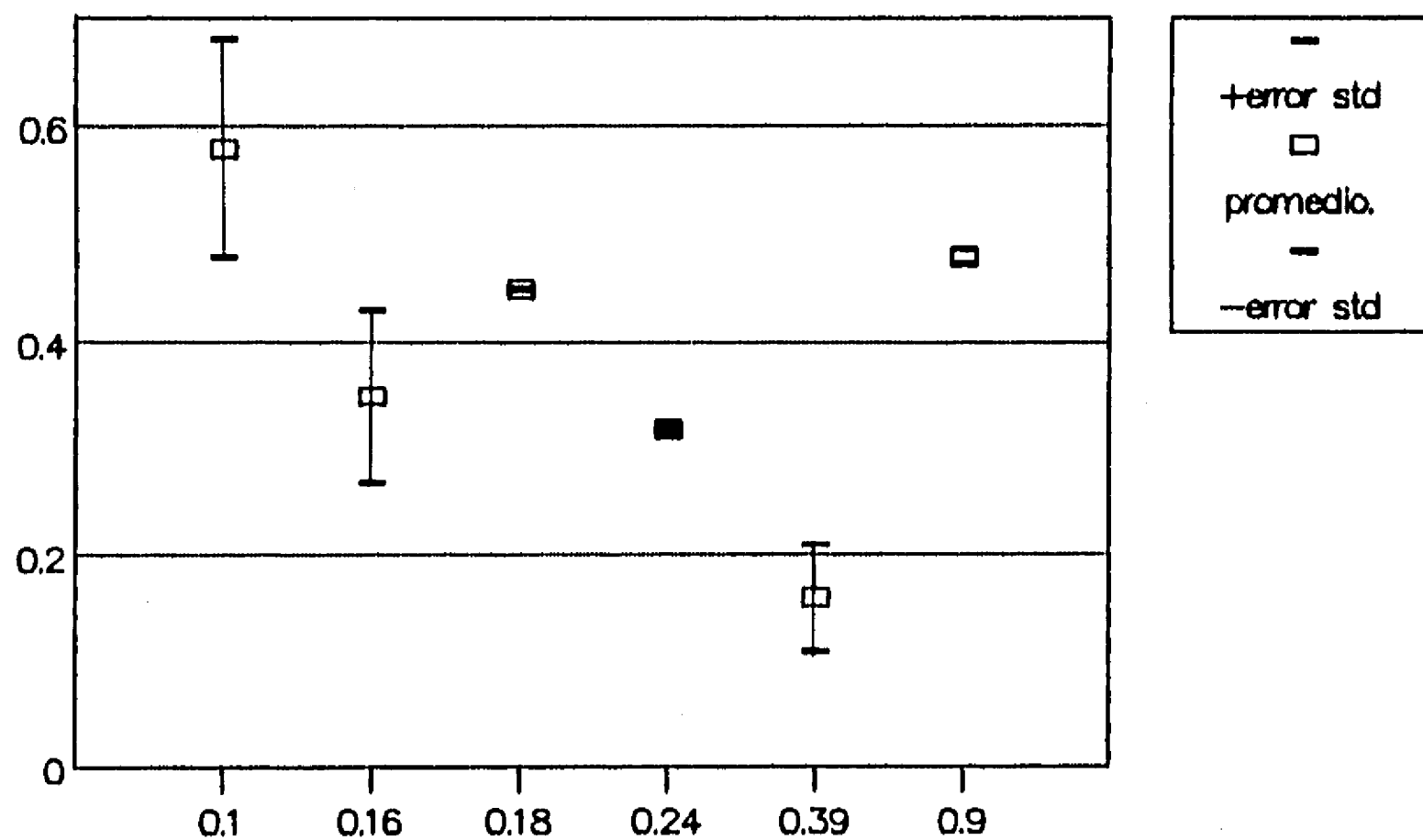


Figura 6.7.b. Actividad peroxidásica de extractos de mezquite muestreados en febrero de 1989,  $r = -0.3$ . [x = Conductividad del manto (S/m); y = Actividad peroxidásica (abs/min)].

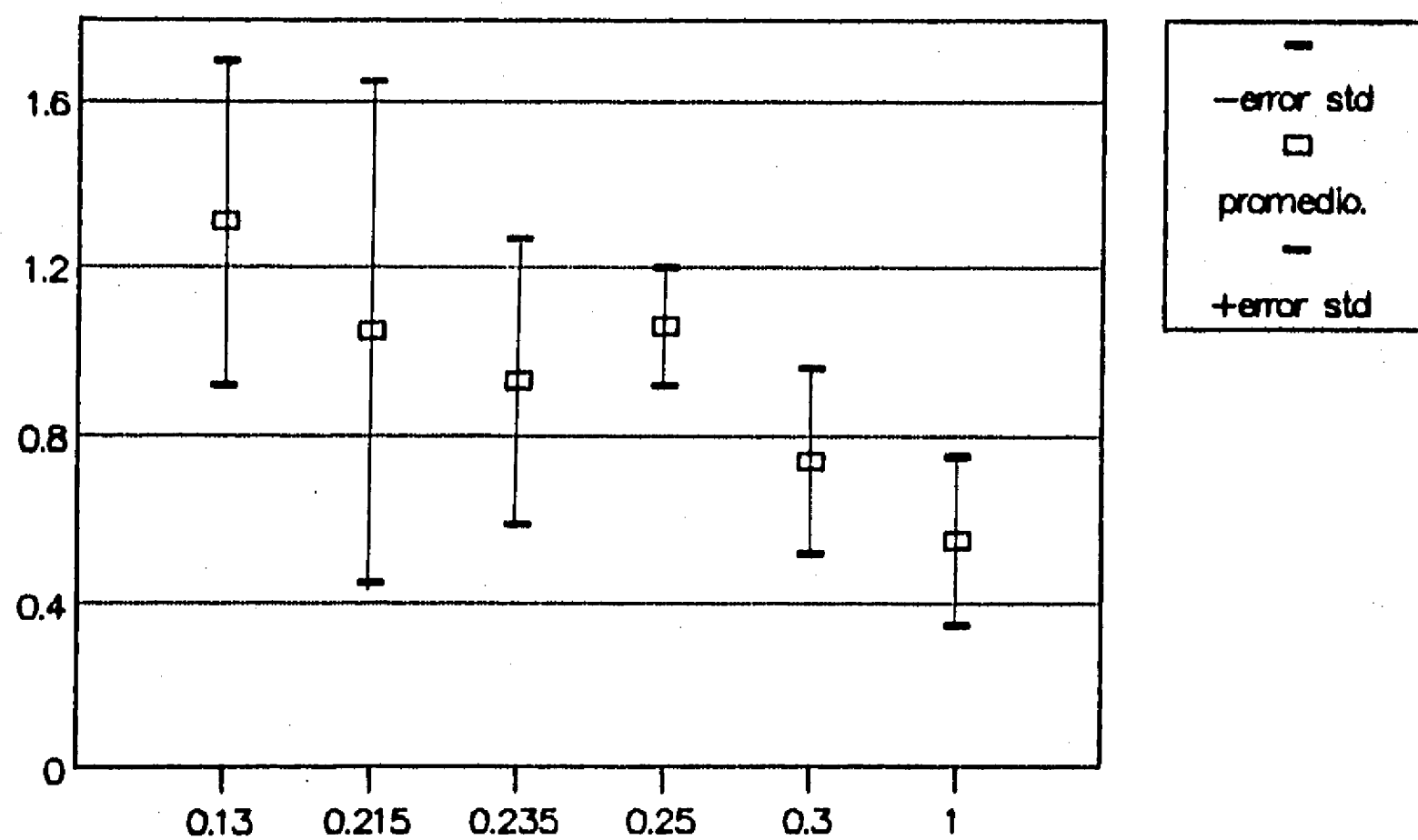


Figura 6.7.c. Actividad peroxidásica de extractos de mezquites. Diciembre 1989,  $r = -0.95$ . [x = Conductividad del agua freática (S/m); y = Actividad peroxidásica (abs/min)].

La Figura 6.8 muestra la respuesta peroxidásica de extractos de foliolos de mezquite cuando se ensayan a diferentes concentraciones de NaCl en la mezcla de reacción. Se observa que, independientemente al origen del extracto, la actividad PO es máxima a 0.5M de NaCl. La actividad disminuye drásticamente a concentraciones de cloruro de sodio mayores, aunque dentro del rango de concentración de la sal estudiado nunca llegó a abatirse completamente. La concentración media de NaCl en los foliolos fue de 0.007M.

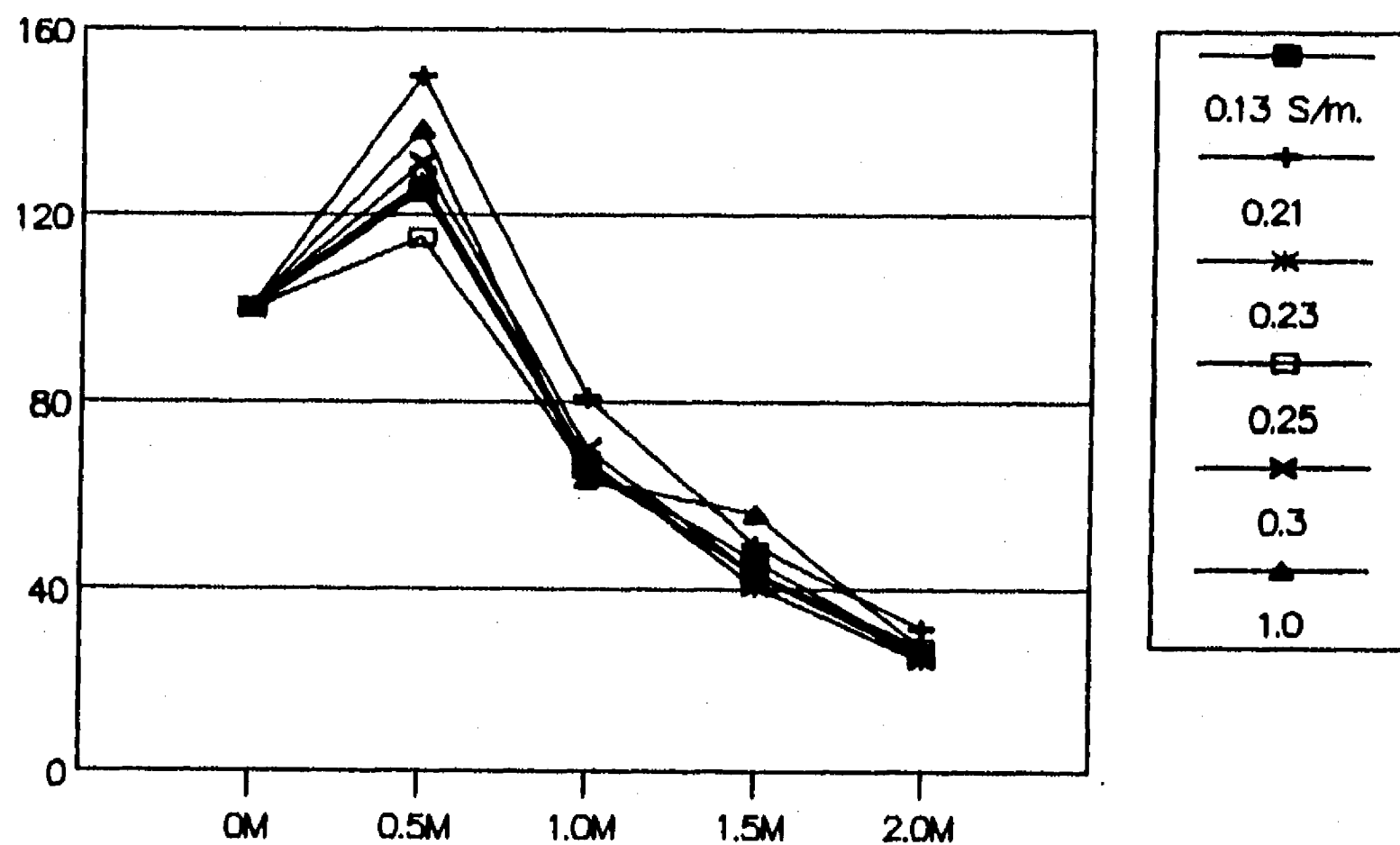


Figura 6.8. Actividad peroxidásica de extractos de mezquites en presencia de NaCl. [x = Concentración de sal (M); y = Porcentaje de actividad].

El isoelectroforegrama de los extractos de foliolos de mezquite (Figura 6.9.) muestra el patrón de isoPO de extractos de foliolos de mezquites. Se observa un patrón que no muestra ninguna relación con la calidad salina de los mantos freáticos y sólo manifiesta una composición poco usual presentando

principalmente isoPO aniónicas.

µmhos	Code plant	pH		
		10		3
900	LA-1		0 0 0 0	
900	LA-2	0	0 0 0 0	
1000	HG-1		0 0 0 0	0 0
1000	HG-2		0 0 0 0	0
1600	FK-1		0 0 0 0	
1600	FK-2		0 0 0 0	
2400	LG-1		0 0 0 0	0
2400	LG-2		0 0 0 0	
1800	K16-1		0 0 0	
1800	K16-2		0 0 0	
3900	C1011		0 0 0 0	
3900	C1012		0 0 0 0	
9000	JC-1		0 0 0 0	
9000	JC-2		0 0 0 0	
14000	C1021		0 0 0	
14000	C1022		0 0 0	

Figura 6.9. Isoelectroforegrama (pH 3-10) en gel de agarosa de extractos de foliolo de mezquites. Isoperoxidasas reveladas por actividad de guaiacol peroxidasa.

La Figura 6.10 (a-b) muestra la concentración (mg) de clorofila (Chl) total, clorofila a y clorofila b por g de MS de foliolos de mezquite, así como el promedio y desviación estándar del contenido de clorofila total en relación con la conductividad de los diferentes pozos. Se observa que no existe una dependencia de la concentración de clorofilas ni de su composición con la salinidad de las aguas subterráneas.

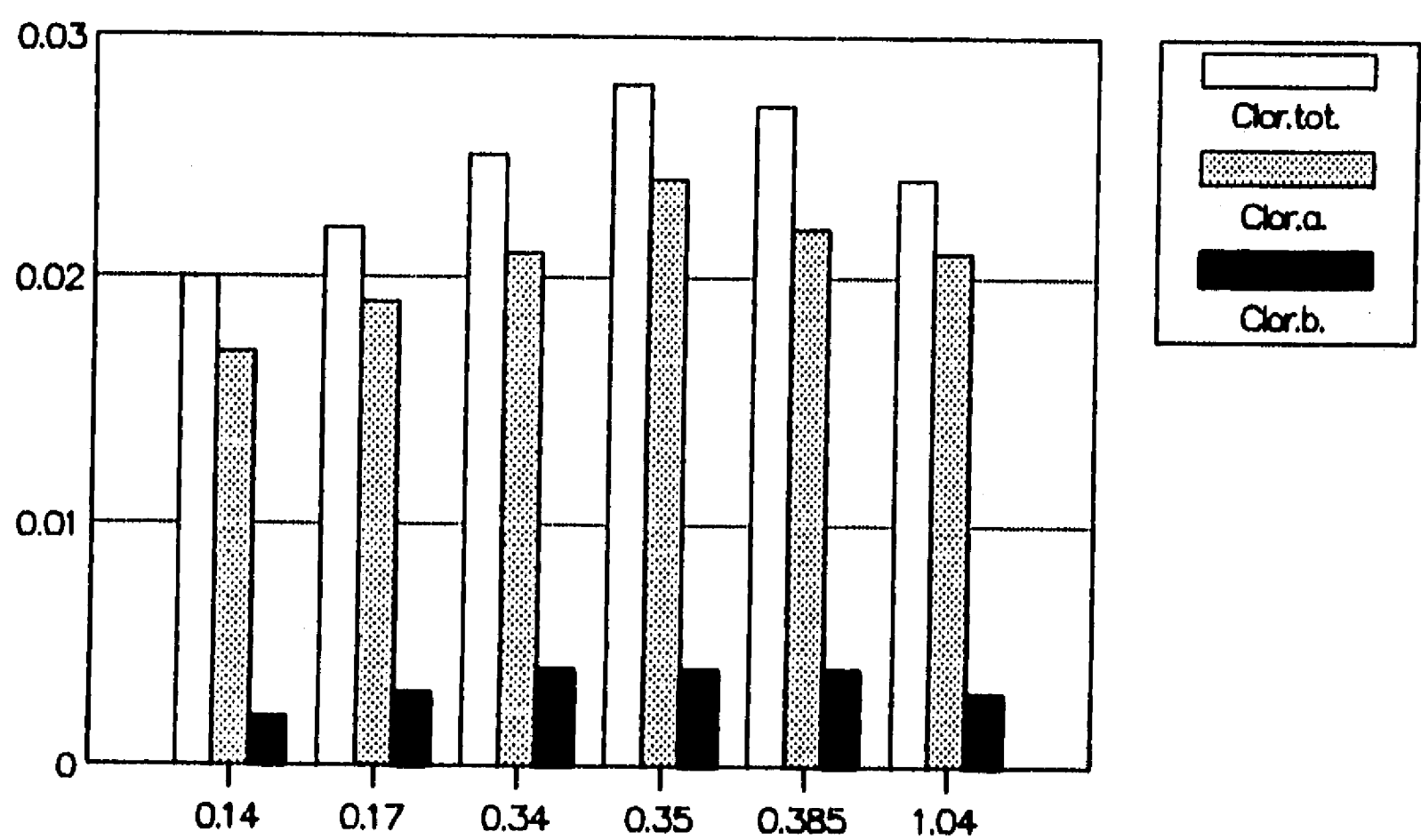


Figura 6.10.a. Composición de clorofilas de extractos de mezquites. [x = Conductividad (S/m); y = Concentración de clorofila (mg/ g de foliolo en masa seca)].

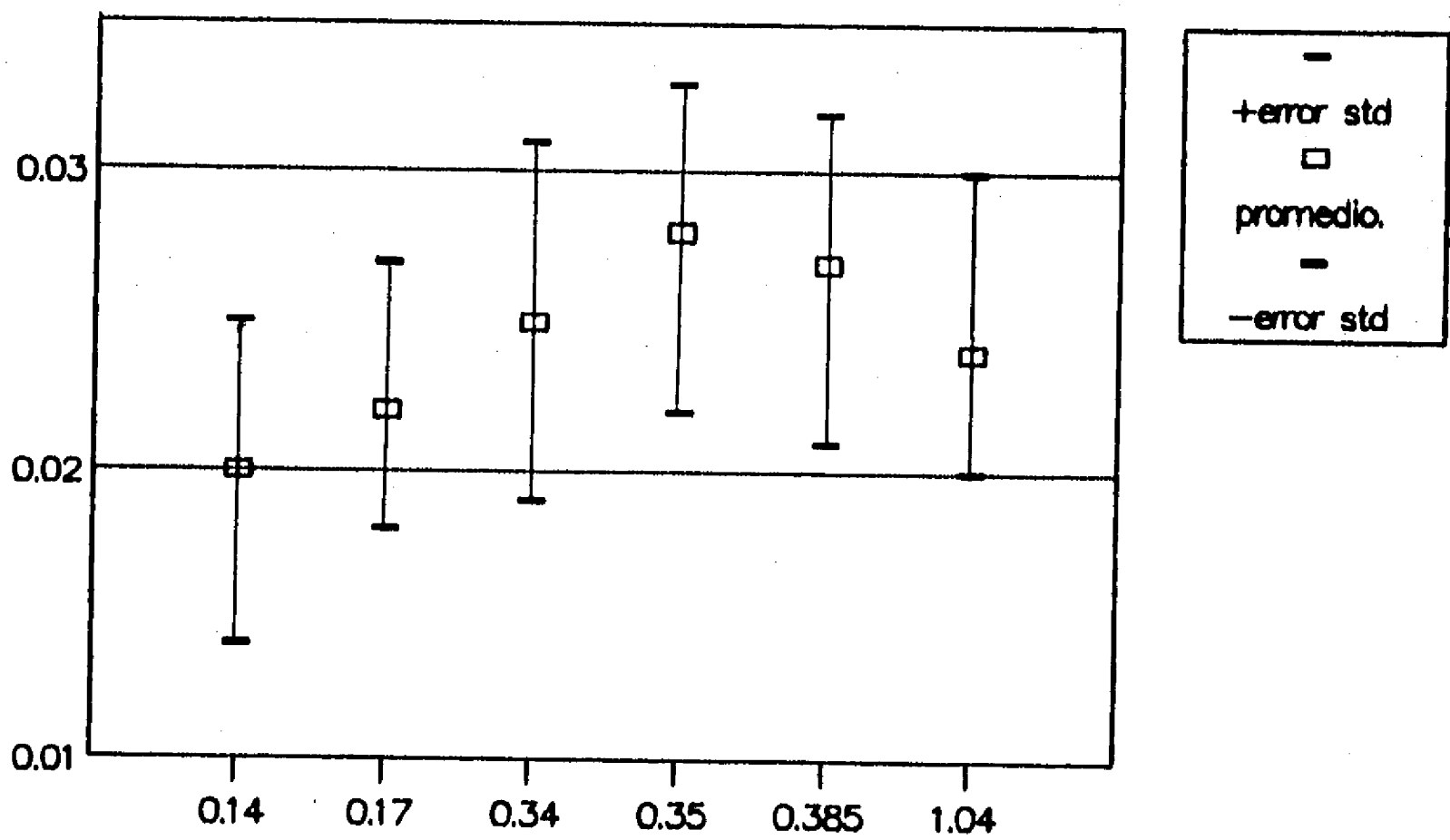


Figura 6.10.b. Clorofilas totales en extractos de mezquites. [x = Conductividad del agua freática (S/m); y = Concentración (mg clorofila/ g foliolo en masa seca)].

La Figura 6.11 muestra la composición bioquímica (metabolitos de bajo peso molecular) encontrados en extractos de folíolos de los mezquites estudiados.

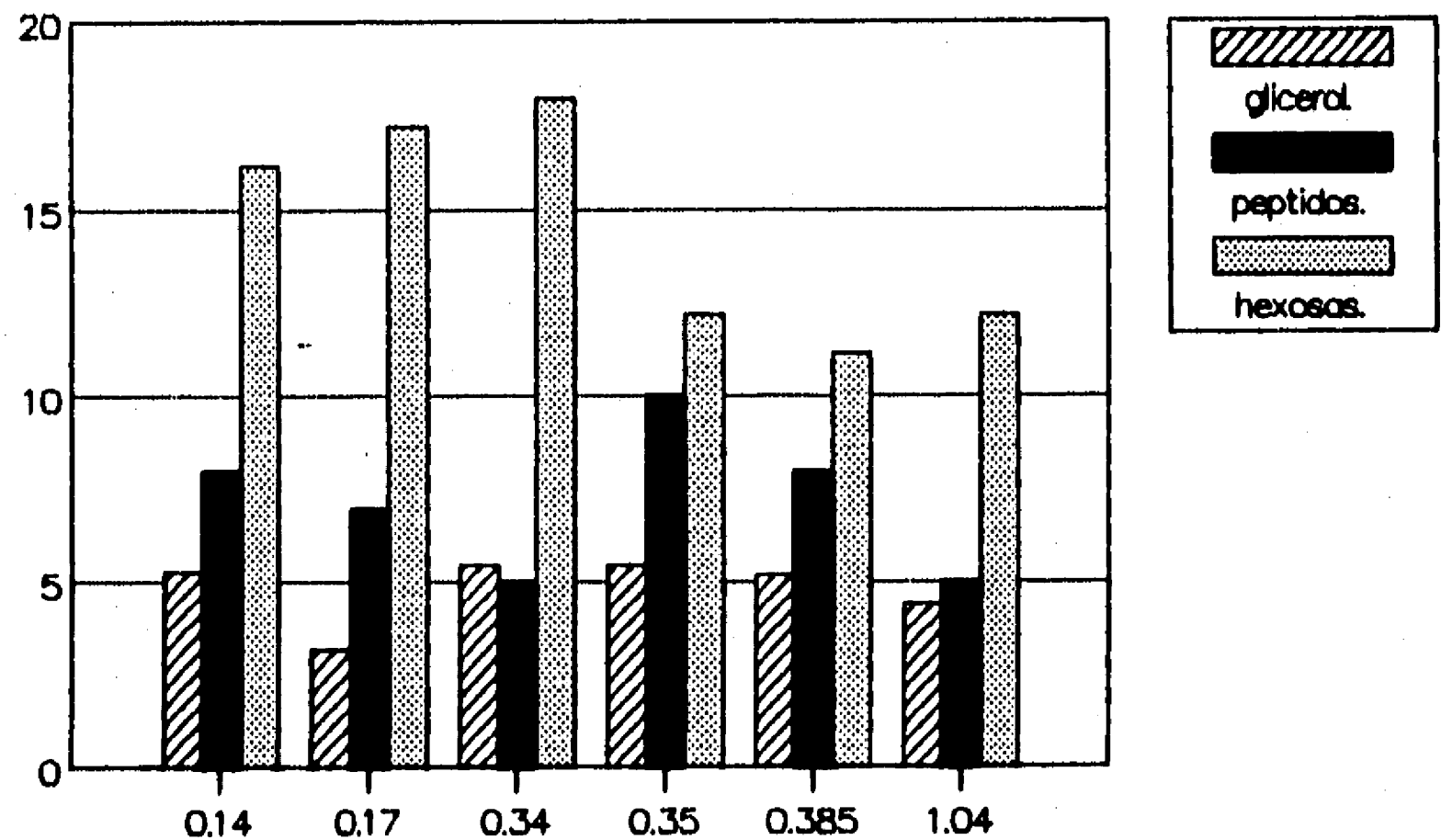


Figura 6.11. Composición de metabolitos de bajo peso molecular en extractos de mezquites. [x = conductividad del agua freática en S/m; y = mg/g foliolo en masa seca].

En la Figura 6.12 se observa que la mezcla de hormonas 2, 4-D  $10^{-6}$ M y BA  $10^{-7}$ M fue la que permitió mayor crecimiento y porcentaje de inducción de callos a partir de folíolos de mezquite, por lo que se seleccionó para continuar con el estudio in vitro. Siguiendo la técnica aquí descrita se pueden obtener callos de mezquite a partir de folíolos en un periodo de 2 a 3 meses.

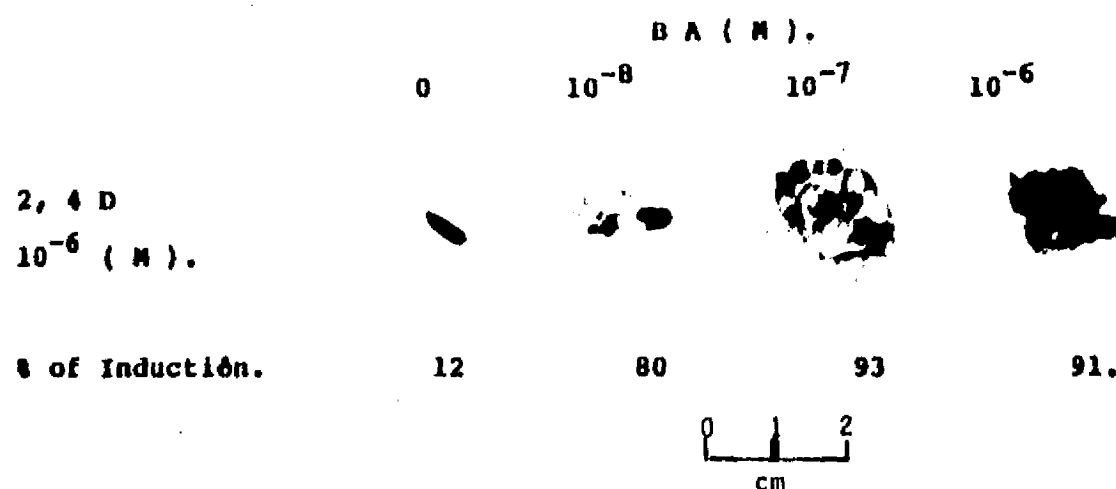


Figura 6.12. Influencia de la concentración de BA en la producción de callos a partir de folíolos de mezquite. Tamaño del callo y porcentaje de inducción.

La Figura 6.13 muestra células en suspensión obtenidas a partir de los callos de mezquite. Las células se sembraron en tres ocasiones en un periodo de nueve meses. Se conservó la viabilidad de las células durante el periodo descrito, aunque se observó un periodo de duplicación prolongado. No ha sido posible obtener biomasa suficiente para continuar con los ensayos *in vitro* con diferente concentración de NaCl para determinar la respuesta peroxidásica de las células en suspensión de folíolos de mezquite.

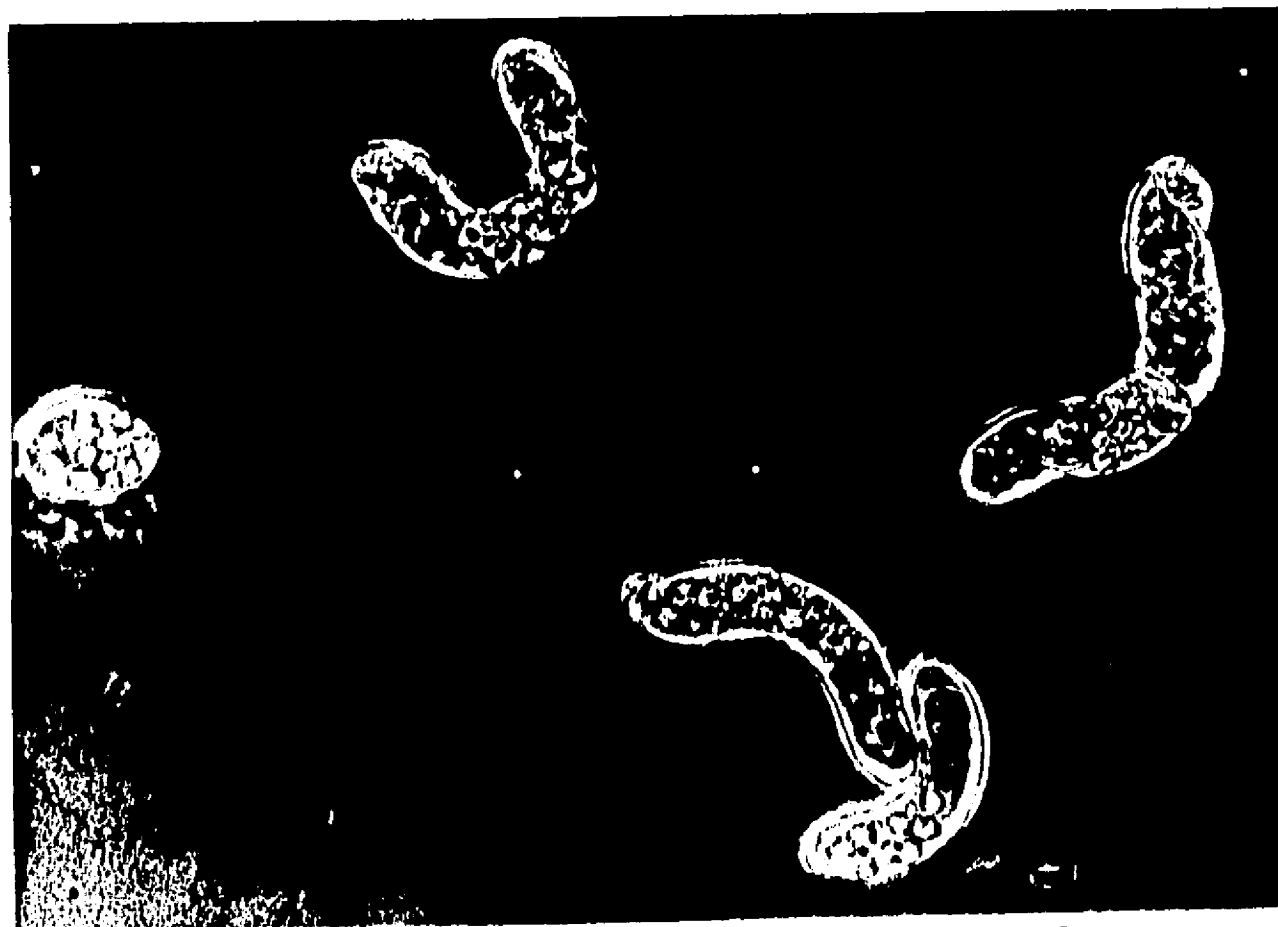


Figura 6.13. Células en suspensión obtenidas a partir de callos de mezquite. Condiciones de cultivo: 2, 4-D  $10^{-6}$ M y BA  $10^{-7}$ M.

## 7.0. DISCUSION.

El clima de la zona de estudio mostró ser muy variable, como se observa en las figuras 6.1.a-c. De hecho el estado de Baja California Sur, además de ser el de menor promedio de precipitación anual, también es el de mayor variación en el régimen pluvial (Reyes-Coca y Rojo, 1985). Existen marcadas diferencias entre los patrones de las estaciones climatológicas cercanas a nuestra zona de muestreo, tanto en temperatura como en precipitación, lo que indica una posible influencia diferencial del clima para cada área de estudio y su vegetación.

Las aguas subterráneas reportadas en este estudio son empleadas, principalmente, con fines agrícolas, por lo que son continuamente explotadas para riego. Los aumentos en la conductividad se pueden deber a la concentración de sales presentes en el subsuelo o a la sobreexplotación, lo que puede provocar la intrusión de aguas de mayor salinidad. Las disminuciones en la concentración salina a los casos de recarga del acuífero por lluvias ocasionales ocurridas en las zonas montañosas que limitan a la cuenca y no necesariamente a las locales.

El porcentaje de masa seca fue el parámetro que mostro mayor variabilidad entre los individuos de cada grupo. Sin embargo, el análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre los grupos.

La actividad peroxidásica de los mezquites varía en forma diferente a la de la masa seca de los foliolos (Figura 6.4.), por lo que la respuesta enzimática parece no estar influenciada del contenido de agua foliar.

La composición química de los foliolos aunque ligeramente variable en la concentración, no mostró diferencias



significativas entre los grupos, ni correspondencia con la composición o concentración de las aguas freáticas (zona de saturación) que llega a tener hasta 1.8 S/m, lo que es casi la mitad de la conductividad del agua de mar. Lo que puede deberse a que estas plantas tengan la capacidad de explorar zonas húmedas no saturadas más superficiales y con menor concentración salina.

Contrariamente a lo reportado por Kalir y col. (1984), quienes reportaron que las PO de *Halimione portulacoides* no presentan un máximo en el rango de concentración de NaCl 0-3M, las PO de los extractos de mezquite presentan una actividad máxima a 0.5M de NaCl, disminuyendo hasta casi 20% de la actividad a 2M, y estos autores también sugieren que la actividad medida en presencia de sal aumenta en forma directa con la del suelo en que fueron cultivadas esas plantas.

Tampoco el patrón electroforético de isoperoxidasas presentó bandas que puedan ser asociadas con la concentración de sales de los mantos freáticos estudiados. Es notoria la predominancia de isoPO aniónicas en los extractos de folíolos de mezquite, isoPO que en otros organismos son responsables de la degradación de auxinas (Gaspar y col., 1982).

La evaluación preliminar de la respuesta peroxidásica de los mezquites a la concentración de sales presentes en las aguas freáticas (García-Carreño y Ochoa, 1991) muestra que la actividad peroxidásica de los extractos de folíolos de mezquites es independiente de la concentración salina de las aguas ( $r < -0.3$ ); aunque en algunos muestreos se observa una mejor correlación, como la de diciembre de 1989 en la que el  $r$  fue igual a  $-0.95$ . Los resultados de este trabajo están de acuerdo con otros reportes realizados en plantas seleccionadas y cultivadas en condiciones controladas (Edreva, 1990) que señalan la participación de las PO en la respuesta de las plantas al estrés. Sin embargo, la variabilidad entre los individuos de cada grupo en los valores del parámetro analizado son muy amplias por lo que la

respuesta de los mezquites puede estar influenciada por factores desconocidos.

La variabilidad en la actividad PO y el porcentaje de masa seca de extractos de los folíolos de mezquite coincide con la alta variabilidad fenotípica y productividad de biomasa, de hasta un orden de magnitud, en la progenie de un individuo (Felker y col, 1981a). Este hallazgo es compatible con el conocimiento de hibridización interespecífica que se presenta en estas especies (Felker y col, 1981b) y la autoinfertilidad reportada por Felker y Clark (1981), lo que resulta en la producción de plantas alógamas.

En un intento por determinar si las variaciones en la actividad PO de plantas de un mismo pozo, y de los diferentes pozos, se debe a la influencia de otros estímulos ambientales, se realizó un análisis que incluyó a la temperatura ambiente. Como se observa en la Figura 7.1. el análisis de residuos de la temperatura vs actividad PO muestra la tendencia general de las plantas a disminuir la actividad cuando baja la temperatura (Figura 6.1.a.).

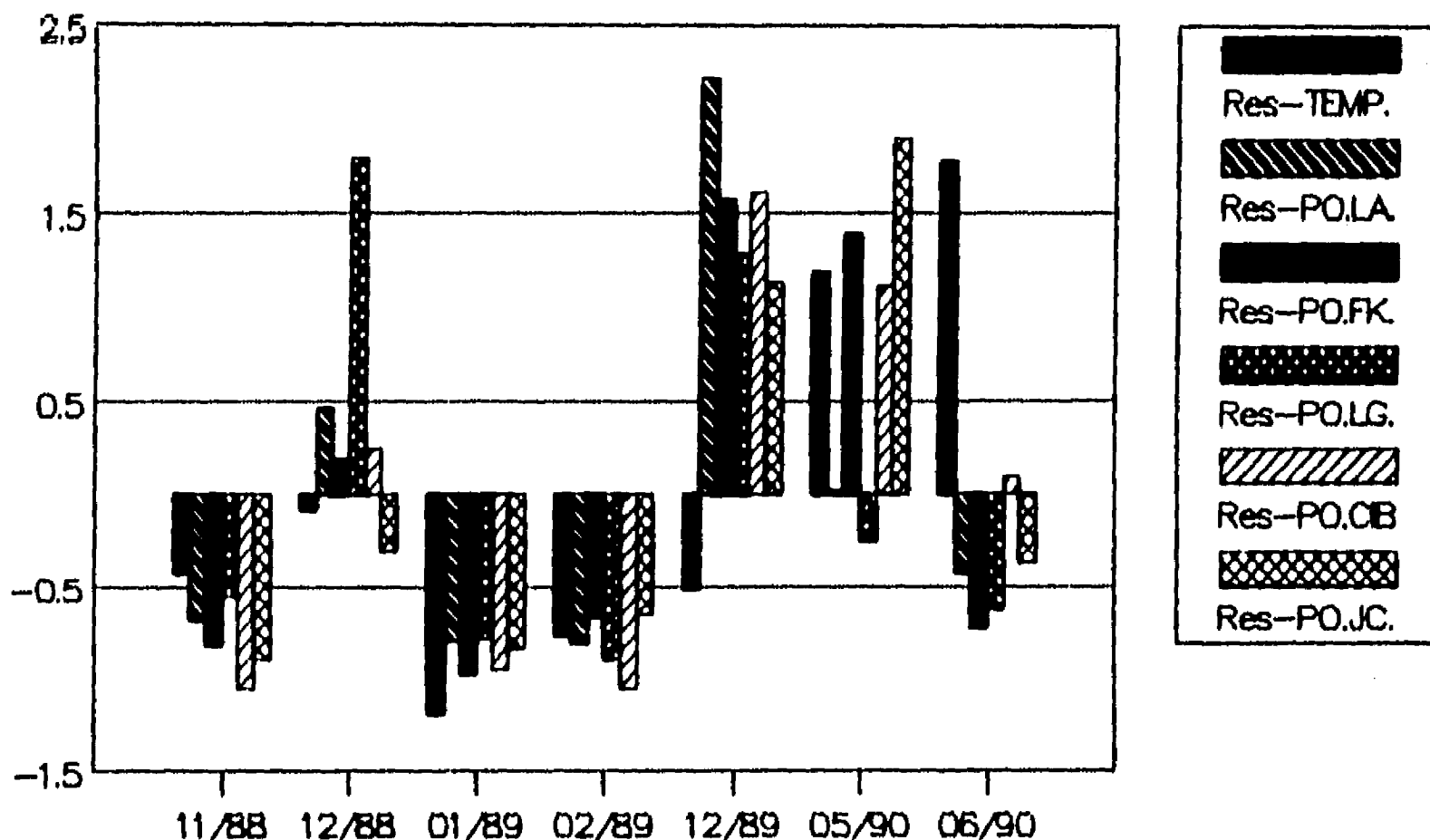


Figura 7.1. Análisis de residuos de la temperatura media en la fecha de muestreo y de la actividad peroxidásica de los extractos de mezquite [x = Fecha de muestreo; y = Residuos].

Se ha reportado que el aumento en la actividad PO de las plantas es una de las múltiples respuestas que las plantas pueden presentar al estrés (Castillo, 1985; Hagege y col., 1988; *inter alia*). Una actividad PO menor a la promedio, encontrada en forma generalizada en las plantas de todos los pozos estudiados cuando la temperatura se conservó por debajo del promedio, puede ser un indicio de que las plantas no se encontraban bajo tensión. Este hallazgo indica indirectamente que una temperatura adecuada para la especie estudiada es de 9 a 23°C. Lo que muestra que la especie probablemente sea termoresistente y no termófila, como se le tiene actualmente clasificada (Redowski, 1988).

Las PO aisladas de sus folíolos presentan una actividad máxima a 0.5M de NaCl, lo que corresponde a poco menos la molaridad del agua de mar (0.6M de NaCl), a pesar que el promedio de concentración de NaCl en los extractos de folíolos es de 0.007M con máximos de 0.016 y mínimos de 0.003M. En consecuencia, es notable la falta de correlación de la composición iónica de los

extractos de foliolos y la de los mantos subterráneos de los que toman el agua.

Se ha reportado también una disminución en la concentración de clorofila (clorosis) en plantas expuestas a ciertas condiciones de estrés (Endreva y col., 1989). Sin embargo, la concentración foliar de clorofila a, b y total (suma de a y b) de los mezquites estudiados tampoco presentó variación conforme a la calidad de los mantos freáticos.

La concentración de los metabolitos de bajo peso molecular (hexosas, glicerol y péptidos), reportados como posibles osmoreguladores, no correlaciona con la salinidad de los mantos, a diferencia de lo reportado por Vazquez-Duhalt y Arredondo (1991) para una microalga (*Botryococcus braunii*) donde se observó un aumento en la concentración intracelular de uno de estos compuestos. No descartándose la posibilidad de que otros sean los responsables de mantener el potencial osmótico de las hojas en caso de ser necesario.

En resumen, en el caso de los mezquites estudiados, la respuesta peroxidásica en hojas parece enmascarada por la gran variación individual. Esto dificulta la interpretación de los resultados del monitoreo de la actividad enzimática. Por otro lado, a pesar de haberse observado una ligera tendencia negativa entre la actividad enzimática y la conductancia de los mantos freáticos (Fig 6.7.b y c) para los muestreos de invierno, los demás datos sugieren que las plantas no necesariamente están en contacto con los mantos freáticos, sobre todo si las condiciones de precipitación son favorables..

Los mezquites influyen importantemente en la composición química de los suelos bajo su dosel (Virgina, 1986). La Figura 7.2 muestra el análisis de residuos de la concentración de carbón orgánico, nitrógeno total y nitrógeno en nitratos, en función de la conductividad de los mantos freáticos. Se observa que a 0.186

S/m (Pozo LG) los tres parámetros graficados aumentan, en comparación con los demás pozos. La cantidad de nitrógeno fijado por simbiosis y la productividad dependen de la vitalidad con que la planta se desarrolla, así que estos resultados muestran que la influencia sobre el suelo es mayor en los grupos desarrollados en el área con mantos de salinidad intermedia.

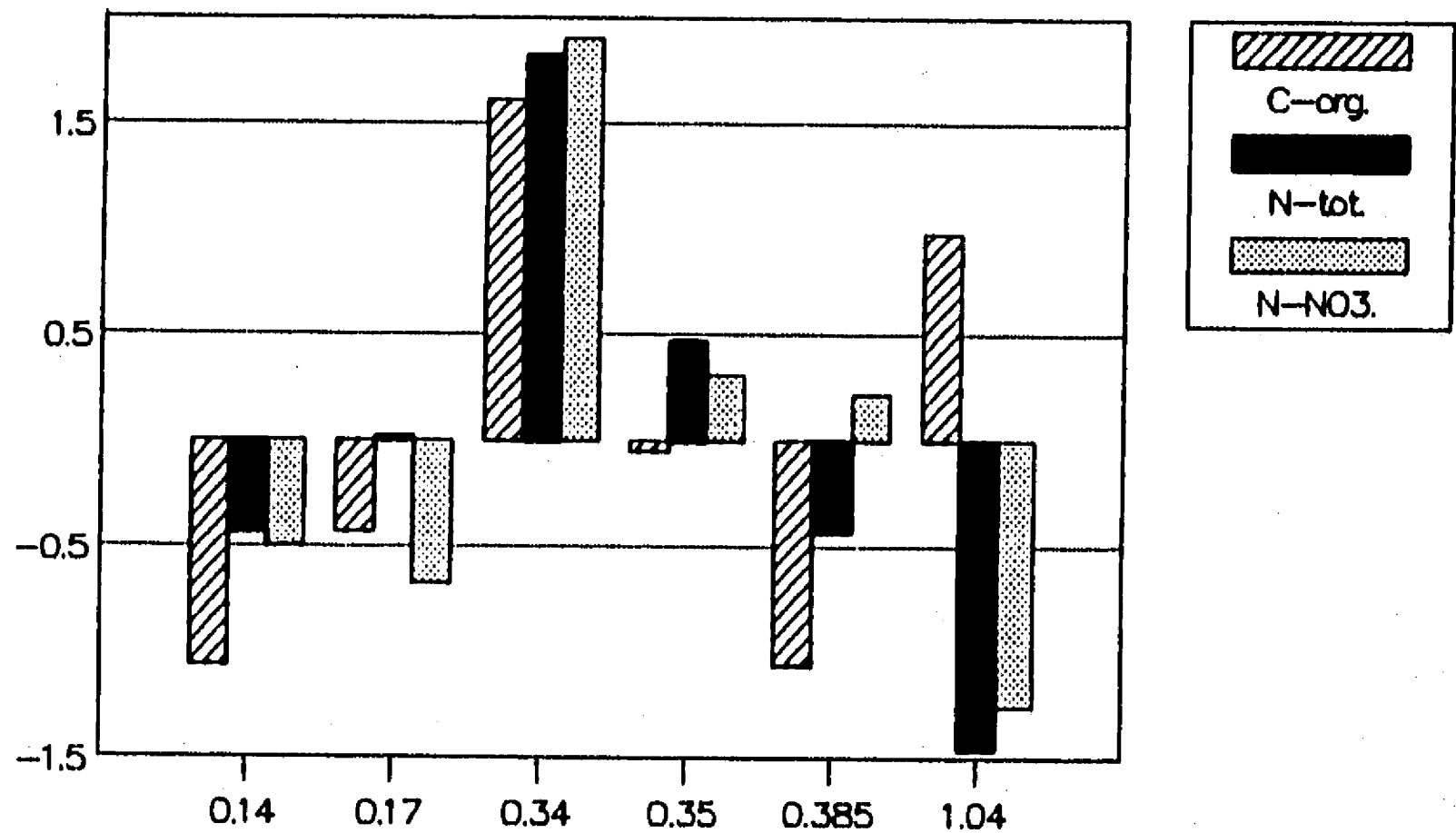


Figura 7.2. Análisis de residuos del contenido de carbón orgánico, nitrógeno en nitratos y nitrógeno total en suelos bajo el dosel de mezquites asociados a mantos freáticos con diferente salinidad. [x = Conductividad (S/m); y = Residuos (X-Xprom/ds)].

La generación de callos a partir de folíolos de mezquites (*Prosopis articulata*) es posible empleando BA y 2, 4-D como hormonas de inducción. A partir de los callos se ha logrado obtener células en suspensión viables. Estas células presentan, bajo las condiciones de este estudio, un tiempo prolongado de generación, lo que ha evitado la producción de biomasa suficiente para poder realizar estudios *in vitro* por ahora.

## 8.0. CONCLUSIONES.

Los mezquites estudiados presentan una composición química ( $H_2O$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{++}$ ,  $HCO_3^-$  y  $Cl^-$ ) y bioquímica (Clorofilas a, b y totales, proteína, PO, glucosa y glicerol) heterogénea, lo que coincide con una alta variación en tasas de crecimiento reportada para el género (Felker y col., 1981), y es compatible con la autoinfertilidad de la especie (Felker y col., 1981a). Nuestros análisis muestran una considerable variación entre individuos, aunque no se encontraron diferencias entre los grupos estudiados.

No ha sido posible correlacionar bandas de isoPO con la conductividad de los mantos freáticos, aunque si existe un patrón común de isoPO en que predominan las aniónicas.

Los resultados obtenidos en este estudio no permiten el empleo de la actividad peroxidásica como bioindicador de la calidad salina de las aguas subterráneas, ya que los resultados obtenidos permiten asumir que las plantas pueden estar tomando agua de otros horizontes no salinos.

La dispersión en varios parámetros evaluados es congruente con la variabilidad fenotípica reportada para estas plantas (Felker y col., 1981; 1981a; Rhodes y Felker, 1988). Esta característica les ha permitido su amplia distribución en el continente Americano, aún en diferentes condiciones climáticas, de calidad de suelo y aguas subterráneas.

Por otro lado, los mezquites al obtener un abasto constante de agua, no han generado respuestas adaptativas típicas de otras xerófilas, como sistemas de almacenamiento de agua, transpiración diurna disminuida durante la época de sequía, o metabolismo CAM (Schulte y Nobel, 1989). Los mezquites, gracias a sus cualidades freatófitas, mantienen su transpiración diurna prácticamente constantes, aún en la temporada de sequía (Nielsen y col., 1983;

Sharifi y col., 1983). Por otro lado, estas plantas no parecen almacenar osmoreguladores del tipo de los metabolitos de bajo peso molecular para evitar el estrés salino.

## 9.0. PERSPECTIVAS.

El estudio en cultivo de tejidos (células en suspensión) de mezquite podría ayudar a determinar si la variabilidad individual mostrada en este estudio es la causa de la respuesta encontrada.

El conocer las condiciones de cultivo para producir cantidades de biomasa celular suficiente para realizar ensayos de respuesta a la salinidad debe ser un objetivo a mediano plazo. Por otro lado, el contar con una clona de células permitiría reducir la variación genética para la realización de experimentos y propagación de plantas ornamentales y de cultivo. Además puede contribuir a la obtención de líneas con características particulares interesantes para producir plantas, por ejemplo: hiperproductoras de vainas, halotolerantes, con mayor contenido de proteína en las semillas, sabor agradable (producción de azúcares como sacarosa) etc.

Una cuestión que habrá que resolver en el futuro es la concerniente a la capacidad de los mezquites de depender en forma exclusiva o facultativa de los mantos freáticos. Definir con mayor claridad a que se refiere el término freatófita, que literalmente significa "planta de pozo"

Un estudio que se antoja necesario es en cultivo de plántulas expuestas a diferente salinidad. En él se podrá demostrar si los mezquites responden a la salinidad, tomando en cuenta la variabilidad individual.

No se puede descartar *a priori* a otras freatófitas como posibles indicadores de calidad salina. En este estudio se seleccionó a una de ellas por su distribución, y abundancia, pero existen otras aún no estudiadas para el mismo fin.

Finalmente, es importante mencionar que los mezquites debido a

---



su halotolerancia, temerresistencia, capacidad de tomar agua del subsuelo, fijar nitrógeno y tener productividades altas son plantas ideales para estudios de prospección agronómica de zonas áridas. Es posible que de haberse seleccionado, hace siglos, como se hizo con otras plantas como maíz, trigo y leguminosas, ahora los mezquites serían una de las plantas más importantes para la alimentación, construcción, y ornato, en la tercera parte del mundo continental: las zonas áridas.

## 10.0. REFERENCIAS.

- Arnon, D. 1945. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*. 24, 1-15.
- Barman, T. 1985. *Enzyme Handbook*. vol I, II y suplemento. Springer-Verlag.
- Bradford, M. 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms sensitivities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-54.
- Castillo, F., Penel, C. y Greppin, H. 1984. Peroxidases released induced by ozone in *Sedum album* leaves. *Plant Physiology*. 74, 848-51.
- Castillo, F. 1985. *Activite peroxydasique et pollution atmospherique*. Thesis (2115) de Doctorado. Universidad de Ginebra, Suiza.
- , F., Miller, P. y Greppin, H. 1987. Extracellular biochemical markers of photochemical oxidant air pollution damage to Norway spruce. *Experientia* 43, 111-5.
- Cowen, R. 1990. Seeds of protection. *Sciences News*. 137, 350-1.
- Dahl, B. 1982. Mesquite as a reangland plant. *Proceedings of the symposium, Mezquite Utilization*, Texas Tech University. a1-a12.
- Davis, S. y Wiest, R. 1971. *Hidrogeología*. Ariel Ediciones. Barcelona. 322-84.
- De Felipe, M., Golvano, M., Lang, P., y Pozuelos, J. 1988. Differential effects of isoproturon on the photosynthetic apparatus and yield of two varieties of wheat and *L rigidum*. *Weed Research*. 28, 85-92.
- Endreva, A., Georgieva, I. y Cholacova, N. 1989. Pathogenic and non-pathogenic stress effects on peroxidases in leaves of tobacco. *Environmental and Experimental Botany*. 29, 365-77.
- Felger, R. 1985. New arid land crops from México. en: *Uso y preservación de los recursos biológicos marinos y de zonas áridas*. Eds: J.L. Ochoa y J. Moreno-López. pp 13-24.
- Felker, P., Clark, P., Laag, A., y Pratt, P. 1981a. Salinity tolerance of the tree legumes: Mesquite (*Prosopis glandulosa*, P

*velutina* and *P articulata*) Kiawe (*P pallida*) and Tamarugo (*P tamarugo*) grown in sand culture on nitrogen-free media. *Plant and Soil*. 61, 311-7.

-----, Cannell, G., y Clark, P. 1981b. Variations in growth among 13 *Prosopis* (Mesquite) species. *Experimental Agriculture*. 17, 209-18.

-----, y Clark, P. 1981. Rooting of mesquite (*Prosopis*) cuttings. *Journal of Range Management*. 34, 466-8.

Figueiredo, A. 1990. Mezquite: History, composition and food uses. *Food Technology*. noviembre, 118-28.

FitzPatrick, E. 1980. *Soils, their formation, classification and distribution*. Capítulo 2. Longman Ed. 9-50.

García-Carreño, F.L. y Ochoa, J.L. 1991 The effect of saline stress on peroxidase activity in the mezquite (*Prosopis articulata*) leaf. *Journal of Arid Environments*. 20, en prensa. Anexo, Manuscrito II.

García-Monarez, H., Pimentel, R., Perez, J. y Flores, E. 1986. *Estudio geohidrológico de la cuenca La Paz-El Carrizal*. Reporte Técnico. UABCS. México.

Gaspar, T., Penel, C., Thorpe, T., y Greppin, H. 1982. *Peroxidasas 1970-1980*. Université de Geneve, Geneve.

-----, Castillo, F., y Greppin, H. 1985. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiologia Plantarum*. 64, 418-23.

----- y Greppin, H. 1986. Peroxidases: structures and catalytic reactions, biosynthesis, transport and location, physiological roles. *Bulletin Groupe Poluphenols* (C.R. Journées intern d'Etude, Montpellier) 13, 159-76.

Greenway, A. y Munns, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology*. 31, 149-90.

Guderian, R., Klumpp, G. y Klumpp, A. 1989. Effects of SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> and NO<sub>x</sub>, singly and combination, on forest species. en: *Plants and pollutants in developed and developing countries*. Ed: Ozturk, M. pp 231-268.

Hagege, D., Kevers, C., Boucaud, J. y Gaspar, T. 1988. Activités peroxydasiques, production d'éthylène, lignification et limitation de croissance chez *Suaeda maritima* cultivé en l'absence de NaCl. *Plant Physiology and Biochemistry*. 26, 609-14.

- Hammond, E. 1954. *A geomorphic study of the Cape Region of Baja California*. University of California Publications in Geology California.
- Hendriks, T., Jong, A., Wijman, H. y van Loon, L. 1990. Antigenic relationships between petunia peroxidase a and peroxidase isoenzymes in other *Solanaceae*. *Theoretical and Applied Genetics*. 80, 113-20.
- Hirayama, O. y Mihara, M. 1987. Characterization of membrane lipids of higher plants different in salt-tolerance. *Agriculture and Biology and Chemistry*. 51, 3215-221.
- Jarrell, W., y Virginia, R. 1990. Soil cation accumulation in a mesquite woodland: sustained production and long-term estimates of water use and nitrogen fixation. *Journal of Arid Environments*. 18, 51-8.
- Kalir, A., y Poljakoff, A. 1981. Changes in activity of malate dehydrogenase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase in leaves of *Halimione portulacoides* (L.) Aellen exposed to high sodium chloride concentrations. *Annals of Botany*. 47, 75-85.
- Kalir, A; Omri, G; Poljakoff, A. 1984. Peroxidase and catalase activity in leaves of *Halimione portulacoides* exposed to salinity. *Physiologia Plantarum*. 62, 238-44.
- Kates, M. 1982. *Techniques of lipidology*. Eds: Work, T y Work, E. North-holand/ american elsevier.
- Kay, L. y Basile, D. 1987. Specific peroxidases isoenzymes are correlated with organogenesis. *Plant Physiology*. 84, 99-105.
- Kuppers, K. y Klumpp, G. 1988. Effects of ozone, sulfur dioxide, and nitrogen dioxide on gas exchange and starch economy in Norway spruce (*Picea abies*). *GeoJournal*. 17, 271-5.
- Lehninger, A. 1981. *Biochemistry*. Worth Publishers, Inc. NY. 251-2.
- León de la Luz J.L. 1981. *Informe de Actividades*, CIB. México.
- Li, Z., Attias, J. y Theller, M. 1990. Filtration stresses-induced variations of peroxidase activity in cell suspension cultures of sycamore (*Acer pseudoplatanus*) cells. *Physiologia Plantarum*. 78, 22-8.
- Lickl, E. Beck, R. y Ebermann, R. 1987. Response of peroxidase and amylase isoenzyme activities of *Aesculus hippocastanum* and *Picea abies* to gamma and beta irradiation. *Phyton*. 27, 177-80.

- Mato, M., Rúa, M. y Ferro, E. 1988. Changes in levels of peroxidases and phenolics during root formation in *Vitis* cultured in vitro. *Physiologia Plantarum*. 72, 84-8.
- Miller, R. y Kelley, T. 1989. Mechanical stress stimulates peroxidase activity in cucumber fruit. *Hortscience*. 24, 650-2.
- Morikawa, T. 1988. Monosomic analysis of leaf peroxidase Px0 and Px9 loci in hexaploid oats. *Genome*. 30, 99-102.
- Nieman, R., Clarck, R., Ogata, G. y Mass, E. 1988. Effects of salt stress on adenine and uridine nucleotide pools, sugar and acid-soluble phosphate in shoots of pepper and safflower. *Journal of Experimental Botany*. 39, 301-9.
- Nilsen, E., Sharifi, M., Rundel, P., Jarrell, W. y Virginia, R. 1983. Diurnal and seasonal water relations of the desert phreatophyte *Prosopis glandulosa* (honey mesquite) in the Sonoran Desert of California. *Ecology*. 64, 1381-93.
- , Virginia, R., y Rundel, P. 1987. Phenology of warm phreatophytes: seasonal growth and herbivory in *Prosopis glandulosa* (honey mesquite). *Journal of Arid Environments*. 13, 217-29.
- Palmer, T. 1981. *Understanding enzymes*. Ellis Horwood Limited. England. p 91.
- Rawson, D., Willmer, A. y Turner, A. 1989. Whole-cell biosensors for environmental monitoring. *Biosensors*. 4, 299-311.
- Reish, D. 1988. The use of toxicity testing in marine environmental reserch. en: *Marine organisms as indicators*. Soule, D y Kleppel, G. (Eds). Springer-Verlag. NY. 231-45.
- Reyes-Coca, S. y Rojo, P. 1985. Variabilidad de la precipitación en la península de Baja California. *Revista de Geofísica*, No 22/23.
- Rhodes, D. y Felker, P. 1988. Mass screening of *Prosopis* (Mesquite) seedlings for growth at seawater salinity concentrations. *Forest Ecology and Management*. 24, 169-76.
- Richards, L. (Editor) 1973. *Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos*. Ed. Limusa, SA. México. 172 p.
- Robinson, T. 1979. The determination of proteins in plant extracts than contain polyphenols. *Plant Sciences Letters*. 15, 211-6.

- Rzedowski, J. 1988. Análisis de la distribución geográfica del Complejo *Prosopis* en Norteamérica. *Acta Botánica Mexicana*. 3, 7-19.
- Salinas-Zavala, C. 1986. Memorias del curso especial de titulación. *Análisis de sistemas marinos*. UABCS. México.
- Schulte, P. y Nobel, P. 1989. Responses of a CAM plant to drought and rainfall: Capacitance and osmotic pressure influences on water movement. *Journal of Experimental Botany*. 40, 61-70.
- Sharifi, M., Nilsen, E., y Rundel, P. 1982. Biomass and net primary production of *Prosopis glandulosa* (Fabaceae) in the Sonoran Desert of California. *American Journal of Botany*. 69, 760-7.
- , M., Nilsen, E., Virginia, R., Rundel, P. y Jarrel, W. 1983. Phenological patterns of current seasons shoots of *Prosopis glandulosa* in the Sonoran Desert of Southern California. *Flora*. 173, 265-77.
- Shreve, F. y Wiggins, I. 1937. *Vegetation and flora of the Sonoran Desert*. Stanford Ca. Stanford University Press.
- Siegel, S., and Siegel, B., 1986. Peroxidase activity and stress. en: *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. Ed. Greppin, H., Penel, C., and Gaspar, Th. Université de Genève, Genève, pp. 427-432.
- Schmidt, R. 1988. The arid zones of México: climatic extremes and conceptualization of the Sonoran Desert. *Journal of Arid Environments*. 16, 241-56.
- Stanley, S. 1989. *Earth and life through time*. Capítulo 3. Freeman and Co. 59-77.
- Stevens, H., Calvin, M., Lee, K., y Siegel, Z. 1978. Peroxidase activity as screening parameter for salt stress in *Brassica* species. *Phytochemistry*. 17, 1521-2.
- Todd, D. 1980. *Groundwater hydrology*. Segunda Edición. John Wiley & Son. N.Y. 414-20.
- Vazquez-Duhalt, R. y Arredondo-Vega, B. 1991. Haloadaptation of the green alga *Botryococcus braunii* (race A). *Phytochemistry*. en prensa.
- Virginia, R., y Jarrel, W. 1983. Soil properties in a mesquite-dominated Sonoran Desert ecosystems. *Soil Science Society of America Journal*. 47, 138-44.

Virginia, R. 1986. Soil development under legume tree canopies. *Forest Ecology and Management*. 16, 69-79.

Virginia, R., Jenkins, M., y Jarrell, W. 1986. Depth of root symbiont occurrence in soil. *Biology of Fertile Soils*. 2, 127-30.

11.0. ANEXOS.



1 PEROXIDASES AS BIOCHEMICAL MARKERS OF ENVIRONMENTAL STRESS AND  
2 PHYSIOLOGICAL STATUS OF PLANTS.

3 FERNANDO LUIS GARCIA-CARREÑO.

4 Biología Experimental, Centro de Investigaciones Biológicas,  
5 PO Box 128, La Paz, 23000 BCS, México. Fax (682) 53625.

6 ABSTRACT.

7 This paper reviews the monitoring of changes in plant  
8 peroxidase as a form of biochemical marker and indicator of  
9 environmental stress due to pollution, hypoxia, cold,  
10 mechanical injury, water deficit, salinity, infections, or  
11 physiological status such as organogenesis, ripening or  
12 senescence. Peroxidase can also be used in taxonomic studies,  
13 grafting, and hybridization since activity and molecular  
14 composition of the enzyme correlate with the plant condition.

15 Plant peroxidases are versatile indicators because they  
16 are ubiquitous and correlate with a wide range of events.  
17 Unfortunately, it appears that the different methodology so  
18 far reported for the recuperation of the enzyme from the plant  
19 tissues and the subsequent quantification of the enzyme  
20 activity can be misleading and even inhibit standardization  
21 of a technique for the detection of the peroxidases response  
22 of plants. The successful application of plant peroxidases as  
23 biochemical marker depends largely on the plant selected for  
24 the study and the technique used to evaluate the kinetic and  
25 molecular parameters of peroxidases. The purpose of this work  
26 is to 1) illustrate potential use of peroxidase as biomarker,  
27 2) offer suggestions for the plant selection, and 3) give a

standard procedure for the enzymes extraction. Some  
2 suggestions for avoiding methodological drawbacks are  
3 included.

4 Running title: Plant peroxidases as biomarkers.

5 Key words: Biochemical marker, environmental stress,  
6 physiological process, plant peroxidase activity.

7 Abbreviations: BM-biochemical markers; isoPO-isoperoxidases;  
8 PO-peroxidases.

9 BIOCHEMICAL MARKERS.

10 Biochemical markers can be useful indicators of the  
11 clinical status of an animal. For example, an abnormal glucose  
12 level correlates with diabetes, the presence of protein in  
13 urine with renal disorders, and an increase of chorionic  
14 gonadotropin is a signal in the early detection of pregnancy.  
15 Specific biochemical markers can be applied in different  
16 sciences, such as medicine, food technology, environmental  
17 sciences, and agronomy. They can indicate the physiological  
18 status of an individual and the influence of environmental  
19 conditions on a population. Plant metabolite pools, enzyme  
20 activities related to plant developmental processes (e.g.  
21 organogenesis, senescence etc), or environmental stresses  
22 (e.g. infection, water or salt levels) are now under study,  
23 because they can be particularly useful in the early  
24 detection of alterations in plants before obvious physical  
25 damage or change becomes apparent (Castillo, 1986).

26 Plant peroxidases are involved in key biochemical  
27 processes such as auxin catabolism, lignification, or healing.

1 This review focuses on the kinetic and molecular properties  
2 of peroxidases as biochemical markers of environmental stress,  
3 physiological status, and developmental changes in plants.

#### 4 GENERAL PROPERTIES OF PEROXIDASES.

5 The foremost function of peroxidases (Donor:  
6 hydrogen-peroxide oxidoreductase. EC 1.11.1.7) is the  
7 reduction of hydrogen peroxide at the expense of a vast number  
8 of electron donors available to the cells (Paul, 1963;  
9 Saunders, Holmes-Siedle and Stark, 1964; Gaspar, Penel, Thorpe  
10 and Greppin, 1982). Peroxidases, together with catalase (EC  
11 1.11.1.6) and superoxide dismutase (EC 1.15.1.1.), are an  
12 enzymatic system that eliminates the toxic products of the  
13 biological reduction of molecular oxygen in aerobic organisms.  
14 Peroxidases reduce hydrogen peroxide using a wide range of  
15 substances as hydrogen donors: phenols, aromatic di- and  
16 triols, and aromatic diamines, which are all present in plant  
17 tissues. Peroxidases are partially or completely inhibited by  
18 polyphenols, CN', and by high concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. PO are  
19 present in almost all plants studied, and with a widely  
20 different number of isoenzymes. Kay and Basile (1987) have  
21 reported as many as 47 isoforms in *Nicotiana tabacum* tissues.

#### 22 CORRELATIONS BETWEEN PEROXIDASES AND STIMULI.

23 Because higher plants are "motionless" organisms, their  
24 autotrophic metabolism is strongly dependent on environmental  
25 conditions. Therefore, they possess mechanisms for rapid  
26 adaptation to environmental changes. Modification in  
27 peroxidases activity level, isoPO composition, or peroxidases

1 compartmentalization is one of the fastest mechanisms for  
2 metabolic regulation in plants (Gaspar et al., 1982).

3 Changes in peroxidases activity in several Genera have  
4 been reported in association with physiological or  
5 developmental status. Studies include: fruit ripening in  
6 *Lycopersicon esculentum* (Rotham and Nicolas, 1989), barrier  
7 zone formation in red maple (Smith and Shortle, 1990), aging  
8 in *Cucumis sativus* (Miller and Kelley, 1989), auxin  
9 resistance in *Nicotiana tabacum* (Hakamura, Van Telgen, Mennes,  
10 Ono and Libbenga, 1988), grafting in *Pronus avium* (Schmid,  
11 Feucht and Treutter, 1988), sexual differentiation in  
12 *Asparagus officinalis* (Longo, Rossi, Longo and Soave, 1990),  
13 hybridization in *Camellia* sp (Hakoda, 1987), taxonomy in  
14 *Quercus* sp (Lickl and Eberman, 1987) and *Calypogela* sp  
15 (Szweykowski and Krzakowa, 1990) and organogenesis;  
16 histological changes in *Nicotiana tabacum* (Kay and Basile,  
17 1987), root formation in *Vitis vinifera* (Mato, Rúa and Ferro,  
18 1988), poorly rootable stocks in *Malus domestica* (Gus'kov,  
19 Takhomirov and Polikarpova, 1988), and anther development in  
20 *Zea mays* (Delvalleé and Dumas, 1988).

21 Early detection of enzymes in plant extracts has  
22 demonstrated a good correlation between environmental stresses  
23 and peroxidases activity in plants that have been cultivated  
24 under controlled conditions, and a general correlation between  
25 stimuli and changes in plant peroxidases has been proposed  
26 (Siegel and Siegel, 1986). Reports on alterations in  
27 peroxidases activity in response to environmental stimuli

1 include: infection in *Citrus aurantifolia* (van lelyveld and  
 2 van Vuuren, 1988), in *Triticum aestivum* (Flott, Moerschbacher,  
 3 and Reisener, 1989), and in *Hevea brasiliensis* (Geiger, Rio,  
 4 Mandris and Nicole, 1989), Bayoud disease in *Phoenix*  
 5 *dactylifera* (Baaziz, 1989), symbiosis in *Allium porrum* (Spanu  
 6 and Bonfante-Fasolo, 1988), mechanic damage in *Cucumber*  
 7 *sativus* (Miller and Kelley, 1989), pollution in *Raphanus*  
 8 *sativus* (Petit, 1984), *Sedum album* (Castillo, Penel and  
 9 Greppin, 1984), *Picea abies* (Castillo, Miller and Greppin,  
 10 1987), *Picea abies* and *Fagus sylvatica* (Guderian, Klumpp and  
 11 Klumpp, 1989), herbicides in *Lolium rigidum* (deFelipe, Lucas  
 12 and Pozuelo, 1988), hormones treatment in *Pisum sativus*  
 13 (Cassab, Lin, Lin and Varner, 1988), and salt stress in  
 14 *Brassica sp* (Stevens, Calvin, Lee and Siegel, 1978), *Halimione*  
 15 *portulacoides* (Kalir, Omri and Poljakoff-Mayber, 1984), *Suaeda*  
 16 *maritima* and *Beta vulgaris* (Hagege, Kevers, Grandin, Boucaud  
 17 and Gaspar, 1988b).

#### 18 TYPE OF PLANT PEROXIDASES RESPONSE.

19 Specific stimuli induce changes in kinetic and molecular  
 20 properties of plant peroxidases. For example, increase or  
 21 reduction of enzyme activity, changes in the isoperoxidase  
 22 pattern, distribution along tissues (epidermis, cortex, xylem,  
 23 internode, hypocotyl or fruit), and cell localization  
 24 (intracellular, extracellular, ionic or covalent bound to  
 25 membranes).

26 Some authors have demonstrated an increase in peroxidase  
 27 activity as response to ozone (Castillo, 1985; Castillo et

1 al., 1987), pollutant gases on forest species (Guderian et  
 2 al., 1989, and Klumpp, Guderian and Koppers, 1989), root  
 3 infection (Geiger et al., 1989; ethylen effect (Cassab et al.,  
 4 1988), and mechanical stress (Miller and Kelley, 1989).  
 5 However, a reduction in peroxidases activity level has been  
 6 also reported. These studies involve herbicide treatment  
 7 (Iadonin and Spesivtsen, 1976), and salt stress (Stevens et  
 8 al., 1976).

9 Plants can undergo changes in isoPO composition in  
 10 response to stress or developmental conditions. These changes  
 11 result in an increase or decrease in the number of bands in  
 12 electrophoretic pattern. Particular isoperoxidase patterns  
 13 have been associated with changes in physiology or  
 14 environmental conditions of plants (Ray and Basile, 1987;  
 15 Lickl and Eberman, 1987; Delvalleé and Dumas, 1988; Mato et  
 16 al., 1988; Rotham and Nicolas, 1989; Hagege et al., 1988b;  
 17 Schmid et al., 1988; Miller and Kelley, 1989).

18 Plants can also respond to different stimuli by changing  
 19 their peroxidase tissue distribution (Cassab et al., 1988;  
 20 Goldberg, Kevers and Gaspar, et al., 1989). Plants contain  
 21 several isoPO whose pattern of expression is tissue specific,  
 22 developmentally regulated, and controlled by environmental  
 23 stimuli. Peroxidases levels in the cell wall of immature  
 24 regions of the plant (including the apical hook) are involved  
 25 in the ethylene regulation of cell growth (Cassab et al.,  
 26 1988). Castillo et al. (1984), Castillo et al. (1987), and  
 27 Goldberg et al. (1989), have isolated several types of

peroxidases from leaves and hypocotyls. The results of these studies showed a different peroxidases activation as a response to the experimental treatment. Apparently the free extracellular fraction was the most affected by the stressing agent, showing an increase of almost six times in enzyme activity. On the other hand, enzymes present in total cell material increased their activity only 1.32 times in experimental plants (Castillo et al., 1984).

Since peroxidases are involved in several biochemical processes related to the development and growth of the plant, the outcome of the response to stress (as a change in the basic peroxidases activity in the exterior of the cell) can lead to lignification and a reduction in growth.

#### PLANT TISSUES USED IN THE STUDY OF PEROXIDASES.

Many different plant tissues have been tested for plant peroxidases response to environmental or physiological studies: leaf tissue (Klumpp et al., 1989; Castillo et al., 1987; Petit, 1984; van Lelyveld and van Vuuren, 1988; Guderian et al., 1989; Flott et al. 1988; Baaziz, 1989;), the xylem (Geiger et al., 1989), roots (Spanu and Bonfante-Fasolo, 1988), hypocotyls (Cassab et al., 1988; Golberg et al., 1989), fruits (Rotham and Nicolas, 1989; Miller and Kelley, 1989), stems (Mato et al., 1989), and whole plants (Flott et al., 1989).

#### "IN VIVO" vs "IN VITRO" METHODS OF STUDY.

Almost all experiments for determining the influence of internal and external factors on plant peroxidase activity

were carried out "in vitro" (tissue culture, hydroponics and plant culture in greenhouses); this allowed the control of experimental conditions such as plant source, inbreeding, temperature, illumination intensity, photoperiod, soil composition, nutrients and atmospheric gas mixture (Castillo, 1985; Kalir, et al., 1984; Guderian et al., 1989; Flott et al., 1988; Kay and Basile, 1987; deFelipe et al., 1988). Fewer studies have been conducted in the field where natural conditions occur (Petit, 1984; van Lelyveld and van Vuuren, 1988; Baaziz, 1989).

#### RESPONSE TO HIGH OR LOW CONCENTRATIONS OF STRESSING AGENT.

Changes in peroxidase activity as response to increasing concentration of salt is well documented. Stevens et al. (1978), found a decrease in PO activity in cultivars of Brassica when the effect of dilutions of full strength sea water on plants were assayed. On the other hand, Kalir et al. (1984), showed an increase in peroxidases activity of leaves when *Halimione portulacoides* plants were exposed to high salinity during growth. Moreover, in this study, salinity changes the properties of enzyme proteins: they precipitated at a higher ammonium sulfate concentration, were recovered later during molecular exclusion filtration, and showed a shift in the maximal, minimal and optimal temperatures. More recently, responses of halophytes to lower concentrations of salt are being studied. Hagege, Kevers, Boucaud and Gaspar (1988a), and Hagege et al. (1988b) showed that halophytic plants grown under salt deficient conditions responded by

1 increasing both the soluble and the extracellular peroxidase  
2 activity. In these plants high levels of PO activity  
3 corresponded proportionately to high levels in lignin  
4 production in the internodes. In turn, this reduced the length  
5 of the internodes, causing reduced growth in the stressed  
6 plants.

#### 7 METHODOLOGICAL DRAWBACKS.

8 The use of enzymes as biochemical markers for stress or  
9 physiological status in plants is easy to perform, but not  
10 exempt from technical problems. One of the main problems in  
11 the use of biochemical parameters as markers is that almost  
12 all environmental stresses can induce changes in treated  
13 plants at almost the same rate. Another problem is the fact  
14 that stress can affect the whole metabolic process in the  
15 plant and promote non-specific reactions (Castillo, 1986).

16 In addition, the relationship between peroxidases  
17 activity and environmental stimuli is not necessarily  
18 constant. This may be due to variations in sampling  
19 techniques, or the age and health of collected tissues. This  
20 variability could ultimately preclude the use of plant  
21 peroxidases as stress markers.

22 The actual number of isoperoxidases detected in a plant  
23 extract is largely dependent on the extraction and separation  
24 technique used, and on the method used to elicit the  
25 peroxidase activity (Gaspar et al., 1982; Kay and Basile,  
26 1987; Miller and Kelley, 1989). Finally, other hem-containing  
27 enzymes can also oxidize peroxidase substrates (Saunders et

1 al., 1964) and interfere with the actual peroxidases. PO  
2 activity can also be inhibited by other substances presented  
3 in plants such as phenols, organic acids and ions (Gaspar et  
4 al., 1982; Castillo, 1986).

#### 5 PEROXIDASES AS BIOCHEMICAL MARKERS.

6 Peroxidases have been studied for more than a century  
7 (Paul, 1963) and are among the most investigated enzymes. They  
8 are involved in several physiological processes in plants: in  
9 cell wall construction, lignin biosynthesis, crosslinking of  
10 proteins, crosslinking in hemicellulose and pectine, and as  
11 a scavenger of hydrogen peroxide a toxic product of the  
12 reduction of oxygen.

13 Peroxidases have a vast application in biotechnology.  
14 They have been used as 1) biological reagents in  
15 heterogeneous immunoenzymatic assays (ELISA), where PO is a  
16 antibody-linked label (Tijssen and Kurstak, 1984), 2) waste  
17 water treatment, where peroxidases removes phenols from coal-  
18 conversion aqueous effluents (Klivanov, Tu and Scott, 1983),  
19 3) a rapid, cheaper and accurate enzymatic assay for vitamin  
20 C, in fruits and vegetables (Casella, Gullotti, Marchesini and  
21 Petrarulo, 1989), 4) lignin degradation (Lewis, Razal and  
22 Yamamoto, 1987), and 5) for mimicking the extra-hepatic  
23 bio-oxidation of exogens such as carcinogenic amines, anti-  
24 tumor agents which undergo biotransformations before reaching  
25 their biological target (Meunier, 1987).

26 Studies with higher plants have suggested that adaptative  
27 phenotypic changes occur in the activation energy of several

1 enzymes during acclimation (Baaziz, 1989). Moreover, many  
 2 researchers have shown that the physiological alterations of  
 3 plants in response to different environmental stresses are  
 4 related to enzymes that catalyse redox reactions (Levitt,  
 5 1972). Thus, peroxidases activity appears to be a molecular  
 6 key in the rapid adaptation of whole plants to changes in  
 7 their physiology or environment (Gaspar, Penel and Greppin,  
 8 1986). Some molecular or kinetic enzyme properties will be  
 9 evident before the plant shows any sign of alteration.

10 According to the literature, plant responses to internal  
 11 or external stimuli are shown to increase peroxidases  
 12 activity, among other phenomena. However, there are some  
 13 reports that show a decrease in PO activity in response to  
 14 stress. There is a well documented correlation between higher  
 15 levels of PO activity and lower levels of plant growth. This  
 16 is because more peroxidases activity produced more internodal  
 17 lignification, indol acetic acid catabolism, and cell wall  
 18 biogenesis. Thus, plant growth inhibition can be a useful  
 19 general response to environmental stress. However, this  
 20 phenomenon appears to be a particular, species-specific response  
 21 and general rules cannot be applied.

22 Plant responses to internal or environmental conditions  
 23 can be reflected in changes in kinetic or molecular  
 24 peroxidases properties, or a combination of both. Therefore,  
 25 it is also necessary to screen all possible kinetic or  
 26 molecular peroxidases parameters in response to a particular  
 27 stress, especially when a marker of a particular event is

1 required.

2 Several plant tissues (leaves, xylem, roots, etc), have  
 3 been used for the study of the peroxidases response in plants.  
 4 However, other tissues or, in particular cases, the whole  
 5 plant, may also show appropriate responses to some internal  
 6 or external factors.

7 In general, almost all research work has been performed  
 8 in greenhouses under controlled conditions. However, from a  
 9 biotechnological point of view, it is still necessary to  
 10 develop field studies for the assay of environmental or  
 11 physiological stresses. Physical parameters, plant inbreeding,  
 12 health, and age of tissue have to be taken into account  
 13 because they can restrict the predictive value of peroxidases,  
 14 precluding their use as markers of an event.

15 In almost all the experimentation dealing with plant  
 16 peroxidase response to stimuli, the concentration of the  
 17 stimulating factor is higher than in normal conditions.  
 18 However, the research of Hagege et al. (1988a and b),  
 19 indicates that salt deficiency might be considered a stress  
 20 for halophilic and halotolerant plants. This could be true for  
 21 other environmental stresses where adapted plants may be  
 22 exposed to lower concentrations of a particular agent (e.g.  
 23 temperature, oxygen or water).

24 The response of experimental subjects to specific  
 25 treatment depends on the effectiveness of the treatment and  
 26 the natural variations among subjects. Thus natural  
 27 variability among experimental units is an important source

1 of error (not a mistake) and must be expected. Only if two  
 2 entirely homogeneous group were compared, any differences  
 3 between groups could be assumed to be due to treatment  
 4 differences. Since the typical plant response to a wide range  
 5 of environmental stresses is a dramatic change in peroxidases  
 6 activity, it is essential to carefully select suitable plants.  
 7 A fit plant is that in which individual phenotypic variation  
 8 is not more than the variation expected by the stimulus  
 9 (García-Carreño and Ochoa, 1991). The information obtained  
 10 from experimental plants must be contrasted with those of  
 11 appropriate controls.

12 Isozyme extraction from a particular tissue is one of the  
 13 critical steps in the study of peroxidases response to  
 14 stimuli. Several fractions of enzyme extracts can be obtained  
 15 using appropriate methods. Peroxidases activities from various  
 16 tissue compartments have been studied: epidermal,  
 17 extracellular, residual cell material, and total cell material  
 18 from leaves (Castillo et al., 1984), cell-wall-bound from  
 19 roots (Spanu & Bonfante-Fasolo, 1988), and the soluble,  
 20 ionically bound and covalently bound fraction (Kay and Basile,  
 21 1987). A proposed methodology (Castillo, 1984), for the  
 22 recuperation of all possible fractions is as follows: 1)  
 23 extraction of extracellular fraction by vacuum infiltration:  
 24 plant tissue is placed in a filtering flask containing buffer  
 25 or distilled water, the tissular extracellular spaces are  
 26 infiltrated by vacuum, and the extracellular peroxidases is  
 27 recuperated by centrifugation; 2) extraction of the ionically

1 bound extracellular fraction by vacuum infiltration with high  
 2 concentration of NaCl or KCl (1M); 3) extraction of total cell  
 3 material by homogenization in high ionic-strength in a  
 4 Waring-blender or similar apparatus. Alternately: 1)  
 5 homogenizing the total soluble material in a buffer containing  
 6 a protective agent such as mercaptoethanol or dithiothreitol,  
 7 and a non-ionic detergent such as: octoxynol (Triton X-100),  
 8 and 2) incubating the covalently bound fraction in a buffer  
 9 containing cellulases and pectinases.

10 Almost all extracts can contain other enzyme activities  
 11 that may influence the results. This can be avoided by using  
 12 a specific peroxidases substrate. For example, van Loon (1971)  
 13 described a method using guaiacol to differentiate PO from  
 14 other enzyme activities, such as polyphenoloxidases.

15 Several plant compounds present in plant extracts, such  
 16 as phenols and organic acids, can inhibit peroxidases  
 17 activities. These impurities can be eliminated by adding up  
 18 to 1% of polyvinyl-pyrrolidone (PVP) in the extraction buffer  
 19 for the removing of phenolics and acids. The use of anti-foam  
 20 products can avoid enzyme proteins denaturation during violent  
 21 extractions (blender homogenization).

#### 22 CONCLUDING REMARKS.

23 The need for biochemical markers to assess environmental  
 24 conditions (e.g. agronomical parameters, pollutants,  
 25 underground water and soil salinity), physiological processes  
 26 (e.g. ripening, maturation, anther development etc), and  
 27 taxonomic relationships in commercial plants, makes plant

peroxidases highly important for research and development. Since plant peroxidases are affected by internal and external stresses, they can be applied to broad fields of study to detect physiological, environmental or taxonomic effects. However, methodological differences have prevented the standardization of reported results. Standard techniques for a) plant selection and b) the extraction of peroxidases have been proposed in this paper.

#### ACKNOWLEDGEMENTS.

It is a pleasure to thank Drs J.L. Ochoa (Thesis Director), H. Villarreal, P. Whitehead for their comments and specially to Dr R. Vazquez-Duhalt for his suggestions during the early preparation of this review as part of the Ph D Thesis of the Author.

#### LITERATURE CITED.

- Baaziz, M., 1989. The activity and preliminary characterization of peroxidase in leaves of cultivars of date palm, *Phoenix dactylifera* L. *New Phytologist*, 111, 403-11.
- Casella, L., Gullotti, M., Marchesini, A., and Petrarulo, M., 1989. Rapid enzymatic method for vitamin C assay in fruits and vegetables using peroxidase. *Journal of Food Sciences*, 54, 374-75.
- Cassab, G., Lin, J., Lin, L., and Varner, J., 1988. Ethylene effect on extensin and peroxidase distribution in the subapical region of pea epicotyls. *Plant Physiology*, 88, 522-24.

- Castillo, F., Penel, C., and Greppin, H., 1984. Peroxidase release induced by ozone in *Sedum album* leaves. *Plant Physiology*, 74, 846-51.
- 1985. *Activité peroxydasique et pollution atmosphérique*. Thèse No 2115. Faculté des Sciences, Université de Genève.
- 1986. Extracellular peroxidases as markers of stress. In: *Molecular and Physiological aspects of Plant Peroxidases*. Eds. Greppin, H., Penel, C., and Gaspar, Th. Université de Genève, Genève, pp. 419-26.
- Miller, P., and Greppin, H., 1987. Extracellular biochemical markers of photochemical oxidant air pollution damage to Norway spruce. *Experientia*, 43, 111-15.
- deFelipe, M., Lucas, M., and Pozuelo, J., 1988. Cytochemical study of catalase and peroxidase in the mesophyll of *Lolium rigidum* plants treated with isoproturon. *Journal of Plant Physiology*, 132, 67-73.
- Delvallée, I., and Dumas, C., 1988. Anther development in *Zea mays*, changes in protein, peroxidase and esterase patterns. *Journal of Plant Physiology*, 132, 210-17.
- Flott, B., Moerschbacher, B., and Reisener, H., 1989. Peroxidase isoenzyme pattern of resistant and susceptible wheat leaves following stem rust infection. *New Phytologist*, 111, 413-21.
- García-Carreño, F.L., and Ochoa, J.L., 1991. The effect of saline stress on peroxidase activity in the mezquite



- 1 (Prosopis articulata) leaf. Journal Arid Environments,  
2 20, in press.
- 3 Gaspar, T., Penel, C., Thorpe, T., and Greppin, H., 1982.  
4 Peroxidases 1970-1980. Université de Genève, Genève.
- 5 ----- and Greppin, H., 1986. Peroxidases: structures  
6 and catalytic reactions, biosynthesis, transport and  
7 location, physiological roles. Bulletin Groupe  
8 Polyphenols, 13, 159-76.
- 9 Geiger, J., Rio, B., Nandris, D., and Nicole, M., 1989.  
10 Peroxidase production in the tissues of the rubber tree  
11 following infection by root fungi. Physiology and  
12 Molecular Plant Pathology, 34, 241-56.
- 13 Goldberg, R., Kevens, C., and Gaspar, T., 1989. Guaiacol and  
14 ascorbate peroxidase compartmentation and gradient along  
15 the growing mung bean hypocotyl. Biochemistry and  
16 Physiology Pflanzen, 184, 155-61.
- 17 Guderian, R., Klumpp, G., and Klumpp, A., 1989. Effects of  
18 SO<sub>2</sub>, SO<sub>3</sub> and NO<sub>x</sub>, singly and in combination, on forest  
19 species. In: Plants and Pollutants in developed and  
20 developing Countries. Ed. Ozturk, M.A. Botany Department,  
21 Science Faculty, Izmir, Turkey. pp. 231-68
- 22 Gus'kov, A., Tikhomirov, A., and Polikarpova, F., 1988.  
23 Peroxidase activity in clone apple-tree stocks differing  
24 in capacity for rhizogenesis. Soviet Plant Physiology,  
25 35, 945-54.
- 26 Hagege, D., Kevers, C., Boucaud, J., and Gaspar, T., 1988a.  
27 Activités peroxidasiques, production d'éthylène,

- 1 lignification et limitation de la croissance chez Suaeda  
2 maritima cultivé en l'absence de NaCl. Plant Physiology  
3 and Biochemistry, 26, 609-14.
- 4 ----- Grandin, Boucaud, J., and Gaspar, T., 1988b.  
5 Peroxidase activities and ethylene production by calli  
6 of Beta vulgaris (halotolerant plant) and Suaeda maritima  
7 (halophilic plant), obtained in absence of NaCl. In:  
8 Growth and differentiation in plants, Ed. K.K. Dhir.  
9 Hakoda, N., 1987. Studies on the interrelationships between  
10 cultivars of Camellia sasanqua Thumb. and species  
11 of the genus Camellia Linn., based on peroxidase  
12 isozymes. Journal of Japan Society of Horticulture  
13 Sciences, 56, 339-43.
- 14 Kalir, A., Omri, G., and Poljakoff-Mayber, A., 1984.  
15 Peroxidases and catalase activity in leaves of Halimione  
16 portulacoides exposed to salinity. Physiologia Plantarum,  
17 62, 238-44.
- 18 Kay, L., and Basile, D., 1987. Specific peroxidase isoenzymes  
19 are correlated with organogenesis. Plant Physiology, 84,  
20 99-105.
- 21 Klivanov, A. Tu, T. and Scott, K., 1983. Peroxidase-catalyzed  
22 removal of phenols from coal-conversion waste  
23 waters. Science, 221, 259-60.
- 24 Klumpp, G., Guderian, R., and Kupperts, K., 1989. Peroxidase-  
25 und superoxiddismutase-aktivität sowie prolingehalte von  
26 fichtennadeln nach belastung mit O<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub> und NO<sub>2</sub>. European  
27 Journal of Forest Pathology, 19, 84-97.

- 1 Ladonin, V.F., and Spesivtsev, L.G., 1976. Study of the  
2 localization of triazine herbicide in plants cells  
3 in relation to their effect of metabolism. Chemical  
4 Abstract, 85: 104984.
- 5 Levitt, J., 1972. Responses of plants to environmental  
6 stresses. Academic Press, NY.
- 7 Lewis, N., Razal, R., and Yamamoto, E., 1987. Lignin  
8 degradation by peroxidase in organic media: a  
9 reassessment. Proceedings of National Academy of  
10 Sciences, USA, 84, 7925-27.
- 11 Lickl, E., and Ebermann, R., 1987. Unterscheidung heimischer  
12 Eichen Quercus spp durch elektrophorese der imsplintholz  
13 vorkommenden amylose- und peroxidase-isoenzyme. Phyton,  
14 17, 165-70.
- 15 Longo, G., Rossi, G., Longo, C. and Soave, C., 1990. Sexual  
16 differentiation in Asparagus officinalis hormonal  
17 content and peroxidase Isoenzymes in female plants.  
18 Sexual Plant Reproduction. 3, 236-43.
- 19 Mato, M., Rúa, M., and Ferro, E., 1988. Changes in levels of  
20 peroxidases and phenolics during root formation in  
21 Vitis culturad in vitro. Physiologia Plantarum, 72,  
22 84-8.
- 23 Maunier, B., 1987. HRPO: as useful tool for modeling the  
24 extra-hepatic biooxidation of exogens. Biochemie,  
25 69, 3-9.
- 26 Miller, A., and Kelley, T., 1989. Mechanical stress stimulates  
27 peroxidase activity in Cucumber fruit. Horticulture

- 1 Sciences, 24, 650-2.
- 2 Nakamura, C., Van Telgen, H., Mennes, A., Ono, H., and  
3 Libbenga, K., 1988. Correlation between auxin resistance  
4 and the lack of a membrane-bound auxin binding protein  
5 and root-specific peroxidase in Nicotiana tabacum. Plant  
6 Physiology, 88, 845-9.
- 7 Paul, K.G., 1963. Peroxidases. In: The Enzymes, 8 Ed. Boyer,  
8 P., Larfdy, H., and Myrback, K., Academic Press, New  
9 York, pp. 227-274.
- 10 Petit, J., 1984. Scale of air pollution related to peroxidase  
11 activity of radish Raphanus sativus leaves. The  
12 Sciences of Total Environment, 39, 189-208.
- 13 Rothan, C., and Nicolas, J., 1989. Changes in acidic and basic  
14 peroxidases activities during tomato fruit ripening.  
15 Horticulture Sciences, 24, 340-2.
- 16 Saunders, B., Holmes-Siedle, A., and Stark, B., 1964.  
17 Peroxidases, Butterworths, London. pp. 271.
- 18 Siegel, S., and Siegel, B., 1986. Peroxidase activity and  
19 stress. In: Molecular and Physiological Aspects of Plant  
20 Peroxidases. Ed. Greppin, H., Penel, C., and Gaspar, Th.  
21 Université de Genève, Genève, pp. 427-432.
- 22 Schmid, P. Feucht, W., and Treutter, D., 1988. IEF getrennte  
23 phloem-peroxidasen an der veredlungsstelle von  
24 Prunus avium kombinationen. Gartenbauwissenschaft,  
25 453, 88-92.
- 26 Smith, K. and Shortle, W., 1990. IAA oxidase, peroxidase and  
27 barrier zone formation in red maple. European

- 1           Journal of Forest Pathology. 20, 241-6.
- 2           Spanu, P. and Bonfante-Fasolo, P., 1988. Cell-wall-bound
- 3           peroxidase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*. New
- 4           Phytologist. 109, 119-24.
- 5           Stevens, H., Calvin, M., Lee, K., and Siegel, B., 1978.
- 6           Peroxidase activity as a screening parameter for salt
- 7           stress in *Brasica* species. *Phytochemistry*, 17, 1521-2.
- 8           Szweykowski, J. and Krzakowa, M., 1990. Peroxidases as
- 9           taxonomic markers for some *Calypogeia* species collected
- 10          in Poland. *Nova Hedwigia*. 51, 241-55.
- 11          Tijssen, P., and Kurstak, E., 1984. Highly efficient and
- 12          simple method for the preparation of peroxidase and
- 13          peroxidase-antibody conjugates for enzyme immunoassays.
- 14          *Analytical Biochemistry*, 163, 451-7.
- 15          van Lelyveld, L., and van Vuuren, S., 1988. Peroxidase
- 16          activity as a marker in greening disease of citrus for
- 17          assessment of tolerance and susceptibility. *Journal of*
- 18          *Phytopathology*, 121, 357-62.
- 19          van Loon, L., 1971. Tobacco polyphenoloxidases: a specific
- 20          staining method indicating non-identity with peroxidases.
- 21          *Phytochemistry*, 10, 503-7.

## The effect of saline stress on peroxidase activity in the mezquite (*Prosopis articulata*) leaf

F. L. Garcia-Carreño & J. L. Ochoa O.

División de Biología Experimental, Centro de Investigaciones Biológicas de Baja California Sur, BOX 128, La Paz, 23000, BCS, Mexico

(Received 4 December 1989, accepted 15 May 1990)

Peroxidase activity and isoperoxidase electrophoretic patterns are being studied in desert plants as biochemical indicators of physiological stress. Herein we report the peroxidase activity of the mezquite (*Prosopis articulata*) leaf associated with water tables of different electrical conductivities supporting plant growth and survival. The poor correlation found for about 18 plants growing in the conductivity range of 1000-18,000  $\mu\text{mhos}$  confirms the wide ecotype variation reported for this species, suggesting different plant strategies in response to saline stress.

### Introduction

Plant biochemical events such as changes in enzyme activity, isoenzyme patterns and metabolite pools are useful indicators of physiological alterations due to environmental conditions. Peroxidase activity has been used for screening different physiological stresses such as drought, cold, infection and salt (Gaspar *et al.*, 1982). Stevens *et al.* (1978) reported a decrease in peroxidase activity with increasing salinity in *Brassica* species, while Kalir *et al.* (1984) found an increase in peroxidase activity in leaves of *Halimione portulacoides* exposed to salinity, and Siegel *et al.* (1986) obtained a fall, followed by a rise, with species of *Zea*, *Brassica* and *Carica*.

The leguminous genus *Prosopis*, commonly known as mezquite or mesquite, is well represented among the various shrub phreatophytes found in the Sonoran desert. The mezquites can produce leaves, flowers and fruits under conditions of severe drought. This is due, primarily, to its deep root system extending down to the phreatic zone (capillary fringe or water table) (Virginia & Jarrell, 1987) which enables the plant to survive in very dry seasons (Felger, 1985). The present work is aimed at determining the peroxidase activity changes in mezquite leaves as a result of variations in the salt concentration of their underground water.

### Materials and methods

#### Study area

Work was conducted on the La Paz-El Carrizal alluvial plain (or Basin) (Hammond, 1954), 24-24°10'N; 110°20'-110°30'W (Fig. 1). The climate is BW(h)hw(e) type, dry or desertic. The average annual air temperature is 23.5°C, with a minimum of 6°C in winter

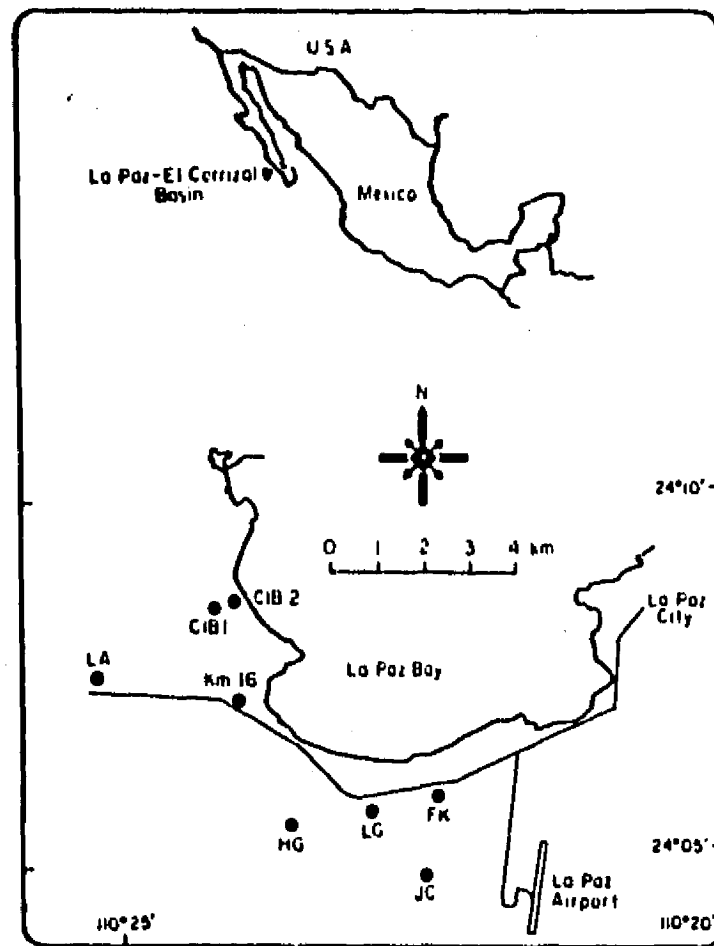


Figure 1. Study area within the La Paz-El Carrizal alluvial plain. The location of selected wells are indicated by the black dots.

and a maximum of 42°C in summer. The average annual rainfall during the summer is 150 mm. The main winds are from the north-west in the fall and winter, and from the south in the spring and summer (Salinas-Zavala, 1986). The biotic community is sarcocaulous shrub (Shreve & Wiggins, 1937; León de la Luz, 1981). Field sampling took place on 25 November and 6 December 1988, and 10 January and 8 February 1989. The quality of the phreatic tables was determined by measuring the electrical conductivity of water samples from eight wells less than 30 m deep. The corresponding conductivities are expressed as  $\mu\text{mhos}$ , which are equivalent to  $\mu\text{S}$ . Shrub branches and water samples were also collected at the same time.

#### Peroxidase activity assay

Separate extracts of 0.5 g of leaves from each of two or three plants were obtained by homogenisation in a mortar with 5 ml of 50 mM acetate buffer, pH 5.1, and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Protein content was assayed according to the method of Bradford (1976). Peroxidase activity was determined by mixing 0.010 ml sample with 2 ml substrate mixture containing 16 mM guaiacol and 2 mM hydrogen peroxide in 50 mM acetate

buffer, pH 5.1, at 25°C. The increase in absorbance as a result of peroxidase activity was recorded at 470 nm.

#### Isoelectric focusing

Agarose (0.8%) thin layer horizontal isoelectric focusing was performed according to LKB Application Notes 317, at 15°C on 10 × 11 cm plastic sheets. Mezquite leaf extracts (10  $\mu\text{l}$ ) were applied to the gel on filter paper. Electrofocusing separation was carried out at constant power (5 W) for 1.5 h. The gels were immersed in freshly prepared guaiacol solution (16 mM) with 50 mM acetate buffer, pH 5.1. After 5 min, the guaiacol solution was drained off and the gels washed with distilled water before being immersed in 0.03%  $\text{H}_2\text{O}_2$  solution until isoperoxidase bands were visible. For drying, the gels were covered with a filter paper sheet soaked in ethanol, followed by three dry sheets and pressed for 30 min under a glass plate and a 1 kg weight. The gels were then blown dry with warm air.

#### Results

The peroxidase activity of mezquite leaves, and the electrical conductivity of the various water tables supplying the plants, sampled at different times, reflect an erratic response to saline stress (Tables 1 and 2). Interestingly, due to a chance rainfall, a reduction in the ionic strength of the water from selected wells was significant at the third sampling

Table 1. Water table conductivities (C in  $\mu\text{mhos}$ ) and specific peroxidase activity (Q) in different mezquite leaf samples

Well name		Sampling 25 Nov. 1988		7 Dec. 1988		10 Jan. 1989		8 Feb. 1989	
Plant code no.		C	Q	C	Q	C	Q	C	Q
LA	LA-1	1100	31	1000	34	900	29	900	31
	LA-2		42		160		34		23
	LA-3		29		ND		20		27
HG	HG-1	1400	12	1400	50	1200	24	1000	36
	HG-2		19		120		28		31
	HG-3		ND		80		33		46
FK	FK-1	2200	51	2000	166	1650	35	1600	66
	FK-2		27		81		16		39
LG	LG-1	2450	36	2500	64	2350	17	2400	37
	LG-2		13		131		20		30
K-16	K-16-1	3200	97	3400	470	1800	75	1800	ND
	K-16-2		57		53		43		50
CIB1	CIB1-1	4200	16	4200	87	3700	28	3900	16
	CIB1-2		17		45		14		17
JC	JC-1	11,000	29	12,000	67	10,000	45	9000	42
	JC-2		34		34		22		37
CIB2	CIB2-1	18,000	ND	17,000	ND	13,500	15	14,000	34
	CIB2		38		115		20		ND

ND = ?????????????

Table 2. Water table conductivities (C in  $\mu\text{mhos}$ ) and protein content (P in  $\text{mg ml}^{-1}$  of extract) in different mezquite leaf samples

Sampling		25 Nov. 1988		6 Dec. 1988		10 Jan. 1989		8 Feb. 1989	
Well name	Plant code no.	C	P	C	P	C	P	C	P
LA	LA-1	1100	1.6	1000	0.9	900	1.0	900	1.4
	LA-2		0.6		0.2		0.4		0.3
	LA-3		0.5		ND		0.5		0.7
HG	HG-1	1400	1.5	1400	1.3	1200	1.0	1000	2.0
	HG-2		1.1		0.8		0.8		1.4
	HG-3		ND		0.4		0.9		1.3
FK	FK-1	2200	0.9	2000	0.2	1650	0.5	1600	0.6
	FK-2		0.9		0.6		0.5		0.7
LG	LG-1	2450	1.0	2500	0.4	2350	0.5	2400	0.9
	LG-2		0.8		0.2		0.4		1.0
K-16	K-16-1	3200	0.5	3400	0.1	1800	0.4	1800	ND
	K-16-2		0.3		0.6		0.5		0.9
CIB1	CIB1-1	4200	0.6	4200	0.5	3700	0.9	3900	1.3
	CIB1-2		0.9		0.3		0.9		0.7
JC	JC-1	11,000	0.9	12,000	0.7	10,000	0.7	9000	1.2
	JC-2		0.7		0.8		0.9		1.3
CIB2	CIB2-1	18,000	0.3	17,000	0.1	13,500	0.2	14,000	0.6
	CIB2-2		0.5		0.1		0.3		ND

ND = ?????????????

(Fig. 2), allowing us to establish a correlation between enzyme activity and the effect of salt within each plant. It is apparent that the enzyme activity of mezquite leaves is not dependent on the influence of salt concentration in the water supply to the plant. Mezquite plants show a mean peroxidase activity of 31 units in water with an electrical

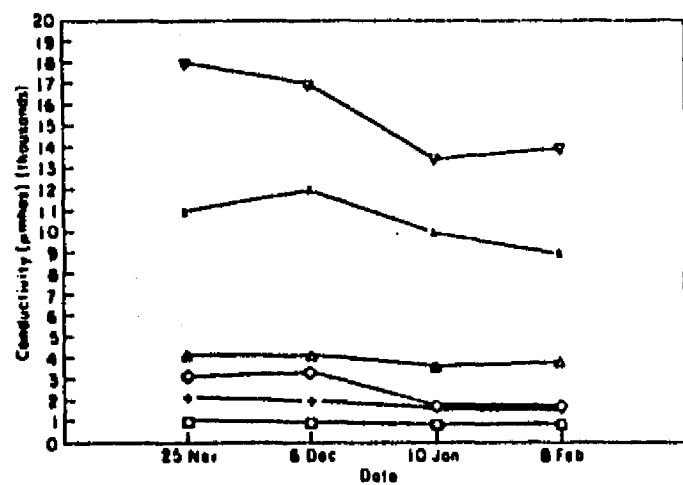


Figure 2. Electrical conductivity of water tables at different sampling dates. Plant codes: □ LA; + FK; ◇ K16; △ CIB1; × JC; ▽ CIB2.

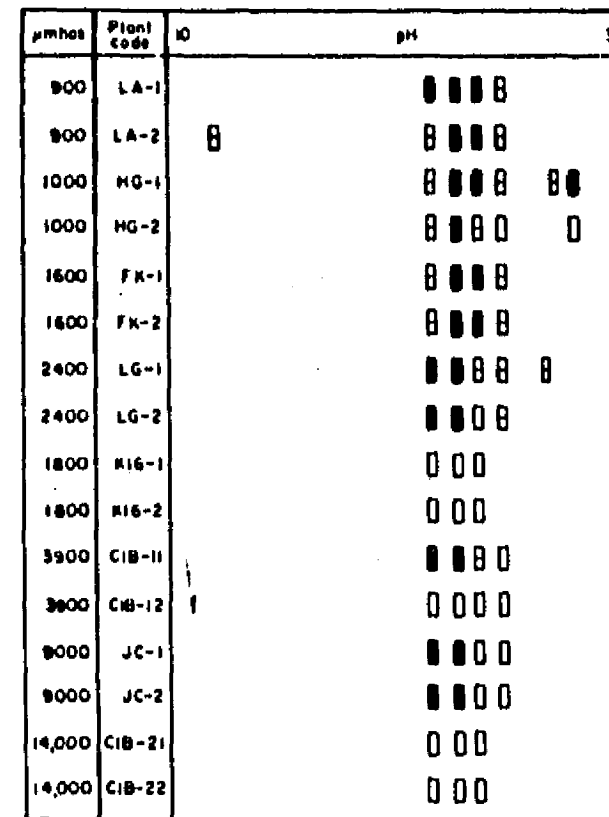


Figure 3. Isoperoxidase pattern from mezquite leaves by isoelectrofocusing (pH 3-10). Intensity of staining is suggested using bars from weak (no bar shown) to very intense (dark square).

conductivity value of 1100  $\mu\text{mhos}$ , which is practically the same as when the conductivity is 10 times higher. Moreover, there are some examples where the enzyme activity is either higher or lower than 31 units in the range of conductivities hitherto found.

In addition, the isoperoxidase zymogram of the different extracts from mezquite leaves does not reveal any particular feature, or isoperoxidase enzyme bands, that could be associated with salt stress (Fig. 3); they only appear unusual in composition, indicating mainly an anionic character, with one exception where a faint cathodic isoperoxidase band was observed.

### Discussion

The water used for general consumption in Baja California Sur State is supplied from wells. About  $5 \times 10^6 \text{ m}^3$  of rain water drain away to the sea each year in the La Paz-El Carrizal Basin system alone (Garcia-Monarez *et al.*, 1986). Part of this water infiltrates the soil before draining into the sea, giving rise to very diverse quality phreatic tables, from drinkable to salty, supporting various plant communities. Although there are a number of physical methods employed to localise underground water, it is often necessary to dig in order to determine the water quality.

Peroxidase activity and isoperoxidase zymograms have been used as screening parameters for salt stress in plants from different genera including *Brassica*, *Halimione*, *Beta*

and *Suaeda*, cultivated in greenhouses or under cell culture conditions (Stevens *et al.*, 1978; Kalir *et al.*, 1984; Hagege *et al.*, 1988). This report is the first attempt to establish the relationship between mezquite leaf peroxidase activity with water table salinity. Mezquite plants were chosen because they are almost always dependent on phreatic water for survival and are widely distributed in the northern half of Mexico. The results obtained suggest a lack of correlation between mezquite leaf peroxidase activity, and/or isoperoxidase pattern, and the salt concentration in their supplying water tables.

It is known that, in addition to peroxidase activity, saline stress may induce changes in several other biochemical parameters in plants such as photosynthetic potential (Robinson *et al.*, 1983), specific protein production (Ericson & Alfinido, 1984), activities of isocitrate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase (Rabe *et al.*, 1982), abscisic acid, zeatin riboside, cis and trans zeatin, adenine and adenosine (Dumbroff & Walker, 1981), membrane lipid ratio (Hirayama & Mihara, 1987) and ethylene production (Hagege *et al.*, 1988). In the case of mezquite, there appears to be a complex response to saline stress which remains to be elucidated. Further screening of other biochemical indicators of saline stress in mezquite may help to estimate the water quality of phreatic deposits.

We are grateful to J. L. León de la Luz, Dr Claude Grenot, M. M. Grindell and Dr R. Vazquez-Duhalt for their suggestions and criticisms of this work.

#### References

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram sensitivities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-54.
- Dumbroff, E. B. & Walker, M. A. (1981). Effects of salt stress on abscisic acid and cytokinin levels in tomato. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 101: 461-70.
- Ericson, M. C. & Alfinido, S. H. (1984). Proteins produced during salt stress in tobacco cell culture. *Plant Physiology*, 74: 506-509.
- Felger, R. S. (1985). New arid land crops from México: three examples for immediate development. In: Ochoa, J. L. & Moreno-Lopez, J. (Eds), *Uso y Preservación de los Recursos Biológicos Marinos y de Zonas Áridas*. pp. 13-24. Uppsala: Uppsala University Press.
- García-Monárrez, H., Pimentel-Hernández, R., Pérez-Venzor, J. F. & Flores, E. Z. (1986). Estudio geohidrológico complementario de la Cuenca La Paz-El Carrizal para proporcionar agua en bloque a la Ciudad de La Paz, BCS. *Reporte Técnico Geociencias*. México: Universidad Autónoma de Baja California Sur. 300 pp.
- Gaspar, Th., Penel, Cl., Thorpe, T. & Greppin, H. (Eds) (1982). *Peroxidasas*. Geneva: Geneva University Press. 324 pp.
- Hammond, E. H. (1954). A geomorphic study of the cape region of Baja California. *University of California Publications in Geography*, No. 00, 000 pp.
- Hagege, D., Kevers, C., Grandin, M., Boucaud, J. & Gaspar, Th. (1988). Peroxidase activities and ethylene production by calli of *Beta vulgaris* (halotolerant plant) and *Suaeda maritima* (halophilic plant), obtained in absence of NaCl. In: Dhir, K. K. (Ed.), *Growth and Differentiation in Plants* (in press).
- Hirayama, O. & Mihara, M. (1987). Characterization of membrane lipids of higher plants: differences in salt tolerance. *Agricultural Biological Chemistry*, 51: 3215-21.
- Kalir, A., Omri, G. & Poljakoff-Mayber, A. (1984). Peroxidase and catalase activity in leaves of *Halimione portulacoides* exposed to salinity. *Physiologia Plantarum*, 62: 238-44.
- León de la Luz, J. L. (1981). Informe de actividades. *Centro de Investigaciones Biológicas de Baja California Sur*. México. 000 pp.
- Rabe, R., Noble, W. & Kohler, A. (1982). Effects of sodium chloride on photosynthesis and some enzyme activities of *Potamogeton alpinus*. *Aquatic Botany*, 14: 159-65.
- Robinson, S. P., Downton, J. S. & Millhuse, J. A. (1983). Photosynthesis and ion content of leaves and isolated chloroplasts of salt-stressed spinach. *Plant Physiology*, 73: 238-42.
- Salinas-Zavala, C. (1986). Memorias de curso especial de titulación. *Análisis de Sistemas Marinos*. UABCS. México.

- Shreve, F. & Wiggins, I. L. (1937). *Vegetation and Flora of the Sonoran Desert*. Stanford, California: Stanford University Press. 1740 pp.
- Siegel, B. Z., Siegel, S. M., Shun, J. & Chang, D. (1986). Peroxidase activity and stress: a complex relationship. In: Greppin, H., Penel, C. & Gaspar, Th. (Eds), *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. pp. 427-32. Geneva: Geneva University Press.
- Stevens, H. C., Calvin, M., Lee, K. & Siegel, Z. (1978). Peroxidase activity as a screening parameter for salt stress in *Brassica* species. *Phytochemistry*, 17: 1521-22.
- Virginia, R. A. & Jarrell, W. M. (1987). Approaches for studying the function of deep root systems. In: Tenhunen, J. D. (Ed.), *Response to Stress*. pp. 107-127. Berlin: Springer-Verlag.