



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE OXIDACIÓN DE
ÁCIDO INDOLACÉTICO POR ISOPEROXIDASAS AISLADAS
DE PARED CELULAR DE *Solanum lycopersicon*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

BEATRIZ ROSALES RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX. 2010





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 esta 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.

Dedico este trabajo a mi familia, que es la motivación y fortaleza que constantemente guía mi vida, especialmente a mamá y a mi amado esposo.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en los laboratorios de Fisiología Vegetal y Biogeoquímica de la Unidad de Biología y Prototipos de la F.E.S. Iztacala, bajo la dirección del Dr. Ignacio Peñalosa Castro, a quien agradezco por su gran paciencia y asesoría excepcional. Adicionalmente, esta tesis fue efectuada gracias al apoyo otorgado por el Proyecto PAPIIT IN226210 "Participación de las peroxidasas de clase III obtenidas del apoplasto de tallos *Solanum lycopersicon* en la oxidación de los ácidos indolacético e indolbutírico" y al Proyecto PAPCA No. 74 "Estudios de la participación de las peroxidasas de clase III de *Solanum lycopersicon* en la oxidación de las auxinas ácido indolacético y ácido indolbutírico".

A las personas que compartieron sus conocimientos y aportaron valiosos consejos, los Doctores Elías Piedra y César Flores, el Maestro Rafael Quintanar y la Maestra Josefina Vázquez quien brindó un apoyo esencial en el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE

	Pág.
Resumen	1
Introducción	3
Auxinas	4
Etapas de formación en el enraizamiento adventicio	8
Peroxidasas	9
Peroxidasas Clase III y su actividad ácido indolacético oxidasa	10
Análisis Proteómicos de la pared celular	12
Objetivos	15
Material y Métodos	16
NaCl y digestión enzimática para obtener proteínas relacionadas iónica y covalentemente a la pared celular (Método A)	16
Extracción de proteínas relacionadas iónica y covalentemente a la pared celular empleando CaCl ₂ y LiCl (Método B)	17
Extracción proteica a través del método de aislamiento de protoplastos por digestión enzimática con la finalidad de separar el apoplasto (Método C)	17
Obtención de material vegetal	18
Ensayo de actividad peroxidasa (PXs)	18
Medición de actividad AIA oxidasa	19
Electroforesis en geles de poliacrilamida	19
Resultados	23
Discusión	49
Conclusiones	57
Anexo	59
Referencias	68

Resumen

En el presente estudio se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes, revelando actividad peroxidasa y AIA oxidasa, con la finalidad de determinar isoperoxidasas en paredes celulares de tallo, hoja y raíz de *Solanum lycopersicon* en distintas etapas de desarrollo.

Tres métodos para extraer proteínas de la pared celular fueron evaluados. En el primer método (A) se emplearon NaCl y enzimas celulasa y pectinasa para obtener fracciones conteniendo proteínas adheridas iónica y covalentemente a la pared celular (Chaoui *et al.*, 2003). El segundo método (B) consistió en la extracción con CaCl₂ y LiCl en dos pasos sucesivos como describe Feiz *et al.* (2006) en su estudio proteómico en *Arabidopsis*. En el tercer método (C) se utilizó un procedimiento para el aislamiento de protoplastos mediante digestión enzimática, con la finalidad de separar el apoplasto (Peñalosa, 1998). La eficiencia de los distintos métodos fue evaluada en función de factores de purificación y a patrones isoenzimáticos obtenidos en los geles de poliacrilamida.

Con el Método B se determinaron tres isoperoxidasas (**a**, **m**, **p**) con actividad auxina oxidasa asociada iónicamente a la pared celular de tallo (Sobrenadante CaCl₂ y LiCl). Adicionalmente, una de estas isoperoxidasas es exclusivamente revelada con este procedimiento.

Los resultados obtenidos con el Método C sugieren que isoperoxidasas (**o**, **j**) con actividad AIA oxidasa se encuentran localizadas tanto en la fracción soluble del apoplasto como en la pared celular de hoja y tallo de jitomate en su cuarta semana de desarrollo. En las fracciones obtenidas de segmentos de raíces no se observaron bandas que indiquen la presencia de actividad auxina oxidasa en el periodo evaluado.

Empleando el Método A, reportado por Chaoui *et al.* (2003) para la extracción de proteínas asociadas a la pared celular, 16 isoformas revelaron actividad peroxidasa en las fracciones correspondientes a tejidos de hoja, tallo y raíz de *S. lycopersicon* estudiados en tres etapas de desarrollo. En el periodo comprendido por cuatro semanas de desarrollo, se evidenciaron diez isoformas, de las cuales la isoforma identificada con la letra **a** posee actividad AIA oxidasa en la fracción adherida iónicamente a la pared celular de tejidos de hoja. En la sexta semana de desarrollo, el patrón electroforético reveló ocho isoperoxidasas, la actividad auxina oxidasa fue evidenciada en fracciones de proteínas adheridas iónicamente a la pared celular en tallo y raíz. En ambos tejidos, la actividad AIA oxidasa revelada correspondió en movilidad a la isoperoxidasa **a**. En la etapa de

desarrollo correspondiente a 12 semanas se obtuvo el perfil isoenzimático más completo revelando doce isoformas. En esta edad, los tejidos de tallo y raíz presentaron isoenzimas con actividad auxina oxidasa. En tallo la isoforma **a** se localizó en la fracción citoplásmica; en raíz dos nuevas isoenzimas presentaron la capacidad de oxidar AIA: la isoforma **g** ubicada en la fracción citoplásmica y la isoforma **i** que reveló actividad auxina oxidasa en la fracción adherida covalentemente a la pared celular.

En conclusión, se sugiere que el Método A es el protocolo adecuado para la extracción de isoperoxidasas, adicionalmente los resultados de este trabajo, indican que la actividad AIA oxidasa y peroxidasa analizadas en distintos tejidos, varían dependiendo de su localización en el órgano y de la edad de las plantas. El catabolismo del AIA en *S. lycopersicon* está ligado probablemente a la acción de siete isoperoxidasas (**a, g, i, j, m, o, p**).

Introducción

La propagación vegetativa es una técnica de reproducción asexual de amplio uso en horticultura, agricultura y ciencias forestales (Hartmann *et al.*, 1990; Ludwig-Müller *et al.*, 2005). Consiste en multiplicar células obtenidas de un individuo a partir de las cuales se generan nuevos individuos genéticamente idénticos al original. En la medida en que este tipo de propagación pueda utilizarse en cualquier especie vegetal, se tendría la oportunidad de mantener líneas con características de mayor importancia para el hombre, además de perpetuar clones de plantas sin semillas y de alcanzar estados de madurez más rápidamente (Janick *et al.*, 1974). La formación de raíces adventicias es un factor crucial en la propagación vegetativa (De Klerk *et al.*, 1999; Günes, 2000) y es un proceso que cobra gran importancia cuando se requiere propagar una especie sin que se pierdan sus caracteres genéticos por causa de la segregación característica de la reproducción sexual (Vázquez, 2002). Precisamente, debido a que éste es un método eficiente, practicado para mantener la fidelidad y la rápida producción de plantas (Nag *et al.*, 2001), existe interés comercial en la comprensión de las cuestiones bioquímicas y fisiológicas base del proceso de enraizamiento adventicio (Ford *et al.*, 2001).

Las raíces adventicias se originan de regiones distintas al sistema de raíces primario, difieren de las raíces laterales, ya que se forman a partir de tejidos del tallo y no de la raíz (Peñalosa, 1998). Las raíces adventicias pueden derivarse del cambium o en el caso de segmentos de tallo, a partir de callos. Por tanto, parecen existir dos vías para la formación de raíces adventicias: (i) La organogénesis directa a partir de tipos celulares establecidos o (ii) a partir de tejido del callo que se formó como consecuencia de daño mecánico (Casson y Lindsey, 2003). La formación de raíces adventicias es un proceso complejo afectado por múltiples factores endógenos, que incluyen fitohormonas y factores ambientales como el daño mecánico y la iluminación (Sorin *et al.*, 2005; Nag *et al.*, 2001). Las auxinas y las citoquininas son los principales factores endógenos en la regulación de la formación de raíces adventicias (Nordström *et al.*, 1991).

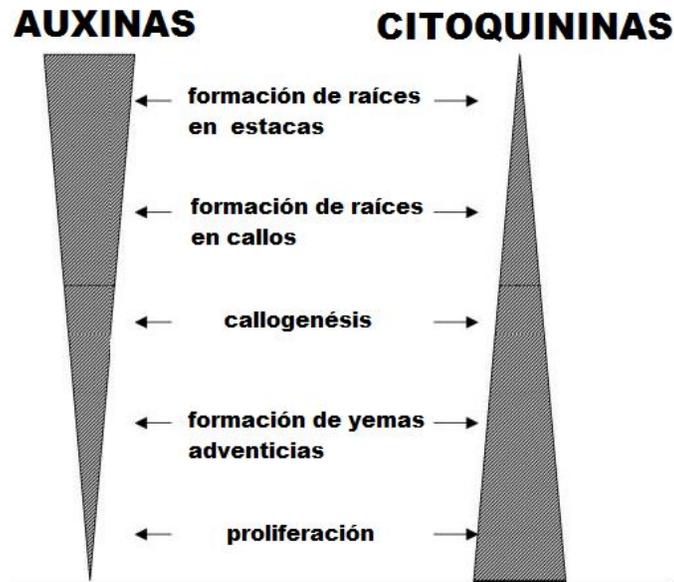


Fig.1. El control de diferentes programas organogénicos a través de la relación entre auxinas y citoquininas. Gaspar *et al.*, 2003.

AUXINAS

Las auxinas en plantas superiores son el ácido indol-3-acético (AIA) cuyos efectos se conocen más que el de otras auxinas; el ácido 4-cloroindolacético (4-Cl-AIA); el ácido fenilacético (PAA) y el ácido indol-3-butírico (AIB) (Vázquez, 2002). Estas sustancias están involucradas virtualmente en cada uno de los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Bennet *et al.*, 1998; Rashotte *et al.*, 2003; Gaspar *et al.*, 2003; Blakeslee *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2007; Benjamins y Scheres, 2008) que incluyen la división, alargamiento y diferenciación celular (Bennet *et al.*, 1998) que a su vez conducen a la curvatura del coleóptilo, el desarrollo de tejidos vasculares, la formación de raíces adventicias, la inhibición del crecimiento de las yemas axilares, las respuestas trópicas, la prevención de la abscisión de los frutos y la inducción de su partenocarpia (Kefeli, 1978; Valero y Labrador, 1995). Se sintetizan fundamentalmente, aunque no exclusivamente, en la parte aérea de las plantas (Bhalerao *et al.*, 2002), y se redistribuyen a través de una compleja red de transporte polarizado (Tian *et al.*, 2007, Benjamins y Scheres, 2008). La regulación de los niveles de auxina depende de la tasa de síntesis, de la velocidad de transporte, de la formación de conjugados y de la tasa de

degradación del compuesto (Vázquez, 2002; Woodward y Bartel, 2005).

El transporte polar de auxinas sucede principalmente en los tejidos del parénquima vascular, más probablemente el xilema; dirigiéndose del ápice hacia la base del tallo (transporte “basipetálico”) y desde la base del tallo hacia la punta de la raíz (transporte “acropetálico”). En la raíz ocurre el transporte basipetálico (desde el ápice de la raíz hacia la base) en los tejidos epidermal y cortical. El movimiento polar ocurre de célula a célula, atravesando membranas, haciendo uso de los transportadores de influjo (AUX1) y eflujo (PIN) (Fig. 2) (Friml, 2003; Blakeslee *et al.*, 2005, Taiz y Zeiger, 2006). Asimismo existe un transporte no polar en el floema, que se da a mayor velocidad, es pasivo y no precisa energía, como ocurre con la auxina que pasa del tallo hacia la raíz, impulsada por el flujo del floema (Swarup *et al.*, 2001).

Particularmente, las auxinas han demostrado ser importantes en procesos relacionados con la rizogénesis tales como la iniciación y emergencia de raíces adventicias, el patrón de distribución de meristemos radiculares y la elongación radicular (Ljung *et al.*, 2005). Adicionalmente se ha reportado que la interdependencia de las etapas fisiológicas en el proceso de enraizamiento se asocia con cambios en la concentración de auxinas endógenas (Gaspar *et al.*, 1996).

La principal auxina endógena es el ácido indolacético (AIA) (Fig. 3), sintetizado a partir de triptófano o empleando una vía triptófano independiente (Zhao, 2008) en las regiones meristemáticas del ápice del tallo, hojas jóvenes en desarrollo y raíces (Feldman, 1981; Blakeslee *et al.*, 2005; Ford *et al.*, 2001; Ljung *et al.*, 2005). El AIA derivado del tallo es transportado acropetálicamente a través del estele hacia el ápice de la raíz (Muday, 2001; Friml, 2003).

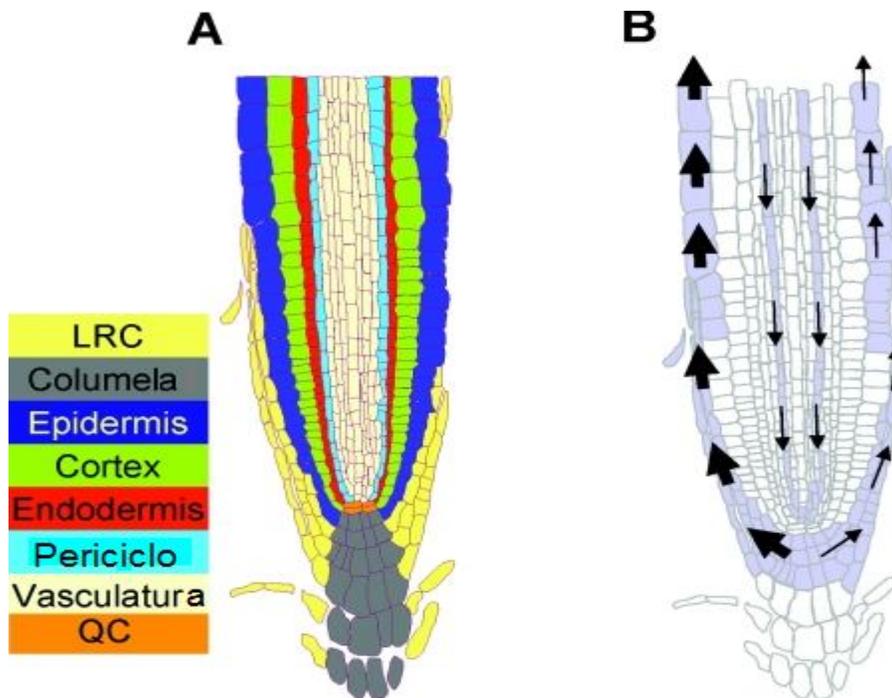


Fig.2. **(A)** Estructura celular y de las capas celulares funcionales del ápice de la raíz de *Arabidopsis*. Abreviaturas: QC, centro quiescente; LRC, cubierta lateral de la raíz. **(B)** La auxina se transporta hacia el ápice de la raíz a través de hileras de células del protofloema y luego, en respuesta a la gravedad, se distribuye asimétricamente como consecuencia de la actividad de las proteínas de influjo auxínico (AUX) y las de eflujo (PIN) que están localizadas polarmente en la cubierta lateral de la raíz. El grosor de las flechas ilustra el flujo relativo de auxina. Kerr y Bennett, 2007.

Existen evidencias que sugieren que el AIA acumulado en el ápice de la raíz puede ser transportado posteriormente en dirección basipétala hacia zonas de elongación y diferenciación radicular, donde es esencial para procesos de elongación celular, gravitropismo, e iniciación y desarrollo de raíces laterales (Rashotte *et al.*, 2000; Casimiro *et al.*, 2001; Swarup *et al.*, 2001; Bhalerao *et al.*, 2002, Kerr y Bennet, 2007). Estos procesos parecen ser dependientes del transporte mediado por los acarreadores de aflujo y eflujo, que dirigen al AIA hacia células específicas en el ápice de la raíz (Swarup *et al.*, 2001; Friml *et al.*, 2002; Benková *et al.*, 2003, citados en Ljung *et al.*, 2005)

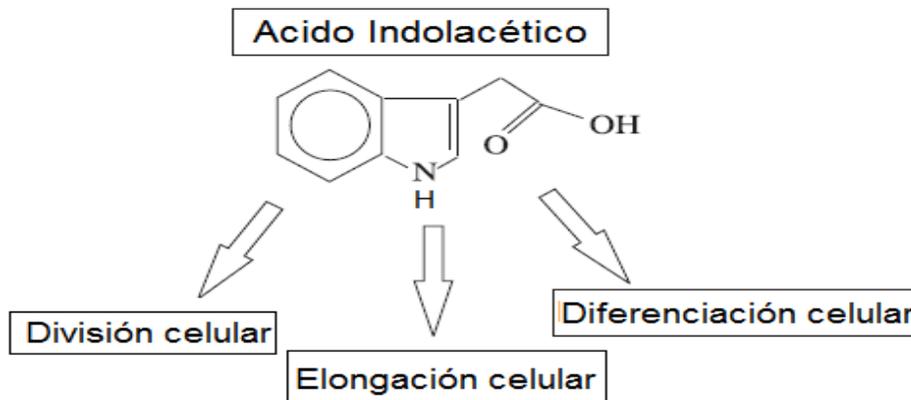


Fig. 3. El ácido indolacético (AIA), la principal auxina en plantas superiores, regula diversos procesos celulares fundamentales que incluyen división, elongación y diferenciación. Bennett *et al.*, 1998.

Rubery, Sheldrake y Raven propusieron, en su hipótesis quimiosmótica, que el transporte polarizado de auxinas es conducido por un gradiente de H^+ entre el citoplasma neutro y el apoplasto ácido, generado por ATPasas en la membrana plasmática. En el apoplasto, un cambio en el equilibrio de la forma ionizada y lipofílica del AIA resulta en la mayor difusión de la auxina en la membrana plasmática y al interior de la célula. En el citoplasma neutro, el AIA se encuentra casi exclusivamente en su forma aniónica (prácticamente impermeable), y solo puede salir de la célula a través de los transportadores de eflujo (Rubery y Sheldrake, 1974; Raven, 1975 citados en Bennett *et al.*, 1998). También contribuye a la entrada del AIA en su forma ionizada a la célula, la actividad de los acarreadores proteicos de influjo pertenecientes a la familia AUX1/LAX (Kerr y Bennet, 2007).

El ácido indol butírico (AIB), de la misma forma que el AIA, se encuentra en formas conjugadas, aunque en niveles significativamente menores (Ludwig-Müller *et al.*, 1993). Ambas fitohormonas pueden ser interconvertidas (Bartel *et al.*, 2001), lo cual sugiere que el AIB posiblemente actúa como un precursor del AIA, como lo han publicado Epstein y Lavee (1984) en *Vitis vinífera*.

El AIA fue la primera fitohormona empleada para estimular el enraizamiento en cortes vegetales (Cooper, 1935 citado en Ludwig-Müller, 2003), no obstante, el AIB se considera la auxina predilecta para inducir la formación de raíces debido a que es más potente en comparación con el AIA u otras auxinas sintéticas

(Ludwig-Müller, 2000). La capacidad superior del AIB para promover la formación de raíces adventicias ha sido atribuida principalmente a tres factores: su capacidad de inducir el movimiento del AIA desde el epicótilo hacia el hipocótilo (Teale *et al.*, 2006); su transformación lenta y continua en AIA (Bartel *et al.*, 2001; Ludwig-Müller, 2000); y su alta estabilidad química, tanto en solución como en tejidos, en comparación con el AIA (Nordström *et al.*, 1991). Sin embargo, aun existen diversas variedades y cultivares en la mayoría de las especies que no responden a tratamientos aplicando AIB; estas diferencias en la capacidad para formar raíces en especies consideradas como de difícil o fácil enraizamiento han sido atribuidas a variaciones en el metabolismo de auxinas (Epstein y Ludwig-Müller, 1993; Blazkova *et al.*, 1997).

ETAPAS DE FORMACION EN EL ENRAIZAMIENTO ADVENTICIO

Diversos estudios básicos sobre la formación de raíces adventicias se han llevado a cabo bajo condiciones *in vitro* (Molassiootis *et al.*, 2004; Vatulescu *et al.*, 2004) así como *in vivo* (Friedman *et al.*, 1985; Jarvis, 1986) con la finalidad de dilucidar y delimitar las fases sucesivas en su formación y regulación. El enraizamiento parece ser un proceso de desarrollo que consta de distintas etapas, cada una con requerimientos y características propias (Kevers *et al.*, 1997). En tal sentido, los eventos fisiológicos que subyacen a la inducción de raíces pueden ser revelados utilizando aproximaciones moleculares; uno de los cambios más notorios en el curso del enraizamiento se presenta en la actividad de enzimas peroxidasas, condición que ha llevado a emplearlas como marcadores dentro de este proceso (Ludwig-Müller, 2003). Particularmente Nag *et al.* (2001) identificaron tres fases que comprenden el proceso de formación de raíces adventicias en hipocótilos de frijol mungo, basándose en niveles endógenos de AIA y actividad de peroxidasas: inducción, iniciación y expresión. El periodo de inducción se caracteriza por una baja actividad peroxidasa que corresponde con un primer pico de AIA presente a las 24 h, indicando el término de la fase de inducción. Un pico en la actividad de peroxidasas y bajos niveles de AIA a las 72 h representa el final de la fase de iniciación. La actividad de peroxidasas declina posteriormente, en la fase de expresión y los niveles de AIA se incrementan lentamente (Fig.4).

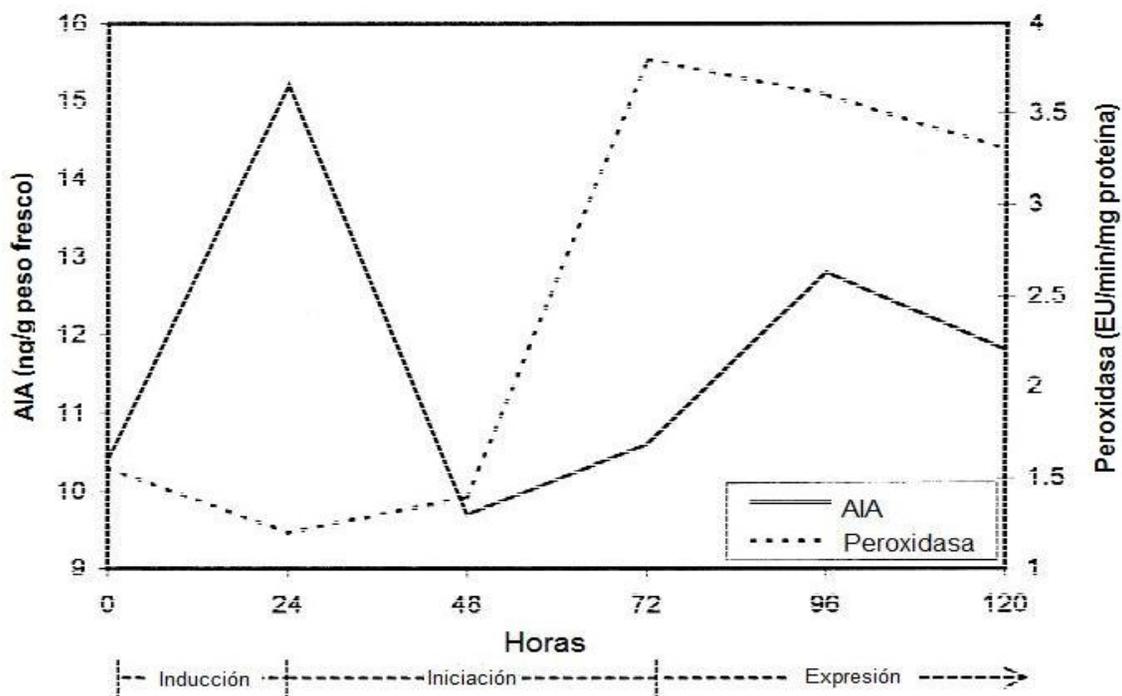


Fig. 4. Fases y duración de la formación de raíces adventicias y su relación con niveles endógenos de AIA y actividad de peroxidasas en hipocótilos de frijol mungo. Imagen de Nag *et al.*, 2001.

PEROXIDASAS

Las peroxidasas son hemoproteínas que presentan la capacidad de transformar al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en H_2O , mediante la oxidación simultánea de una variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos (Veitch, 2004). En general son poco específicas y realizan funciones diversas, entre las que destaca su participación en los mecanismos de defensa, de reparación, de depuración de radicales libres, tolerancia a la salinidad y los relacionados con el control del desarrollo (Valério *et al.*, 2004).

Las peroxidasas han sido clasificadas en tres grandes clases, basándose en la similitud de la secuencia de aminoácidos y en el análisis de su estructura tridimensional (Johri *et al.*, 2005; Passardi *et al.*, 2006): las ascorbato-peroxidasas de plantas, las peroxidasas del citocromo c mitocondriales y las catalasas-peroxidasas bacterianas pertenecen a la misma rama evolutiva de origen procariótico designadas como peroxidasas clase I (EC 1.11.1.5/.6/.7); las

peroxidasas extracelulares de lignina (ligninasas) y las peroxidasas dependientes de manganeso (en las que el Mn^{+2} es el agente reductor) presentes en ejemplares del reino Fungi son consideradas peroxidasas de clase II (EC 1.11.1.13/14) y finalmente a la clase III pertenecen las peroxidasas secretadas por plantas superiores (EC 1.11.1.7); entre ellas se encuentran las peroxidasas extracelulares o las vacuolares (Johri *et al.*, 2005).

Las plantas superiores contienen dos clases de hemo peroxidasas, las clases I y III. La clase I comprende peroxidasas intracelulares, mientras que las de clase III, en casi todos los casos, son secretadas en la pared celular o en el medio circundante, o en la vacuola (Cosío y Dunand, 2009). Ambas peroxidasas comparten la misma estructura general, consisten en una ferriprotoporfirina IX como grupo prostético y diez hélices α . Las peroxidasas clase III presentan tres hélices α adicionales, una región de aminoácidos conservada y cuatro puentes disulfuro. La protoporfirina IX y dos aminoácidos residuales (arginina e histidina) son esenciales para la actividad catalítica de estas peroxidasas que comprende el intercambio de protones y electrones. En el ciclo peroxidativo estándar, las enzimas catalizan la reducción de H_2O_2 al aceptar electrones de diversas moléculas donadoras tales como precursores de lignina, componentes fenólicos, auxinas y metabolitos secundarios (Passardi *et al.*, 2004).

PEROXIDASAS CLASE III Y SU ACTIVIDAD ÁCIDO INDOLACÉTICO OXIDASA

Las peroxidasas de clase III son las principales enzimas que controlan el desarrollo y la diferenciación celular en plantas superiores. Son proteínas salvo raras excepciones, de una sola cadena, comúnmente glicosilada, compuesta aproximadamente de 300 aminoácidos (Kim y Lee, 2005; Jouili *et al.*, 2008). Pueden distinguirse en aniónicas y catiónicas de acuerdo a su movilidad electroforética (Johri *et al.*, 2005). En presencia de H_2O_2 son capaces de oxidar una gran variedad de compuestos aromáticos (Geng *et al.*, 2001 citado en Dogan *et al.*, 2007) especialmente fenólicos, como guayacol, pirogalol, ácido clorogénico, catequina y catecol (Dogan *et al.*, 2007; Murakami *et al.*, 2007). El mecanismo catalítico implica la formación de dos intermediarios denominados

compuestos I y II (Fig. 5), los cuales pueden reaccionar con co-substratos orgánicos, formando finalmente el producto radical.

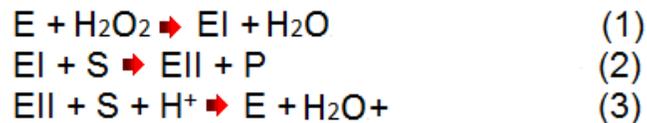


Fig.5. Las peroxididasas clase III catalizan la oxidación de diversos donadores de electrones artificiales y fisiológicos utilizando peróxido de hidrogeno. E, EI y EII son las enzimas nativas, que presentan diferencias en su interacción con la luz por su estado redox, S y P son el sustrato y el producto de la oxidación cuando se transfiere un electrón.

Presentes exclusivamente en plantas superiores bajo diversas formas moleculares, las peroxididasas de clase III parecen estar implicadas en distintos procesos fisiológicos, como son la lignificación y suberización de la pared celular, la deposición de polifenoles, la formación de estructuras papilares, el reforzamiento de la pared por entrecruzamiento de proteínas, oxidación de compuestos fenólicos, la producción de radicales tóxicos (Pérez *et al.*, 2004), la defensa contra agentes patógenos y la elongación celular (Johri *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2007). Particularmente, estas peroxididasas se han encontrado asociadas con el catabolismo del ácido indolacético, la diferenciación de primordios, la vascularización, la generación de paredes celulares y la síntesis de etileno, eventos fisiológicos que pueden afectar la formación de raíces adventicias en distintas etapas de desarrollo (Tartoura, 2001).

Las peroxididasas comprenden múltiples isoenzimas que difieren en la especificidad de sustratos, composición de aminoácidos, propiedades químicas (Grambow, 1986 citado en Terragó *et al.*, 2003) y localización dentro del tejido vegetal (Gaspar *et al.*, 1982 citado en Quesada *et al.*, 1990).

Las isoperoxidasas son capaces de presentar distintas funciones, las cuales pueden estar relacionadas con su distribución diferencial dentro de los tejidos (Gaspar *et al.*, 1982; Okusa *et al.*, 1996 citado en Pérez *et al.*, 2004). Se ha demostrado su localización en paredes celulares, vacuolas (Sánchez y Núñez, 1990a; Jouli *et al.*, 2008; Morales y Ros Barceló, 1997), plasmalema (Mika *et al.*, 2010), citosol (Alexandrov *et al.*, 2009), organelos de transporte y ribosomas (Gaspar *et al.*, 1982). Ocasionalmente se ha reportado actividad en mitocondrias (Pérez *et al.*, 2004; Hadzi-Taskovic Sukalovic y Vuletic, 2003) y cloroplastos

(Pérez *et al.*, 2004), no obstante los estudios citoquímicos no confirman su localización, sugiriéndose que la actividad encontrada es resultado de contaminación por otras fracciones celulares (Gaspar *et al.*, 1982).

Las peroxidasas vegetales, principalmente localizadas en la pared y la vacuola de las células, poseen actividad AIA oxidasa (Sánchez y Núñez 1990a). En términos del catabolismo de AIA, se puede proceder en ausencia (AIA oxidasa) o presencia (AIA peroxidasa) de H₂O₂. Sin embargo, la adición de H₂O₂, a la mezcla de reacción, conduce a un aumento en la tasa de oxidación (Kobayashi *et al.*, 1984). La enzima AIA oxidasa es considerada un elemento del sistema de regulación de la concentración de auxina «*in vivo*», por lo tanto, participa en la regulación del crecimiento (Sanchez y Nuñez 1990a, 1990b; Zheng y van Huystee, 1992). Precisamente, el papel de las peroxidasas en la regulación «*in vivo*» de la concentración de AIA se ha relacionado con situaciones anormales en plantas superiores, como sistema de defensa natural contra el estrés peroxidativo (Mehlhorn y Kumert, 1986 citados en Zheng y van Huystee, 1992), heridas, infecciones, sobredosis de AIA, etc. (Waldrum y Davies, 1981; Machackova *et al.*, 1988 citados en Sánchez y Núñez 1990a)

ANALISIS PROTEOMICOS DE LA PARED CELULAR

La mayor actividad de peroxidasas ocurre en las paredes celulares, donde estas enzimas pueden estar involucradas en la modulación de la rigidez y extensibilidad de la pared. Sin embargo, el rol de las peroxidasas dentro del metabolismo es incierto debido al diverso número de reacciones que catalizan y al número de especies isoenzimáticas (Kim y Lee, 2005). En la pared celular, las peroxidasas se encuentran solubles o unidas por enlaces covalentes o iónicos a otros componentes (Ros Barceló *et al.*, 1988 citado en Riquelme y Cardemil, 1993; Jamet *et al.*, 2006; Feiz *et al.*, 2006), no obstante no existe un acuerdo sobre cuántas o qué tipo de peroxidasas están vinculadas a la pared celular (Evans, 1990).

La proteómica es un enfoque adecuado para identificar proteínas asociadas a la pared celular de plantas superiores (Watson *et al.*, 2004; Boudart *et al.*, 2005; Jamet *et al.*, 2006, 2008). No obstante, uno de los puntos más importantes en el estudio del proteoma de la pared celular continúa siendo la dificultad para aislar proteínas asociadas (Proteínas de la Pared Celular=PPC) reduciendo al mínimo la contaminación por proteínas citosólicas. Por lo tanto, la calidad de un análisis proteómico en su mayoría depende del protocolo de aislamiento empleado. En

este sentido, se han desarrollado dos tipos de procedimientos para extraer proteínas de la pared celular: destructivo y no destructivo (Jamet *et al.*, 2008). Las técnicas no destructivas (no dañan la membrana plasmática durante la extracción de proteínas adheridas iónica o covalentemente) han sido empleadas en *Arabidopsis* (Boudart *et al.*, 2005). Las proteínas débilmente unidas a las paredes celulares han sido extraídas empleando soluciones de baja fuerza iónica, y las fuertemente asociadas por interacciones iónicas han logrado ser recuperadas empleando soluciones con NaCl, LiCl o CaCl₂ (Feiz *et al.*, 2006). A pesar de las dificultades de la extracción y aislamiento de las PPC, en diversos estudios se ha caracterizado el proteoma de las paredes celulares de distintas especies, incluyendo *Arabidopsis* (Boudart *et al.*, 2005), *Zea mays* (Álvarez *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2006), y *Medicago sativa* (Watson *et al.*, 2004). En el caso de *Arabidopsis*, las 400 PPC identificadas pudieron ser categorizadas en diversos grupos funcionales. Dentro de estos, el segundo grupo de proteínas más abundante en la pared celular correspondió a enzimas oxidoreductasas, incluyendo peroxidasas (Chen *et al.*, 2008).

Con relación a las peroxidasas, en distintos estudios se ha establecido su presencia en la pared celular en especies como *Lupinus albus* (*Fabaceae*), *Vitis vinifera* (*Vitaceae*), *Capsicum annuum* (*Solanaceae*), *Lactuca sativa* (*Asteraceae*) y *Catharanthus roseus* (*Apocynaceae*) (Morales y Ros Barceló, 1997). Adicionalmente, se ha reportado la purificación y caracterización parcial de dos peroxidasas catiónicas aisladas de pared celular de semillas y plántulas de *Araucaria araucana* (Riquelme y Cardemil, 1993). Recientemente, Passardi *et al.* (2006) determinaron que dos peroxidasas de clase III asociadas a la pared celular de *Arabidopsis*, Atp_{prx}33 y Atp_{prx}34, se encuentran involucradas en las reacciones que promueven la elongación celular.

La pared celular vegetal es una estructura muy dinámica que controla la forma y elongación celular. En tal virtud, los cambios en la arquitectura celular se atribuyen a las peroxidasas de clase III, que a través de sus dos ciclos catalíticos peroxidativo e hidroxilico pueden detener la elongación a través de la formación de uniones dentro de la pared celular o favorecerla mediante la regulación de la concentración de H₂O₂ o por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que fragmentan las uniones celulares (Passardi *et al.*, 2004). Indirectamente, las peroxidasas también pueden controlar la elongación celular a través de su actividad AIA oxidasa. El AIA puede ser oxidado por dos mecanismos distintos: siguiendo una vía convencional dependiente de H₂O₂ y otra independiente de H₂O₂ que requiere oxígeno (Savitsky *et al.*, 1999 citado en

Passardi *et al.*, 2006). De esta forma, las peroxidasas regulan la concentración de auxinas (Palmieri *et al.*, 1978 citado en Waldrum y Davies, 1981; Chaoui *et al.*, 2003; Günes, 2000) y de forma paralela, los niveles de expresión de peroxidasas son dependientes de la concentración endógena de auxinas (Gaspar *et al.*, 1996).

En esta dirección, la actividad de peroxidasas y su patrón isoenzimático han sido estudiados en relación con el catabolismo del AIA (Gaspar *et al.*, 1994, Saxena *et al.*, 2000 citado en Molassiotis *et al.*, 2004). La evaluación de la localización subcelular de la actividad AIA oxidasa realizada por Waldrum y Davies (1981) en hipocótilos de *Pisum sativum L. var Alaska*, demostró que ésta es escasa o nula en el citoplasma y, por tanto, se juzga poco probable que participe en el control de AIA endógeno, asimismo, reportan que la mayor actividad de la enzima se localizó en organelos y paredes celulares, señalando que esta ubicación es incompatible con su presunta participación en el control del desarrollo, aunque no puede descartarse la función regulatoria de un elemento sólo porque su localización sea extracitoplásmica. Posteriormente, se reportó (Zheng y van Huystee, 1992) la localización de una peroxidasa aniónica en el citoplasma de hipocótilos de cacahuate (*Arachis hypogaea*) que presentó mayor afinidad por AIA y ácido ascórbico en presencia de H₂O₂ que la peroxidasa catiónica de la pared celular aislada del mismo tejido. La peroxidasa catiónica demostró tener un papel importante en las funciones de la pared celular, incluyendo la oxidación de tirosina y feruloil-pentosanos, mientras que se consideró que la peroxidasa aniónica citosólica desarrolla un papel importante en el sistema de defensa en contra del estrés peroxidativo y en el proceso de crecimiento.

En la base de datos Peroxibase, con respecto a peroxidasas de clase III se dispone de las secuencias de aminoácidos predichas por la caracterización de RNAs mensajeros en diversas especies de plantas, entre éstas, *Solanum lycopersicon* (jitomate) ha sido una de las especies estudiadas con mayor extensión, reportándose 62 isoperoxidasas de clase III, sin embargo su localización celular no es definida totalmente, asimismo las isoformas características, la regulación de su actividad catalítica, la naturaleza de su elevado polimorfismo enzimático o, en definitiva, su función son aspectos que aún quedan por dilucidar.

Uno de los métodos para dilucidar las funciones de las peroxidasas de clase III consiste en aislarlas, purificarlas y estudiar el papel funcional de cada enzima

por separado (Johri *et al.*, 2005). Aunque en el aislamiento, debería contemplarse que por ser proteínas de secreción, se excluyeran del estudio a las proteínas intracelulares. En este sentido, disponer de las que se encuentran en el apoplasto y las obtenidas de fracciones conteniendo paredes celulares, con la mayor parte de sus proteínas unidas, sin un grado apreciable de contaminación por proteínas citosólicas, facilitaría su caracterización y localización. Con esto en mente, resulta crucial optimizar protocolos para la extracción y separación de fracciones proteínicas de la pared celular de jitomate. Recientemente se ha reportado que el trabajo con buffers de alta densidad, baja fuerza iónica y pH ácido favorecen fraccionar paredes con estas características (Feiz *et al.*, 2006). Por consiguiente en el presente estudio, se pretende localizar y caracterizar isoperoxidasas con actividad de AIA oxidasa unidas a la pared celular de *Solanum lycopersicon* mediante el empleo de métodos de proteómica de pared celular.

Objetivo general

Aislar isoperoxidasas de tallo, hojas y raíces de *Solanum lycopersicon* variedad Saladet "Reconquista" y comparar su actividad peroxidasa y AIA oxidasa en fracciones enriquecidas de pared celular, obtenidas en tres etapas de desarrollo.

Objetivos particulares

- Evaluar la eficacia de tres métodos utilizados en proteómica para aislar peroxidadas en pared celular de jitomate.
- Obtener los patrones isoenzimáticos de peroxidadas extraídas de paredes celulares de tallos, raíces y hojas de plántulas de jitomate y determinar cuáles bandas presentan actividad AIA oxidasa.
- Comparar la actividad y los patrones isoenzimáticos en tres momentos en el curso del desarrollo de las plantas.

Para cumplir con los objetivos planteados se empleó la siguiente metodología:

Material y Métodos

Obtención de fracciones de paredes celulares

Inicialmente se realizaron ensayos preliminares, empleando distintos métodos de extracción de proteínas de paredes celulares, con la finalidad de determinar el método más adecuado para este proyecto.

NaCl y digestión enzimática para obtener proteínas relacionadas iónica y covalentemente a la pared celular (Método A)

La extracción de las proteínas adheridas a la pared celular se realizó como lo describe Chaoui *et al.* (2003) con algunas modificaciones. El tejido vegetal se homogeneizó con mortero y pistilo en solución amortiguadora (fosfato de potasio 50 mM pH 7 conteniendo ácido ascórbico 5 mM y EDTA 0.2 mM), utilizando por cada gramo de tejido 1 ml de buffer. El homogeneizado se centrifugó a 1300 xg durante 15 minutos en centrífuga refrigerada (Beckman). Inmediatamente, la pastilla resultante se lavó con buffer de extracción para centrifugarse nuevamente, obteniéndose así la pastilla que se consideró como la fracción con paredes celulares. Ambos sobrenadantes fueron almacenados a una temperatura de -70 °C para su posterior análisis. La fracción de proteínas adheridas iónicamente a la pared celular fue obtenida a través de la incubación de la pastilla en buffer cloruro de sodio 1 M en agitación continua durante 2 horas. Transcurrido este lapso, la pastilla dispersada se centrifugó a 13 000 xg durante 15 minutos. El sobrenadante se consideró como la fracción iónica después de ser dializado por 24 horas con el buffer de extracción mientras que la pastilla obtenida se lavó para centrifugarse nuevamente. La pastilla se resuspendió e incubó durante 24 horas en agitación constante, en buffer con 0.1 M de acetato de sodio pH 4.5, 5 mM de ascorbato de sodio adicionando celulasa (EC 3.2.1.4; 4.5 U/ml) y pectinasa (EC 3.2.1.15; 9 U/ml). Transcurrido este tiempo, la mezcla en digestión se centrifugó a 13 000 xg durante 20 minutos. El sobrenadante así como la pastilla se dializaron un periodo de 24 horas contra el buffer de extracción. El dializado del sobrenadante se consideró como la fracción de proteínas unidas covalentemente a la pared celular.

Extracción de proteínas relacionadas iónica y covalentemente a la pared celular empleando CaCl_2 y LiCl (Método B)

El material vegetal se procesó de acuerdo a Feiz *et al.* (2006), con algunos ajustes. Se homogeneizó a una temperatura de 4°C durante 15 segundos en solución buffer (acetato de sodio 5 mM pH 4.6 conteniendo sacarosa 0.4 M y PVP insoluble al 1%). El homogeneizado se centrifugó a 1000 $\times g$ durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. La pastilla se recuperó para centrifugar en dos ocasiones a 1000 $\times g$ durante 15 minutos empleando un buffer de acetato 5 mM pH 4.6, sacarosa 0.4 M. La pastilla resultante se resuspendió a través de papel filtro con presión reducida empleando 2 L de buffer de acetato 5 mM pH 4.6. Posteriormente, la fracción de paredes celulares se sometió a fuerza iónica al resuspender la pastilla en buffer acetato de sodio 5 mM pH 4.6 con CaCl_2 0.2 M en agitación por un lapso de 5 minutos. La pastilla se centrifugó a 4000 $\times g$ por 15 minutos, el sobrenadante se recuperó y almacenó para ser dializado posteriormente mientras que la pastilla se resuspendió durante 5 minutos en agitación en buffer de acetato 5 mM pH 4.6 conteniendo LiCl 2 M y se procedió a centrifugar a 4000 $\times g$ durante 15 minutos; el sobrenadante se recuperó para su posterior diálisis. Ambos sobrenadantes se trataron por separado en membrana de diálisis durante 24 h en 1L de buffer de acetato de sodio 5 mM pH 4.6.

Extracción proteica a través del método de aislamiento de protoplastos por digestión enzimática con la finalidad de separar el apoplasto (Método C)

Este procedimiento consistió en la digestión de las paredes celulares y el aislamiento de protoplastos de acuerdo a Peñalosa (1998), con algunas modificaciones. El tejido vegetal se colocó en cajas Petri para ser plasmolizado en medio PP (Plasmólisis de Protoplastos) 13 M conteniendo: KH_2PO_4 200 μM , KNO_3 1 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM y manitol 0.6 M, pH 5.8 durante 30 minutos, posteriormente se trasladaron a solución fresca PP 13 M conteniendo 1000 U de celulasa y 75 U de pectinasa, manteniéndose en agitación durante 4 hrs a 30°C con la finalidad de digerir las paredes celulares. Se filtró a través de un tamiz de nylon con malla de 60 μm y el filtrado se centrifugó a 10 $\times g$ durante 20 minutos a 10°C. Se separó el sobrenadante para su posterior análisis y la pastilla se resuspendió en 8 ml de sacarosa 0.7 M, repartiendo la suspensión resultante en dos tubos, a cada uno se le añadieron 4 ml de solución conteniendo: sacarosa

350 mM, manitol 300 mM, MES-TRIS 25 mM pH 6.5 y 2 ml de solución con: manitol 0.6 M y MES-TRIS 25 mM pH 6.5 (las soluciones se agregaron cuidadosamente para obtener un gradiente). El gradiente se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos. Los protoplastos fueron extraídos utilizando una pipeta Pasteur, comprobando su presencia al observarlos por microscopía de campo claro. Para cada fracción obtenida empleando los distintos métodos se cuantificaron proteínas por el método de Bradford, realizando la lectura de absorbencia a 595 nm del complejo proteína-azul de coomasie G-250 en un espectrofotómetro, para lo cual se realizó una curva patrón de albúmina de suero de bovino (BSA) con una concentración de 10-50 µg; así mismo se realizaron ensayos de actividad de peroxidasas con o-dianizidina y registro de actividad de AIA oxidasa con uno o más de los siguientes métodos: oximetría y electroforesis en geles de poliacrílida revelando con azul rápido BB Base.

Obtención de material vegetal

Una vez determinado el procedimiento de separación de fracciones de paredes celulares que sería empleado en este estudio se procedió a obtener las plántulas de jitomate.

Aproximadamente 900 semillas certificadas de jitomate (*Solanum lycopersicon* variedad Saladet "Reconquista", Western Seeds) se sumergieron durante 24 horas en agua corriente con el propósito de hidratarlas. Posteriormente se instalaron almácigos en el invernadero de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) localizado en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI) regando cada tercer día con agua corriente y empleando solución nutritiva Hoagland una vez por semana hasta obtener plántulas de 4, 6 y 12 semanas de desarrollo. Una vez transcurrida cada etapa de crecimiento, las hojas, tallos y raíces de las plántulas fueron recolectadas y almacenadas por separado a -70 °C para procesarlas posteriormente utilizando el método de separación de fracciones celulares previamente seleccionado.

Ensayo de actividad peroxidasa (PXs)

La actividad peroxidasa se registró mediante el método espectrofotométrico continuo: se adicionaron 50 µl de cada fracción obtenida a una solución buffer citrato de sodio 50 mM pH 4.8. Se empleó como sustrato reductor o-dianizidina 0.63 mM y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 20 mM como sustrato oxidante. Se

determinó la velocidad de la reacción de oxidación de la o-dianizidina por la enzima, en presencia de H₂O₂, en un espectrofotómetro, registrándose los valores de absorbancia a 450 nm. Se tomó la variación de la densidad óptica en el tiempo, durante dos minutos a intervalos de 2 segundos. La actividad enzimática de peroxidasas se expresó en unidades de absorbancia por minuto miligramo de proteína.

Medición de actividad AIA oxidasa

Se siguió polarográficamente el consumo de oxígeno de las fracciones que registraron una actividad significativa de peroxidasas, con un electrodo tipo Clark (Hansatech mod. CB1D), a 30 °C con una agitación de 200 rpm en la celda. El medio de reacción incluyó buffer acetato de sodio 100 mM pH 4.8, 2,4-diclorofenol (DCP) 1.2 mM, cloruro de manganeso (MnCl₂) 1mM, H₂O₂ al 1% y AIA 10 mM. Se determinó el consumo en nanomoles de oxígeno por minuto por miligramo de proteína.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

La obtención de los patrones isoenzimáticos se efectuó en geles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones no desnaturizantes, con una concentración de 4% para el gel condensador y 12.5 % en el gel separador. La corrida se realizó en un sistema Miniprotean II (Bio-Rad) con una intensidad de 150 V, 50 mA durante una hora empleando TRIS (1X) 2.48 mM, glicina 19.2 mM, pH 8.3. Posteriormente la actividad Px se reveló en el gel al teñirlo a temperatura ambiente durante 30 minutos con una solución de benzidina 3.8 mM y H₂O₂ al 30% en en tampón acetato de sodio/ácido acético 0,5 M (pH 4,6). La actividad AIA oxidasa se reveló al sumergir los geles en un medio conteniendo Solución A (4 mg azul rápido BB Base/ml de etanol), Solución B (0.0041 g de ácido p-cumárico/ml etanol, 0.0044 g de AIA/ml etanol, 12.5 ml de agua y 1 ml de H₂O₂ al 30 % y Solución C (buffer acetato de sodio 0.2 M pH 4.2). Los geles permanecieron en esta solución a temperatura ambiente y en agitación aproximadamente durante 24 hrs. Las imágenes digitalizadas de los geles fueron procesadas con el software GeneTools para la obtención de la intensidad correspondiente, asignándose un valor de 100 a la máxima intensidad. Los geles que revelaron actividad AIA oxidasa no pudieron ser analizados con este programa debido a que la intensidad de las bandas reveladas fue insuficiente.

Los resultados que se describen a continuación, fueron seleccionados como experimentos tipo representativo de un mínimo de dos ensayos y en los casos donde se indique se muestran como el promedio de las repeticiones realizadas

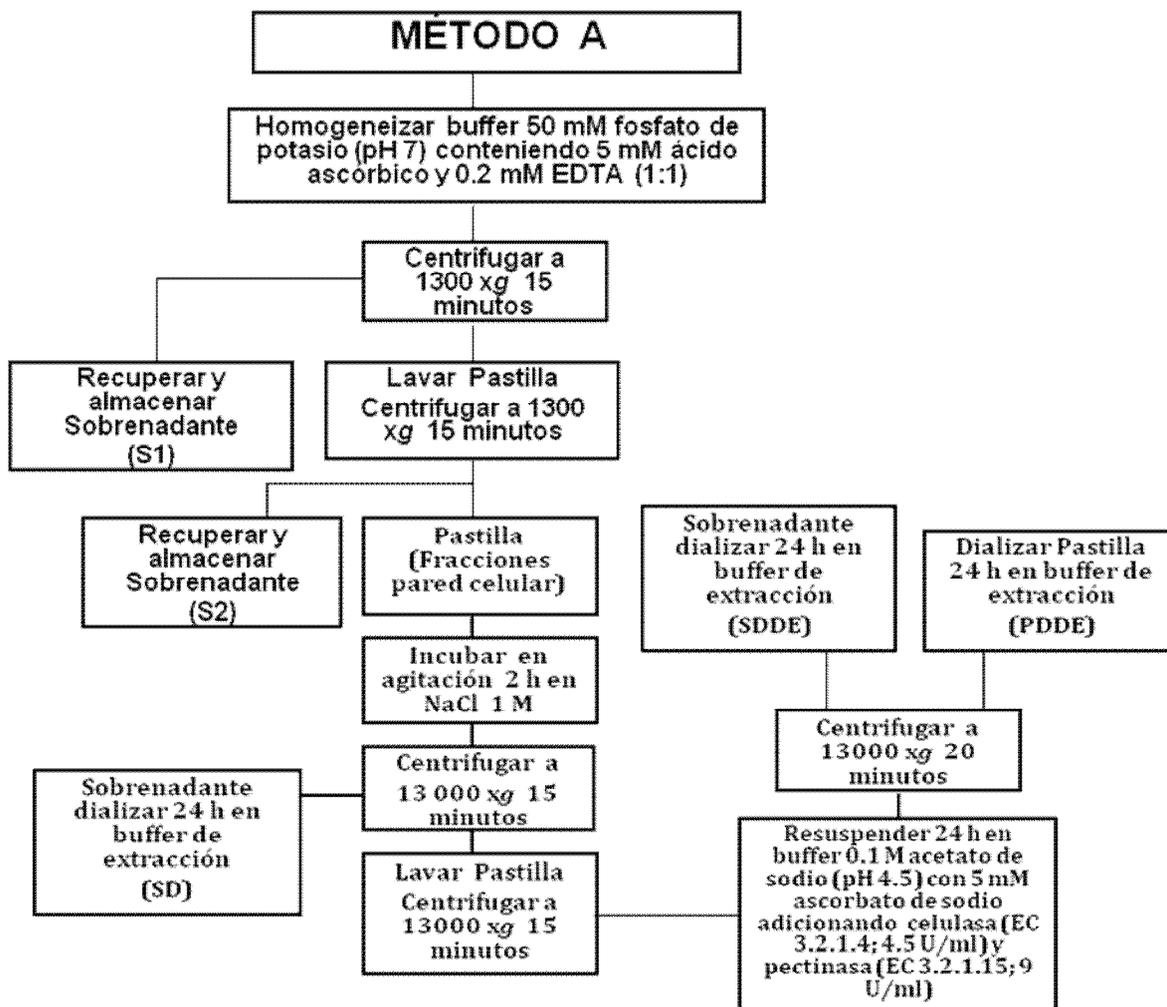


Fig. 6. Método A para la extracción de proteínas de la pared celular de *S. lycopersicon*.

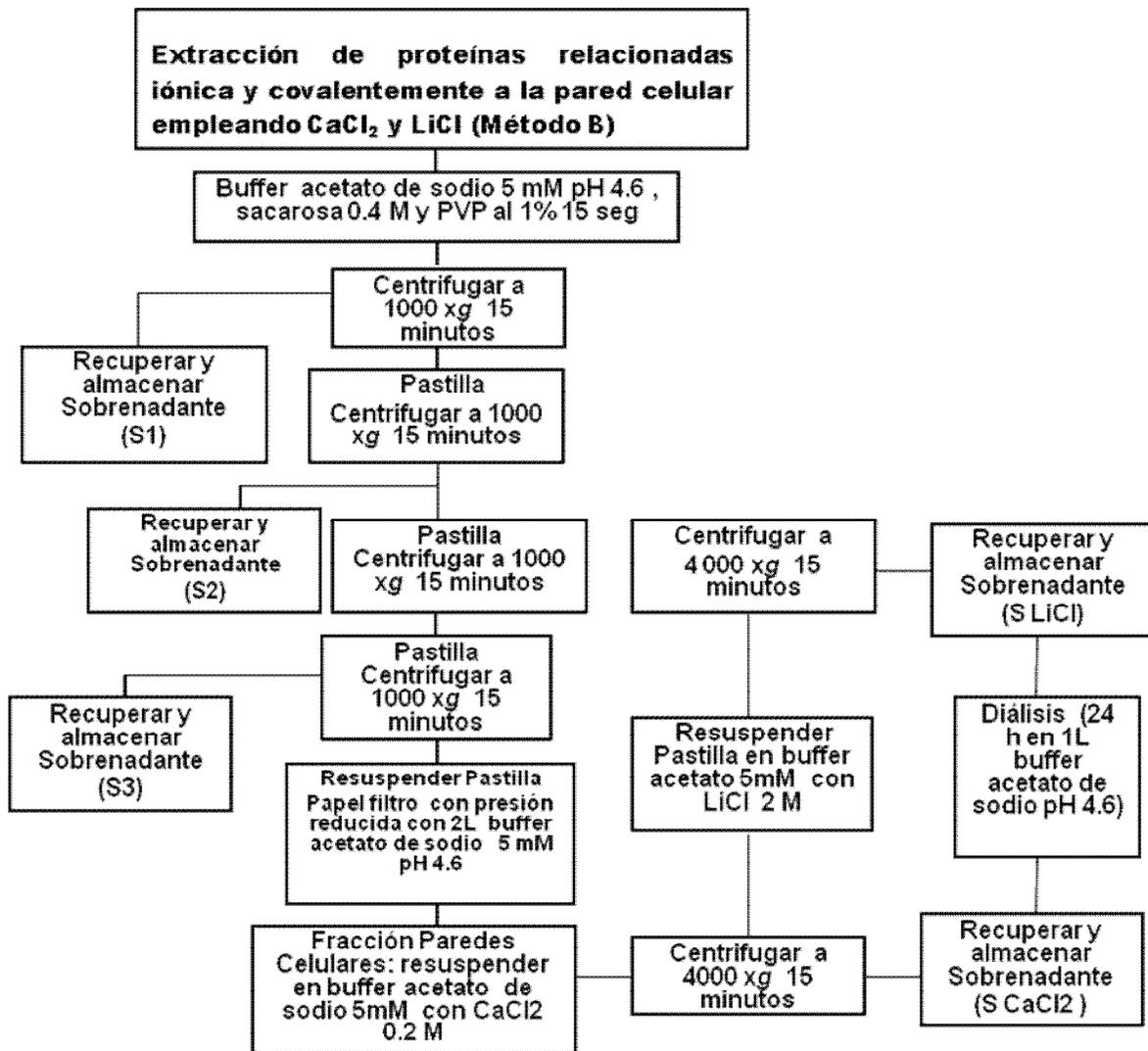


Fig. 7. Método diseñado para la extracción de proteínas de la pared celular de *Solanum lycopersicon* de acuerdo a Feiz *et al.*, 2006.

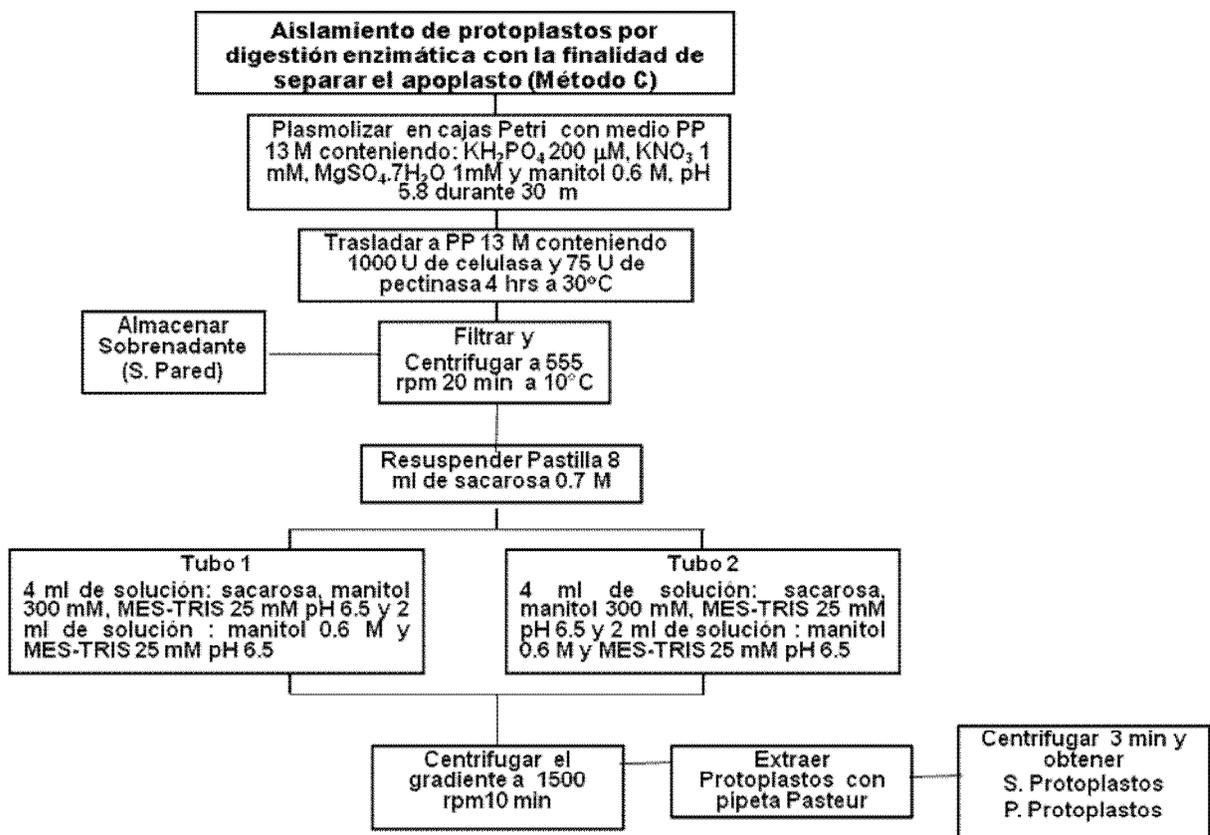


Fig. 8. Procedimiento consistente en la digestión de paredes celulares de *S. lycopersicon* para el aislamiento de protoplastos de acuerdo a Peñalosa, 1998.

Resultados

Extracción de proteínas de la pared celular

Uno de los objetivos de este trabajo fue estandarizar un procedimiento eficiente para el aislamiento de enzimas peroxidasas asociadas a la pared celular de *S. lycopersicon*. Para este propósito se evaluaron tres protocolos de extracción. En el procedimiento A (Fig. 6) las proteínas adheridas a la pared celular fueron extraídas utilizando NaCl y digestión enzimática (Chaoui *et al.*, 2003) mientras que en el método alternativo (B) se emplearon CaCl₂ y LiCl como describe Feiz *et al.*, (2006) en su estudio proteómico en *Arabidopsis* (Fig. 7). El tercer procedimiento (C) consistió en aislar protoplastos utilizando enzimas pectinasa y celulasa para digerir la pared celular (Fig. 8). La eficiencia de los distintos procedimientos se determinó en función a factores de purificación y a los patrones isoenzimáticos obtenidos en geles de poliacrilamida. Los esquemas de purificación de peroxidasas con actividad AIA oxidasa registrada en la pared celular de tejidos de jitomate en distintos estados de desarrollo se muestran en la Cuadro 1.

En el Método A, la fracción S1 corresponde a la extracción de peroxidasas solubles con un buffer conteniendo ácido ascórbico para minimizar la oxidación. En este esquema de purificación la fracción de proteínas unidas iónicamente a la pared celular (SD) se recuperó con NaCl en tanto que las proteínas adheridas covalentemente (SDDE) fueron extraídas después de digerir con celulasa y pectinasa. La actividad peroxidasa no fue preservada completamente en el transcurso del procedimiento de purificación, observándose una pérdida de actividad en la fracción SDDE. La fracción SD registró un valor de 1.356 mg de proteína obtenido a partir de 100 gr de hojas y un factor de purificación de 13. La actividad AIA oxidasa total en la fracción citosólica (S1) de *S. lycopersicon* fue considerablemente mayor que en las fracciones de la pared celular.

En el Método B, los Sobrenadantes 1, 2 y 3 que representan la fracción soluble carecen de registro polarográfico impidiendo la estimación de la actividad específica y factores de purificación, bajo estas circunstancias resulta complicado realizar un análisis completo sobre la eficiencia de los distintos procedimientos. El Sobrenadante CaCl₂ y LiCl presentaron una menor actividad específica en comparación con SD (Método A) que constituye también la fracción relacionada iónicamente a la pared celular.

Cuadro 1. Etapas en el proceso de purificación de peroxidasas solubles y adheridas a la pared celular de tallo y hoja de *Solanum lycopersicon*. El factor de purificación indica el aumento de la actividad específica en relación a la del extracto soluble. El rendimiento representa la recuperación de la actividad enzimática en relación con la actividad total del extracto soluble.

	Fracción	Proteína total mg	Actividad total nmoles O ₂ /min/ mg proteína	Actividad específica nmoles O ₂ / min/mg proteína	Factor de purificación	Rendimiento (%)
METODO A Hoja 12 semanas	Sobrenadante 1 (S1)	75.746	1828.5	24.14	1	100
	Sobrenadante 2 (S2)	1.5062	323	214.45	8.88	17.66
Soluble	NaCl Sobrenadante dializado (SD)	1.356	427.5	315.26	13	23.35
	Sobrenadante dializado después de digestión enzimática (SDDE)	9.6122	123.5	12.85	0.53	6.73
	Pastilla dializada después de digestión enzimática (PDDE)	92.604	0	0	0	0
Pared Celular	Sobrenadante 1	----	----	----	----	----
	Sobrenadante 2	----	----	----	----	----
	Sobrenadante 3	----	----	----	----	----
METODO B Tallo	Sobrenadante CaCl₂	----	----	183.84	----	----
	Sobrenadante LiCl	----	----	172.73	----	----
Soluble	Sobrenadante Pared	1.8018	24.94	13.84	1	100
	Sobrenadante Protoplastos	3.1014	21.37	6.89	0.5	85.69
	Pastilla Protoplastos	4.6251	0	0	0	0
METODO C Hoja 4 semanas						

Extracción proteica con CaCl_2 y LiCl (Método B)

Patrón isoenzimático de peroxidasa y su actividad Ácido indolacético oxidasa

En este método de purificación únicamente se presentan imágenes que evidencian la presencia de isoperoxidasas en las fracciones asociadas con la pared celular de tallo, específicamente por interacciones iónicas: Sobrenadante CaCl_2 y Sobrenadante LiCl .

En la Fig. R1 se observa que ambas fracciones S. CaCl_2 y S. LiCl revelaron tres bandas, éstas fueron identificadas, de acuerdo a su movilidad electroforética como isoformas **a**, **m**, **p**. En Sobrenadante CaCl_2 y Sobrenadante LiCl **a** presentó una intensidad de 17.74 y 2.67 respectivamente. Asimismo, la intensidad de las bandas **m**, **p** se consideró superior en Sobrenadante CaCl_2 en comparación con Sobrenadante LiCl (Fig. R18, R30, R34)

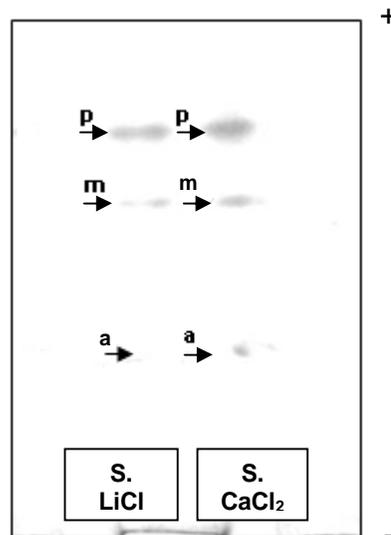


Fig. R1. Actividad peroxidasa de proteínas purificadas de pared celular de tallo de jitomate. En el gel la fracción lavada con CaCl_2 0.2 M contenía 6.2 μg de proteína en tanto que en la fracción correspondiente a LiCl 2M la concentración de proteína fue 6.6 μg .

En la Fig. R2 puede apreciarse que en ambas fracciones las isoperoxidasas **a**, **m**, **p** revelaron actividad auxina oxidasa. Las bandas son más intensas en la fracción Sobrenadante CaCl₂ en comparación con el Sobrenadante LiCl, indicando que una vez que estas isoenzimas se remueven con Ca²⁺, la adición de Li⁺ no contribuye con la misma eficiencia a poner en solución a estas isoenzimas disociándolas de la pared celular de *S. lycopersicon*. La intensidad de la isoperoxidasa **p** (Rf= 0.24) fue superior comparativamente con el resto de las bandas (Fig. R34). Adicionalmente, la banda **p** se reveló únicamente en estas fracciones obtenidas con el Método B.

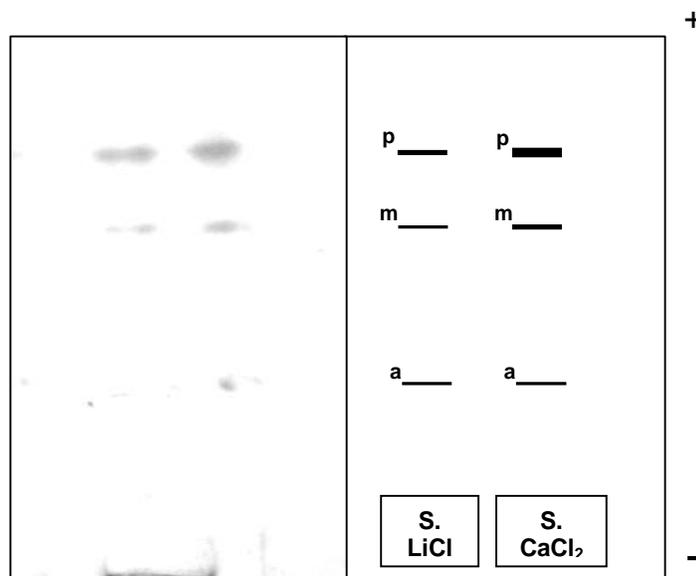


Fig. R2. Zimograma que representa la actividad auxina oxidasa revelada en las fracciones asociadas iónicamente (Sobrenadantes CaCl₂ y LiCl) a la pared celular de tallo de *S. lycopersicon*.

Actividad Peroxidasa y AIA oxidasa

En relación a la actividad peroxidasa evaluada espectrofotométricamente, el Método B permitió registrar valores más altos en las fracciones relacionadas con la pared celular en comparación con fracciones solubles (Cuadro 2). El Sobrenadante CaCl₂, que corresponde a una fracción unida iónicamente a la pared celular, presentó la mayor actividad peroxidasa (10.72 U ABS./min./mg proteína).

El consumo de oxígeno únicamente fue evaluado polarográficamente en las

fracciones Sobrenadante CaCl₂ y Sobrenadante LiCl, presentando un registro de 183.84 nmolesO₂/min/mg proteína y 172.73 nmolesO₂/min/mg proteína, respectivamente.

Cuadro 2. Registro de actividad peroxidasa soluble y en la pared celular de tejidos de tallo de *S. lycopersicon*, obtenidas de acuerdo al Método B.

	Fracción	Actividad Peroxidasa U abs/min/mg proteína
	Soluble	Sobrenadante 1
Sobrenadante 2		6.75
Sobrenadante 3		5.27
Pared celular	Sobrenadante CaCl ₂	10.72
	Sobrenadante LiCl	8.51

Cuadro 3. Isoformas peroxidasa y AIA oxidasa identificadas en los Sobrenadantes CaCl₂ y LiCl (Método B) que representan la fracción de proteínas adheridas a la pared celular de tallo de *S. lycopersicon*. Se eligió un número (1, 2, 3) para indicar el rango de intensidad que expresaron las bandas en los geles de poliacrilamida. **1:** 1-30, **2:** 31-60, **3:** 61-100.

Banda	Rf	Actividad Peroxidasa		Actividad AIA oxidasa	
		S. CaCl ₂	S. LiCl	S. CaCl ₂	S. LiCl
a	0.02	1	1	1	1
m	0.18	1	1	1	1
p	0.24	3	3	3	3

Extracción proteica a través del método de aislamiento de protoplastos por digestión enzimática con la finalidad de separar el apoplasto (Método C)

Para establecer la fracción subcelular en que se localizarían peroxidasa con actividad AIA oxidasa, se obtuvieron extractos proteicos de tejidos de hoja, tallo y raíz de *S. lycopersicon* con cuatro semanas de desarrollo, se cuantificó la actividad peroxidasa (espectrofotométricamente) y AIA oxidasa (registro polarográfico) obteniéndose ambos patrones isoenzimáticos en geles de poliacrilamida no desnaturizantes (Fig. R3 y R4).

Patrón isoenzimático de proteínas con actividad peroxidasa obtenido al aislar protoplastos de *S. lycopersicon* en la cuarta semana de desarrollo

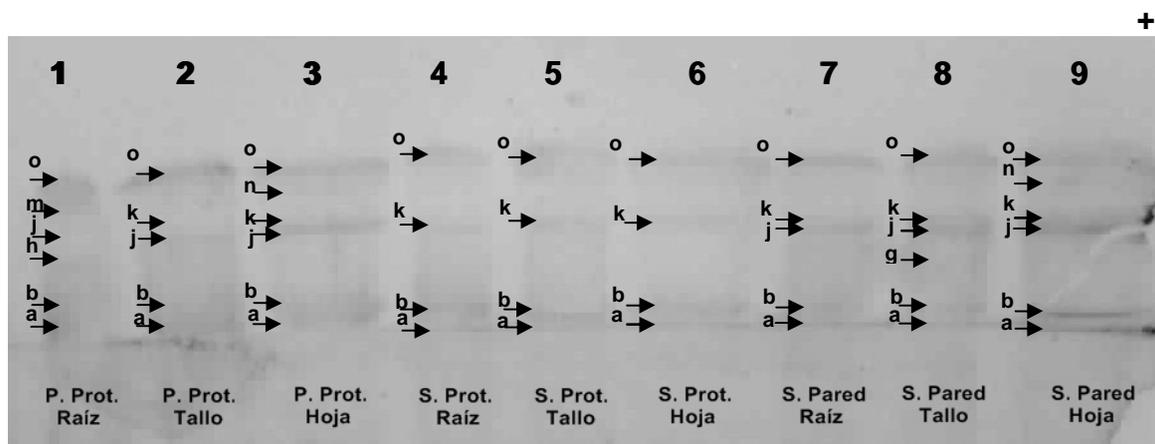


Fig. R3. Patrón isoenzimático de actividad peroxidasa en hoja, tallo y raíz de *S. lycopersicon* con cuatro semanas de desarrollo. Las fracciones se obtuvieron conforme al Método C descrito en Materiales y Métodos. Los carriles 1-6 pertenecen a muestras de protoplastos obtenidos de cada tejido (carriles 1-3 corresponden a las pastillas y 4-6 a los sobrenadantes). Los carriles restantes 7-9 contienen sobrenadantes de digeridos de pared celular. Se representan en el gel el ánodo (+) y el cátodo (-).

El patrón isoenzimático revelado en extractos proteicos obtenidos de tejidos de *S. lycopersicon* que presentan cuatro semanas de desarrollo, exhibió 9 isoformas (Fig. R3, bandas **a**, **b**, **g**, **h**, **j**, **k**, **l**, **m**, **n**). Las bandas **h**, **m** se presentaron únicamente en la fracción protoplastos, derivada de tejidos de raíz (Carril 1); en tallo la banda **g** se visualizó específicamente en la fracción que

correspondería a proteínas relacionadas con la pared celular (Carril 8). El patrón electroforético obtenido en hoja estableció que la isoforma **n** se presentó exclusivamente en las fracciones correspondientes al apoplasto y a protoplastos aislados (Carriles 3 y 9). Las isoperoxidasas **a**, **b**, **k** y **o** se revelaron en cada una de las fracciones. La banda **j** no se evidenció en las fracciones S. Protoplastos de hoja, tallo y raíz lo que sugeriría que esta isoperoxidasa se localiza en el apoplasto. La intensidad de las bandas **a** y **b**, respecto al resto de las fracciones, fue ligeramente más intensa en la pared celular de hoja (Fig. R18-R19, Método C), sugiriendo que ambas isoformas se hallan asociadas a esta estructura.

Patrón isoenzimático de peroxidadas con actividad Acido indolacético oxidasa obtenido al aislar protoplastos de *S. lycopersicon* con cuatro semanas de desarrollo

La figura R4 presenta el gel de poliacrilamida que reveló actividad AIA oxidasa presente en tejidos de hoja y tallo de plántulas de jitomate con 4 semanas de desarrollo. Los carriles 8 y 9 correspondientes a los sobrenadantes de tejidos de hoja y tallo digeridos con celulasa y pectinasa, exhibieron la isoperoxidasa **j** identificada previamente, indicando que, específicamente localizadas en el apoplasto de hoja y tallo en esta etapa de desarrollo existen isoperoxidasas aniónicas con la capacidad de oxidar a la auxina AIA. Adicionalmente, los carriles 2 y 3 que contuvieron fracciones de protoplastos aislados de hoja y tallo revelaron, respectivamente una banda de ligera intensidad y distinta movilidad en comparación a las bandas apreciadas en los carriles 8 y 9; estas bandas se correlacionaron en términos de movilidad electroforética con la isoperoxidasa **o**, sugiriendo la posibilidad de que en ambos tejidos se localicen isoperoxidasas solubles y relacionadas al apoplasto con la capacidad de oxidar AIA. En el gel no se observaron bandas que proporcionen evidencia de actividad AIA oxidasa en las fracciones obtenidas del tejido radical.

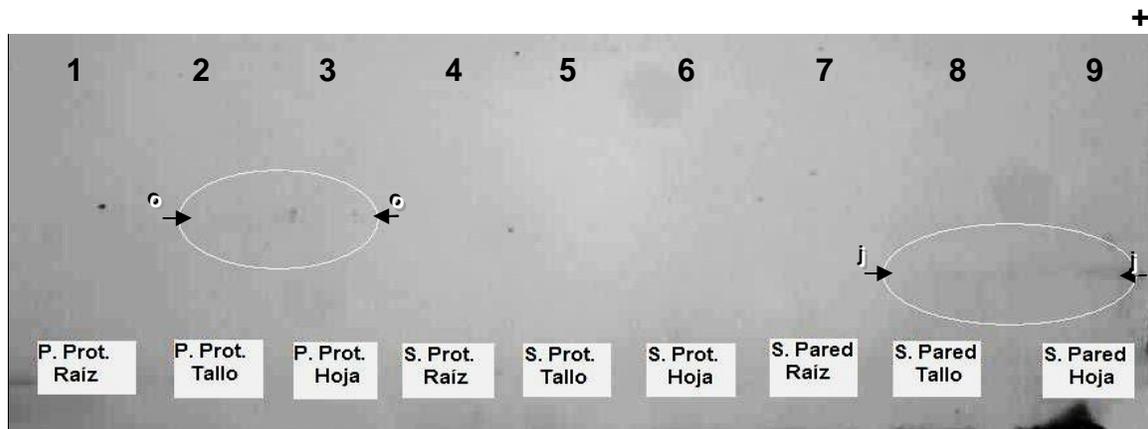


Figura R4. Perfil isoenzimático de actividad AIA oxidasa en hoja, tallo y raíz de *S. lycopersicon* de cuatro semanas de desarrollo. Las fracciones se obtuvieron siguiendo el protocolo diseñado para aislar protoplastos. Los carriles 1-3 contienen sobrenadantes de digeridos de pared celular. Los carriles restantes pertenecen a muestras de protoplastos (carriles 4-6 corresponden a los sobrenadantes y 7-9 a las pastillas). La actividad AIA oxidasa fue revelada con azul rápido BB base. Se representan en el gel el ánodo (+) y el cátodo (-).

Actividad Peroxidasa y AIA oxidasa

En relación con la actividad peroxidasa evaluada espectrofotométricamente, la muestra correspondiente al sobrenadante del digerido de pared celular de raíz exhibió mayor actividad con respecto al resto de las fracciones; el mismo caso se presentó en el consumo de $\text{nmoles O}_2/\text{mg proteína}/\text{min}$. Los valores más bajos de actividad peroxidasa y consumo de O_2 ($\text{nmoles}/\text{mg proteína}/\text{min}$) se registraron en la pastilla de protoplastos aislados de tejidos de hoja, tal como se muestra en el Cuadro 4. Estos resultados indicarían que en raíz se presenta menor actividad peroxidasa así como actividad AIA oxidasa en el citoplasma, en comparación con las actividades enzimáticas registradas en la fracción derivada del apoplasto.

Cuadro 4. Actividad Peroxidasa en U ABS/min/mg proteína y Actividad AIA oxidasa expresada como consumo de nmolesO₂/min/mg proteína en extractos proteicos de *S. lycopersicon* obtenidos con el Método C.

Fracción		Actividad peroxidasa (U ABS/min/mg proteína)	Actividad AIA oxidasa (nmolesO ₂ /min/mg proteína)
Sobrenadante Pared	Hoja	3.12	13.84 ± 1.98
	Tallo	1.27	15.53
	Raíz	9.3	21.6±0
Sobrenadante Protoplasto	Hoja	3.2	6.89±0
	Tallo	2.45	4.155±0.595
	Raíz	5.6	11.25
Pastilla Protoplasto	Hoja	0.84	0
	Tallo	1.24	2.29
	Raíz	-----	9.87

Cuadro 5. Método C: Isoformas peroxidasa y AIA oxidasa identificadas en fracciones correspondientes a proteínas intracelulares (I) o asociadas al apoplasto (A) de *Solanum lycopersicon* con cuatro semanas de desarrollo. Se eligió un número (1, 2, 3) para indicar el rango de intensidad que expresaron las bandas en los geles de poliacrilamida. 1: 1-30, 2: 31-60, 3: 61-100.

Banda	Rf	Actividad peroxidasa						Actividad AIA oxidasa					
		Hoja		Tallo		Raíz		Hoja		Tallo		Raíz	
		I	A	I	A	I	A	I	A	I	A	I	A
a	0.02	1	2	2	1	1	1						
b	0.04	1	3	1	1	2	1						
g	0.10				1								
h	0.12					1							
j	0.13	1	3	1	1	1	1	1		1		1	
k	0.15	2	3	1	1	1	1						
m	0.18					1							
n	0.19	1	2										
o	0.22	2	3	3	2	2	2	1		1			

Localización subcelular de peroxidasas determinadas con el Método A de extracción de proteínas asociadas a la pared celular de hoja, tallo y raíz de *S. lycopersicon* y su variación con el desarrollo

Una vez efectuados los distintos procedimientos diseñados para obtener proteínas de pared celular, se determinó que, para fines de este trabajo, las mejores condiciones de extracción y registro de actividad AIA oxidasa se obtuvieron con el Método A.

Dada la importancia de las peroxidasas en los procesos de crecimiento, se pretendió estudiar el perfil isoenzimático en tres momentos del desarrollo. Para la caracterización del patrón isoenzimático de peroxidasas en extractos proteicos de *S. lycopersicon* obtenidos a las 4, 6 y 12 semanas de desarrollo, en particular aquellas que presenten actividad AIA oxidasa en la pared celular, se utilizaron técnicas electroforéticas aunadas al procedimiento de aislamiento de proteínas de la pared celular. Adicionalmente, se cuantificaron la actividad peroxidasa (espectrofotométricamente) y AIA oxidasa (registro polarográfico).

Patrón isoenzimático de peroxidasas en *S. lycopersicon* de 4, 6 y 12 semanas de desarrollo

Actividad peroxidasa de *S. lycopersicon* revelada en la cuarta semana de desarrollo

Los tejidos analizados presentaron, en el periodo de crecimiento correspondiente a cuatro semanas, diez isoenzimas peroxidasa (Fig. R5). Empleando este protocolo de purificación se obtuvo un patrón isoenzimático distinto al presentado previamente (Fig. R3), observándose variantes isoenzimáticas que difieren en movilidad electroforética e intensidad. El perfil isoenzimático de peroxidasas indicó que en la cuarta semana de desarrollo aparecen las bandas **c** y **l** mientras que la isoforma **m** no es evidente. La isoperoxidasa **j** únicamente fue visualizada en la fracción de hoja relacionada con peroxidasas solubles (S1H).

En tejidos de raíz fue posible determinar la existencia de dos isoperoxidasas asociadas a la pared celular. En la fracción SDR, la isoperoxidasa **a** se apreció con mayor intensidad indicando que se encuentra asociada iónicamente a la pared celular (Fig. R18, Método A cuatro semanas). Adicionalmente, la isoforma **h** exhibió una mayor intensidad en la fracción citoplasmica S1R aunque la intensidad ligeramente inferior observada en la fracción SDDER (Fig. R25)

sugiere una relación, determinada por interacciones covalentes, con la pared celular.

En este trabajo se analizó la fracción PDDE a pesar de que ésta no señala la presencia de isoperoxidasas relacionadas a la pared celular, la existencia de bandas en esta fracción podría indicar un cierto grado de contaminación al ser conservados en la muestra restos de la pared u otros elementos celulares como lo es el caso de la banda **h** en PDDER, que registró la intensidad más alta en esta etapa de desarrollo (Fig. R25).

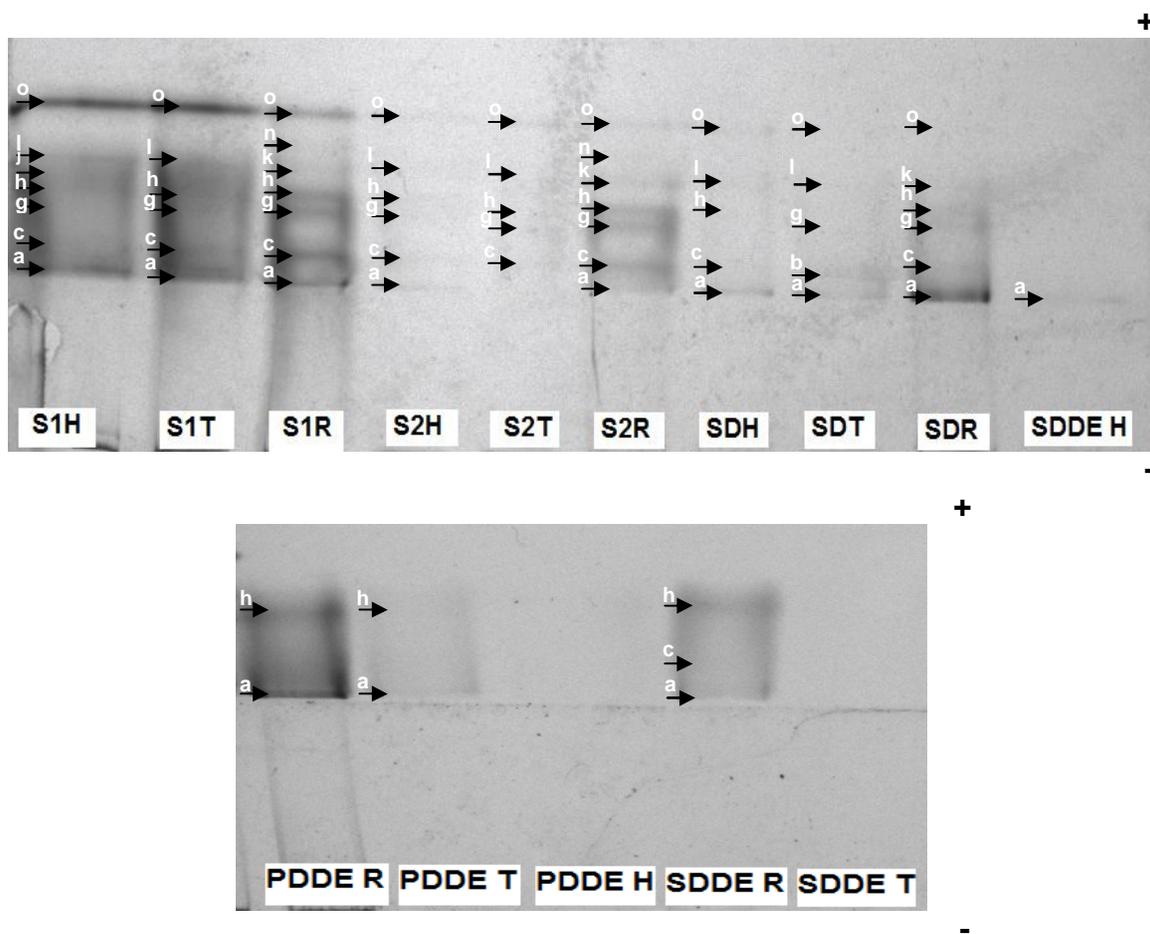


Fig. R5. Patrón isoenzimático de peroxidasas presentes en tejidos de hoja, tallo y raíz de jitomate en su cuarta semana de desarrollo. Las fracciones S1 y S2 corresponden a isoperoxidasas solubles. Las fracciones SD y SDDE incluyen respectivamente peroxidasas relacionadas iónica y covalentemente a la pared celular.

Actividad peroxidasa de *S. lycopersicon* revelada en la sexta semana de desarrollo

El patrón isoenzimático obtenido en esta etapa de desarrollo únicamente reveló ocho isoperoxidasas presentes en los extractos proteicos derivados de tejidos de hoja, tallo y raíz (Fig. R6). Con el transcurso de dos semanas, las bandas **d**, **e**, **f**, se hicieron visibles, no obstante las bandas **c**, **n**, **o** no fueron detectadas en el gel. Como se observa en el perfil isoenzimático, la intensidad de las bandas (concentración isoenzimática) fue variable entre las isoformas que se localizan en un mismo tejido así mismo difiere entre una enzima en particular visualizada en órganos distintos. La banda **a** presentó una intensidad de 46.25 en la fracción SDR en tanto que en S1R registró un valor de 71.57 (Fig. R18, Método A seis semanas), indicando probablemente que la isoforma se asocia a la pared celular, específicamente por interacciones iónicas y en una mayor proporción presenta una localización soluble. Adicionalmente, las isoformas **a**, **k** se presentaron más intensas en la fracción SDT en comparación con la fracción soluble S1T, indicando su asociación de tipo iónica con la pared celular (Fig. R18, R28). Con respecto a tejidos de hoja, el número de bandas apreciadas en la fracción iónicamente adherida a la pared celular (SDH) no varía respecto a las isoformas visualizadas en la fracción de peroxidadas solubles (S1H), no obstante cada banda (**a**, **b**, **e**, **h**, **j**, **k**) registró una intensidad superior en esta última fracción sugiriendo que estas isoperoxidasas mantienen una dinámica de asociación-disociación, que en esta fase del desarrollo favorece una mayor proporción de isoperoxidasas solubles (Fig. R18, R19, R22, R25, R27, R28). En la fracción que se obtuvo después de digerir la pared celular (SDDEH) únicamente la isoforma **k** se reveló con una intensidad de 86.51 (Fig. R28), denotando que exclusivamente esta isoenzima se ubica tanto en la porción soluble (apoplasto) como en la pared celular, manteniendo una asociación tal, que sólo se puede remover después de digerir celulosa y pectina. En la fracción PDDE, obtenida de los tres tejidos estudiados en este trabajo, se visualizaron algunas bandas, lo que podría indicar que durante el aislamiento existió un cierto grado de contaminación al ser conservados en la muestra restos de la pared u otros elementos celulares.

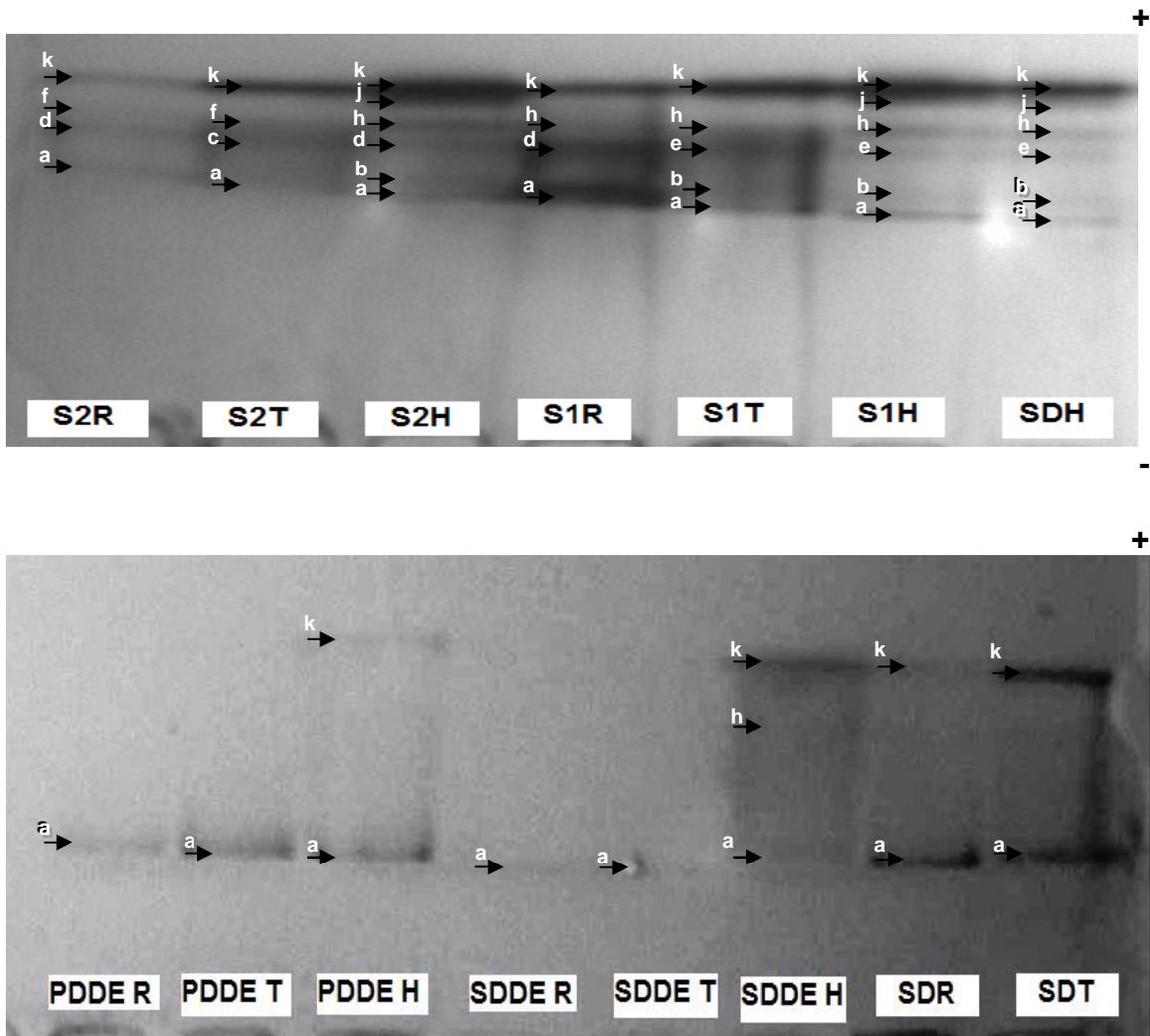


Fig. R6. Patrón isoenzimático que representa las peroxididasas reveladas en las distintas fracciones de hoja, tallo y raíz de jitomate de seis semanas de desarrollo obtenidas con el Método A de purificación de paredes celulares.

Actividad peroxidasa de *S. lycopersicon* revelada en la duodécima semana de desarrollo

En la fase de desarrollo correspondiente a doce semanas se obtuvo un perfil electroforético más completo, conformado por 12 isoperoxididasas (Fig. R7). En tejidos de raíz, la fracción soluble presentó un número de isoformas superior (10) al observado en otros órganos en etapas anteriores. La banda **a** se reveló

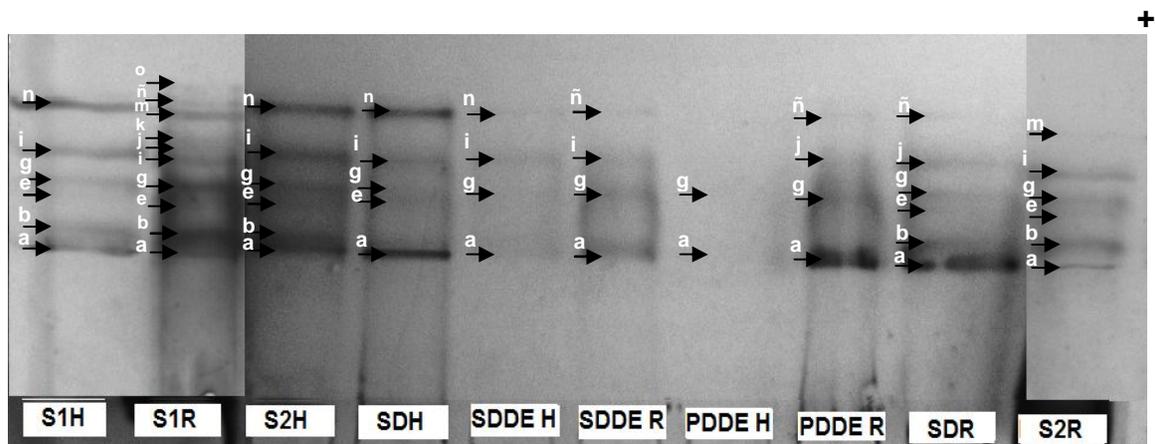
con una intensidad superior (Fig. R18) en los extractos proteicos que representan la fracción unida iónicamente (SDR) y la obtenida después de digerir paredes celulares (SDDER), en comparación con la demostrada en la fracción soluble (S1R), sugiriendo que en la etapa de crecimiento correspondiente a 12 semanas, esta isoenzima se asocia en mayor proporción a las paredes, probablemente mediante su interacción iónica; una posible explicación es que la mayor proporción de la isoenzima unida resulta de una adhesión con mayor fuerza a la pared celular, consecuentemente, no es posible removerla por completo, y sólo al digerir esta estructura, se logra extraer la actividad remanente; en etapas previas de desarrollo, en este órgano, la isoperoxidasa **a** se consideró unida iónicamente a la pared, por lo que en el curso del desarrollo hay cambios en la pared o en la isoenzima que provocan una mayor dificultad para removerla con soluciones de alta fuerza iónica.

En hoja, la isoforma **a** se apreció con mayor intensidad en la fracción SDH en comparación con S1H (Fig. R18); aparentemente en este órgano, específicamente en la duodécima semana de desarrollo, una mínima proporción de la isoperoxidasa **a** se encuentra soluble en el apoplasto, y la mayor proporción se encuentra adherida por enlaces iónicos a la pared celular. Por otra parte, las bandas **b**, **i** se localizan en la fracción soluble (apoplástica); la banda **n** presentó una intensidad de 60.82 y 44.53 en las fracciones S1H y SDH (Fig. R31), respectivamente, sugiriendo que se trata de una isoperoxidasa que también presenta un equilibrio de asociación-disociación.

En cuanto a las isoperoxidasas detectadas en tallo, la fracción soluble exhibió bandas muy intensas (**b**, **o**, **a**). La banda **a** se reveló ligeramente más intensa en esta fracción en contraste con lo observado en la fracción SDDER (Fig. R18); determinándose que, probablemente la isoforma **a** no se encuentra unida con mayor afinidad a la pared celular de este órgano, de tal manera que tras la digestión se puede solubilizar una proporción de la actividad; en la fracción iónicamente adherida a la pared celular (SD) no fue posible evaluar la existencia de isoenzimas, debido a que la concentración de proteína en la muestra resultó insuficiente. Adicionalmente la isoforma **b** se encuentra disuelta probablemente en el apoplasto; la banda **i** es menos activa en relación con las bandas **a**, **b**, y su presencia en la fracción soluble es similar a la isoperoxidasa **b**, considerándose la posibilidad de que en su mayor parte se encuentre disuelta en el apoplasto. La banda **o** presenta un comportamiento semejante al presentado por la isoforma **a**, en cierta proporción se mantiene adherida a la pared celular aun después de digerir con enzimas celulasa y pectinasa.

Al analizar los perfiles isoenzimáticos revelados en las distintas etapas de desarrollo se determinó que la banda **c** sólo es visualizada en el periodo de crecimiento que comprende 4 semanas, en tanto que las bandas **d**, **f**, exclusivamente son apreciadas en el gel correspondiente a seis semanas. Al transcurrir doce semanas de desarrollo, las bandas **j**, **n**, **o**, evidentes previamente en la cuarta semana, se visualizan nuevamente. La banda **h** observada en la cuarta y sexta semana deja de apreciarse en plantas con doce semanas de desarrollo, sin embargo la presencia de las bandas **i**, **m**, **ñ**, se limita únicamente a esta etapa del desarrollo.

En general, las fracciones analizadas en las tres regiones de *S. lycopersicon* mostraron variaciones en cuanto al número e intensidad de las bandas en un mismo tejido en el transcurso de su desarrollo.



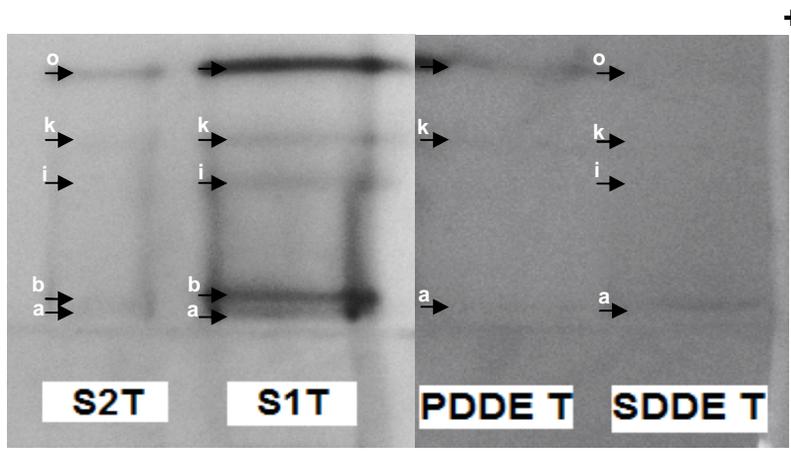


Fig. R7. Actividad peroxidasa revelada en fracciones obtenidas de fragmentos de hoja, tallo y raíz de 12 semanas de edad. La fracción de proteínas adheridas iónicamente a la pared celular (SD) de tallo no fue incluida en el gel debido a la concentración insuficiente de proteína.

Expresión de isoperoxidasas con actividad de Acido indolacético oxidasa en *S. lycopersicon* de 4, 6 y 12 semanas de edad

Actividad AIA oxidasa revelada en jitomate con 4 semanas de desarrollo

La distribución de los patrones isoenzimáticos con actividad peroxidasa observada en tejidos de jitomate se comparó con el patrón de actividad AIA oxidasa obtenido en los mismos extractos proteicos.

Los geles de poliacrilamida realizados con los distintos extractos proteicos obtenidos de segmentos de hoja, tallo y raíz correspondientes a cuatro semanas de desarrollo, revelaron únicamente en la fracción SDH la presencia de una banda (Fig.R8). La movilidad de esta isoenzima es semejante a la banda identificada con la letra **a** en el perfil electroforético realizado para evidenciar actividad peroxidasa (Fig. R5), indicando que en la pared de hoja, asociada por enlaces iónicos, existe una isoperoxidasa que posee adicionalmente la capacidad de oxidar AIA.

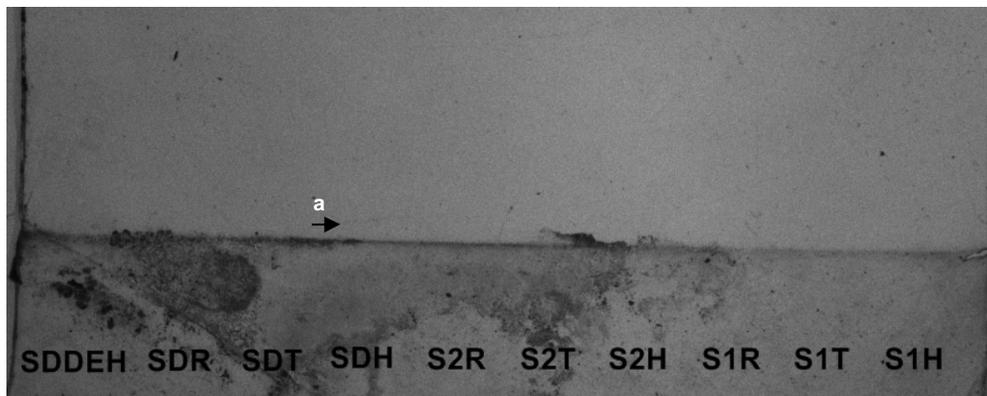


Fig. R8. Actividad AIA oxidasa revelada en la fracción iónicamente adherida a la pared celular de tejidos de hoja obtenida de *Solanum lycopersicon* en la cuarta semana de desarrollo.

Actividad AIA oxidasa revelada en jitomate con 6 semanas de desarrollo

La posibilidad de que la actividad AIA oxidasa, revelada en extractos proteicos correspondientes a seis semanas de desarrollo, se relacione con la expresión de actividad peroxidasa fue examinada al comparar el comportamiento electroforético de las isoformas reveladas en ambos geles. En esta etapa de desarrollo se evidenció que existe una isoenzima peroxidasa, asociada iónicamente a la pared celular de tejidos de tallo y raíz de *S. lycopersicon* (fracciones SDT y SDR, Fig. R9), que presenta la capacidad de oxidar AIA. La movilidad electroforética de esta banda también correspondió con la isoforma **a**. En la fracción soluble de estos tejidos no se encontró evidencia que sugiriera actividad AIA oxidasa.



Fig. R9. Actividad AIA oxidasa revelada en muestras correspondientes a extractos proteicos de la pared celular de tallo y raíz de *Solanum lycopersicon* en la sexta semana de desarrollo.

Actividad AIA oxidasa revelada en jitomate de 12 semanas de desarrollo

En fracciones obtenidas de tejidos de tallo de doce semanas de desarrollo se evidenció, en la fracción S1, la presencia de una banda relativamente intensa muy próxima al cátodo que sugiere la existencia de actividad AIA oxidasa en la fracción soluble (citoplasma o solución que riega a las paredes) (Fig.R9). La movilidad expresada por esta banda fue consistente con una isoenzima identificada previamente en el patrón realizado para revelar actividad peroxidasa (banda **a** en S1 Fig. R7). En las fracción SDDE no se observaron bandas que indiquen actividad auxina oxidasa asociada a la pared celular, por consiguiente es posible argumentar que en tejidos de tallo, específicamente en la fracción soluble existe una isoperoxidasa que exhibe la capacidad de catalizar la oxidación de AIA.

En la Fig. R10 se observa que los carriles correspondientes a las fracciones S1 y SDDE, obtenidas de tejidos de raíz, presentaron, respectivamente una banda con actividad AIA oxidasa. En el carril que representa la fracción soluble (S1) la banda apareció más cercana al cátodo y de mayor intensidad que la isoenzima revelada en la fracción de proteínas asociadas covalentemente a la pared celular (SDDE). La banda apreciada en S1 coincidió en términos de movilidad electroforética con la banda **g** revelada en la fracción S1R (Fig. R7), en tanto que la banda visualizada en el carril SDDE fue consistente con la banda **i**. En el caso

de las fracciones procedentes de segmentos de hoja, los geles no mostraron bandas que indicaran la presencia de isoenzimas con actividad AIA oxidasa derivadas de la fracción soluble o asociadas a la pared celular.

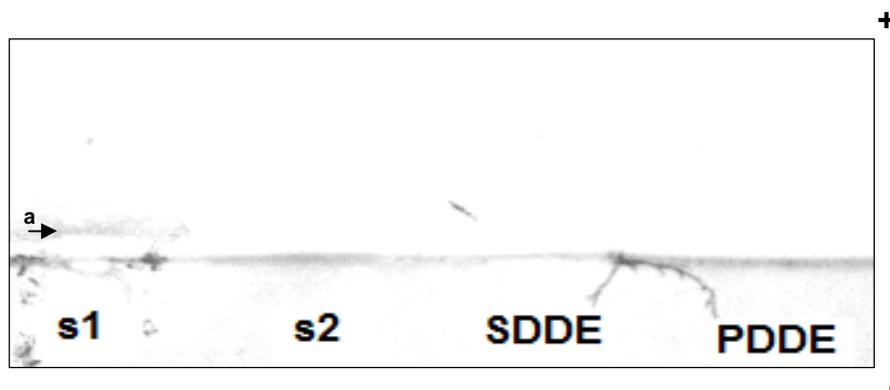


Fig. R10. Isoenzima en la fracción soluble con actividad AIA oxidasa en tallo de jitomate de 12 semanas de desarrollo.

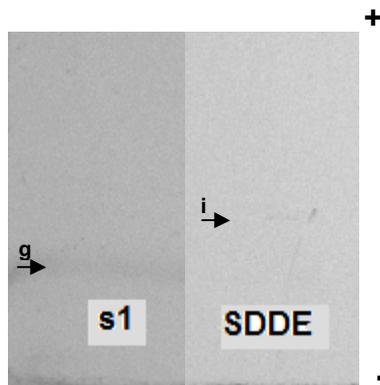


Fig. R11. Isoenzimas de peroxidasa con actividad AIA oxidasa en raíz de jitomate de 12 semanas de desarrollo.

Cuadro 6. Isoformas peroxidasa y AIA oxidasa identificadas en la fracción soluble o en la pared celular de *Solanum lycopersicon* para el periodo de cuatro, seis y doce semanas de desarrollo (Método A). Se eligió un número (1, 2, 3) para indicar el rango de intensidad que expresaron las bandas en los geles de poliacrilamida. **1:** 1-30, **2:** 31-60, **3:** 61-100.

Banda	Rf	Actividad Peroxidasa									Actividad AIA oxidasa								
		Hoja			Tallo			Raíz			Hoja			Tallo			Raíz		
		4s	6s	12s	4s	6s	12s	4s	6s	12s	4s	6s	12s	4s	6s	12s	4s	6s	12s
a	0.02	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1				1	1		1	
b	0.04		1	1	1	1	1			2									
c	0.05	1			1	1		2											
d	0.07		1						1										
e	0.08		1	1		1				1									
f	0.09					1			1										
g	0.10	1		1	1			1		1								1	
h	0.12	1	1		1	1		2	1										
i	0.13			1			1				1							1	
j	0.14	1	1															1	
k	0.15		3			3	1	1	1	1									
l	0.16	1			2														
m	0.18																	1	
n	0.19			2				1											
ñ	0.20																	1	
o	0.22	1			2		2	1		1									

Actividad peroxidasa en hoja, tallo y raíz de jitomate evaluada en tres etapas de desarrollo

Las fracciones obtenidas en las distintas etapas de desarrollo de *S. lycopersicon* mostraron en su mayoría actividad peroxidasa en el ensayo con o-dianizidina.

En general, la fracción PDDE presentó alta actividad peroxidasa. No obstante, en esta etapa de extracción se considera que existe cierto grado de contaminación, al ser conservados en la muestra restos de la pared u otros elementos celulares.

El tejido radical, en la duodécima semana de desarrollo registró en la fracción soluble, la mayor actividad peroxidasa (28 U ABS/min/mg proteína), adicionalmente la actividad peroxidasa en las fracciones correspondientes a peroxidasas adheridas iónica y covalentemente a la pared (SD y SDDE) fue 1.1 y 1.2 U ABS/min/mg proteína (Fig. R14).

Respecto a los tejidos de hoja, la actividad peroxidasa es mínima en la cuarta y duodécima semana de desarrollo. Los valores más altos se observan en la sexta semana de desarrollo. En este periodo la actividad registrada en la fracción S1 que representa a peroxidasas solubles, fue mayor en comparación con las fracciones asociadas iónica y covalentemente con la pared celular (Fig. R12). En tallo, específicamente en la semana doce de desarrollo, se presentó el valor más alto en la fracción que corresponde a peroxidasas adheridas iónicamente a la pared celular (SD), registrando una actividad peroxidasa de 1.9 U ABS/min/mg proteína. La actividad peroxidasa de este tejido se observó similar en la cuarta y sexta semana de desarrollo (Fig. R13).

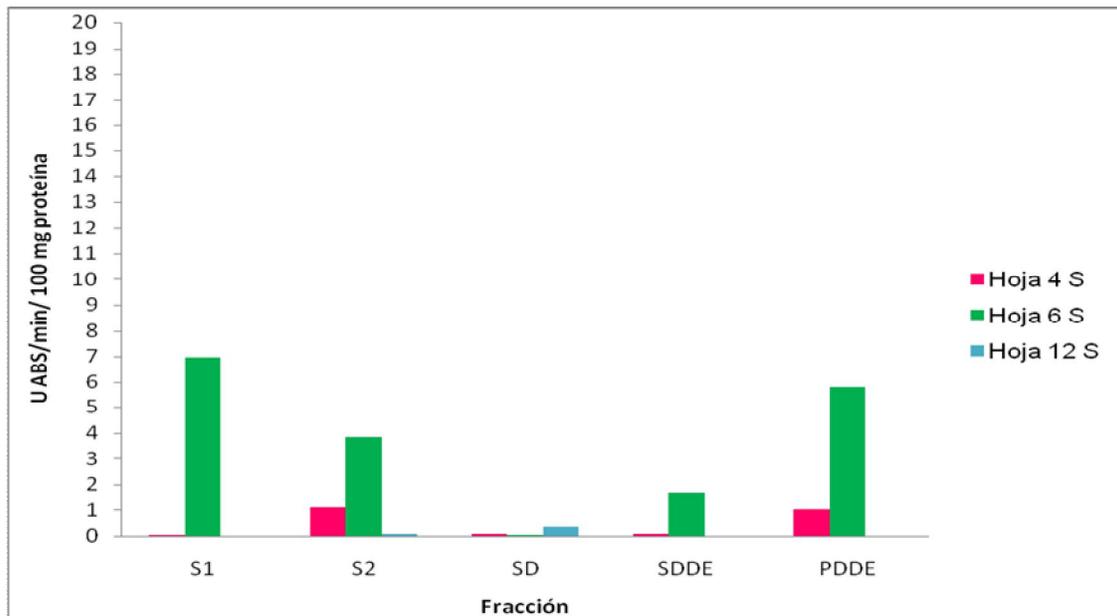


Fig. R12. Actividad Peroxidasa en U ABS/min/mg proteína registrada en cada fracción obtenida en tejidos de hoja de *S. lycopersicon* en tres etapas de desarrollo con el Método A. S1, Sobrenadante 1; S2, Sobrenadante 2; SD, Sobrenadante Dializado; SDDE, Sobrenadante Dializado después de Digestión Enzimática; PDDE, Pastilla Dializada después de Digestión Enzimática.

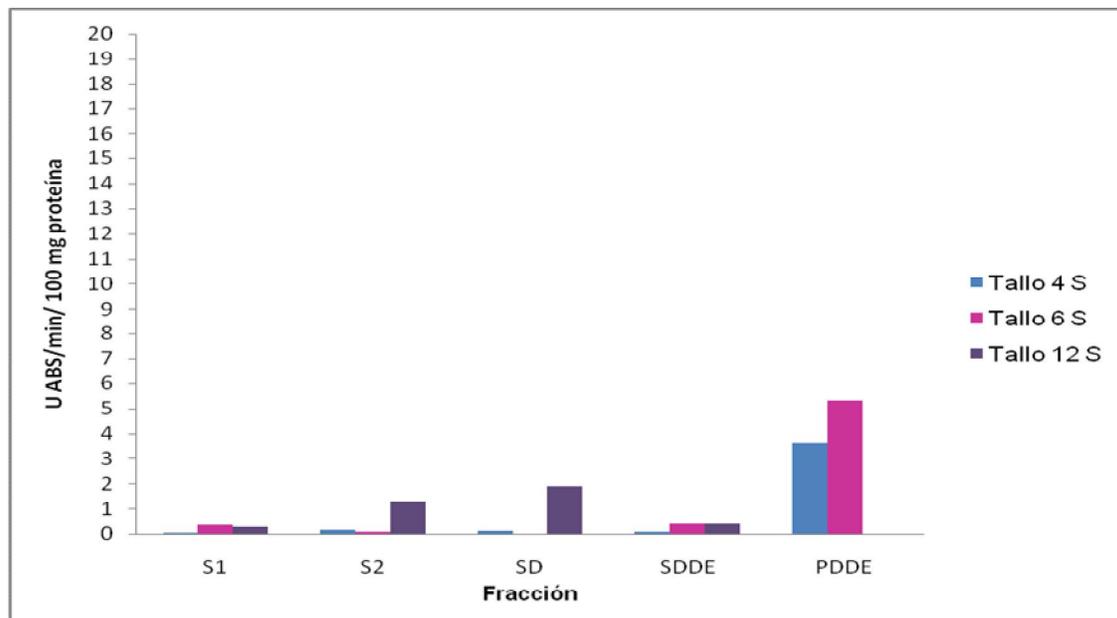


Fig. R13. Actividad peroxidasa registrada en tallo durante tres momentos en el curso de su desarrollo. Las distintas fracciones se obtuvieron conforme al Método A.

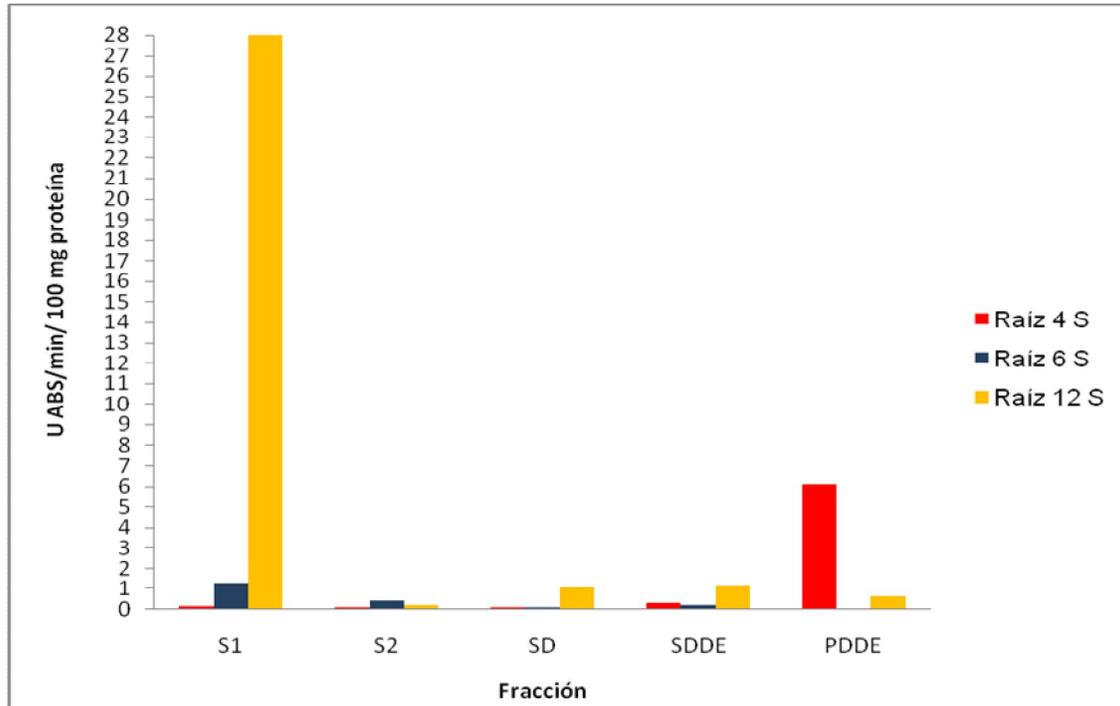


Fig. R14. Actividad peroxidasa obtenida espectrofotométricamente en fracciones obtenidas de tejidos de raíz en tres etapas de desarrollo.

Actividad AIA oxidasa

Se evaluó la capacidad para oxidar AIA en presencia de DCP, $MnCl_2$ y H_2O_2 de las peroxidasas extraídas de hoja, tallo y raíz de *S. lycopersicon* en distintas fases de desarrollo (4, 6 y 12 semanas). En tejidos con cuatro semanas de desarrollo, se llevó a cabo, únicamente para las fracciones PDDE, el registro polarográfico empleado para el seguimiento continuo de la oxidación de AIA, obteniéndose valores en hoja y tallo de 22.65 y 13.08 nmoles de O_2 /mg proteína/minuto, respectivamente. En raíz la actividad AIA para este periodo fue nula. En la sexta y duodécima semana de desarrollo las fracciones que presentaron actividad AIA oxidasa y sus respectivos valores de consumo (expresados en nmoles de O_2 /mg proteína/minuto) se muestran en las Fig. R15-R17. En general, la fracción en la que se obtiene un mayor registro de consumo de O_2 corresponde a proteínas unidas iónicamente a la pared celular (SD). Adicionalmente, en la etapa de doce semanas de desarrollo las fracciones solubles S1 (raíz) y S2 (hoja y tallo) presentaron valores altos en la reacción de oxidación. En la sexta semana de desarrollo, específicamente en la fracción SD, se observó la mayor actividad AIA en tejidos de raíz (598.99 nmoles de O_2 /mg

proteína/minuto) (Fig. R15), en el caso de tallo en este periodo se registró una actividad de 458.6 nmoles de O₂/mg proteína/minuto (Fig. R16). En tejidos de hoja se obtuvo la actividad mínima (40.84 nmoles de O₂/mg proteína/minuto) (Fig. R17). No obstante, en este último tejido, la actividad AIA registrada polarográficamente en la fracción SD, obtenida en plántulas de doce semanas, se incrementa, presentando un valor de 315.26 (Fig. R15). En tallo, a las doce semanas, la fracción en cuestión no exhibió actividad AIA oxidasa (Fig. R16).

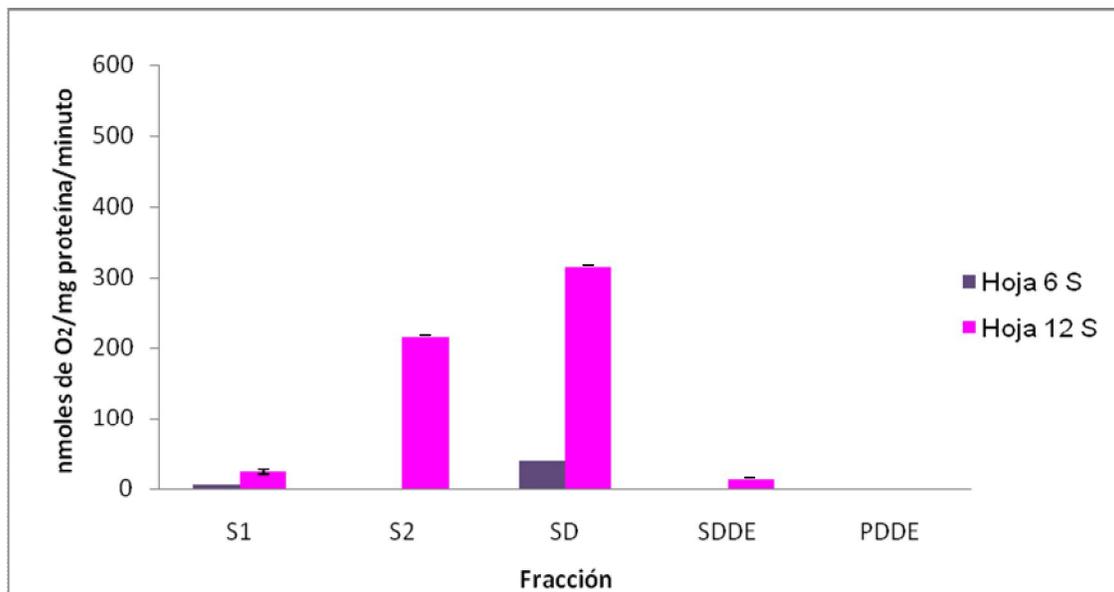


Fig. R15. Actividad AIA oxidasa expresada en nmoles de O₂/mg proteína/minuto presente en hoja de seis y doce semanas de desarrollo. En la fracción S2 de tejidos de hoja (seis semanas) no se registró la actividad AIA oxidasa expresada en nmoles de O₂/mg proteína/minuto. Se representa la desviación estándar de dos repeticiones.

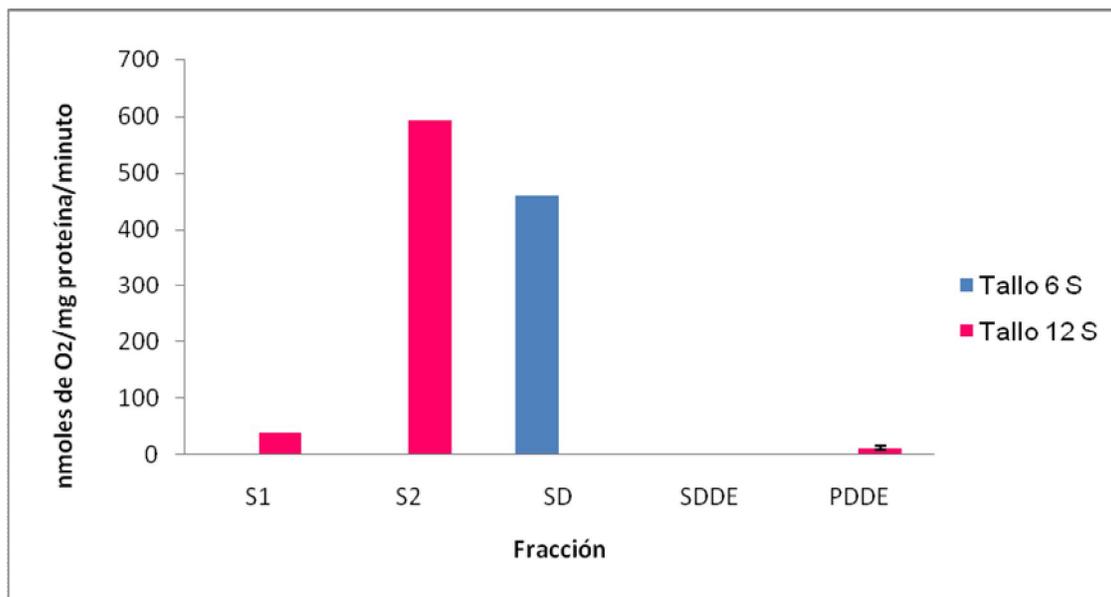


Fig. R16. Actividad AIA evaluada polarográficamente en fracciones obtenidas de tejidos de tallo de seis y doce semanas de desarrollo. En el periodo de seis semanas no se realizó registro de consumo de O₂ para las fracciones citoplásmicas (S1 y S2). Sólo en PDDE se representa la desviación estándar de dos repeticiones.

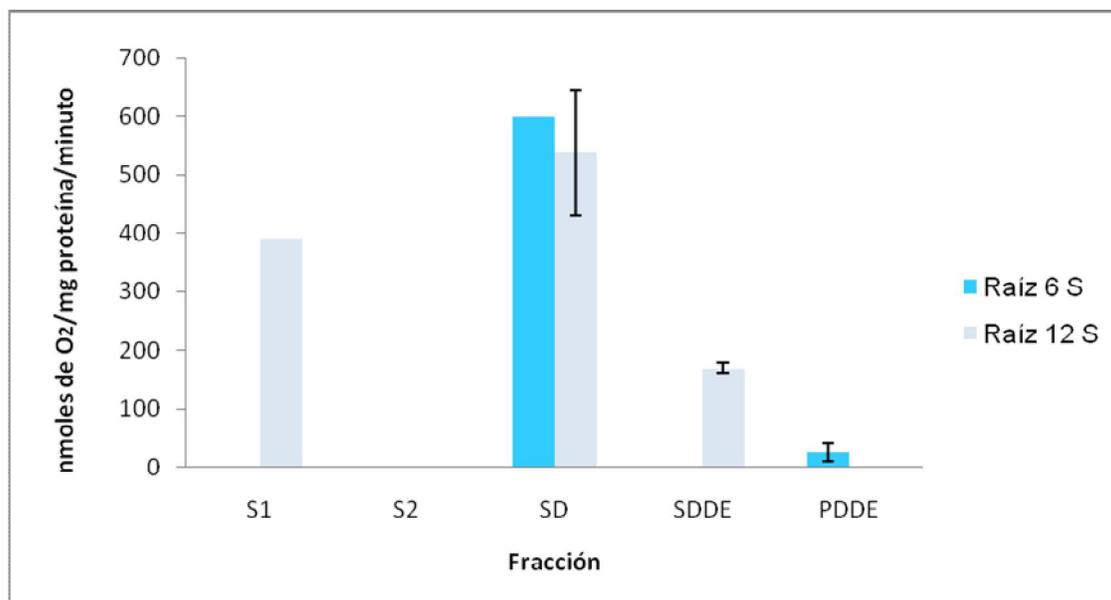


Fig. R17. Registro polarográfico de la actividad AIA oxidasa presente en fracciones obtenidas de tejido radical con seis y doce semanas de desarrollo. No se realizó un registro de consumo de O₂ para las fracciones citoplásmicas (S1 y S2) en el periodo de seis y doce semanas (S1).

Discusión

Para diseñar un procedimiento de aislamiento de paredes celulares y la posterior extracción de proteínas, inicialmente varias características generales deben ser tomadas en cuenta. Las paredes celulares vegetales son constituidas principalmente por polisacáridos de gran densidad. Esta propiedad se puede utilizar para purificarlas a través de gradientes de densidad por centrifugación (Feiz *et al.*, 2006). Por otra parte, la estructura bioquímica de las paredes es compleja, y se distinguen tres tipos de proteínas relacionadas a la pared celular (PPC) con base en su interacción con componentes celulares (Jamet *et al.*, 2006). Existen proteínas que poseen poca o nula interacción con los polisacáridos de la pared y por lo tanto se mueven libremente en el espacio intracelular. Alternativamente, las PPC se encuentran adheridas a la matriz por interacciones Van der Waals, puentes de hidrógeno, e interacciones iónicas o hidrofóbicas. Estas interacciones también pueden ser moduladas por la composición del medio de aislamiento. Por lo general, una baja fuerza iónica es preferida para mantener los enlaces iónicos, pero también para diluir la fuerza iónica de la pared celular. Adicionalmente se trabaja en un pH ácido para mantener las interacciones existentes entre proteínas y polisacáridos (Feiz *et al.*, 2006). Finalmente, las PPC pueden estar unidas covalentemente a componentes de la pared celular y ser resistentes a la extracción con sales. A pesar de las dificultades específicas que representan la extracción y análisis de las PPC, el análisis proteómico de la pared celular se ha convertido recientemente en un campo de estudio importante. Los proteomas de pared celular obtenidos en diversas especies demostraron que la estructura y composición de la pared celular es regulada durante el desarrollo. Estos estudios también permiten comparar los proteomas obtenidos de paredes celulares de diferentes órganos, en relación con sus funciones. Sin embargo, existen varias limitantes en el desempeño de la proteómica de pared celular: (i) la ausencia de una membrana delimitante puede resultar en la pérdida de las PPC durante el procedimiento de aislamiento, (ii) las redes de celulosa, hemicelulosa y pectinas forman trampas potenciales para las proteínas intracelulares que contaminan a los extractos que contienen PPC, (iii) las PPC están localizadas en una matriz de polisacáridos e interactúan en distintas formas con otros componentes celulares, dificultando su extracción, (iv) la separación de PPC a través de 2-DE es poco eficiente, ya que la mayoría son glicoproteínas básicas. Por último, la baja abundancia de muchas PPC es sin duda un importante factor limitante para su identificación. Por otra parte, un proteoma completo de pared celular puede no quedar resuelto

empleando un solo método de extracción además de resultar ser insuficiente para entender la dinámica de las proteínas que se asocian a la pared celular, de esta forma, pueden establecerse tratamientos en un proceso de fraccionamiento, que ayuden a identificar la fuerza de asociación y el tipo de interacciones que se presentan en un grupo de proteínas que constituyen una familia muy numerosa, las Peroxidasas de clase III.

Por consiguiente en este trabajo se utilizaron tres procedimientos para la extracción de Peroxidasas de clase III con base en los criterios que conducen al aislamiento de PPC en *S. lycopersicon*. El procedimiento en general buscó la separación de las proteínas solubles localizadas en el apoplasto, y la purificación de paredes celulares seguida por la extracción de las proteínas adheridas aumentando la fuerza iónica. No obstante, esta aproximación implicó cierta pérdida de las proteínas adheridas débilmente a la pared celular, y la contaminación con proteínas intracelulares que se asocian de una manera no específica a las paredes celulares (Feiz *et al.*, 2006). Sin importar si se trabaja con células vivas o paredes aisladas, la composición del buffer de extracción es crítica y determina qué tipo de proteínas pueden ser liberadas de las paredes celulares. Las proteínas solubles se disuelven con una solución de baja concentración iónica, en tanto que las proteínas que se asocian iónicamente, son extraídas con sales (Chen *et al.*, 2008). En el caso de las proteínas adheridas fuertemente a la pared se recurre a un tratamiento secuencial con enzimas capaces de degradar a los polisacáridos de la pared celular.

En el presente estudio la comparación cuantitativa de las fracciones proteínicas extraídas con los distintos protocolos demostró que con el Método A la actividad peroxidasa es más relevante al observarse un valor considerablemente elevado en la fracción S1, correspondiente a tejidos de raíz con doce semanas de desarrollo (Fig. R14). En relación con el Método B (Cuadro 2), éste proporciona una actividad peroxidasa superior con respecto al Método C de aislamiento de protoplastos (Cuadro 4). El Método B emplea CaCl_2 y LiCl para la extracción de proteínas relacionadas a la pared celular de *S. lycopersicon*. La extracción de proteínas unidas iónicamente a paredes celulares purificadas, comúnmente es lograda usando buffers de alta fuerza iónica, especialmente si contienen CaCl_2 (Borderies *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 1997). El efecto del CaCl_2 aparentemente radica no únicamente en el intercambio iónico. La habilidad del calcio como quelante, puede explicar, a través de un mecanismo de competencia, que las proteínas o glicoproteínas asociadas débilmente con la pared puedan ser solubilizadas selectivamente con CaCl_2 . Se ha reportado que

el CaCl_2 es más efectivo que otras sales como NaCl o LiCl (Boudart *et al.*, 2005), aunque este último es recomendado para disociar glicoproteínas (Voigt y Frank, 2003) o proteínas unidas con mayor fuerza a la pared celular (Melan y Cosgrove, 1988 citados en Watson *et al.*, 2004). No obstante, el valor superior de actividad peroxidasa registrado en tejidos de raíz analizados con el Método A concuerda más con la condición glicoproteica que favorece la disociación al emplear NaCl o LiCl. Adicionalmente, el registro polarográfico realizado para evaluar la actividad AIA oxidasa, presentó una velocidad de consumo de O_2 inferior en fracciones correspondientes al Método B: Sobrenadante CaCl_2 y Sobrenadante LiCl (expresado en nmoles de O_2/mg proteína/minuto), en contraste con la registrada en la fracción SD (Método A extracción con NaCl) que también representa una fracción de proteínas asociadas a la pared celular por interacciones iónicas (Fig. R15-R17); lo que incita a considerar que el Na^+ remueve más eficientemente que el Ca^{2+} y Li^+ a las peroxidasas asociadas iónicamente a la pared celular. La actividad AIA oxidasa presentada en la fracción SDDE obtenida por digestión enzimática con el Método A, fue bastante más reducida o no fue detectable (Fig. R15-R16).

Los tres procedimientos manifestaron actividad auxina oxidasa en los geles de poliacrilamida. En tejidos con cuatro semanas de desarrollo, procesados conforme al Método C, se observaron isoperoxidasas intracelulares (isoforma **o**) y asociadas al apoplasto de hoja y tallo (isoforma **j**) que catalizaron la oxidación de AIA (Fig. R4). Las fracciones, obtenidas con el Método B, que presentan una asociación iónica con la pared celular evidenciaron tres bandas identificadas como isoperoxidasas **a**, **m**, **p** (Fig. R2). Cabe mencionar que esta última banda fue apreciada exclusivamente en los extractos proteicos obtenidos al emplear CaCl_2 y LiCl, presentando una intensidad de 100 y 63.87 respectivamente (Fig. R34). El que este método (B) haya sido descartado para definir la localización subcelular de isoperoxidasas con actividad auxina oxidasa asociada a la pared celular de distintos tejidos de *S. lycopersicon* y su variación con el desarrollo, se debe a que es un procedimiento que requiere grandes volúmenes de buffer de acetato empleado para lavar la fracción de paredes celulares (Método B, Materiales y métodos) y a que por otra parte, en la extracción efectuada con CaCl_2 y LiCl en dos fases sucesivas, el LiCl no contribuye con la misma eficiencia a situar isoenzimas en solución disociándolas de la pared celular de *S. lycopersicon*. El Método A difiere de los Métodos de extracción B y C en que éste aparentemente permite identificar el tipo de asociación (iónica o covalente) que existe con la pared celular. En concreto, el Método A se eligió para localizar isoenzimas peroxidasas con actividad AIA oxidasa en la pared celular de

jitomate en tres momentos en el curso de su desarrollo. Inicialmente las peroxidases adheridas iónicamente (SD) se extrajeron con un buffer conteniendo NaCl, posteriormente empleando celulasa y pectinasa, se digirió la pared celular para remover las proteínas que aún permanecieran asociadas (SDDE). Ambas fracciones, obtenidas a partir de tejidos de hoja, tallo y raíz en periodos correspondientes a cuatro, seis y doce semanas de desarrollo, demostraron actividad peroxidasa en geles de poliacrilamida. En plántulas con cuatro semanas de desarrollo la isoforma **a** asociada iónicamente a la pared celular de hoja (SDH) demostró actividad auxina oxidasa (Fig. R4). Este resultado no coincidió con lo observado en el patrón isoenzimático obtenido al aislar protoplastos (Método C), donde tejidos de hoja y tallo en el mismo periodo de desarrollo exhibieron isoenzimas con actividad AIA oxidasa que difieren (Fig. R4) con la isoforma **a** caracterizada con el Método A (Fig. R8). Desafortunadamente de los extractos proteicos derivados de tejidos con cuatro semanas de desarrollo, solamente fue determinada la concentración de nmoles de O_2 /mg proteína/minuto en la fracción correspondiente a la pastilla del dializado de las paredes digeridas con celulasa y pectinasa (PDDE, Método A), haciendo imposible corroborar por algún método complementario, la existencia de actividad AIA oxidasa en tallo, si bien electroforéticamente con la concentración de proteína incluida en el gel de poliacrilamida no se detectó esta actividad. No obstante podría considerarse que ambos protocolos de extracción contribuyen a constituir un análisis de localización específica de las diferentes isoperoxidasas para esta especie.

En el periodo de seis semanas de desarrollo se determinó la presencia de una isoenzima que exhibió actividad AIA oxidasa, asociada iónicamente a la pared celular de tallo y raíz. Esta isoenzima correspondió en términos de movilidad electroforética con la isoperoxidasa **a**. En tejidos de hoja no se encontró actividad AIA oxidasa relacionada a la fracción soluble ni a la pared celular (Fig. R9), o al menos no fue apreciable con la concentración de proteína utilizada en las condiciones de ensayo establecidas.

Se revelaron isoformas con actividad AIA oxidasa en la fracción soluble correspondiente a fragmentos de tallo (isoforma **a**) y raíz (isoforma **g**) con 12 semanas de desarrollo; en tejidos de raíz, particularmente, se identificó una isoperoxidasa (**i**) que no logró ser removida por intercambio iónico de la pared celular, con la capacidad de oxidar AIA (Fig. R10; Fig. R11). La actividad AIA oxidasa registrada polarográficamente en hoja (Fi. R15) no coincidió con el análisis subsecuente realizado en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes, donde la actividad fue nula en esta etapa de desarrollo,

probablemente debido a la escasa concentración de proteína incluida. El registro polarográfico empleado para realizar un seguimiento continuo de la oxidación de AIA no ha demostrado ser un método eficaz, pues los registros del consumo de las mezclas preparadas no siempre permiten interpretar claramente cuál de los componentes es oxidado; por otra parte medir exclusivamente el consumo de oxígeno no proporciona información acerca de los productos que en cada condición se formaron (Peñalosa, 1998). Las peroxidasas presentes en jitomate (*Lycopersicon esculentum* var. *Tropic*) dependen de acuerdo a Kokkinakis y Brooks (1979), de la presencia de H₂O₂ para la oxidación de AIA y en ausencia de peróxido, tienen una actividad casi nula al catalizar la reacción en presencia de cofactores como 2,4 DCP y manganeso, sin embargo, de acuerdo a Pressey (1990), esta baja actividad se debe a una dependencia de ciertos aniones como el fosfato.

En relación a la intensidad calculada para las bandas que exhibieron actividad peroxidasa **a, b, g, h, j, k, m, n, o**, comunes en los Métodos C y A, esta resultó ser mayor en las bandas **a, g, h, k, n**, reveladas en los extractos proteínicos obtenidos con el Método A (Fig. R18, R24, R25, R28, R31). De las bandas **c, d, e, f, i, l, ñ**, exclusivas en determinadas etapas de desarrollo analizadas con el Método A, la máxima intensidad fue registrada para la banda **l** (Fig. R29) mientras que la banda **e** presentó la menor intensidad (Fig. R22). La banda **a** se observó en cada una de las fracciones extraídas con los tres métodos, presentando en el Método A una intensidad superior (Fig. R18).

En este estudio la actividad auxina oxidasa, evidenciada con los Métodos A, B y C, fue atribuida a siete isoperoxidasas (**a, g, i, j, m, o, p**). Otros investigadores determinaron en extractos de jitomate únicamente la presencia de una peroxidasa implicada en la degradación de AIA (Evans, 1968; Frenkel, 1972). Aunque usualmente se relaciona la actividad peroxidasa con el control hormonal, en el caso de esta especie resultó prematuro asumir esa relación debido a la falta de información disponible acerca de las propiedades físicas y catalíticas de esta peroxidasa y a la ausencia de un método de purificación que permitiera una estimación cuantitativa de las peroxidasas unidas iónicamente (Ranadive y Haard, 1972; Ridge y Osborne, 1971). Por otra parte, Kokkinakis y Brooks (1979) reportaron que más del 80% de la actividad peroxidasa encontrada en el pericarpio de *Lycopersicon esculentum* var. *Tropic* correspondió a una sola isoperoxidasa. Siguiendo un efectivo esquema de purificación se determinó que esta peroxidasa aniónica consta de dos cadenas de polipéptidos con un peso molecular de 46 000 y 19 000, respectivamente, unidas por puentes disulfuro. No obstante, la tasa extremadamente baja de oxidación de AIA presentada por esta

peroxidasa aniónica en las condiciones de prueba utilizadas por dichos investigadores no elimina la posibilidad de que la enzima actué como agente fisiológico para la oxidación de IAA *in vivo*. Otro estudio (Andrews *et al.* 2000) realizado en *Lycopersicon esculentum* reporta que el cese del crecimiento del fruto de esta especie probablemente es inducido por un aumento en la actividad peroxidasa que proporciona rigidez a la pared celular. Estos investigadores hallaron un máximo de cuatro isoperoxidasas relacionadas iónicamente con la pared celular del fruto en diversas etapas de crecimiento. Desafortunadamente, no es posible constatar que las peroxidadas en cuestión corresponden con alguna de las isoenzimas reveladas en este trabajo.

Se ha sugerido que generalmente las isoenzimas peroxidadas de tipo catiónico se encuentran asociadas con la degradación de AIA (Van den Berg *et al.* 1983; Grambow y Langenbeck-Schwich, 1983 citados en Quesada *et al.*, 1990) y las peroxidadas aniónicas están relacionadas con la síntesis de lignina (Catesson *et al.*, 1986; Sato *et al.*, 1993; Polle *et al.*, 1994), este planteamiento es consistente con lo encontrado en el presente estudio donde la isoperoxidasa catiónica a localizada en hoja, tallo y raíz de jitomate en diferentes etapas de desarrollo presentó actividad AIA oxidada. Las peroxidadas involucradas con la lignificación se han localizado en la pared celular (Sato *et al.*, 1993; Andrews *et al.*, 2000) y en el espacio libre de la pared (Polle *et al.*, 1994), mientras que las peroxidadas implicadas en la oxidación del AIA han sido localizadas en el citosol (Ros Barceló *et al.*, 1990) y en el apoplasto (Chaoui *et al.*, 2004, Vatulescu *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que en *S. lycopersicon* una misma isoperoxidasa con capacidad de oxidar AIA puede encontrarse tanto en la fracción soluble (que contiene proteínas derivadas del citoplasma y de la porción soluble del apoplasto) como en la de la pared celular, lo que puede atribuirse a que las peroxidadas solubles del apoplasto se asocien electrostáticamente tanto a las proteínas integrales de membrana, como ya lo han sugerido Mika *et al.* (2010), como a los componentes de las paredes celulares.

Se han propuesto diferentes razones para explicar la variabilidad de las peroxidadas de clase III, que entre otras características presentan distinta movilidad electroforética en extractos crudos de tejidos vegetales. La interacción de peroxidadas con compuestos fenólicos, la digestión proteolítica, así como el grado de glicosilación podrían ser algunas de las razones. Sin embargo, los estudios genéticos y moleculares han demostrado que las peroxidadas de clase

III están codificadas por varios genes, como es indicado por la expresión isoenzimática (Jöhri *et al.*, 2005). La gran diversidad de secuencias promotoras existentes explica parcialmente que toda clase de estímulo interno o externo regule la expresión genética. Por otro lado, la variabilidad del canal de acceso entre las hélices- α F y G justifica la diversidad de actividades catalizadas. La flexibilidad en la regulación y la especificidad del sustrato dentro de la familia multigénica de las peroxidases podría explicar la omnipresencia de estas enzimas en el ciclo de vida de las plantas (Passardi *et al.*, 2006). Precisamente, la diversidad de sustratos que son oxidados a través del ciclo peroxidativo indica por qué estas proteínas están implicadas en un amplio rango de procesos fisiológicos, particularmente en el catabolismo del AIA. Algunas peroxidases son capaces de catalizar la oxidoreducción independiente de H_2O_2 a través de un mecanismo catalítico que difiere del clásico ciclo peroxidativo (Gazaryan *et al.*, 1996). Este ciclo hidroxílico, descrito recientemente ha abierto la posibilidad de un nuevo rango de funciones para las peroxidases clase III. En este ciclo alternativo, las peroxidases pueden ser convertidas a oxyferroperoxidases (compuesto III) en dos distintas vías, originando la formación de varias especies reactivas de oxígeno (ROS). Consecuentemente las peroxidases clase III son consideradas como enzimas bifuncionales que pueden oxidar varios sustratos en la presencia de H_2O_2 . Su participación en muchos procesos fisiológicos y de desarrollo pueden ser detectados en plantas desde su germinación hasta su senescencia. A través de la generación de radicales hidroxil (-OH), las peroxidases pueden jugar un papel crucial en la protección de la semilla en los primeros días de germinación al reducir el ataque por agentes patógenos. En semillas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) se confirmó la presencia de peroxidases, demostrando que su producción comienza tan pronto como la radícula emerge (al romper el endospermo crea una región vulnerable a los patógenos). Las peroxidases son capaces de regular el crecimiento por elongación a través de diferentes ciclos, favoreciendo dicho proceso al generar radicales oxígeno (ciclo hidroxílico) o por la regulación de la concentración local de H_2O_2 (ciclos peroxidativo e hidroxílico). Las peroxidases catalizan el proceso de entrecruzamiento de grupos fenólicos, inhibiendo la elongación celular en respuesta a varios factores externos como lo son las interacciones con patógenos, heridas mecánicas y estrés ambiental o sólo como parte del desarrollo normal de la pared celular durante el crecimiento, diferenciación y senescencia (Córdoba-Pedregosa *et al.*, 1996).

La regulación de la actividad AIA-oxidasa, que cataliza la oxidación descarboxilativa del AIA, se supone que juega un importante papel en el control de la concentración del AIA. Por su parte, el control de los niveles hormonales resulta decisivo para su acción, ya que los efectos producidos por el AIA en los procesos de desarrollo (crecimiento, diferenciación, rizogénesis, abscisión, etc.) dependen en gran medida de su concentración. Los factores que pueden modificar la actividad AIA-oxidasa son muy diversos. Entre otros, se han descrito variaciones producidas por luz, iones metálicos como Cu^+ , Fe^{+2} y Co^+ , retardadores del crecimiento, y diversas fitohormonas como citoquininas, giberelinas y auxinas, incluido el AIA. Dependiendo de la concentración de auxina, aumenta o disminuye la actividad de diferentes isoenzimas AIA-oxidasa. La autorregulación de su destrucción por el propio AIA, puede ser de gran interés fisiológico, ya que representaría un mecanismo de protección frente a las concentraciones altas, y por tanto tóxicas, de esta hormona, circunstancia que puede producirse como consecuencia de infecciones u otras situaciones patológicas que impliquen alteraciones de la biosíntesis o del transporte del AIA (Sánchez y Núñez, 1990b).

En un trabajo anterior (Sánchez y Núñez, 1990a), se comprobó que la distribución de AIA-oxidasa a lo largo de los hipocótilos etiolados de *Lupinus albus*, L., está relacionada con la de AIA, lo que sugiere una posible regulación de la actividad degradativa por el substrato. El hecho de que la actividad peroxidasa no muestre siempre variaciones paralelas a las de AIA oxidasa, sugiere que aunque el AIA puede modular la actividad peroxidasa, no todas las isoperoxidasas tienen la misma capacidad para degradar el AIA, como se ha demostrado en este trabajo y en trabajos previos (Endo, 1968; Sahulka, 1970).

La actividad auxina oxidasa localizada en el apoplasto, representaría un excelente mecanismo de control de los niveles hormonales, por su localización extracelular y debido a que las auxinas estimulan la acidificación en el apoplasto, con estas características, se lograría su inactivación antes de ser incorporadas a la célula. También resulta muy significativa la elevada actividad peroxidasa encontrada en el tejido radical en el periodo comprendido por doce semanas de desarrollo. Se ha sugerido que la actividad peroxidasa incrementa con la edad (Pérez *et al.*, 2004), en este tejido también se encontró importante actividad auxina oxidasa, que indicaría que si esta enzima está implicada en el control de los niveles auxínicos y éstos determinan la respuesta rizogénica conforme se incrementa la proporción de tejido radical, se tiene una mayor degradación de auxinas, evitando la sobreproducción en este tejido (Peñalosa, 1998). En adición, Günes (2000) concluyó que la enzima AIA oxidasa se relaciona con el

enraizamiento y probablemente afecta la formación de raíces a través del catabolismo de AIA.

El presente estudio evidenció que de las 17 isoperoxidasas identificadas preliminarmente (con los tres métodos de purificación) en diferentes tejidos de *S. lycopersicon*, la mayoría no muestran actividad AIA-oxidasa, sin embargo todas las fracciones que revelaron actividad AIA-oxidasa siempre presentaron actividad peroxidasa (Cuadro 6). Sin embargo, existe el reporte de que Sequeira y Mineo (1966) aislaron en raíces de tabaco una AIA-oxidasa que carecía de actividad peroxidasa. No obstante, este resultado no ha podido ser confirmado posteriormente (Hoyle, 1972). Teniendo en cuenta las condiciones de extracción, las actividades enzimáticas que se han determinado en este trabajo, corresponden a las fracciones solubles incluyendo proteínas derivadas tanto del citoplasma o vacuola, como de la solución que riega a las paredes celulares, por fuera de las células; o a las proteínas ligadas iónica o covalentemente a la pared celular, que constituyeron la fracción insoluble del apoplasto. En cualquier caso, la actividad AIA-oxidasa encontrada en estos extractos proteicos, puede considerarse como un indicador de la capacidad que poseen los tejidos de esta especie para degradar esta hormona.

Como proyección a futuro se plantea identificar el grado de contaminación por proteínas intracelulares evaluando la actividad enzimática del marcador glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en los extractos proteicos obtenidos al emplear el Método A (NaCl y digestión enzimática para obtener proteínas relacionadas iónica y covalentemente a la pared celular).

Conclusiones

Se demostró la existencia de un sistema de enzimas peroxidasa con actividad AIA oxidasa, localizado tanto en la fracción soluble como en la pared celular, coincidiendo con la localización esperada. Los tres métodos analizados contribuyen a dilucidar un perfil más completo de localización subcelular de las isoenzimas de esta especie, además se pudo evidenciar en los tejidos estudiados un conjunto de diecisiete isoperoxidasas de las cuales siete (**a, g, i, j, m, o, p**) presentaron actividad auxina oxidasa, cuya intensidad sugiere su localización preferente.

El patrón isoenzimático de las peroxidosas presentes en *S. lycopersicon*, obtenido con el Método A, reveló variaciones en cuanto al número e intensidad

de las bandas a lo largo de su desarrollo. La banda **a** fue común en todas las fracciones extraídas bajo diferentes condiciones, no obstante en extractos proteínicos obtenidos conforme al Método A el revelado presentó una intensidad superior a 60. Con este método, en el primer periodo analizado (4 semanas) se reveló en tejidos de hoja una isoperoxidasa (**a**) asociada iónicamente a la pared celular y que también presentó actividad de AIA oxidasa. En tallo y raíz de *S. lycopersicon* en dos etapas de desarrollo (6 y 12 semanas) se evidenciaron isoperoxidasas que presentaron la capacidad de catalizar la oxidación de AIA. Con respecto al periodo de desarrollo correspondiente a seis semanas, en tejidos de tallo y raíz, la isoperoxidasa **a** demostró una asociación iónica con la pared celular. En el caso de tejidos de doce semanas de desarrollo, en raíz, la isoforma **a** se localizó en la fracción soluble, en tallo se expresaron las isoenzimas **g**, **i**; esta última se presentó en la fracción que se mantuvo adherida a la pared celular aún después de tratar con iones Ca^{2+} .

La isoenzima **a** encontrada en los diversos tejidos presenta diferencias en su afinidad con la pared celular. Adicionalmente, esta isoforma aislada en extractos proteicos obtenidos con los Métodos A y B, demostró actividad auxina oxidasa. En general, los resultados del presente trabajo, indican que la actividad peroxidasa y AIA oxidasa analizada en distintos tejidos, varían dependiendo de su localización en el órgano y de la edad de las plantas.

ANEXO. Intensidad de la bandas reveladas con los Métodos A, B y C

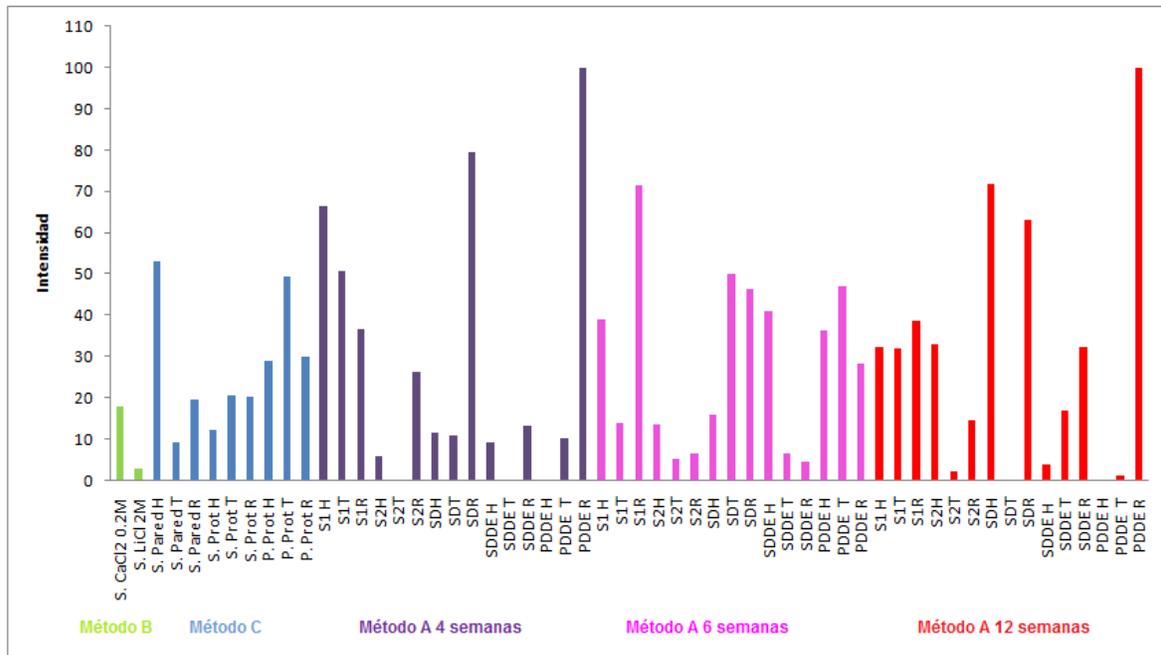


Fig. R 18. Intensidad calculada para la banda **a** presente en cada una de los extractos proteicos obtenidos con tres Métodos.

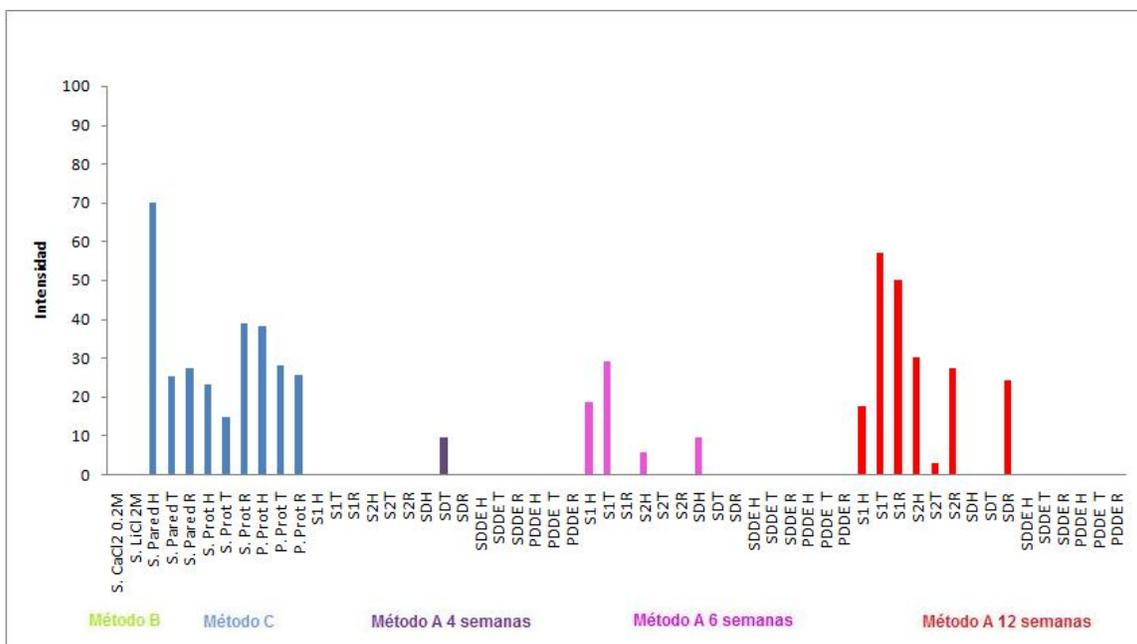


Fig. R19. Intensidad calculada para la banda **b** presente en determinados extractos proteicos obtenidos con los Métodos de aislamiento A y C.

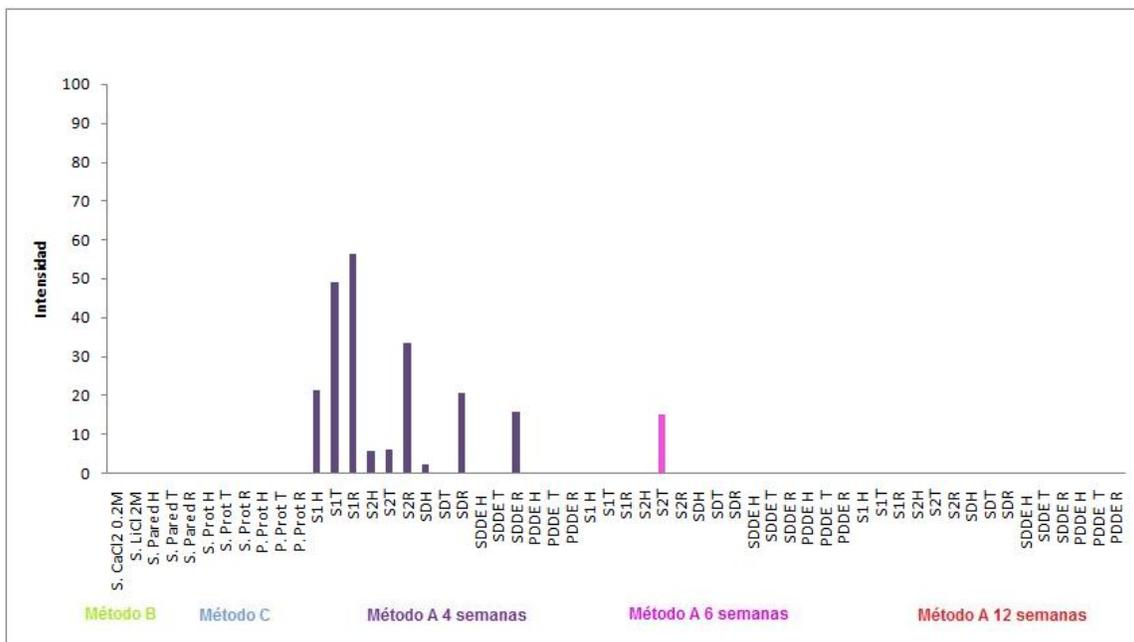


Fig. R20. Intensidad presentada por la banda **c** en fracciones correspondientes a las etapas de cuatro y seis semanas de desarrollo analizadas con el Método A.

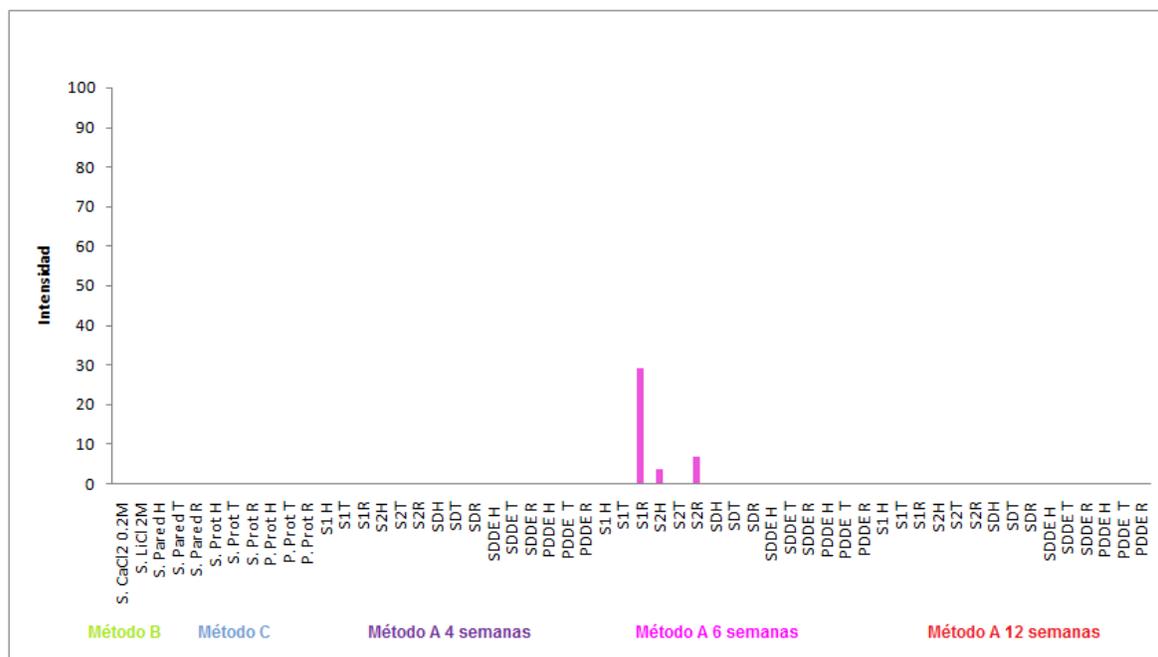


Fig. R21. Intensidad calculada para la banda **d** presente exclusivamente en el periodo correspondiente a seis semanas de desarrollo.

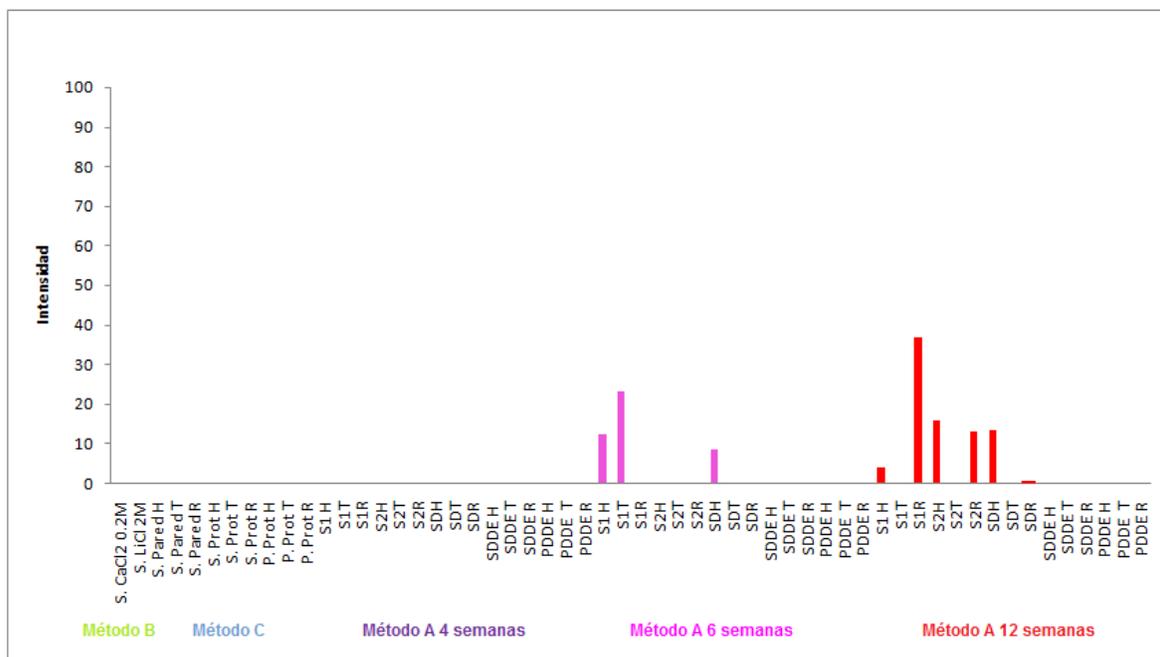


Fig. R22. Intensidad presentada por la banda e identificada con el Método A en tejidos de *S. lycopersicon* con seis y doce semanas de desarrollo.

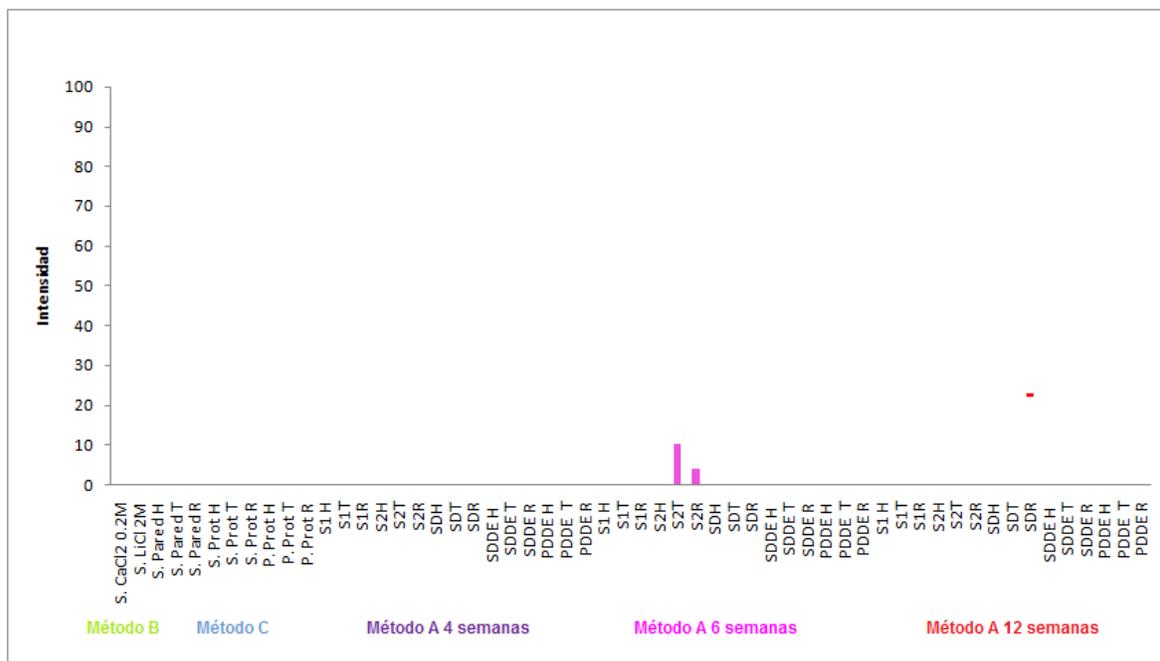


Fig. R23. Intensidad de la banda f exclusiva en fracciones solubles de tallo y raíz de seis semanas de desarrollo (Método A).

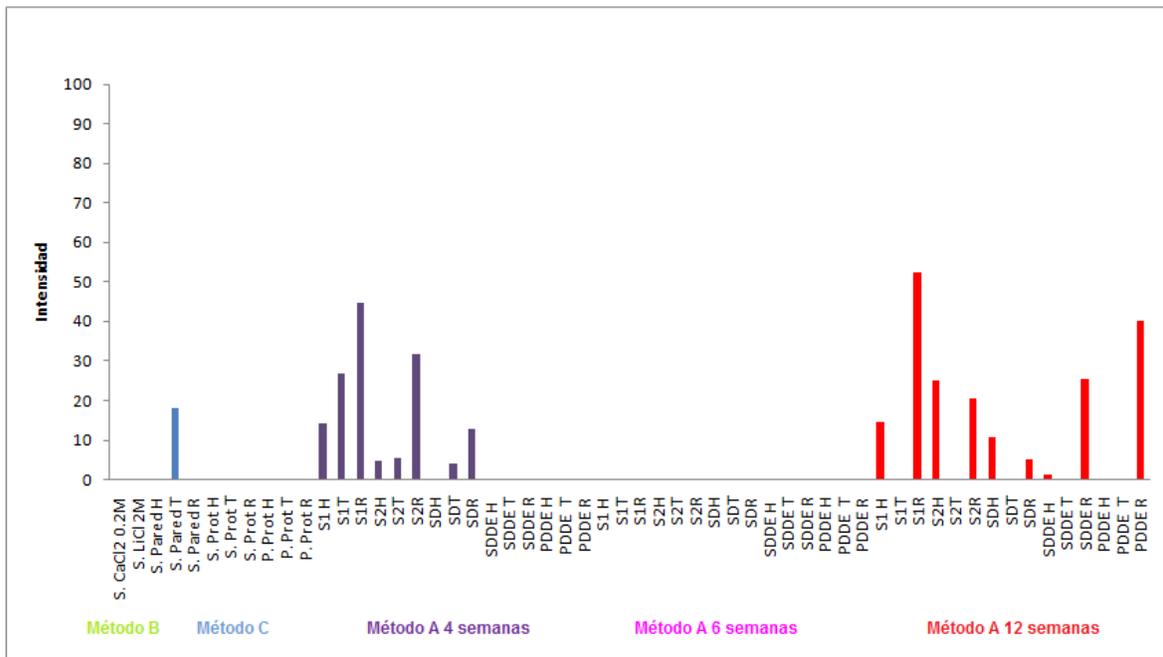


Fig. R24. Intensidad registrada para la banda **g** en extractos proteicos obtenidos con los Métodos C y A.

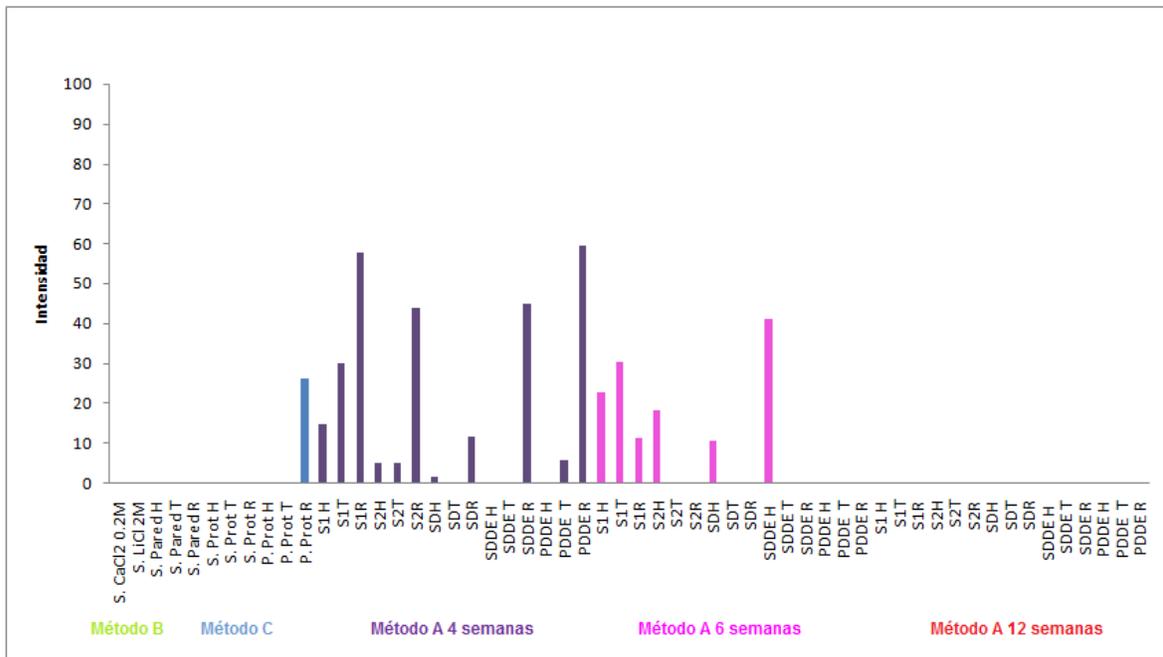


Fig. R25. Intensidad de la banda **h** apreciada en fracciones extraídas con los Métodos A y C.

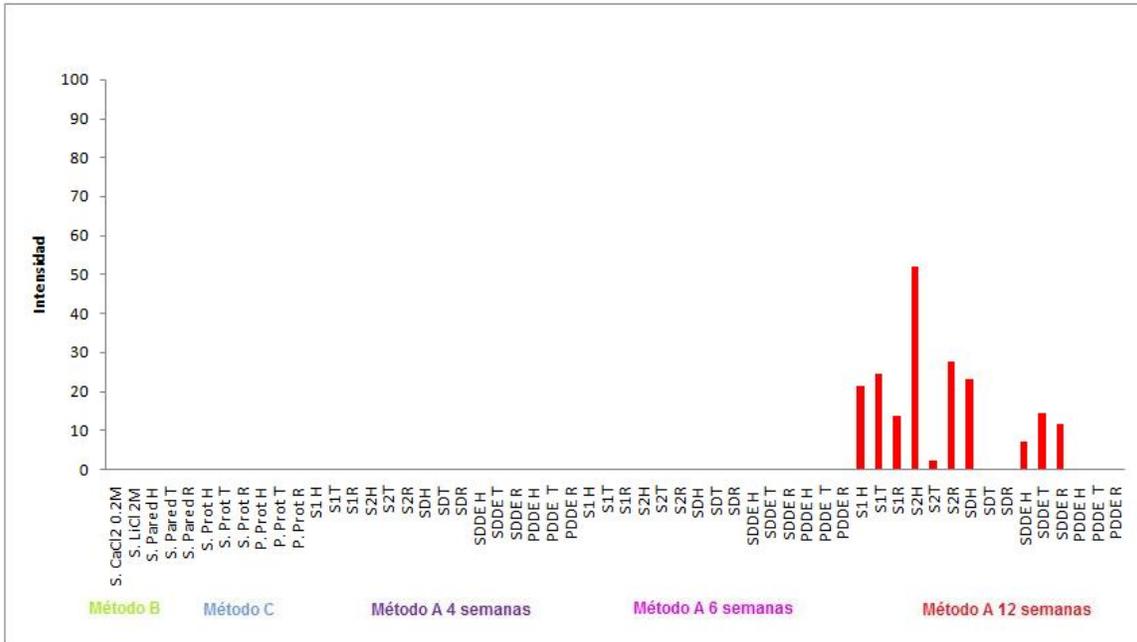


Fig. R26. Intensidad de la banda i observada exclusivamente en fracciones obtenidas de tejidos de tallo y raíz con doce semanas de desarrollo (Método A).

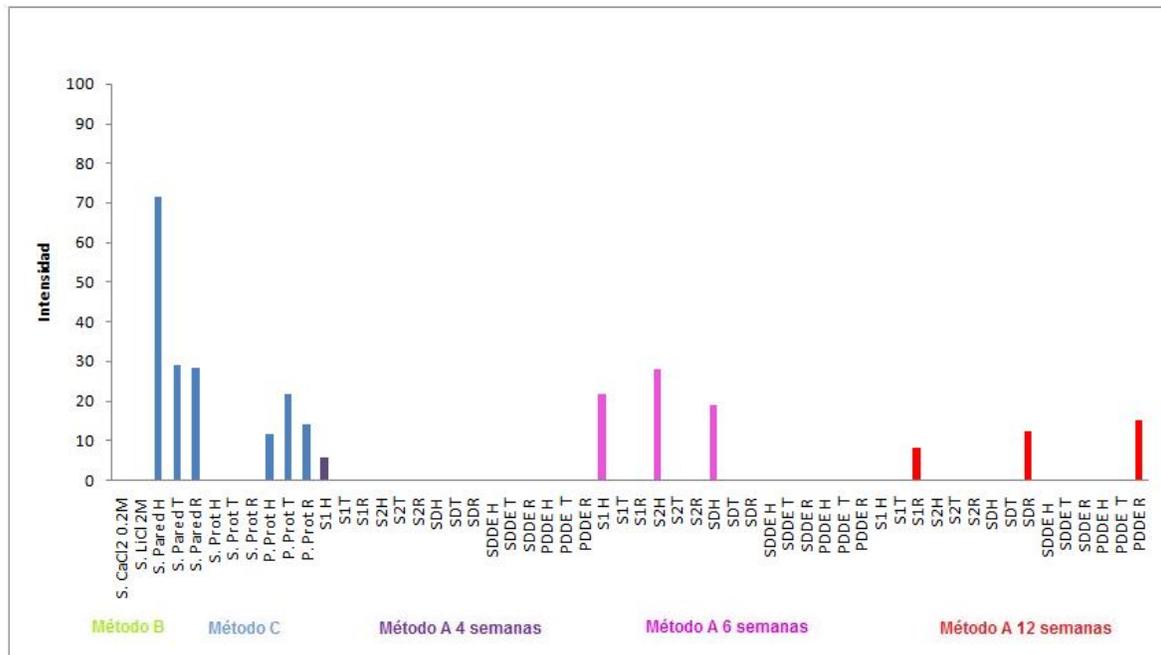


Fig. R27. Intensidad de la banda j relacionada con extractos proteicos obtenidos con el Método C y el Método A en las etapas de cuatro, seis y doce semanas de desarrollo.

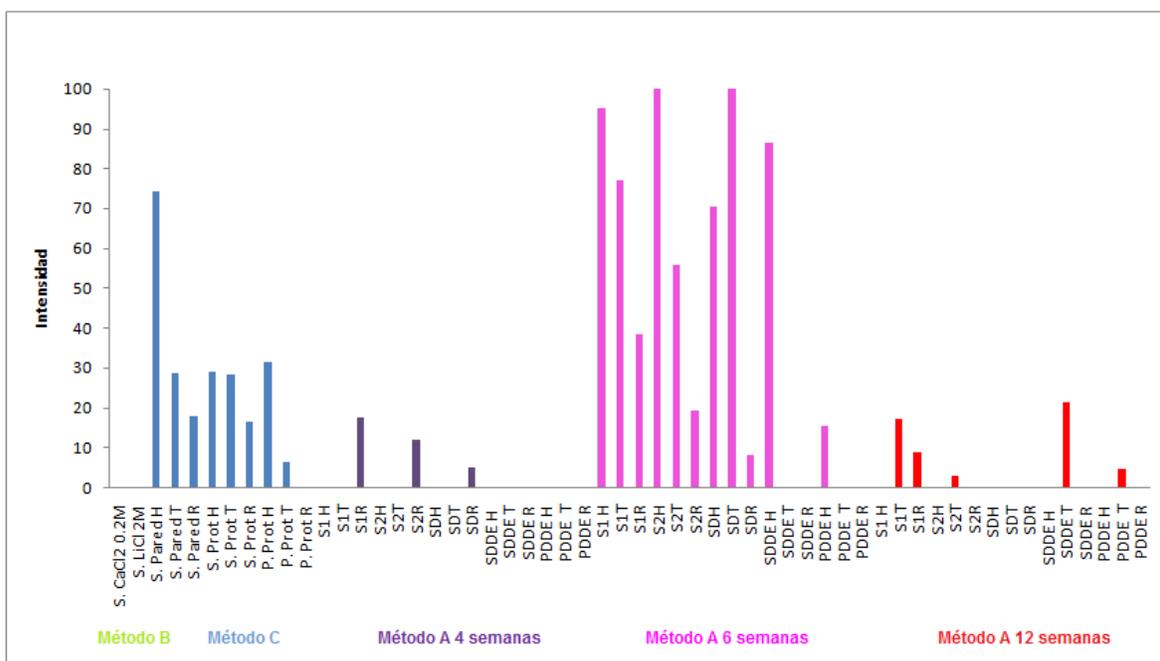


Fig. R28. Intensidad de la banda **k** determinada en extractos proteicos obtenidos con los Métodos C y A.

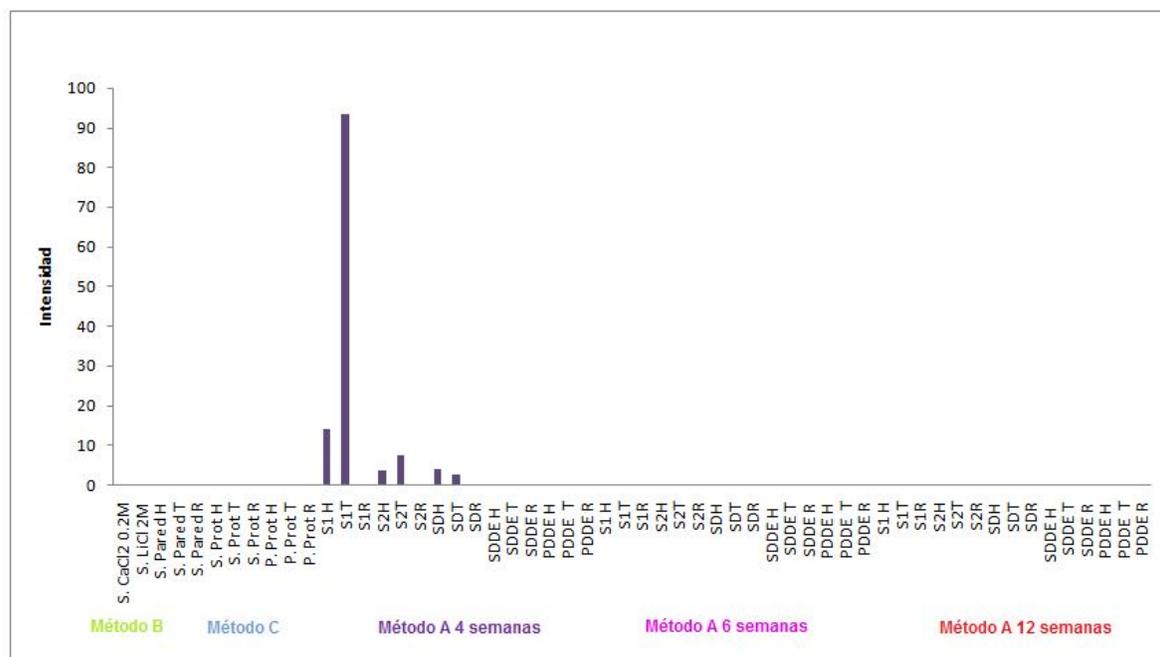


Fig. R29. Intensidad registrada para la banda **l** que se observó exclusivamente en el periodo de cuatro semanas de desarrollo estudiado con el Método A.

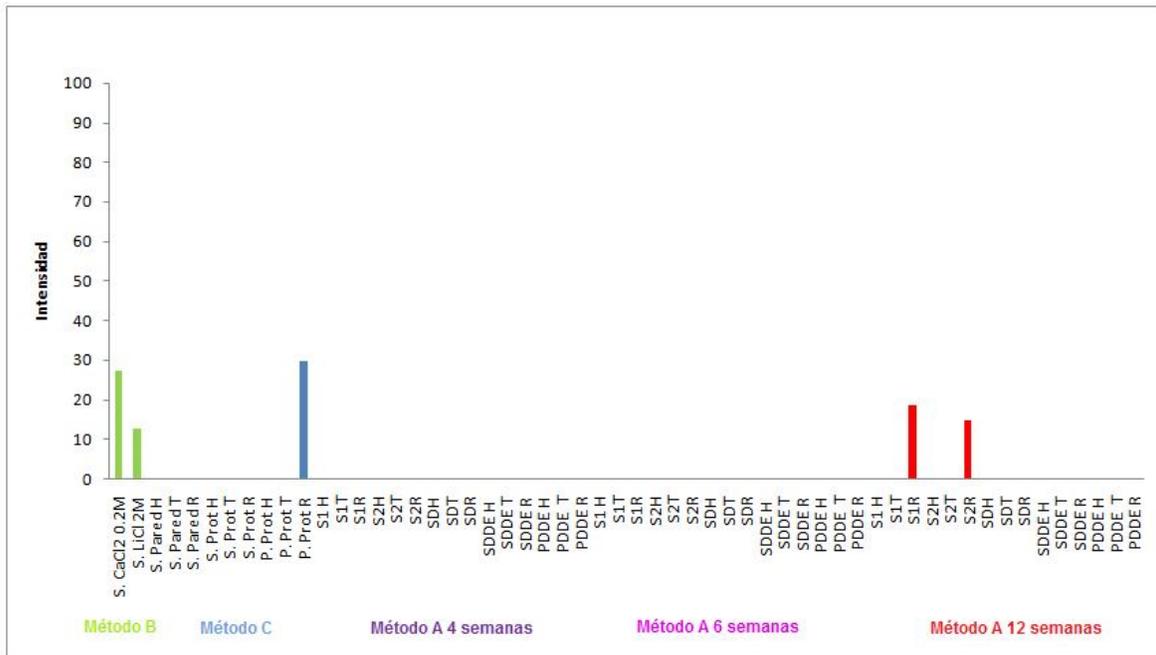


Fig. R30. Intensidad de la banda **m** evidenciada en extractos proteicos obtenidos con los tres métodos de aislamiento estudiados en este trabajo.

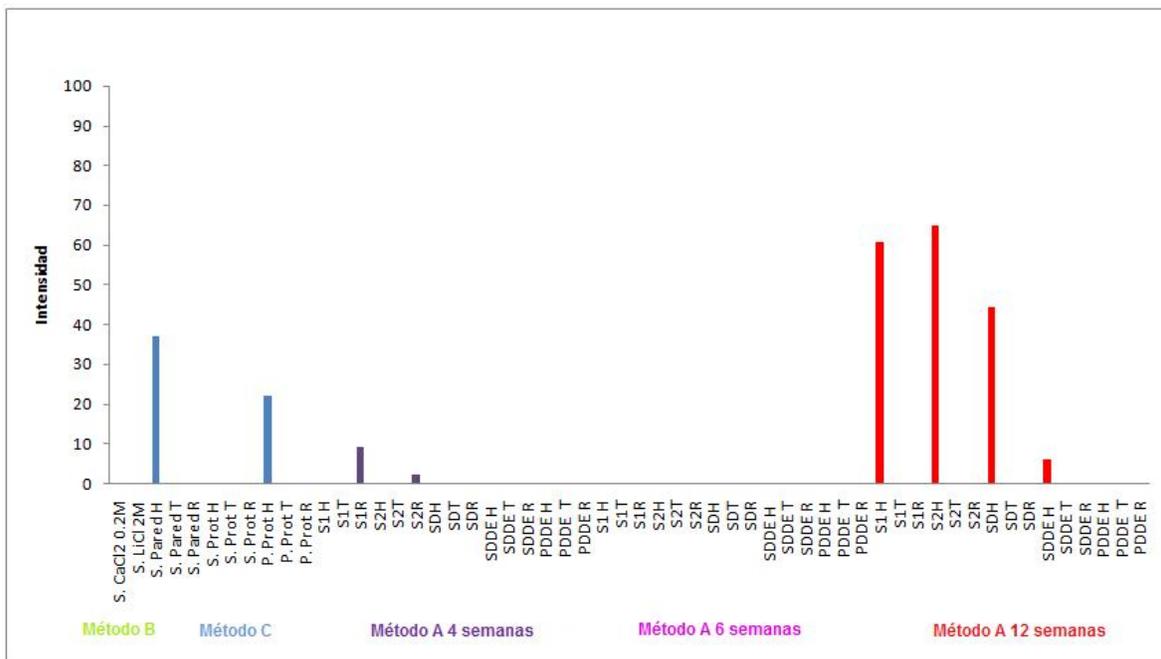


Fig. R31. Intensidad de la banda **n** presente en fracciones aisladas con los Métodos A y C.

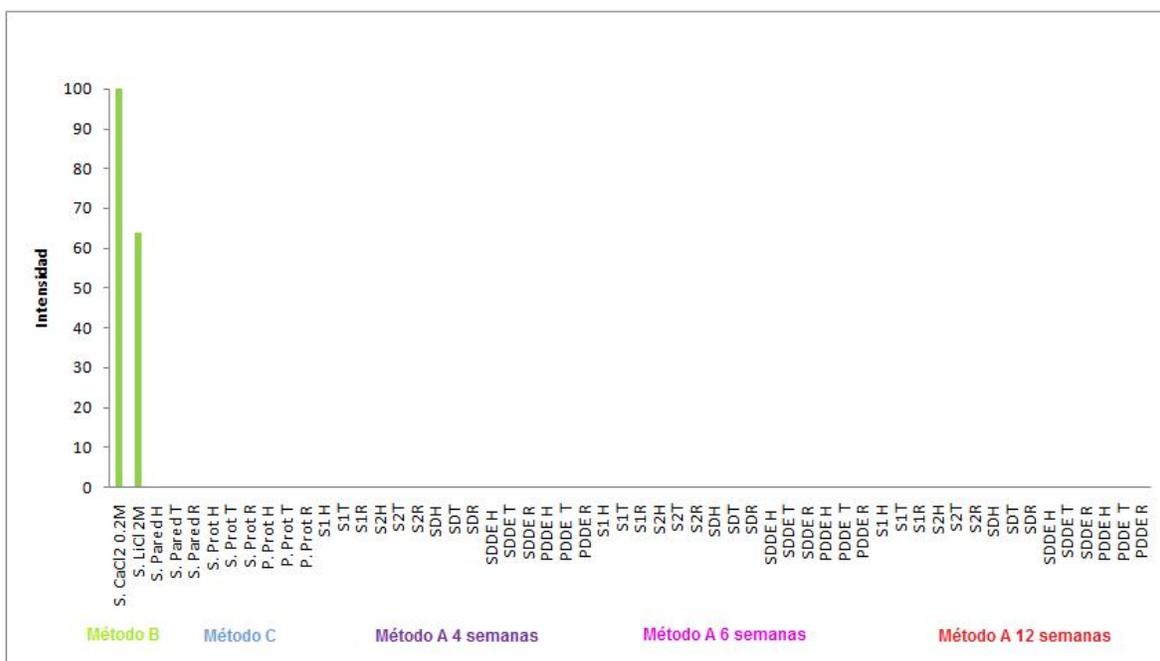


Fig. R34. Intensidad registrada para la banda **p** exclusivamente presente en fracciones obtenidas con el Método B.

Referencias

Alexandrov N.N., Brover V.V., Freidin S., Troukhan M.E., Tatarinova T.V., Zhang H., Swaller T.J., Lu Y.-P., Bouck J., Flavell R.B., Feldmann K.A. (2009) Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing. *Plant Mol. Biol.* 69:179-194.

Alvarez, S., Goodger J., Marsh E.L., Chen S., Asirvatham V.S. y Schachtman D.P. (2006) Characterization of the Maize Xylem Sap Proteome. *Journal of Proteome Research* 5(4): 963-972.

Andrews, J. Malone M., Thompson D.S., Ho L.C. y Burton K.S. (2000) Peroxidase isozyme patterns in the skin of maturing Tomato fruit. *Plant, Cell and Environment* 23: 415–422.

Bartel, B., LeClere S., Magidin M. y Zolman B. (2001) Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid b-oxidation. *J Plant Growth Regul.* 20: 198-216.

Benková , E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G., y Friml J. (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115: 591-602.

Benjamins, R. y Scheres, B. (2008) Auxin: The looping star in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 443-465.

Bennett, M.J., Marchant A., May S.T. y Swarup R. (1998) Going the distance with auxin: unravelling the molecular basis of auxin transport. *Phil.Trans. R. Soc. Lond. B.* 353:1511-1515.

Bhalerao R.P., Eklöf J., Ljung K., Marchant A., Bennett M. y Sandberg G. (2002) Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in Arabidopsis seedlings. *Plant J.* 29:325-32.

Blakeslee, J.J., Peer W.A. y Murphy A.S. (2005) Auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology.* 8:494-500.

Blazkova, A., Sotta B., Tranvan H., Maldiney R., Bonnet M., Einhorn J.H., Kerhoas L. y Miginiac E. (1997) Auxin metabolism and rooting in young and mature clones of *Sequoia sempervivens*. *Physiologia Plantarum* 99:73-80.

Borderies, G., Jamet E., Lafitte C., Rossignol M., Januneau A., Boudart G., Monsarrat B., Esquerre-Tugaye M.T., Boudet A., Pont-Lezica R. (2003) Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: a critical analysis. *Electrophoresis* 24:3421–3432.

Boudart, G., Jamet E., Rossignol M., Lafitte C., Borderies G., Jauneau A., Esquerré-Tugayé M. y Pont-Lezica R. (2005) Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: Identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics* 5: 212-221.

Casimiro, I., Marchant A., Bhalerao R.P., Dhooge S., Swarup R., Graham N. (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13:843–52.

Casson, S.A. y Lindsey K. (2003) Genes and signalling in root development. *New Phytologist* 158:11–38.

Catesson, A.M., Imberty A., Goldberg R., Czaninski Y. (1986) Nature, localization and specificity of peroxidases involved in lignification processes. In: Greppin H, Penel C, Gaspar T (eds) *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. University of Geneva, Geneva, pp 189–198.

Chaoui, A., Jarrar B. y El Ferjani E. (2003) Effects of cadmium and copper on peroxidase, NADH oxidase and IAA oxidase activities in cell wall, soluble and microsomal membrane fractions of pea roots. *Journal of Plant Physiology* 161: 1225-1234.

Chen, X. Y., Kim S.T., Cho W.K., Rim Y., Kim S., Kim .S.W, Kang K.Y., Park Z.Y. y Kim J.Y. (2008) Proteomics of weakly bound cell wall proteins in rice calli. *Journal of Plant Physiology* 1-11.

Cooper, W.C. (1935) Hormones in relation to root formation on stem cuttings. *Plant Physiol.* 10: 789-794.

Córdoba-Pedregosa, M.C, González-Reyes J. A., Cañadillas M.S., Navas P. y Córdoba F. (1996) Role of Apoplastic and Cell-Wall Peroxidases on the stimulation of root elongation by Ascorbate. *Plant Physiol.* 11 2: 1119-1125.

Cosío, C. y Dunand C. (2009) Specific functions of individual class III peroxidase genes. *J. Exp. Bot.* 60 (2): 391-408.

De Klerk, G.J., Van Der Krieken W. y De Jong J.C. (1999) Review The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cell. Dev. Biol.--Plant.*35:189-199.

Dogan, S., Turan P., Dogan M., Arslan O. y Alkan M. (2007) Partial characterization of peroxidase from the leaves of thymbra plant (*Thymbra spicata* L. var. *spicata*).*Eur Food Res Technol.* 225:865-871.

Endo, T. (1968) Indoleacetate oxidase activity of horseradish and other plant peroxidase isozymes. *Plant Cell Physiol.* 9:333-341.

Epstein, E. y Lavee S. (1984) Conversion of indole-3-butyric acid to indole-3-acetic acid by cuttings of grapevine (*Vitis vinifera*) and olive (*Olea europea*). *Plant Cell Physiol.* 25: 697-703.

Epstein, E. y Ludwig-Müller J. (1993) Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, biosynthesis, metabolism, and transport. *Physiologia Plantarum* 88: 382-389.

Evans, J.J. (1968) Peroxidases from the extreme dwarf tomato plant. Identification, isolation, and partial purification. *Plant Physiol.* 43: 1037-1041.

Evans J.J. (1990) Cell wall bound and soluble peroxidases in normal and dwarf tomato. *J. Agric. Food Chem.* 38 (4): 948-951.

Feiz, L. Irshad, M., Pont-Lezica, R.F., Canut, H. y Jamet, E. (2006) Evaluation of cell wall preparations for proteomics: a new procedure for purifying cell walls from *Arabidopsis hypocotyls*. *Plant Methods* 2:10.

Feldman, L.J. (1981) Effect of auxin on acropetal auxin transport in roots of Corn. *Plant Physiology* 67:278-281.

Ford, Y.Y., Bonham E.C., Cameron R.W.F., Blake P.S. Judd H.L. y Harrison-

Murray R.S. (2001) Adventitious rooting: examining the role of auxin in an easy- and a difficult-to-root plant. *Plant Growth Regulation* 00:1-11.

Frenkel, C. (1972) Involvement of peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase isozymes from pear, tomato, and blueberry fruit in ripening. *Plant Physiol.* 49: 757-763.

Friedman, R.A., Altman A. y Bachrach U. (1985) Incorporation of precursors into polyamines II. *Plant Physiol.* 79:80–83.

Friml, J., Wisniewska J., Benková E., Mendgen K., Palme K. (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* 415: 806–809.

Friml, J. (2003) Auxin transport-shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology* 6:7-12.

Gaspar, T.H., Penel C., Thorpe T. y Greppin H. (1982) Peroxidases 1970-1980: A Survey of their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants. - Univ. of Geneva Press, Geneva, pp. 9-60.

Gaspar, T.H., Kevers C., Hausman J.F., Ripetti V. (1994) Peroxidase activity and endogenous free auxin during adventitious root formation. In: Lumsden, P.J., Nicholas L.R., Davies W.J. (eds) *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp 289–298.

Gaspar, T.H., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D., Thorpe T. (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell Dev-Plants* 32:272–289.

Gaspar, T.H., Kevers C., Faivre-Rampant O., Crevecoeur M., Penel C., Greppin H., y Dommes J. (2003) Changing concepts in plant hormone action. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 39:85–106.

Gazaryan, I.G., Lagrimini M. (1996) Tobacco anionic peroxidase overexpressed in transgenic plants: aerobic oxidation of indole-3-acetic acid. *Phytochemistry* 42: 1271–1278.

Geng, Z., Rao K.J., Bassi A.S., Gijzen M. y Krishnamoorthy N. (2001) Investigation of biocatalytic properties of soybean seed hull peroxidase. *Catal Today* 64:233-238.

Grambow, H.J. y Langenbeck-Schwich B. (1983) The relationship between oxidase activity, peroxidase activity, hydrogen peroxide and phenolic compounds in the degradation of indole-3-acetic acid in vitro. *Planta* 157: 131-137.

Grambow, H. (1986). En: *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. H. Greppin, C. Penel y T. Gaspar (Eds.). University of Geneva, Switzerland, pp. 31-41.

Günes, T. (2000) Peroxidase and IAA-oxidase activities during rooting in cuttings of three poplar species. *Turk J Bot* .24:97-101.

Hadzi-Taskovic, Sukalovic V. y Vuletic M. (2003) The characterization of peroxidases in mitochondria of maize roots. *Plant Science* 164: 999-1007.

Hartmann, H. T.; Kester, D. E.; Davies, F. T. (1990) *Plant propagation: principles and practices*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.

Hoyle, M.C. (1972) Indoleacetic acid oxidase: a dual catalytic enzyme. *Plant Physiol*. 50: 15-18.

Jamet, E., Canut H., Boudart G., Irshad y Pont-Lezica R. (2006) Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends in Plant Science* 11 (1): 33-39.

Jamet, E., Albenne C., Boudart G., Irshad M., Canut H. y Pont-Lezica R. (2008) Recent advances in plant cell wall proteomics. *Proteomics* 8: 893-908.

Janick, J., Schery R.W., Woods F.W. y Ruttan V.W. (1974) *Plant Science. An Introduction to World Crops.*, 2 ed. W.H. Freeman and Co., San Francisco, USA. pp 3-25.

Jarvis, B.C. (1986) *Endogenous control of adventitious rooting in non-woody cuttings*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers. 191 p. 191-222.

Johri, S., Jamwal U. , Rasool S., Kumar A., Verma V. y Qazi G.N. (2005) Purification and characterization of peroxidases from *Withania somnifera* (AGB 002) and their ability to oxidize IAA. *Plant Science* 169: 1014-1021.

- Jouili, H., Bouazizi H., Rossignol M., Borderies G., Jamet E. y El Ferjani E. (2008) Partial purification and characterization of a copper-induced anionic peroxidase of sunflower roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 46:760-767.
- Kefeli, V. (1978) Natural plant growth inhibitors and phytohormones. Dr. W. Junk b.v. Publishers. The Hague/Boston. 277 pp.
- Kerr, I.D. y Bennett, M.J. (2007) New insight into the biochemical mechanisms regulating auxin transport in plants. *Biochem J.* 401: 613–622.
- Kevers, C., Hausman J.F., Fairre-Rampant O., Evers D. y Gaspar T. (1997) Hormonal control of adventitious rooting: progress and questions. *J Appl Bot.* 71:71-79.
- Kim, S.S. y Lee D.J. (2005) Purification and characterization of a cationic peroxidase Cs in *Raphanus sativus*. *Journal of Plant Physiology* 162:609-617.
- Kobayashi, S., Sugioka K., Nakano H., Nakano M., Kubota S.T. (1984) *Biochemistry* 23, 4589.
- Kokkinakis, D.M. y Brooks J.L. (1979) Tomato Peroxidase. Purification, caracterización, and catalytic properties. *Plant Physiology* 63, 93-99.
- Ljung, K., Hull A.K., Celenza J., Yamada M., EstelleM., Normanly J. y Sandberg G. (2005) Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell* 17:1090-1104.
- Ludwig-Müller, J., Sass S., Sutter E., Wodner M. y Epstein E. (1993) Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Growth Regul.* 13: 179-187.
- Ludwig-Müller, J. (2000) Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *J Plant Growth Regul.* 32: 219-230.
- Ludwig-Müller, J. (2003) Peroxidase isoenzymes as markers for the rooting ability of easy-to-root and difficult-to-root *Grevillea* species. *In Vitro-Plant* 39: 377-383.

Ludwig-Müller, J., Vertocnik A. y Town C.D. (2005) Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on Arabidopsis stem segments. *Journal of Experimental Botany* 56(418):2095-2105.

Melan, M.A. y Cosgrove D.J., (1988) Evidence against the involvement of ionically bound cell wall proteins in pea epicotyl growth. *Plant Physiol.* 86: 469-474.

Mehlhorn, H. y Kumert, K. J. (1986) in *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases* (Greppin, H., Penel C. y Gaspar Th., eds), pp. 437-440. Universite de Geneve Centre de Botanique, Switzerland.

Mika, A., Boenisch, M.J., Hopff, D. y Lühje, S. (2010) Membrane-bound guaiacol peroxidases from maize (*Zea mays* L.) roots are regulated by methyl jasmonate, salicylic acid, and pathogen elicitors. *J. Exp. Bot.* 61:831-841.

Molassiotis, N. A., Dimassi K., Diamantidis G., y Therios I. (2004) Changes in peroxidases and catalase activity during *in vitro* rooting. *Biologia plantarum* 48 (1): 1-5.

Morales, M. y Ros Barceló A. (1997) A basic peroxidase isoenzyme from vacuoles and cell walls of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry* 45(2): 22-232.

Muday, G. (2001) Auxins and tropisms. *J. Plant Growth Regul.* 20:226-243.

Murakami, S., Takahara H. y Shiraiwa M. (2007) Purification and characterization of three neutral extracellular isoperoxidases from rye leaves. *Phytochemistry* 68:777-784.

Nag, S., Saha K. y Choudhuri M.A. (2001) Role of auxin and polyamines in adventitious root formation in relation to changes in compounds involved in rooting. *J Plant Growth Regul.* 20:182–194.

Nordström, A.C., Jacobs F.A. y Eliasson L. (1991) Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid on internal levels of the respective auxins and their conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Plant Physiol.* 96:856-861.

Okusa, K., Miyakoshi T. y Chen C.L. (1996) Comparative studies on

dehydrogenative polymerization of coniferyl alcohol by laccase and peroxidases. Preliminary results. *Holzforschng.* 50 (1):15-30.

Palmieri, S., Odoardi M., Soressi G.P., Salamini F. (1978) Indole acetic acid oxidase activity in two high-peroxidase tomato mutants. *Physiol Plant.* 42: 85-90.

Passardi, F., Penel C. y Dunand C. (2004) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* 9 (11):534-540.

Passardi, F., Tognolli, M., De Meyer M., Penel, C. y Dunand, C. (2006) Two cell wall associated peroxidases from *Arabidopsis* influence root elongation. *Planta* 223:965-974.

Peñalosa, C.I. (1998) Efecto del AIB, el AIA y el floriglucinol sobre la respiración en mitocondrias aisladas y la actividad de auxina oxidasas. Y su correlación con la respuesta de formación de raíces adventicias en hipocotilos de *Phaseolus aureus* bajo diferentes condiciones. Tesis Doctorado. Facultad de ciencias. UNAM.

Pérez, E., Rodríguez Y., Hernández M.A., de la Noval B.M. (2004) Dinámica de inducción de algunos sistemas de defensa en la interacción HMA-Tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*) var. Amalia. II. Inducción y expresión de peroxidases polifenoloxidasas en raíces de tomate. *Cultivos tropicales* 25 (2):45-52.

Polle, A., Otter T. y Seifert F. (1994) Apoplastic Peroxidases and Lignification in Needles of Norway Spruce (*Picea abies* L.) . *Plant Physiol.* 106: 53-60.

Pressey, R. (1990) Anions activate the oxidation of indoleacetic acid by peroxidases from tomato and other sources. *Plant Physiol.* 93:798-804.

Quesada, M.A., Tigier H.A., Bukovac M.J y Valpuesta V. (1990) Purification of an anionic isoperoxidase from peach seeds and its immunological comparison with other anionic isoperoxidases. *Physiologia Plantarum* 79: 623-628.

Rashotte, A.M., Brady S.R., Reed R.C., Ante S.J. y Muday G.K. (2000) Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122: 481-490.

Rashotte, A.M., Poupart P., Waddell C.S. y Muday G.K. (2003) Transport of the two natural auxins, indole-3-butyric acid and indole-3-acetic acid, in *Arabidopsis*. Plant Physiology 133: 761-772.

Raven, J. A. (1975) Transport of indoleacetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. New Phytol. 74: 163-172.

Ranadive, A.S. y Haard N.F. (1972) Peroxidase localization and lignin formation in developing pear fruit. J Food Sci. 37: 381-383.

Ridge, I. y Osborne D. J. (1971) Role of peroxidase when hydroxyproline-rich protein in plant cell wall is increased by ethylene. Nature New Biol. 299: 205-208.

Riquelme, A. y Cardemil L. (1993) Peroxidases in the cell walls of seeds and seedlings of *Araucaria araucana*. Phytochemistry 32(1): 15-20.

Robertson, D., Mitchell G.P., Gilroy J.S., Gerrish C., Bolwell G.P., Slabas A.R. (1997) Differential extraction and protein sequencing reveals major differences in patterns of primary cell wall proteins from plants. J. Biol. Chem. 272: 15841–15848.

Ros Barceló, A., Pedreño M.A., Muñoz R. y Sabater F. (1988) Lupin peroxidases. II. Binding of acidic isoperoxidasas to cell walls. Physiologia Plantarum 73: 238-244.

Ros Barceló, A., Pedreño M.A., Ferrer M.A., Sabater F., Muñoz R. (1990) Indole-3-methanol is the main product of the oxidation of indole-3-acetic acid catalyzed by two cytosolic basic isoperoxidasas from *Lupinus*. Planta 181: 448–450.

Rubery, P.H. y Sheldrake A.R. (1974) Carrier-mediated auxin transport. Planta 88: 101-121.

Sahulka, J. (1970) Electrophoretic study on peroxidase, indoleacetic acid oxidase and o-diphenoloxidase fractions in extracts from different growth zones of *Vicia faba* L. roots. Biol. Plant. 12(3):191-198.

Sánchez-Bravo, J. y Núñez C. (1990a) Distribución de AIA-oxidasa y peroxidasa en hipocótilos etiolados de *Lupinus albus*, L. Relación con el crecimiento. Anales de Biología. 16 (Biología Vegetal, 5): 137-142. Secretariado de Publicaciones-Universidad de Murcia.

Sánchez-Bravo, J. y Núñez C. (1990b) Cambios en la actividad AIA-oxidasa y peroxidasa en hipocótilos de *Lupinus albus*, L., producidos por tratamientos con Ac.Indolil-3-acético. Anales de Biología. 16 (Biología Vegetal, 5): 143-151. Secretariado de Publicaciones-Universidad de Murcia.

Sato, Y., Sugiyama M., Gorecki R.J., Fukuda H., Komamine A. (1993) Interrelationship between lignin deposition and the activities of peroxidase isoenzymes in differentiating tracheary elements of *Zinnia*. Planta 189: 584–589.

Savitsky, P.A., Gazaryan I.G., Tishkov V.I., Lagrimini L.M., Ruzgas T. y Gorton L. (1999) Oxidation of indole-3-acetic acid by dioxygen catalysed by plant peroxidases: specificity for the enzyme structure. Biochem J. 340: 579-583.

Saxena, C., Samantaray S., Rout G.R. y Das P. (2000) Effect of auxins on *in vitro* rooting of *Plumbago zeylanica*: peroxidase activity as a marker for rooting induction. Biol. Plant. 43: 121-124.

Sequeira, L. y Mineo I. (1966) Partial purification and kinetics of indoleacetic acid oxidase from tobacco roots. Plant Physiol. 41: 1200-1208.

Sorin, C., Bussell J.D., Camus I., Ljung K., Kowalczyk M., Geiss G., McKhann H., Garcion C., Vaucheret H., Sandberg G. y Bellinia C. (2005) Auxin and light control of adventitious rooting in arabidopsis require ARGONAUTE. The Plant Cell 17: 1-17.

Swarup, R., Friml J., Marchant A., Ljung K., Sandberg G. y Palme K. (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. Genes Dev. 15: 2648-53.

Taiz, L. y Zeiger E. (2006) Plant Physiology, Fourth Edition. Sunderland, Massachusetts. 705 pp. ISBN 978-0-87893-856-8.

Tartoura, K.A. (2001) Effect of abscisic acid on endogenous IAA, auxin protector levels and peroxidase activity during adventitious root initiation in *Vigna radiata* cuttings. Acta Physiologiae Plantarum 23(2): 149-156.

Teale W D, I A Paponov, K Palme (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7:847-859.

Terragó, R.J., Faloci M.M., Luna V.C., Sansberro A.P. Mroginski A.L. (2003) Determinación de enzimas peroxidadas en tejidos caulinares de *Ilex dumosa* R. e *Ilex paraguariensis* St. Hil.

Tian, Q., Chen F., Liu J., Zhang F. y Mi G. (2007) Inhibition of maize root growth by high nitrate supply is correlated with reduced IAA levels in roots. 1-10.

Valério, L., De Meyer, M., Penel C. y Dunand C. (2004) Expression analysis of the *Arabidopsis* peroxidase multigenic familia. *Phytochemistry* 65: 1331-1342.

Valero, P. y Labrador E. (1995) Effect of auxin on cell wall glycanhydrolytic enzymes in epicotyls of *Cicer arietinum*. *Physiol. Plant.* 93: 764-770.

Van den Berg, B.M., Chibbar R.N., van Huystee R.B. (1983) A comparative study of a cationic peroxidase from peanut and an anionic peroxidase from petunia. *Plant Cell Rep.* 2: 304-307.

Vázquez M.J. (2002) Efecto del ácido indol-3-acético y ácido indol-3-butírico sobre ATPasas-Ca²⁺ de *Vigna radiata*. Tesis Maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.

Veitch, N.C. (2004) Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 65: 249-259.

Vatulescu, A.D., Fortunato S.A., Sá C.M., Amancio S., Ricardo P.P.C. y Jackson A.P. (2004) Cloning and characterisation of a basic IAA oxidase associated with root induction in *Vitis vinifera*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 609-615.

Voigt, J., Frank R. (2003) Proteins are constituents of the insoluble glycoprotein framework of the chlamydomonas cell wall. *Plant Cell.* 15: 1399-1413.

Waldrum, J.D. y Davies D. (1981) Subcellular localization of IAA oxidase in peas. *Plant Physiol.* 68:1303-1307.

Watson, B.S., Lei Z., Dixon R.A. y Sumner L.W. (2004) Proteomics of *Medicago sativa* cell walls. *Phytochemistry* 65:1709-1720.

Woodward, A. W. y Bartel, B. (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot. (Lond.)* 95, 707-735.

Zhao, Y. (2008) The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 11:16-22.

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

Zhu, J., Chen S., Alvarez S., Asirvatham V.S., Schachtman D.P., Wu Y. y Sharp R.E. (2006) Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. I. Extraction and identification of water-soluble and lightly ionically bound proteins. *Plant Physiol.* 140: 311-325.