

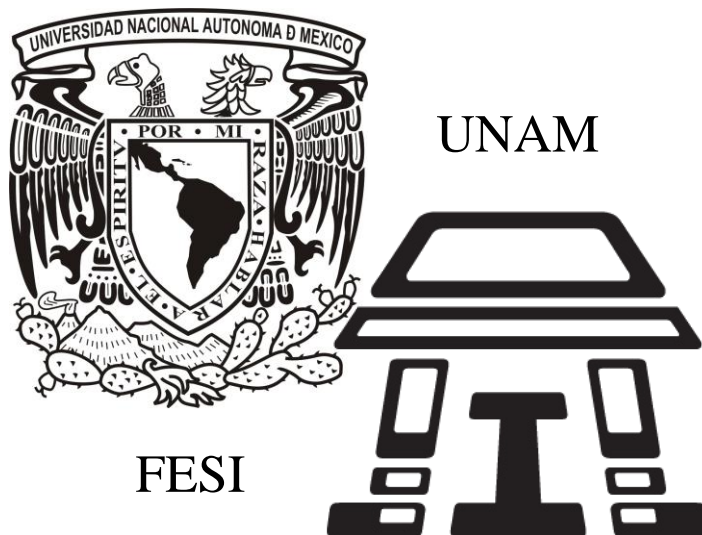


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Unidad de Biotecnología y Prototipos

Fisiología vegetal



ISOPEROXIDASAS ANIÓNICAS DE TALLOS DE BROTES AXILARES DE *Solanum lycopersicum*, CON ACTIVIDAD AIA Y AIB OXIDASA *in vitro*

Tesis que para obtener el título de

BIÓLOGO

Presenta

ANABEL RUIZ FLORES

Director de tesis

DR. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO

México 2013





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.





NOTA PRELIMINAR

Este trabajo se desarrollo con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), el cual concedió la beca de Licenciatura/Conclusión de estudios, a través del proyecto IN226210 durante el periodo 2011-2012.

La parte experimental del trabajo fue realizada en los laboratorios de Fisiología Vegetal y Biogeoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI-UNAM).







AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mi asesor el Dr. Ignacio Peñalosa Castro, por su orientación, dirección y supervisión, así como la confianza que me brindó para proponer y realizar experimentos inesperados durante la elaboración de esta tesis, pues sin su ayuda no se habría llevado a cabo. Gracias por todas sus enseñanzas, sus consejos científicos y personales, por el gran apoyo que recibí durante todos estos años y por alentar mi deseo impaciente de generar soluciones a problemas científicos.

Me siento afortunada de haber llegado por obra maléfica del destino a la FESI, pues fue ésta institución la que me dejó conocer la importancia de la investigación científica y específicamente el estudio de la vida. Agradezco a los profesores Ricardo Mejía, Gerardo Ortíz, Hugo Castro, Beatriz Macedo, José Luis Rodríguez, entre muchos más que contribuyeron a mi formación como persona analítica y crítica destructiva, dejando de lado la manera tradicionalista conformista de estudio.

Tengo la satisfacción de haber pertenecido al un grupo de investigación de la Unidad de Biotecnología y Prototipos que cuenta con una visión integral del mundo, comprometido con la aportación al desarrollo de esta ciencia y a su aplicación práctica. Agradezco a los profesores Josefina V., Rafael Q., Elías P., Luis B., Roberto V. (UMF), y Cesar F., quienes me capacitaron para el buen desempeño en el laboratorio, y por el vasto conocimiento que me transmitieron, no obstante hago hincapié a los momentos de alegría en que la letra muerta y aburrida se tornaba como la palabra viva que adquiría significados folklóricos en un ambiente familiar a lado de mis grandes compañeros y amigos de laboratorio.

Indiscutiblemente no habría podido realizar esto sin ser parte de una gran familia, mis padres Teresa Flores y Evaristo Ruiz, base de todos mis logros, quienes al dejarme libre me hicieron una persona dedicada con metas fijas al seguir su ejemplo y que no sólo quiso ser la estudiante, sino la científico ya que me dieron las alas para volar y crear mi propio juicio, mi hermano Sergio Ruiz que contribuyó desde mi aparición en el mundo con mis primeras aventuras y golpes de la vida, eventos que dieron origen a mi fortaleza y competitividad.

Por supuesto gracias, a quien cambió la concepción sobre la intoxicación química del cerebro de un ser inocente e inconsciente, Raúl Gómez T. P., personaje fundamental y trascendental en mi historia universitaria, aquel por el que me esforcé académicamente y gasté cada biomolécula, con quien compartí el más bello viaje a los planetas y galaxias más lejanas, que provoca en mí un concierto de sentimientos. Te amo.

La riqueza y calidad de amistades evidentemente me alentó a seguir después de la traumática experiencia de la sistemática, con sus maravillosos consejos, sentimientos sinceros e innumerables sonrisas que acababan en tumultuosas carcajadas, dejándonos llevar al ritmo de nuestros corazones sin dolor a los pisotones, nuestras almas tan livianas nos permitieron volar a exóticos lugares sobrenaturales siempre disfrutando al combinar los conocimientos biológicos teóricos con nuestro razonamiento descabezado práctico aplicado.





La estructura, funcionamiento y medio interno de una vida

A diario salía de mi casa y miraba cosas que me asombraban, comenzaba a preguntarme sobre el fenómeno de la vida, ¿cómo germinó, como se alimentó y como creció?, es así como descubrí que la biología era para mí; una ciencia que me mantendría expectante, pues mi alegría muere hasta que mi incertidumbre cesa, y la vida es un suceso fascinante que me sigue conquistando pues es algo inagotable y sobre todo inexplicable.

Las plantas, aquellas que trabajan duramente generando la molécula de la vida, sea de día o de noche, pero siempre renacen y se vigorizan, sucesos que muestran la capacidad que tiene cada ser vivo de existir, es así como me hice rana, pues al sentir que la vida me envolvía me hice sensible y pude respirar por la piel, me gusta volar pero creo saber el porqué de mi odio a las palomas, ellas no cantan, emiten un sonido, que es más bien un lamento y la vida no es para los fugitivos sino para demostrar valentía y sentirnos victoriosos.

Me agrada saber cómo funcionan las plantas, pues después de vivir una maravillosa vida, basada en mecanismos bioquímicos enigmáticos serán cortadas, y aquella fibra vegetal se convertirá en un objeto circular o rectangular, alrededor del cual los personajes contemporáneos con los que he vivido, se reunirán.

Coexistimos en un circo, donde fuimos acróbatas que saltaban al vacío sin ningún prejuicio, dejábamos el miedo atrás, pues sin pensar en la precisión dábamos vueltas en el aire y el abrazo mutuo siempre estabilizaba la caída. Fuimos parte del espectáculo y surgimos como algo inesperado que se siente bien mientras se ve, ahora sé que mi memoria tiene que permanecer intacta para no olvidar todo lo que la luz me permitió ver y la oscuridad me dejó sentir, pues sus sonrisas memorables reviven un sentimiento inmortal que ninguna foto guardará.

Al igual que mi corazón el suelo vibró en los sitios que pisamos, aquellos que por más altos o lejanos jamás dejamos de avanzar, en donde nos convertíamos en los animalillos silvestres que se encontraban inmersos y pertenecientes a la maleza, y no a la humanidad, sino a aquella vegetación que magníficamente se desenvuelve libremente, que se moldea respecto a sus adyacentes cuando se encuentra inmersa en los restos de un mundo aún natural.

Así vivimos, para mí no hay mejor fórmula, pues en ustedes encontré el balance perfecto de mi existencia.





Agradecimientos

Gracias a mis isoformas químicas y biológicas

Unos más altos, otros más bajos, unos más gordos otros más flacos (fisiología), unos más viejos otros más jóvenes (ciclo celular), diferimos en la secuencia de nucleótidos (genotipo), pero codificamos las mismas biomoléculas aunque en mayor o menor proporción (bioquímica) y mejor o peor funcionamiento (metabolismo), tenemos sólo la variante física (fenotipo), coincidimos en el fallo de anticuerpos (patologías), hacemos sinapsis aunque no procesamos igual (sistema nervioso central), contamos con los mismos casi mismos gustos culinarios (perversión alimenticia), pero nos encontramos inmersos en el mismo universo, compartiendo las mismas expectativas de vida, alegrías y emociones de aventuras compartidas en las que utilizamos nuestra energía en reacciones de la manera más eficiente y divertida (química).

Sobrevivientes: Obed Palagot Echavarría, Isaac Morán Martínez, Raúl Gómez Trejo Pérez, Ismael Rea Hernández

Trio inseparable: Harbano Christi-anAbel Feregrino², José Luis Rosales Rodríguez

El recreo: Jorge Herrera Díaz, Daniel Isaac Sánchez Chávez

Tronkilios: Axel Rivero Navarrete, Hector Jaime Ramirez Vázquez,

Mis amigas las peores-personas: Maricruz Trejo Martínez, Helena Hernández Rosales, Alejandra Dávila

Barco, Magali Quintanar, Adriana Palmira, Patricia Mariquez,

Cuatro fantásticos: Antonio, Ali, Alan

Pulk's: Ulises, Adrian, Getze, Pako, Yair

Masters: Ricardo, Miguel, Marco

X tiende a...: Edgar, Eduardo





La sabiduría es a la locura como la razón es a la pasión.

Erasmus de Rotterdam

La locura conduce a la más elevada sabiduría
y es indispensable para generar toda alegría.







ÍNDICE

Abreviaturas	15
Resumen	17
1. INTRODUCCIÓN	19
2. INFORME BIBLIOGRÁFICO	23
2.1 LA PLANTA DE TOMATE	25
2.1.1 Origen	
2.1.1.2 Domesticación	
2.1.2 Producción	
2.1.2.1 Hidroponia como sistema de producción	
2.1.2.2 Sustratos	
2.1.3 Propagación por esquejes	
2.2 FITOHORMONAS	27
2.2.1 Auxinas	
2.2.1.1 Auxinas naturales y sintéticas	
2.2.1.2 Metabolismo de auxinas	
2.2.1.2.1 Biosíntesis	
2.2.1.2.2 Transporte	
2.2.1.2.3 Catabolismo	
2.3 FAMILIAS DE PEROXIDASAS	31
2.3.1 Clasificación	
2.3.2 Isoenzimas y localización	
2.3.3 Reacciones catalizadas por las peroxidasas de clase III	
2.4 ENZIMAS AIA OXIDASA	38
2.5 COMPUESTOS FENÓLICOS	40
3. JUSTIFICACIÓN	41
4. HIPÓTESIS	45
5. OBJETIVOS	49
6. MATERIAL Y MÉTODOS EXPERIMENTALES	53
6.1 PRODUCCIÓN DE MATERIAL VEGETATIVO	55
6.1.1 Germinación se semillas	
6.1.2 Trasplante	
6.1.3 Propagación por esquejes	
6.1.4 Riego	
6.1.5 Control de plagas	





6.2 EXTRACCIÓN DE PEROXIDASAS DE CLASE III	59
6.2.1 Recolección de material biológico	
6.2.1.1 Tallos sin tratamiento	
6.2.1.2 Tallos con tratamiento	
6.2.2 Protoplastos	
6.2.3 Proteínas de la fracción soluble del apoplasto	
6.2.4 Proteínas de paredes celulares	
6.2.5 Apoplasto	
6.2.5.1 Ensayo de diez días de enraizamiento	
6.2.5.2 Ensayo con diferentes pH	
6.2.6 Preservación	
6.3 FRACCIONAMIENTO Y CONCENTRACIÓN DE ISOENZIMAS	63
6.3.1 Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
6.3.1.2 Diálisis	
6.3.2 Electroforesis preparativa	
6.3.3 Columna de intercambio iónico	
6.3.4 Filtración por intercambio iónico	
6.3.5 Filtración por exclusión molecular	
6.3.6 Precipitación con Acetona al 80%	
6.3.7 Recorte de bandas de interés	
6.4 CARACTERIZACIÓN DE ISOPEROXIDASAS	65
6.4.1 Análisis de contenido proteico en solución	
6.4.2 Análisis cinético	
6.4.2.1 Actividad peroxidasa	
6.4.2.2 Actividad auxina oxidasa (AIAox/AIBox)	
6.4.2.2.1 Técnica Salkowski	
6.4.2.2.2 Espectrometría	
6.4.2.2.3 Consumo de O_2	
6.4.3 Análisis de pureza por electroforesis	
6.4.3.1 Electroforesis nativa PAGE	
6.4.3.1.1 Tinción de peroxidadas	
6.4.3.1.2 Tinción de actividad AIAox/AIBox	
6.4.3.2 Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE	
6.4.3.2.1 Tinción con azul de Coomassie	
6.4.3.2.2 Tinción rápida de plata	
6.4.3.2.3 Tinción para glicoproteínas	
6.4.3.3 Ensayo de actividad Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa (G6PDH)	
6.4.4 Determinación de pI	
6.4.4.1 Electroforesis en segunda dimensión (2-D)	
6.5 ANÁLISIS DEL CATABOLISMO AUXÍNICO	73
6.5.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	





6.6 IDENTIFICACIÓN DE UNA ISOPEROXIDASA	73
6.6.1 Espectrometría de masas	
6.6.2 Análisis <i>in silico</i>	
6.6.2.1 Proteína	
6.6.2.2 Estructura	
6.6.2.3 Filogenética	
7. RESULTADOS Y ANÁLISIS	77
7.1 PRODUCCIÓN DE MATERIAL VEGETATIVO	79
7.1.1 Propagación por esquejes	
7.2 PEROXIDASAS DE CLASE III	80
7.2.1 Fraccionamiento y concentración de isoenzimas	
7.2.2 Caracterización de isoperoxidasas de clase III	
7.2.2.1 Efecto del amortiguador	
7.2.2.2 Efecto del pH	
7.2.2.3 Afinidad de sustrato	
7.2.3 Purificación de la Px7	
7.3 CATABOLISMO AUXÍNICO	106
7.3.1 Colorimetría	
7.3.2 Oximetría	
7.3.3 Espectrometría	
6.4.2.2.3 Consumo de O ₂	
6.4.3.2.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	
7.4 ANÁLISIS FISIOLÓGICO DE LAS PEROXIDASAS DE CLASE III EN EL PROCESO DE ENRAIZAMIENTO ADVENTICIO	116
8. DISCUSIÓN	123
9. CONCLUSIONES	133
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
11. APÉNDICES	149







Abreviaturas

- (NH₄)₂SO₄ Sulfato de amonio
- 2-D Segunda dimensión
- A Absorbencia
- AIA Ácido Indol-3-Acético
- AIAox Ácido Indol-3-Acético oxidasa
- AIB Ácido Indol-3-Butírico
- AIBox Ácido Indol-3-Butírico oxidasa
- BLAST Basic Local Alignment Search Tool
- BSA Albúmina de suero bovino
- C Tallos completos
- C₆H₁₄O₆ Manitol
- Ca (NO₃)₂ Nitrato de calcio
- CoI Compuesto I, primera forma enzimática intermedia de la peroxidasa
- CoII Compuesto II, segunda forma enzimática intermedia de la peroxidasa
- CoIII Compuesto III, forma enzimática intermedia y surge cuando la enzima se encuentra con exceso de peróxido de hidrógeno
- CuSO₄·5H₂O Sulfato de cobre pentahidratado
- Da Dalton
- DCP Diclorofenol
- DTT Ditioneitol
- EC 1.11.1.7 Enzimas óxido-reducetasas, actúan sobre peróxido como donador
- EDTA Ácido etilendiaminotetraacético
- FS Fracción soluble del apoplasto
- G6PDH Glucosa- 6-fosfato deshidrogenasa
- H₂MoO₄·4H₂O Ácido molibdico
- H₂O₂ Peróxido de hidrógeno
- H₃BO₃ Ácido bórico
- HCl Ácido clorhídrico
- HEPES N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'-[ácido etanosulfónico]
- HPLC Cromatografía líquida de alta resolución
- HRP Peroxidasa de rábano
- IEF Isoelectroenfoque
-





Abreviaturas

$KC_2H_3O_2$	Acetato de potasio
KH_2PO_4	Fosfato de potasio
KNO_3	Nitrato de potasio
KNO_3	Nitrato de potasio
LC-MS	Cromatografía líquida de micro-flujo
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization
$MgSO_4$	Sulfato de magnesio
$MnCl_2$	Cloruro de manganeso
Na_2CO_3	Carbonato de sodio
$Na_2S_2O_3$	Tiosulfato de sodio
$NaC_2H_3O_2$	Acetato de sodio
$NaCl$	Cloruro de sodio
$NaClO$	Hipoclorito de sodio
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	Fosfato de sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometros
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PC	Pared celular
pH	Potencial de hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
PVP	Polivinilpirrolidona
Px	Actividad peroxidasa
Px#	Peroxidasa
R	Rodajas de tallos
Rf	Movilidad relativa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamonio
TRIS	Tris-hidroximetil-aminometano
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Sulfato de zinc heptahidratado
ϵ	Coefficiente de extincion molar





Resumen

El presente estudio aporta evidencia experimental sobre isoperoxidasas (EC 1.11.1.7) con actividad auxina oxidasa y auxina peroxidasa, así como su localización subcelular, aspectos hasta ahora desconocidos para *Solanum lycopersicum*.

Se obtuvo la fracción soluble (FS) de apoplasto y la correspondiente a pared celular (PC) de brotes axilares para evaluar las isoenzimas libres, las asociadas y el tipo de interacción con la PC. Las actividades peroxidasa, y auxina oxidasa se evaluaron por diferentes ensayos haciendo uso de técnicas colorimétricas, polarografía y electroforesis PAGE/SDS-PAGE, empleando diferentes tinciones para la identificación de productos en reacciones enzimáticas específicas. Se realizaron etapas de purificación por cromatografías en columna e isoelectroenfoque (2-D). La detección de la formación de compuestos oxindólicos fue analizada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Comparando la expresión proteica a lo largo de 10 días de enraizamiento, la actividad enzimática sugiere un equilibrio entre asociación y disociación con la PC, sin embargo en protoplastos se muestra nula, corroborando la localización extracelular de las isoperoxidasas de clase III. El apoplasto reveló 1 peroxidasa catiónica y 11 isoperoxidasas aniónicas, 8 mayormente encontradas en la PC y 3 en la FS. Se demostró el consumo de oxígeno al utilizar AIA o AIB como sustratos en ausencia de peróxido de hidrógeno, y se logró la purificación de una isoperoxidasa, determinada Suberization-associated anionic peroxidase (LePrx76), de acuerdo a un análisis por semejanza en la secuencia de aminoácidos. Las características encontradas en las enzimas estudiadas apoyan la idea que considera su importancia en el control de auxina libre.







1. INTRODUCCIÓN







Entre los procesos que hacen referencia a la regulación de los niveles de las hormonas vegetales auxinas, se encuentra el catabolismo oxidativo o descarboxilativo del ácido Indol-3-Acético, que es una modificación química del anillo indólico o de la cadena lateral respectivamente, reacciones que dan lugar a la pérdida de actividad auxínica y que diversas enzimas tipo peroxidasa catalizan.

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) son enzimas distribuidas en los reinos animal y vegetal, que catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el peróxido de hidrógeno o un hidroperóxido orgánico como molécula aceptora de electrones, siguiendo un mecanismo *ping-pong* (Cleland, 1970, 1990). Estas enzimas se caracterizan por tener como grupo prostético un grupo hemo tipo b (protoporfirina IX), con Fe (III) pentacoordinado, que constituye su centro activo (Welinder y Gajhede, 1993).

Las peroxidasas se encuentran en una gran variedad de organismos, y se pueden clasificar en dos superfamilias en función de sus diferencias estructurales (Welinder, 1992): la superfamilia de las peroxidasas animales y la superfamilia de las peroxidasas bacterianas, fúngicas y de plantas, cuyos componentes a pesar de mostrar en algunos casos una identidad de secuencia baja, presentan el mismo plegamiento y están evolutivamente relacionados (Welinder y Gajhede, 1993).

Esta última superfamilia se divide en tres clases. La clase I, peroxidasas intracelulares de origen procariótico como ascorbato peroxidasas (APXs) y citocromo *c* peroxidasa (CcP); la clase II, peroxidasas intracelulares de origen fúngico como lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP), y la clase III, peroxidasas secretadas por plantas superiores como peroxidasas de rábano picante (HRP), de cebada (BP), de cacahuete (PNP), de hojas de palma africana (AOPTP), de hojas de palma real (RPTP) de semillas de soja (SBP), entre otras. Estas últimas están implicadas en una variedad de procesos fisiológicos a lo largo del ciclo vital de la planta, entre los que cabe citar crecimiento, desarrollo y endurecimiento de la pared celular, lignificación y suberización, catabolismo de auxina y defensa frente al estrés oxidativo y el ataque de patógenos (Chattopadhyay *et al.*, 2000; Pina *et al.*, 2000; Sakharov *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2002; Zamorano *et al.*, 2008).





Además de ésta funcionalidad dentro de la planta, las peroxidasas son enzimas que se utilizan ampliamente por la industria, siendo algunas de sus funciones: síntesis de polímeros orgánicos como polianilina (PANI), decoloración de tintes sintéticos, descontaminación y limpieza de aguas residuales y suelos, síntesis de fármacos orgánicos con alto rendimiento, electrodos enzimáticos, kits de diagnóstico e inmunoensayos enzimáticos. En todos estos procesos, la peroxidasa que se utiliza por excelencia es la peroxidasa de rábano picante (*Armoracia rusticana*), obtenida de sus raíces, además de la peroxidasa de soja (*Glycine max*), que presenta una mayor estabilidad. Razón por la cual la Comisión Científica de la Unión Europea ha definido a las peroxidasas como las proteínas con mayor interés biotecnológico para el siglo XXI, en especial por su potencial para conservar el medio ambiente (Ankara *et al.*, 1991; MacDiarmid, 1997; Raitman *et al.*, 2002).

Desde los primeros estudios con peroxidasas de plantas se ha determinado que son enzimas con una elevada estabilidad frente a cambios térmicos, químicos y de pH. El estudio de peroxidasas de diferentes fuentes vegetales se sigue llevando a cabo, pero hasta el día de hoy de las muchas peroxidasas de clase III caracterizadas bioquímicamente, son pocas las que tienen una estructura tridimensional conocida. Hasta el momento, tan sólo se conoce la estructura cristalográfica de la peroxidasa de rábano (Gajhede *et al.*, 1997), la de cacahuate (Schuller *et al.*, 1996) y la de cebada (Henriksen *et al.*, 1998). El alto porcentaje de glicosilación dificulta su cristalización y protege en muchos casos de la digestión proteolítica. Además, es conocido el bloqueo por piroglutamato del extremo N-terminal de muchas peroxidasas de clase III y la escasa homología de las peroxidasas con otros grupos proteicos.

Al hacer conocer la versatilidad de estas enzimas se empezaron a estudiar otras peroxidasas procedentes de distintas fuentes vegetales y el espectro de conocimiento se fue ampliando. Pues si bien es cierto que algunas de estas enzimas no presentan ningún interés, debido a que no mejoran las características de la peroxidasa de rábano, en cambio, abren un campo de estudio y de aplicación biotecnológica muy interesante, como son, las Pxs de jitomate.





2. INFORME BIBLIOGRÁFICO







2.1 LA PLANTA DE TOMATE

El tomate es una de las hortalizas más redituables y difundidas en el mundo y una de las de mayor valor económico gracias a su gran adaptabilidad, variabilidad, características organolépticas y usos (Hilhorst *et al.*, 1998).

2.1.1 Origen

El tomate planta dicotiledónea *Solanum lycopersicum* es la única especie domesticada (Peralta *et al.*, 2006). La clasificación filogenética de la familia *Solanácea* ha sido recientemente revisada y el anterior género *Lycopersicum* (Miller, 1754) se integró al nuevo género *Solanum* con su nueva nomenclatura, *Solanum* sección *lycopersicum* incluye el tomate cultivado (antes *Lycopersicum esculentum*) y 12 especies silvestres. (Pérez, 2010). Tiene su centro de origen en la región andina que hoy comparten Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile, extendiéndose posteriormente por todo el continente (Rodríguez *et al.*, 2001).

2.1.1.2 Domesticación

El centro de domesticación del tomate se cree que fue México, pues a la llegada de los españoles a América ya estaba integrado a la cultura azteca. Además el nombre moderno tiene su origen en la lengua náhuatl de México donde se le llamaba “tomatl”. Actualmente en el país sigue utilizándose mayoritariamente la palabra jitomate quizás porque los aztecas lo nombraban “xic-tomatl” (Cruces, 1990).

La planta de tomate es potencialmente perenne y es muy sensible a heladas, lo que determina su ciclo anual, de distinta duración según sea la variedad y se desarrolla adecuadamente en un amplio rango de latitudes, tipos de suelos, temperaturas, métodos de cultivo y también es moderadamente tolerante a la salinidad (Chamarro, 2001).

2.1.2 Producción

El cultivo de este fruto es uno de los más redituables en el mundo. México está considerado a nivel mundial como el centro más importante de domesticación del mismo. País donde está considerado como la segunda especie hortícola más importante por la superficie





sembrada y como la primera por su valor de producción. La importancia de este cultivo radica en su valor económico, por lo que su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio (Infoagro, 2003).

2.1.2.1 Hidroponía como sistema de producción

El cultivo sin suelo o hidropónico, en combinación con los invernaderos, posiblemente sea hoy en día el método más intensivo de producción de hortalizas que surge como una alternativa a la agricultura tradicional. El principal objetivo es eliminar o disminuir los factores limitantes de crecimiento asociados a los factores ambientales de la producción, que son sustituidos por otros soportes de cultivo donde se aplican técnicas alternativas de fertilización (Duran *et al.*, 2000). El concepto hidroponía deriva del griego *hidro* (agua) y *ponos* (labor, trabajo), que significa cultivo en agua (Alarcón, 2005). Definiéndose como un sistema de producción en el que las raíces de las plantas se irrigan con una mezcla de elementos nutritivos esenciales disueltos en agua, sistema que en lugar de suelo utiliza como sustrato una materia inerte estéril, o sólo la solución nutritiva. Los sistemas de cultivo hidropónico cerrados son aquellos en los que la solución nutritiva es aportada de forma continua y los abiertos o a solución perdida son aquellos en los que la solución nutritiva es desechada. Los sistemas de riego por goteo, subirrigación, circulación de la solución nutritiva, tuberías de exudación, contenedores, etc. son métodos utilizados para la administración de nutrimentos, los cuales son aplicados sobre un tipo sustrato (agua, materiales inertes o mezcla de materiales orgánicos) (González, 2006).

2.1.2.2 Sustratos

El término sustrato se aplica a todo material sólido, natural, de síntesis o residual, mineral u orgánico, distinto del suelo *in situ*, que al colocarlo en un contenedor, ya sea puro o en forma de mezcla, permite a la planta el anclaje del sistema radicular, que desempeña un papel de soporte para la planta. El sustrato puede o no intervenir en el proceso de nutrición mineral de la planta, por lo que pueden clasificarse como químicamente activos (turbas, cortezas de pino, etc) o químicamente inertes (perlita, lana de roca, roca volcánica, agrolita, etc.) (Terés, 2001). El sustrato es un sistema de tres fracciones, cada una con una función propia. La fracción sólida está constituida por un material poroso, en el que se desarrolla el





sistema radicular de la planta y que asegura el anclaje mecánico de la planta, la fracción líquida aporta el agua y constituye la reserva hídrica de la que las raíces toman el agua para cubrir sus necesidades, y por último la fracción gaseosa asegura las transferencias de oxígeno y dióxido de carbono del entorno radicular. La fase sólida del sustrato puede presentar distintos tamaños de partícula que se relaciona con la capacidad de retención de agua disponible para las plantas y de suministro, la facilidad para la circulación del agua, la capacidad para almacenar nutrientes, así como la superficie de las partículas. Lo cual permite una gran producción en un espacio reducido (Lemaire *et al.*, 2005).

2.1.3 Propagación por esquejes

La propagación se refiere prácticamente a una multiplicación masiva *in vitro*, definido como el procedimiento que comprende la manipulación de plantas, órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas desviándose del proceso sexual (Villalobos y Thrope, 1991, Krikorian, 1991). La metodología convencional más usada ha sido la inducción de la brotación axilar y subsecuente multiplicación de los brotes, debido a la totipotencialidad del meristemo apical y la región del brote apical adyacente, en la cual la cantidad de brotes a producir depende de la cantidad de yemas presentes en el inóculo y los individuos generados mediante este proceso guardan una identidad genética con respecto a la planta de la que han sido generados (Ambris, 1995).

Para la inducción del enraizamiento tanto en esquejes como en acodos, se utilizan reguladores de crecimiento tipo auxinas, los cuales aplicados en el sitio tratado estimulan el desarrollo de raíces. La formación de raíces adventicias es promovida por auxinas como ácido indol-3-acético (AIA) y ácido indol-3-butírico (AIB) (Weaver, 1998, Hartmann *et al.*, 2000, Woodward y Bartel, 2005).

2.2 FITOHORMONAS

Algunas sustancias químicas ocurren naturalmente en los tejidos de las plantas y tienen un papel regulatorio más que nutricional en el crecimiento y desarrollo, siendo activas a concentraciones muy bajas (menos de 1mM), llamadas hormonas o sustancias reguladoras del crecimiento vegetal. Existe gran controversia en utilizar este término, porque se





considera que las hormonas animales presentan ciertas características que las hormonas vegetales no reúnen, en el contexto amplio de que desencadenan respuestas que son específicas en un tiempo y en un tejido determinado, es válido el término “hormonas vegetales” Dun *et al.*, 2009).

Comúnmente los grandes grupos de fitohormonas que se reconocen son, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico, etileno, y auxinas, aunque en los textos más actuales se han añadido algunos otros como los brassinosteroides o los jasmonatos, y más recientemente las estrigolactonas (responsables de lo que se denominó SMS =Second Messenger Signal), que controlan el crecimiento de las yemas axilares (Dun *et al.*, 2009).

2.2.1 Auxinas

Entre las hormonas vegetales, las más estudiadas son las auxinas y constituyen un espectro de compuestos, que difieren estructuralmente y que tienen la capacidad de inducir respuestas que se han denominado tipo “auxina”, a pesar de la redundancia que supone el término.

El estudio de las auxinas empieza desde 1880, cuando Charles Darwin realizó experimentos que lo llevaron a proponer una sustancia hipotética que modulaba el alargamiento del tallo permitiendo el crecimiento trópico hacia la luz, el término auxina fue acuñado por científicos que examinaban sustancias que modulaban el crecimiento de las plantas y que estaban presentes en la orina humana que fueron llamadas auxinas A y B, mientras que un compuesto diferente a ellas, que fue aislado de hongos recibió el nombre de heteroauxina, esta última demostró reproduciblemente su actividad biológica y más tarde (1937) fue caracterizada por Thimann como ácido indolacético (Woodward y Bartel, 2005).

Las auxinas “hacen de todo en las plantas” (Secko, 2007), juegan un papel fundamental en su crecimiento y desarrollo, aunque los mecanismos moleculares mediante los cuales las auxinas controlan tan diversos procesos como la división celular, el alargamiento y la diferenciación, son pobremente conocidos y esperan a ser claramente establecidos (Perrot-Rechenmann y Hagen, 2002, Sánchez Rodríguez *et al.*, 2010).





2.2.1.1 Auxinas naturales y sintéticas

Las auxinas están constituidas por compuestos indólicos (el ácido indol-3-acético, ácido indolbutírico, y el ácido-4-cloro indol acético) y los no indólicos como el ácido fenilacético (Woodward y Bartel, 2005). El ácido indol-3-acético (AIA) fue la primera auxina natural en ser registrada y aún hoy se le considera como la predominante en plantas (Dolan, 1998), posteriormente se han identificado al 4-Cl-AIA y al ácido indol-3-butírico (AIB); existen también de manera comercial las auxinas sintéticas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido 1-naftalenacético (ANA), entre otros compuestos (García, 2002).

2.2.1.2 Metabolismo de auxinas

La hormona vegetal ácido indol-3-acético (AIA), es un compuesto orgánico sintetizado en una parte de la planta y translocado a otro, donde en concentraciones muy bajas, provoca una respuesta fisiológica como la curvatura de coleótilos hacia la luz. La heterogeneidad en los niveles de auxina en los tejidos u órganos se crea en respuesta a los estímulos exógenos transitorios y de desarrollo, mediante señales ambientales, endógenas, y vías de señalización que resultan en un evento particular de desarrollo, por el patrón espacio-temporal de biosíntesis-degradación-conjugación-transporte (Dhramasiri *et al.*, 2005).

Los niveles de esta hormona están regulados en los tejidos de la planta de una manera precisa por una serie de mecanismos, tales como la síntesis, hidrólisis de los conjugados amida- ó éster-AIA, transporte de un lugar de la planta a otro, conversión de AIB a AIA y de AIA en AIB, catabolismo oxidativo o síntesis de conjugados. El balance entre catabolismo y biosíntesis determina el nivel actual de la auxina en una célula y juega un papel importante en muchos procesos de desarrollo desde la germinación de las semillas hasta la apertura de los frutos (Normanly, 1997).





2.2.1.2.1 Biosíntesis

La biosíntesis ocurre a través de cuando menos dos vías, una de ellas depende de triptófano y la otra no (parte del corismato), aunque ninguna de ellas ha sido completamente dilucidada (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010). En la síntesis dependiente del triptófano se han considerado la controlada espacio-temporalmente y el transporte intercelular. La síntesis de auxinas se realiza por todas las partes de plántulas jóvenes, mientras que en etapas más avanzadas, la auxina sintetizada por la raíz primaria es suficiente para mantener la formación de raíces laterales, sin requerirse de la importación de auxina fabricada en otros órganos (Normanly, 2004).

2.2.1.2.2 Transporte

El transporte intercelular de auxinas se realiza mediante, los acarreadores de eflujo llamados Proteínas PIN, los facilitadores de influjo (Auxin1/LIKE AUX1, también llamados AUX/LAX) y los transportadores Multirresistencia. La distribución polar de algunos de estos acarreadores crea los gradientes de auxina. Las auxinas se pueden unir al receptor TIR1 (Transport Inhibitor Response, el cual trabaja como una subunidad caja-F del complejo ubiquitín ligasa SCF_{TIR1} destinando como blanco los reguladores negativos como las proteínas AUX/AIA, de la maquinaria de proteólisis que es la degradación dependiente del proteosoma 26S.

Diversos procesos ocurren a unos cuantos minutos de la aplicación de auxinas a los tejidos vegetales, que incluyen la rápida expansión celular, cambios en la expresión de los genes, y en las actividades de transporte (Zago *et al.*, 2008) que conducen a la acidificación de la pared celular (Grebe, 2005) y un rápido incremento en el potencial de membrana (Karcz y Burdach, 2002) o los niveles de calcio citosólico (Gehring *et al.*, 1990); siendo notorio el aumento en niveles de proteína (Oeller and Theologis, 1995), al igual que en las actividades enzimáticas (Schenck, *et al.*, 2010).

2.2.1.2.3 Catabolismo

Entre los hechos que relacionan al catabolismo de las auxinas con la actividad de enzimas se encuentran, la expresión de CyP87A3 que no es inhibida por cicloheximida, respuesta





característica de los genes de respuesta temprana a auxinas, siendo posible que el producto de expresión esté directamente relacionado con la inactivación o en la inhibición del transporte de auxinas, o en la biosíntesis de antagonistas de las auxinas, en vista de su efecto reductor de la capacidad de respuesta a auxinas (Chaban *et al.*, 2003).

Por otra parte el AIA es rápidamente metabolizado por las peroxidasas, actuando como AIA oxidasas, con la más fuerte actividad durante la fase de iniciación del enraizamiento (Caboni *et al.*, 1997; Nag *et al.*, 2001), que es la segunda etapa del proceso de enraizamiento adventicio. El período inicial de enraizamiento también se acompaña de un aumento del contenido de peróxido de hidrógeno y en la actividad de ascorbato peroxidasa, de catalasa y de Guayacol peroxidasa en las zonas de enraizamiento (Tyburski, J. *et al.*, 2006).

2.3 FAMILIAS DE PEROXIDASAS

Las peroxidasas constituyen un grupo amplio de enzimas, que tienen la capacidad de catalizar la transformación por óxido-reducción del H_2O_2 en H_2O , mediante la oxidación simultánea de una variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos (Veitch, 2004, Hiraga *et al.*, 2001). En general son poco específicas y realizan funciones diversas, entre las que destaca su participación en los mecanismos de defensa, en los de reparación, los de depuración de radicales libres, tolerancia a la salinidad y los relacionados con el control del desarrollo. En el sistema de clasificación enzimática, son encontradas bajo la denominación 1.11.1.7 (indicando que son óxido-reducetasas, que actúan sobre peróxido como donador y que presentan actividad peroxidasa, respectivamente). (Valério *et al.*, 2004; Passardi *et al.*, 2007; Almagro *et al.*, 2009).

Los grupos de peroxidasas pueden organizarse de acuerdo a la presencia o ausencia del grupo hem. En éste se reconocen 6 superfamilias: 1) las peroxidasas tipo DyP (dye decolourizing peroxidase), 2) las haloperoxidasas, 3) las di-hem citocromo C peroxidasas, 4) las peroxidasas animales (mieloperoxidasa, peroxidasa tiroidea, eosinófilo peroxidasa, y glutatión peroxidasa, aunque esta última se encuentra también en plantas), 5) las catalasas y 6) las peroxidasas “no animales” (Hiraga *et al.*, 2001).





2.3.1 Clasificación

Los miembros de la superfamilia de las peroxidasas no animales tienen en común un grupo hem formado por una protoporfirina IX y Fe (III) y comparten una estructura tridimensional muy similar. Esta superfamilia se divide en tres Clases, que al compararlas muestran baja identidad en su secuencia de aminoácidos, llegando a una identidad menor al 20% en los casos más divergentes (Jouilli *et al.*, 2008) presentando funciones y mecanismos de reacción diferentes (Cosio y Dunand, 2009). La superfamilia de las peroxidasas “no animales” reúne un número mucho mayor de proteínas que las contenidas en las demás superfamilias.

Las peroxidasas no animales son enzimas clásicas cuya actividad fue descrita desde 1855 y se han logrado purificar desde 1951. El primer grupo de esta superfamilia es el de las peroxidasas de Clase I o intracelulares y reúne entre ellas a la peroxidasa del citocromo C de levadura, las ascorbato peroxidasas y las catalasas-peroxidasas de bacterias; el segundo grupo es el de las peroxidasas de Clase II o peroxidasas fúngicas de secreción y consta de las ligninasas o peroxidasas de lignina y a las peroxidasas dependientes de Manganeseo; y finalmente el tercer grupo, denominado peroxidasas de Clase III o peroxidasas de secreción. (Hiraga *et al.*, 2001).

Todas ellas tienen un espectro de absorción UV/visible característico de las hemoproteínas (Converso y Fernández, 1995; Kvaratskhelia *et al.*, 1997). Los miembros de esta superfamilia contienen 10 alfa hélices comunes, las de Clase I y II tienen una alfa hélice específica mientras las de clase III presentan 3 hélices específicas (Hiraga *et al.*, 2001) y tienen como inhibidores clásicos al cianuro y a la azida de sodio (Mika y Lüthje, 2003, Askerlund *et al.*, 1987).

Las peroxidasas animales son un grupo de proteínas homólogas y difieren de las no animales en sus estructuras primaria, secundaria y terciaria, aunque comparten con ellas una misma función, teniendo una acentuada similitud en la estructura del sitio activo.





Las Peroxidasas sin grupo Hem, incluyen, de acuerdo a la base de datos “PeroxAIBse” (octubre de 2009), un total de 1998 proteínas. Entre ellas se tiene a la superfamilia de alquilhidroperoxidasas (con 193 proteínas), la superfamilia de las haloperoxidasas (con 164 proteínas), las haloperoxidasas (con 57 proteínas) las catalasas dependientes de Manganeso (96 proteínas), las NADH peroxidasas (13 proteínas), las Tiol peroxidasas: que incluyen las Glutación peroxidasas (con 445 proteínas), Peroxirredoxinas (con 779) y las NADPH oxidasas (con 251 proteínas).

Las peroxidasas de clase III (EC 1.11.1.7), (Almagro *et al.*, 2009), constituyen una amplia familia multigénica, distribuida en todas las plantas terrestres. Tienen aproximadamente 300 residuos aminoácidos, sus pesos moleculares oscilan entre 28 y 60 KDa y la mayoría están N-glicosiladas (Jouili *et al.*, 2008).

2.3.2 Isoenzimas y localización

Los organismos sintetizan enzimas en múltiples formas, denominadas isoenzimas, para catalizar la misma reacción bioquímica. Presentan diferentes propiedades catalíticas, cinéticas, también diferencias en la cadena polipeptídica, en la carga eléctrica y se localizan en distintos lugares dentro de la célula. El primero que habló de isoenzimas fue Theorell en 1942, quien aisló dos isoenzimas de la peroxidasa de rábano. En 1958 Paul aisló cinco formas peroxidasicas del rábano llamadas A, B, C, D y E. Se han encontrado isoenzimas de peroxidasas en una gran cantidad de especies vegetales (Zamorano, 2009).

Las isoenzimas de peroxidasas se clasifican en tres grupos: 1) Isoenzimas ácidas o aniónicas ($pI < 7,0$). Con alto contenido en carbohidratos. 2) Isoenzimas neutras o ligeramente básicas ($7,0 < pI < 9,0$). 3) Isoenzimas muy básicas o catiónicas ($pI > 11,0$). Normalmente tienen muy poco contenido en carbohidratos (Zamorano, 2009).

Las isoenzimas que pertenecen al mismo grupo normalmente tienen estructuras primarias muy similares y a veces sin cambios. Son más significativas las diferencias entre isoenzimas que pertenecen a distintos grupos, no solo en la cadena polipeptídica, sino también en las propiedades catalíticas (Zamorano, 2009).





Las isoperoxidasas de clase III se dividen en tres categorías de acuerdo a la naturaleza de las interacciones que sostienen con los constituyentes de la pared celular, encontrándose en la fracción soluble del apoplasto o unidas a la pared celular. La unión puede ser iónica o covalente. Por cuanto a su carga son aniónicas o catiónicas. Dentro de la célula existe una compartimentación isoenzimática, la cual está relacionada con la funcionalidad de la enzima. Las isoenzimas aniónicas se encuentran normalmente solubles en el apoplasto, por lo que intervienen en las reacciones enzimáticas que en él se desarrollan. Sin embargo, las isoenzimas catiónicas se encuentran en la pared celular y están implicadas en el control de su crecimiento. (Dunand *et al.*, 2002) y (Morimoto *et al.*, 1999).

2.3.3 Reacciones catalizadas por las peroxidasas de clase III

Una de las funciones que ya se mencionaba de las peroxidasas es el catabolismo de auxinas. Al respecto se ha encontrado que las peroxidasas pueden utilizar como sustrato oxidable al AIA para reducir al H_2O_2 , entre éstas, las peroxidasas de las plantas adicionalmente pueden oxidar al AIA en ausencia de H_2O_2 , aunque existe controversia en relación a la incapacidad de catalizar esta reacción en jitomate (Kokkinakis y Brooks, 1979).

Entre las peroxidasas con actividad de AIAoxidasa se distinguen dos tipos de reacción: Una de ellas ocurre con la oxidación del anillo indólico (generando un derivado oxindol) (Tsurumi 1980) y el derivado oxindólico absorbe en la región de 247-251 nm, aunque algunos reportes incluyen el cambio de absorción a 254 nm (Siegel y Galston, 1967); la otra implica la oxidación en la cadena que está unida al anillo, y la consecuente descarboxilación, las peroxidasas de clase III tienen la capacidad de catalizar esta reacción, habiéndose encontrado dos productos principales como consecuencia de dicha catálisis: indolmetanol y metilnoxindol (Beffa *et al.*, 1990), estos derivados siguen siendo indólicos. El requerimiento de cofactores y de peróxido de hidrógeno para la actividad AIAoxidasa varía de acuerdo a la especie. La oxidación del AIA parece involucrar la formación de los Compuestos I, II y III.

El peróxido de hidrógeno oxida la forma férrica (Fe III) de la enzima en un paso que implica la transferencia de 2 electrones para formar el compuesto intermediario que





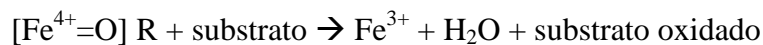
contiene a la enzima, conocido como compuesto I (CoI) que consiste en un radical porfirina π catiónico oxiferrilo, que contiene hierro en su estado de oxidación +4 (Fe IV)



El compuesto I se forma mediante la activación del H_2O_2 con la enzima libre, que contiene al radical porfirina π catiónico (R') que a su vez contiene a uno de los dos equivalentes de oxidación, en vista de que la porfirina es oxidada para formar este radical, y al complejo intermediario oxiferrilo $[\text{Fe}^{4+}=\text{O}]$ que incluye al segundo equivalente de oxidación.



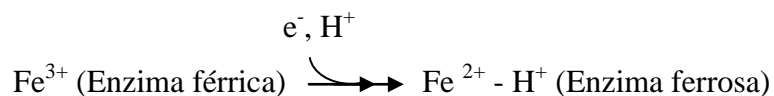
El compuesto I oxida entonces al sustrato y se convierte en el Compuesto II, que mantiene al hemo-oxiferrilo, aunque enseguida,



Éste último regresa a su estado de reposo (Fe^{3+}), oxidando otra molécula del sustrato.

Las hemo-peroxidasas pueden catalizar reacciones consumiendo O_2 , éstas se reconocen como ciclo oxidasa, que es favorecido por bajos niveles de oxígeno, dada la mayor afinidad hacia el O_2 que presenta la ferropoxidasa (Acosta *et al.*, 1988).

Donde el grupo hemo en estado de reposo (Fe^{3+}) puede recibir un electrón y un H^+ , a partir de algún agente reductor, formando el estado ferroso de la enzima, que tiene Fe^{2+} y un H^+ .

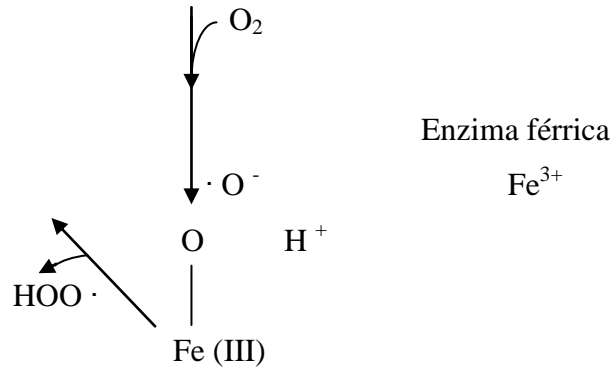


A continuación se capta O_2 y se forma el compuesto III, en el que el Fe^{+2} al enlazar al átomo de la molécula de oxígeno provoca que exista en este último un electrón libre, se





convierte en Fe^{+2} y el segundo átomo de la molécula de O_2 adquiere entonces carga negativa, lo que promoverá que el H^+ se enlace a él,



Desprendiéndose posteriormente un radical $\cdot\text{O}-\text{O}-\text{H}$, al tiempo que se regenera el estado de reposo (la enzima férrica).

Las peroxidasas de este grupo desarrollan un mecanismo eficiente para capturar y activar rápida y específicamente al H_2O_2 .

Las peroxidasas de clase III tienen la capacidad de participar adicionalmente en un ciclo de reacciones llamado “hidroxílico”, que es distinto del peroxidativo. Durante este ciclo, las peroxidasas atraviesan por un estado $\text{Fe}(\text{II})$ y utilizan principalmente el anión superóxido (O_2^{-2}) para generar radicales hidroxilo (Passardi *et al.*, 2004). De esta manera, las peroxidasas de clase III tienen la capacidad de catalizar la oxidación del AIA por dos vías, la oxidativa, en la cual se oxida el AIA en ausencia de H_2O_2 y con consumo de O_2 y la peroxidativa, en la que se transforma al H_2O_2 en agua, al ser reducido con la oxidación concomitante del AIA. La peroxidasa es convertida a una verde-hemo proteína llamada *P-670*, cuando cataliza la oxidación del AIA en condiciones aeróbicas. Al parecer esta conversión se realiza con la participación de los hidroperóxidos derivados del proceso de retorno a la forma inicial de la peroxidasa (Fep^{+3}) de acuerdo al siguiente esquema:





Las Hemo-peroxidasas oxidan un amplio rango de sustratos utilizando el H_2O_2 como oxidante. Se ha aprovechado esta propiedad, para utilizar compuestos diazo que una vez oxidados, adquieren una coloración diferente y generalmente precipitan. Algunos de ellos son el pirogalol (empleado desde 1917 por Willstalter y Stoll) ácido cafeico, 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato), 4-aminoantipirina y fenol, el Guayacol (1mM), la o-dianisidina, el alcohol de coniferilo, la 3,3'-Diaminobencidina 1 mM (Murakami *et al.* 2007), la bencidina al 1% (Arzanova *et al.*, 2002), 4-metoxi-alfa-naftol () el diaminofluoreno, pirogalol (Criquet *et al.*, 2001) y la mezcla pirocatecol (Km 12.5 mM) y anilina (Molaei Rad *et al.*, 2007).

Es importante considerar que las peroxidasas de clase I como las ascorbato peroxidasas se encuentran en el citoplasma, y utilizan como sustrato al ácido ascórbico, y aún cuando la mayoría de las peroxidasas de clase III no son capaces de oxidarlo, algunas de ellas sí lo hacen, especialmente si se usan los sustratos no naturales como el Guayacol, llegando a tener una afinidad mayor por el ascorbato que por el Guayacol, de esta manera, es importante que las fracciones a evaluar estén depuradas para disminuir al máximo la interferencia que puede provocar una sobreestimación de la actividad de alguna de ellas.

El control del nivel endógeno de auxinas es uno de los factores que más estrechamente se ha relacionado con la capacidad rizogénica de las especies hasta ahora estudiadas. Se ha atribuido un papel especialmente importante en este proceso de control a las peroxidasas (Cosio *et al.*, 2009). Estas son enzimas cuya función primaria es oxidar moléculas a expensas de peróxido de hidrógeno.

No es sorprendente que se conozca tan poco sobre sus funciones específicas en la planta, debido a la alta redundancia encontrada en los genes, el amplio espectro de sustratos sobre los cuáles actúan estas enzimas, y las muy similares propiedades inmunológicas de diferentes isoenzimas. Esta complejidad se ha pronunciado aún más, después de la descodificación del genoma de *Arabidopsis*, que se estima que incluye más de 100 genes completos de peroxidasa, con una alta similitud en secuencias. En el jitomate, que también ha sido elegido para obtener su genoma, se han reportado 62 secuencias de peroxidasas de





clase III, algunas parciales y otras completas, sin embargo, en un determinado tejido para un estado de desarrollo definido, se llegan a revelar sólo unas pocas isoenzimas.

2.4 ENZIMAS AIA OXIDASA

En 1947, Tang y Bonner fueron los primeros en hacer alusión a ésta enzima, la cual oxida y destruye la actividad biológica del ácido indol acético (AIA). Determinando un pH óptimo de 6.0 a 6.7, y un máximo de concentración de 25 µg/ml de AIA.

Leopold (1964), hace referencia a la oxidación descarboxilativa del AIA, sobre el requerimiento de un cofactor fenólico, y que éste puede activar la enzima AIA oxidasa, atribuyendo el efecto de activación específicamente a ácidos felúricos y *p*-cumáricos, y que en efecto la presencia de estos compuestos podrían ser la causa de la depresión del crecimiento. De igual manera Segura (1994), menciona a algunos compuestos fenólicos, específicamente monofenoles, como activadores de la reacción de descarboxilación del AIA.

Evans y Alldridge (1965) encuentran 3 veces más actividad de peroxidases en plantas enanas de tomate con respecto a las normales y revelan un máximo de 4 ó 5 bandas en raíces (según se revele con pirogalol o Guayacol). Posteriormente encontraron 3 isoperoxidasas catiónicas y 9 aniónicas en tejido de tallo de jitomate enano. Estas 12 isoenzimas representan cerca del 20% de los genes que se tienen para expresarlas. Parece entonces, que cada planta tiene un “juego” de isoperoxidasas para realizar una amplia variedad de funciones (Cosio y Dunand, 2009).

Por su parte, Huang *et al.* (1971) reportaron un total de 12 isoenzimas al trabajar con agallas de tomate, todas ellas están presentes en el tejido de raíz (revelándose 6 isoenzimas catiónicas y 6 aniónicas cuando se utilizó un amortiguador de pH 8.5), mientras que en tallos y hojas sólo apreciaron muy pocas bandas (3 ó 4 isoenzimas), por cierto las peroxidases catiónicas no fueron revelados en tejidos aéreos de la planta.





Palmieri *et al.* (1978), encontraron un máximo de 8 isoenzimas en mutantes de tomate que presentan elevada actividad de peroxidasa-AIA oxidasa (en una de las plantas mutantes la actividad es quince veces mayor a la que se encuentra en plantas normales y presentan órganos más reducidos en tamaño y peso), 6 de ellas son aniónicas y 2 son catiónicas, se presenta un mayor número de isoenzimas y con mayor actividad en la raíz.

Según Hartmann y Kester (1995), los compuestos fenólicos estarían implicados en procesos tales como la acción de la enzima y por lo tanto afectando la concentración auxínica.

Por otro lado, trabajos citados por Rojas (1995), informan de una estrecha relación entre la actividad de AIA oxidasa y la formación de raíces adventicias. La enzima podría ayudar a la destoxicación del exceso de AIA y actuar sobre la auxina, oxidándola y por lo tanto interfiriendo en su concentración.

Una forma de catabolismo del AIA consiste en la oxidación descarboxilativa de un lado de la cadena del AIA por la enzima AIA oxidasa, llevando a la formación de indol-3-metanol u oxindole-3-metileno, sin embargo el conocimiento respecto a la correlación entre los niveles de AIA y AIA oxidasa durante el proceso de inducción del crecimiento, es aun muy limitado (Zin-Huang *et al.*, 1996).

Los genes que codifican para peroxidosas de clase III en su mayoría constan de 4 exones y 3 intrones (Tognolli *et al.*, 2002), la información contenida en ellos, conduce a la síntesis de proteínas con dominios para unir iones calcio, para unir el grupo hem, para ser glicosiladas y para unirse a componentes de la pared celular, como ocurre con la APRX (peroxidasa aniónica de Cucurbita Pepo) que presenta un motivo con 4 argininas que le confiere capacidad de unión a complejos de pectato de calcio (Cosío y Dunand, 2009).

Las isoenzimas con actividad peroxidasa frecuentemente también muestran actividad de AIA oxidasa. El extracto libre de paredes empleando *Withania somnifera* contuvo algunas peroxidosas y 3 de ellas fueron capaces de oxidar al AIA en presencia de diclorofenol (DCP) y Mn^{2+} y no requirieron de adición de H_2O_2 para su actividad (Johri *et al.*, 2005). Se





ha reportado también que en el jitomate, ninguna peroxidasa de clase III cataliza la oxidación del AIA en ausencia de peróxido (Kokkinakis y Brooks, 1979), aunque en contraparte, Pressey (1990) presenta evidencia de actividad AIA oxidasa en peroxidosas de clase III del jitomate, en ausencia de H₂O₂, mientras existan ciertos aniones como el fosfato en el medio de reacción.

El AIA es rápidamente metabolizado por las peroxidosas, actuando como AIA oxidadas, con la más fuerte actividad durante la fase de iniciación del enraizamiento, que es la segunda etapa del proceso de enraizamiento adventicio. Éste periodo también se acompaña de un aumento del contenido de peróxido de hidrógeno y en la actividad de ascorbato peroxidasa, de catalasa y de Guayacol peroxidasa en las zonas de enraizamiento (Tyburski. *et al.*, 2006).

2.5 COMPUESTOS FENÓLICOS

Las plantas como producto de su metabolismo secundario, son capaces de biosintetizar un elevado número de compuestos fenólicos que químicamente se caracterizan por poseer un anillo aromático más un grupo hidroxilo o un derivado funcional de éste. En una planta pueden contribuir a la oxidación del AIA interfiriendo en la concentración de éste. Esto podría significar que en el tejido adulto, donde hay mayor cantidad de fenoles, la actividad de la enzima AIA oxidasa estaría aumentada (Kanamori, 1995). Algunos tipos de compuestos fenólicos que pueden reducir la concentración de ácido indol acético (AIA) son los monofenoles tales como los ácidos *p*-hidroxibenzoico, vainílicico, *p*-cumárico y siríngico que reducen la disponibilidad de AIA promoviendo su decarboxilación a través de la enzima AIA oxidasa (Hartmann y Kester, 1995).





3. JUSTIFICACIÓN







El estudio biológico de las proteínas que intervienen y regulan la degradación auxínica es parte de una variedad de procesos de gran impacto, ya que a pesar de los años de investigación dedicados al estudio de las auxinas muchas de las preguntas fundamentales sobre su control no han sido contestadas completamente, debido a que la mayoría de los estudios con peroxidasas de clase III se han realizado con mezclas de isoenzimas, sin considerar su distribución subcelular y la afinidad por diferentes sustratos con respecto a los diferentes días de desarrollo en el proceso de enraizamiento adventicio. Por lo que es importante mostrar evidencias experimentales sobre (i) la localización extracelular de peroxidasas de clase III con actividad auxina oxidasa, (ii) los posibles cambios en actividades peroxidasa y oxidasa durante el proceso de enraizamiento (0-10 días), y (iii) la vía de degradación auxínica (AIA/AIB) *in vitro* con isoperoxidasas de clase III apoplásticas de tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum*.







4. HIPÓTESIS







Existen dos grandes cuestiones en el estudio del mecanismo de control de los niveles endógenos de auxina en plantas, (1) ¿cómo se mantiene regulado el contenido de AIA y AIB en la planta?, para esto el catabolismo auxínico ha sido estudiado en varios sistemas y hasta el momento no se ha definido con claridad el mecanismo del proceso. Por tal motivo se pueden sugerir tres hipótesis en relación con las isoenzimas de clase III involucradas con la oxidación del AIA y AIB. La primera considera que los dos tipos de actividad (oxidasa y peroxidasa) están presentes en distintas enzimas y que cada una puede ser purificada, la segunda considera que los dos tipos de actividad residen en una misma peroxidasa pero con 2 sitios activos y la tercera señala que en una isoenzima pueden residir las dos actividades y la diferencia radica en la afinidad hacia el sustrato; y (2) ¿dónde se encuentran las enzimas que realizan tales funciones degradativas?, para esto habría que dilucidar la ubicación subcelular de estas proteínas al aislarlas de diferentes partes de la planta y del tejido, pensando que se localizarían en el apoplasto y no en el contenido citoplasmático puesto que son proteínas de secreción, pudiendo encontrarlas solubles en el apoplasto o unidas a la pared celular mediante algún tipo de interacción iónica, covalente o conformacional.







5. OBJETIVOS







5.1 Objetivo General:

- Determinar la actividad auxina oxidasa de algunas peroxidasas aniónicas de clase III aisladas de tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum*, en ausencia y presencia de H₂O₂.

5.2 Objetivos Particulares:

- Aislar y recuperar isoperoxidasas de clase III presentes en la fracción soluble y en las paredes celulares del apoplasto.
- Purificar peroxidasas aniónicas de clase III para evaluar los parámetros cinéticos de la actividad enzimática peroxidasa y auxina oxidasa, utilizando AIA y AIB como sustratos, en ausencia y presencia de H₂O₂.
- Analizar el catabolismo auxínico que siguen las isoperoxidasas de clase III en su reacción de oxidación.
- Determinar de la secuencia primaria de una isoperoxidasa de clase III mediante espectrometría de masas.
- Analizar las estructuras secundaria y terciaria mediante un análisis *in silico*.







6. MATERIAL Y MÉTODOS EXPERIMENTALES







6.1 PRODUCCIÓN DE MATERIAL VEGETATIVO

6.1.1 Germinación se semillas

Con el propósito de obtener plántulas en condiciones asépticas se sometieron 20 semillas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) a pre-desinfestación con NaClO 1% por un tiempo de 30 minutos, enseguida se procedió al lavado de las semillas con agua destilada, tres veces consecutivas, para eliminar los residuos de la solución anterior. Las semillas permanecieron en imbibición en H₂O destilada por 24 horas.

Previamente a la siembra se preparó una cámara de crecimiento, se utilizaron almácigos con agrolita, posteriormente las semillas se transfirieron a almácigos y se mantuvieron con un fotoperiodo de 12 horas de iluminación y 12 horas de oscuridad a una temperatura constante de 26°C y humedad relativa de 60%, un riego manual 3 veces a la semana hasta alcanzar una talla de 10cm base-ápice.

6.1.2 Trasplante

Todas las plántulas se trasplantaron a tezontle estéril en bolsas de polietileno de 25cmx30cm, colocadas en contenedores de 30cmx30cmx15cm. Antes de llevarlas a condiciones del invernadero fueron aclimatadas al drenaje y la ventilación durante 2 días.

En la etapa final de crecimiento y desarrollo se da la floración y fructificación de las plantas, ésta tuvo lugar en el invernadero de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FESI-UNAM con una temperatura promedio de 30°C y humedad relativa de 50%.

6.1.3 Propagación por esquejes

La proliferación de brotes axilares fue promovida al podar el ápice de las plantas, evitando en lo mínimo la producción de flores y frutos, para así desviar la energía a la producción de yemas axilares. Los brotes fueron utilizados para la producción de plantas evitando el proceso de reproducción sexual.





Se considera como brote axilar aquel que presenta una yema con por lo menos una hoja bien diferenciada, encontrado entre el tallo principal y una rama lateral. De entre estos fueron seleccionados los que se encontraban a una altura entre los 20cm y 60cm (base-ápice), con una talla de tallo de 10cm.

Para la etapa de proliferación de raíces adventicias en esquejes se aplicó Acido Indol-3-Butírico (AIB) con una concentración $5 \times 10^{-5} \text{M}$, este tratamiento se mantuvo 24 horas y al término del mismo, la solución se reemplazó por H_2O destilada realizando los cambios necesarios para evitar la proliferación de microalgas. Se extrajeron esquejes del día cero (sin aplicación de AIB), y a partir del día 1 hasta el día 10 con auxinas (AIB) Estos esquejes se mantuvieron en un cuarto de incubación con un fotoperiodo de 12 horas de iluminación y 12 de oscuridad a una temperatura constante de 26°C y humedad relativa de 60%, por un tiempo de 10 días al término de los cuales se veía el crecimiento total de las raíces producidas.

Posteriormente, los brotes provistos de raíces fueron trasplantados a tezontle estéril en bolsas de polietileno de 25cm x 30cm, colocadas en contenedores de 30cmx30cmx15cm. Estas mismas fueron llevadas a invernadero y se mantuvieron en las mismas condiciones que las plantas madre.

6.1.4 Riego

Se agregó un volumen total de 1.5L de solución nutritiva Hoagland semanalmente por contenedor. De modo que el nivel de agua del contenedor mantuviera una altura de 5cm, se regaron 3 veces por semana dependiendo de la demanda de agua de la planta con respecto a la evaporación, manteniendo aproximadamente 1L remanente.

Los nutrientes requeridos por las plantas fueron suministrados mediante la solución nutritiva Hoagland. La composición nutrimental de la solución fue (mM): 1 KH_2PO_4 , 5 KNO_3 , 2 MgSO_4 , 5 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.88 H_3BO_3 , 0.038 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.016 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.005 $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.





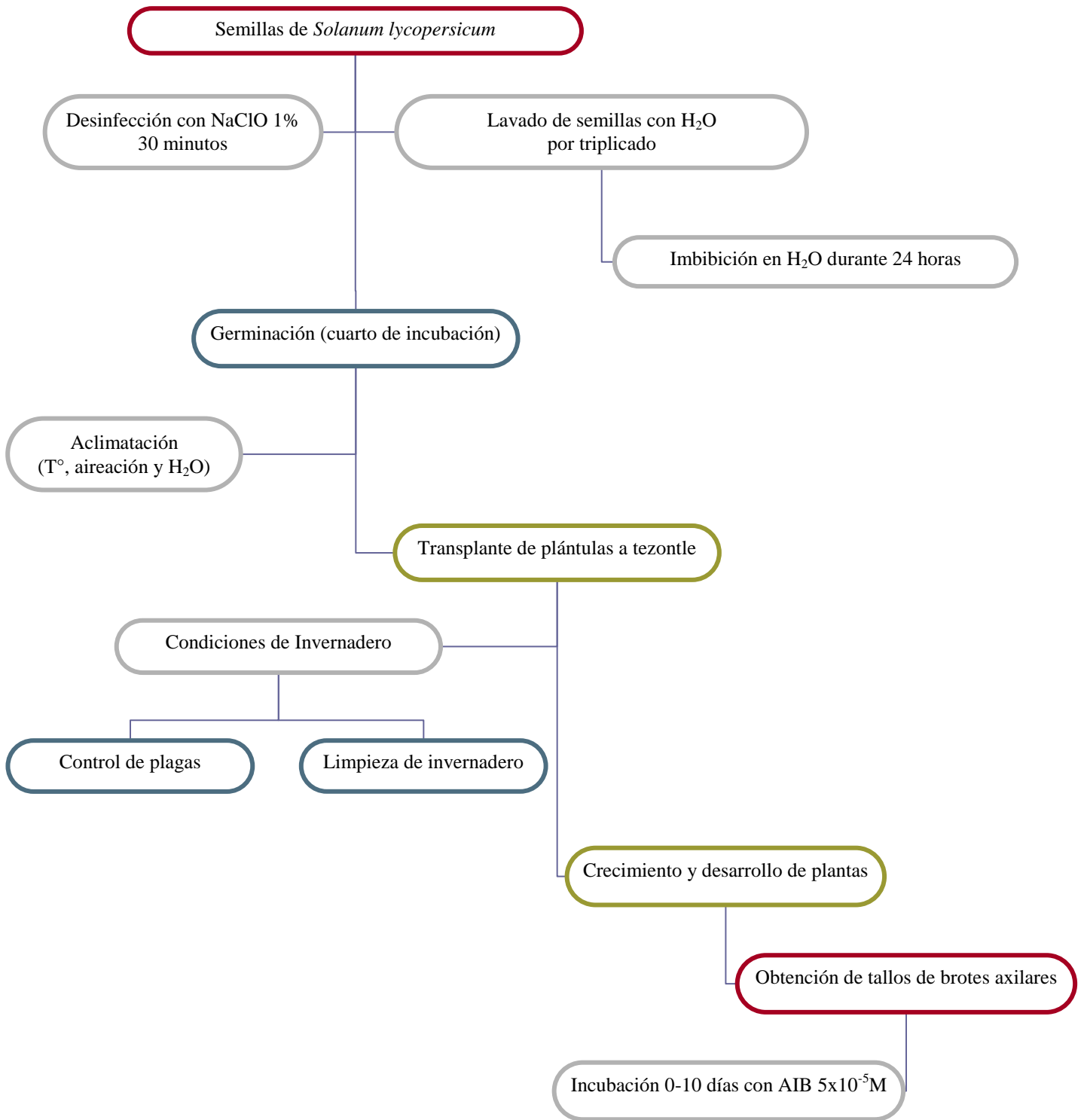
6.1.5 Control de plagas

La mosquita blanca (*Bemisia tabaco*) en jitomate (*Solanum lycopersicum*) en México ocasiona daño directo y transmite enfermedades virales, que reducen el potencial productivo (Railén *et al.*, 2011).

Para su protección se utilizaron cubiertas de malla de polipropileno, sólo en las primeras etapas de desarrollo de las plantas para evitar que el microclima afectara el crecimiento de las plantas. Posteriormente en respuesta a esta problemática, se implementó la aplicación de insecticidas sin lograr erradicar a la mosquita, por lo cual se buscó una estrategia de tipo manual para reducir la población y con el fin de no afectar algún otro factor. Se aplicó pegamento a cuadritos de cartulina amarilla en tres puntos de la planta (ápice, parte media y base), atrayendo a las mosquitas de modo que quedaran inmobilizadas. Con lo cual se observó la disminución y control de la población.

A lo largo del desarrollo del cultivo se realizaron sesiones de limpieza, las cuales implicaban deshierbar la maleza dentro de la nave, el cambio de agua en los contenedores, y la renovación de trampas para mosquita blanca.





Esquema 1. Metodología para la producción de material vegetal





6.2 EXTRACCIÓN DE PEROXIDASAS DE CLASE III

6.2.1 Recolección de material biológico

El material biológico utilizado para la experimentación fue *Solanum Lycopersicum*, obtenido a partir de plantas cultivadas en el invernadero perteneciente a la FESI-UBIPRO, UNAM. Los tallos utilizados provenían de ejemplares de 1 año de edad.

6.2.1.1 Tallos sin tratamiento

Los esquejes de tallos de brotes axilares fueron seleccionados en las plantas a partir de los 20-60cm (base-ápice), con una longitud aproximada de 10cm y fueron procesados en el momento (día cero) para evaluar la actividad auxina peroxidasa y auxina oxidasa.

6.2.1.2 Tallos con tratamiento

Los esquejes de tallos de brotes axilares fueron seleccionados de igual manera y se mantuvieron en incubación en una solución de Ácido Indol-3-Butírico (AIB) 50 μ M durante 24 horas para promover el enraizamiento adventicio, posteriormente se conservaron en agua destilada, cambiándola cada 24 horas durante 10 días, almacenando ejemplares de cada uno de los días, para evaluar la actividad auxina peroxidasa y auxina oxidasa.

6.2.2 Protoplastos

Se extrajeron las proteínas contenidas en la fracción soluble del apoplasto y las adheridas a la pared celular, a partir de tallos de brotes axilares completos o haciendo cortes cilíndricos de aproximadamente 3mm de espesor estos se colocan en una solución que contiene C₆H₁₄O₆ 0.6M, KNO₃ 1mM, MgSO₄ 1mM, disuelto en KC₂H₃O₂ 0.2mM pH 5.1, agregando 1000U de celulasa (EC. 3.2.1.4 de *Penicillium funiculosum*) y 75U de pectinasa (EC. 3.2.1.1.5 de *Aspergillus niger*) por cada 10g de tejido vegetal. La digestión se mantiene en agitación constante a 30°C · 100rpm · 3hrs, para evitar la contaminación de proteínas intracelulares. La separación de protoplastos se hizo a partir de centrifugación, precipitándolos a 500 x g · 25min · 4°C.





La fracción enzimática a analizar fue aquella obtenida del sobrenadante, misma que se centrifugó nuevamente a $10,000 \times g \cdot 30\text{min} \cdot 4^\circ\text{C}$ para eliminar residuos de tejido.

6.2.3 Proteínas de la fracción soluble del apoplasto

Para la obtención de muestra soluble se realizaron extractos a partir de una mezcla 1:2 (g/ml) de tejido fresco por solución de amortiguador $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1M pH 5.7 ó $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 0.02M pH5.7, a la mezcla se adicionó PVP en proporción 1:10 (g/ml de solución) para su homogenización, macerando a baja temperatura y centrifugando a $15,000 \times g$ durante 15 minutos, se recuperó la fase líquida en alícuotas (1.5ml).

6.2.4 Proteínas de paredes celulares

La fase sólida obtenida en la metodología anterior se utilizó para la digestión de paredes celulares agregando 0.01g de celulasa y 1.5ml de pectinasa por cada 15g de tejido obtenido, resuspendiendo el tejido en amortiguador $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1M pH 5.7 proporción 1:1. Para la obtención de la fase líquida se centrifugaron las muestras a $15,000 \times g$. El sobrenadante recuperado se empleó para el análisis enzimático.

6.2.5 Aposto

Se extrajeron a 20°C las proteínas contenidas en la fracción soluble del apoplasto y las adheridas a la pared celular a partir de dos diferentes métodos, uno con tallos completos (C) y otro con cortes cilíndricos “rodajas” (R) de aproximadamente 3mm de espesor, estos se colocan en una solución $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 0.02M pH 5.7 en relación 1:1 [m:v], y se mantuvieron en agitación constante a una velocidad de $100 \times g$ durante 1, 2, 3 y 4 horas (C_1, C_2, C_3, C_4 y R_1, R_2, R_3, R_4 respectivamente); para evaluar la asociación con la pared celular, conservando el tejido de los diferentes tiempos sólo se retiró el sobrenadante y se centrifugó a una velocidad de $15,000 \times g$, a 4°C durante 15 minutos para eliminar partes de tejido contaminante. El tejido restante se resuspendió en un amortiguador $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 0.02M pH 5.7 en relación 1:1 [m:v] agregando 100U de celulasa y 7.5U de pectinasa por gramo de tejido vegetal. La digestión se debe mantener en agitación constante a una velocidad de $150 \times g$, a 20°C durante 1, 2, 3 y 4 horas (C_1, C_2, C_3, C_4 y R_1, R_2, R_3, R_4 respectivamente), para evitar la ruptura de membranas y contaminación de proteínas intracelulares las muestras





fueron centrifugadas a una velocidad de 500 x g, a 4°C durante 25 minutos separando así los protoplastos. La fracción enzimática obtenida del sobrenadante es centrifugada nuevamente a una velocidad de 15,000 x g, a 4°C durante 15 minutos para eliminar posibles residuos de tejido. A las muestras se les adiciona polivinilpirrolidona en proporción 0.1:1 [m:v] polímero usado para adsorber los compuestos fenolicos que pudieran provocar un bajo rendimiento de las isoenzimas, el cual fue retirado al centrifugar nuevamente a una velocidad de 15,000 x g, a 4°C durante 15 minutos .

6.2.5.1 Ensayo de diez días de enraizamiento

Tratamientos {
Extracto I. $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ pH 5.7.
Extracto II. Tritón X-100 2% en $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ pH 5.7
Extracto III. Enzimas de digestión (pectinasa 2.5U/ml y celulasa 5.0U/ml) en $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ pH 5.7

Etiquetas {
Tallos completos (C).
Tallos rodajas (R).
Días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

En los tratamientos IC y IR (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) se colocaron 25ml de amortiguador $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ a una temperatura ambiente 20°C, manteniendo una agitación orbital constante de 150rpm, para provocar una mayor interacción entre el amortiguador de fuerza iónica baja y el apoplasto del modelo biológico.

En los tratamientos IIC y IIR (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) el material biológico fue puesto en contacto con una solución de tritón X-100 X al 2% [v:v] en amortiguador $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ a una temperatura ambiente 20°C, manteniendo una agitación orbital constante de 150rpm, para provocar una mayor interacción entre el amortiguador de fuerza iónica baja y el apoplasto del modelo biológico.

En los tratamientos IIIC y IIIR (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) el material biológico fue puesto en contacto con una solución tritón X-100 2% en amortiguador $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ a una





temperatura ambiente 20°C, manteniendo una agitación orbital constante de 150rpm, para provocar una mayor interacción entre el amortiguador de fuerza iónica baja y el apoplasto del modelo biológico.

Cada uno de los sesenta y seis tratamientos, se mantuvo en agitación durante 40 minutos. Transcurrido este tiempo se obtuvieron las muestras con las enzimas removidas y fueron centrifugadas a una temperatura de 4°C, durante 15 minutos a 15,000 x g.

6.2.5.2 Ensayo con diferentes pH

Se extraen las proteínas a 20°C contenidas en la fracción soluble del apoplasto y las adheridas a la pared celular a partir de dos diferentes métodos, uno con tallos completos (C) y otro con cortes cilíndricos (R), estos fueron colocados en una amortiguador $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 0.02M pH 5.7 haciendo un gradiente de pH (3.5, 4.5, 5.7, 6.5, 7.5 y 8.5) (Hoyle, 1978), se mantuvieron en agitación constante a una velocidad de 100 x g durante 30 minutos; para evaluar la asociación con la pared celular, conservando el tejido del gradiente de pH sólo fue retirado el sobrenadante y centrifugado a una velocidad de 15,000 x g, a 4°C durante 15 minutos para eliminar partes de tejido contaminante. El tejido se resuspendió en un amortiguador $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 0.02M manteniendo el pH de cada muestra, se agregaron 100U de celulasa y 7.5U de pectinasa por gramo de tejido vegetal. La digestión se mantuvo en agitación constante a una velocidad de 150 x g, a 20°C durante 30 minutos, para evitar la ruptura de membranas y contaminación de proteínas intracelulares las muestras fueron centrifugadas a una velocidad de 500 x g, a 4°C durante 25 minutos. La fracción enzimática obtenida del sobrenadante es centrifugada nuevamente a una velocidad de 15,000 x g, a 4°C durante 15 minutos para eliminar posibles residuos de tejido

6.2.6 Preservación

Las muestras son congeladas a -70° C hasta el momento de su análisis, esto para evitar la degradación proteica y preservar la actividad enzimática.





6.3 FRACCIONAMIENTO Y CONCENTRACIÓN DE ISOENZIMAS

6.3.1 Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

A la muestra de proteínas solubles recuperada del extracto crudo y del digerido de paredes celulares se agrega $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con respecto al porcentaje de saturación deseado (40%, 75% y 100%), provocando que la proteína comience a disminuir su solubilidad, causando la precipitación de proteínas, para de esta forma fraccionar y enriquecer la concentración de algunas isoenzimas de nuestro interés. Para evitar algún efecto nocivo sobre la actividad enzimática, se mantiene una temperatura (0°C) y agitación constante. La concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se incrementó gradualmente, a partir del 40% hasta alcanzar un 100%, recuperando las fracciones por centrifugación a $10,000 \times g$ durante 20 minutos a 4°C , la fracción del sobrenadante residual fue utilizada para llevarla a la siguiente concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El sedimento fue resuspendido en un volumen mínimo (1ml) del amortiguador con que se realizó la extracción.

6.3.1.2 Diálisis

El sedimento resuspendido debe transferirse a una bolsa de diálisis previamente lavada e hidratada con agua destilada para eliminar las sales del medio en el que se encuentran. Las proteínas se dializaron contra un amortiguador $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05M pH 5.7, realizando 3 cambios de la misma solución durante 72 horas. Para remover residuos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se centrifuga a $10,000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C .

6.3.3 Columna de intercambio iónico

Este método de separación está basado en la transferencia de materia fluido-sólido. Lo cual implica la transferencia de uno o más iones de la fase fluida sólida por intercambio o desplazamiento de iones de la misma carga, que se encuentran unidos por fuerzas electrostáticas a grupos funcionales superficiales.

La resina utilizada UNOsphereTM Q Anion Exchange Support, es un intercambiador iónico que consta de una amina cuaternaria en la matriz, esferas de macroporos ($> 2000 \text{ \AA}$) que llevan a la rápida cinética de unión, en este caso de proteínas con carga negativa. Las





fracciones proteicas se obtuvieron al emplear un amortiguador de equilibrio $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1M pH5.7 (equilibra la columna), un amortiguador de extracción $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02M pH5.7 (eluye las proteínas catiónicas), y un amortiguador de elución de proteínas aniónicas $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01M pH5.7 con un gradiente de NaCl (0.2M, 0.4M, 0.6M, 0.8M, 1M).

6.3.4 Filtración por intercambio iónico

La separación de proteínas de acuerdo a su carga (negativa) se realizó por medio de un filtro intercambiador (Sartobind Membrane, Quaternary ammonium). Esta técnica permite separar a las proteínas por carga usando un amortiguador que compita por el sitio de unión proteína-membrana. Las fracciones proteicas se obtuvieron al emplear un amortiguador de equilibrio $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1M pH5.7 (equilibra la membrana), un amortiguador de extracción $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02M pH5.7 (eluye las proteínas catiónicas), y un amortiguador de elución de proteínas aniónicas $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01M pH5.7 con NaCl 0.2M, 0.4M, 0.6M, 0.8M, 1M).

6.3.5 Filtración por exclusión molecular

Debido a que la isoperoxidasa aniónica de interés pesa alrededor de 36-38kDa, se utilizaron membranas de corte de 50kDa y 30kDa, permitiendo de este modo la concentración proteica. Las muestras se pasan a través de la membrana de corte 50kDa, centrifugando a una velocidad de 1,000 x g, durante 20 minutos, a 4°C, las proteínas solubles con peso molecular aproximado de 50kDa posteriormente se filtran con la membrana de 30kDa y las proteínas con peso molecular aproximado de 30kDa son excluidas obteniendo la fracción con proteínas de peso molecular <50kDa y >30kDa.

6.3.6 Precipitación con Acetona al 80%

Al pasar por diferentes pasos de purificación las muestras enzimáticas adquieren mayor volumen, lo cual disminuye su concentración. Para obtener mayor enzima en menor volumen se agrega 4:1 [v/v] de acetona (-20°C) con respecto al volumen de proteína soluble, la mezcla se agita en Vórtex y posteriormente se deja precipitando durante 1 hora a -20°C, pasado el tiempo se centrifuga a 15,000 x g durante 10 minutos a 4°C, al retirar el sobrenadante queda una pastilla (proteínas), que se deben mantener a temperatura ambiente





para permitir la evaporación de la acetona residual, finalmente el sedimento se resuspendió en un volumen deseado para su posterior análisis.

6.3.7 Obtención de bandas de interés

Con la finalidad de separar las isoformas según su carga se recortó un carril del gel de poliacrilamida para revelarlo con actividad AIAox y poder sobreponerlo a los otros carriles sin revelador, se recortaron sólo las bandas de interés, las bandas de interés y se congelaron a -70°C , las tiras congeladas se maceraron en el mínimo volumen del amortiguador de extracción para solubilizar la proteína, las muestra se centrifugaron a $14,000 \times g$ durante tres minutos a 4°C , las proteínas aisladas se recuperaron por decantación.

6.4 CARACTERIZACIÓN DE ISOPEROXIDASAS

6.4.1 Análisis de contenido proteico en solución

A las diferentes fracciones enzimáticas se les determinó la concentración de proteína en solución por el método Bradford (1976).

6.4.2 Análisis cinético

6.4.2.1 Actividad peroxidasa

La actividad peroxidasa se puede medir utilizando una gran variedad de sustratos tales como ABTS, ácido ferúlico, catecol, Guayacol, o-dianisidina, o-fenilendiamina o pirogallol. Los productos de oxidación de estos sustratos absorben en la región visible del espectro a diferentes longitudes de onda. El ensayo enzimático se llevó a cabo para la determinación de actividad peroxidasa usando Guayacol como sustrato, utilizando un equipo PERKIN ELMER, Mod. Lambda 2S, U.S.A.

La actividad auxina peroxidasa se determinó por medio de lecturas espectrofotométricas a 470nm . Una alícuota de muestra enzimática se adiciona a un tampón de $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 0.025M , pH 5.7, que contiene Guayacol 0.02M y H_2O_2 al 0.3% [v:v], en proporción 8:1:1 respectivamente. Los cambios de absorbencia debidos al producto de oxidación del Guayacol se siguieron durante cinco minutos a 20°C .





Para el cálculo de la actividad peroxidasa se utilizó el coeficiente de extinción molar $\epsilon_{470} = 26.61$ (mmol cm^{-1}). La actividad específica se expresa como unidades de actividad por miligramo de proteína (U mg^{-1}).

6.4.2.2 Actividad auxina oxidasa (AIAox/AIBox)

Los sustratos AIA y AIB empleados para la determinación de la actividad oxidasa se aplicaron a una concentración $66\mu\text{M}$.

6.4.2.2.1 Técnica Salkowski

Se utilizaron distintas variantes del reactivo Salkowski. Técnica de Pilet and Chollet, Tang y Bonner, y una variante de la técnica anterior (S/2). Utilizando la concentración correspondiente a la fracción proteica. Para determinar la actividad enzimática AIAox espectrofotométricamente.

Los ensayos para determinación de AIAox se valoraron por diferentes tiempos (0, 30, 60, 90 min) a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad, con el fin de evaluar el desarrollo de la reacción. Para determinar la actividad enzimática AIAox se aplica el reactivo de Salkowski dejándolo reaccionar durante 30 minutos en oscuridad para obtener un color estable, midiendo su absorbencia a $\lambda 535\text{ nm}$. Este método nos permite determinar la concentración residual del sustrato con respecto a la concentración inicial de la reacción, extrapolar los datos a partir de una curva de patrón del sustrato.

6.4.2.2.2 Espectrometría

La actividad auxina oxidasa fue determinada en solución utilizando la mezcla de revelado para geles de poliacrilamida. La técnica consta de 3 soluciones. La solución A (agua destilada), la solución B (ácido *p*-cumárico 2mM , AIA/AIB 2mM , H_2O_2 0.1% [v:v]) y la solución C ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 2M pH 4.2), proporción 1:2:1, la concentración final es de 1mM AIA, 1mM ácido *p*-cumárico, 1mM H_2O_2 y 0.5M de $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ pH 4.2, evaluando la actividad enzimática problema. La solución B tuvo otras variantes, sin H_2O_2 y con H_2O_2 $340\mu\text{M}$.





Se determinó la actividad AIA_{ox} a λ 251-253nm que es la longitud de onda a la que absorbe el anillo aromático. También se determinó la formación de ferroperoxidasa y los compuestos I, II y III midiendo a λ 408nm, λ 413nm y λ 670nm respectivamente.

6.4.2.2.3 Consumo de O₂

Con el fin de verificar que la actividad fué oxidasa y no peroxidasa, se registró el consumo de O₂ con un oxígrafo System Hansatech Instruments (KINGS LYNN, England), utilizando un electrodo tipo Clark, manteniendo una temperatura constante (30°C) y la circulación de agua y aire Cole-Parmer Polystat[®], calibrando a 100% y ajustando el contenido de oxígeno. La cinética de consumo de oxígeno fue registrado por un grabador acoplado al oxígrafo Cole-Parmer[®] (Mod. 12.2-0000, U.S.A). Se evaluaron dos medios de reacción, la solución 1) 0.60mM de AIA/AIB, 0.02mM de MnCl₂, 0.075mM de DCP con algunas modificaciones sobre lo reportados por Kokkinakis y Bosko (1979), también se evaluó la actividad oxidasa al usar AIA/AIB 1mM, ácido *p*-cumárico 1mM como cofactor (Hoyle, 1978), siendo la variante de importancia el H₂O₂ (1mM, 0.34mM y sin H₂O₂) en los dos casos.

6.4.3 Análisis de pureza por electroforesis

6.4.3.1 Electroforesis nativa en geles de poliacrilamida

Además de estimar la actividad enzimática por métodos espectroscópicos, se requiere mostrar en condiciones nativas el número, la carga y la abundancia de las diferentes isoperoxidasas.

La técnica PAGE posee un alto poder de resolución, este utiliza un sistema electroforético discontinuo, que se forma por dos geles de distinta porosidad y pH. El superior, llamado concentrador o compactador, con tamaño de poro no restrictivo (grande), el inferior llamado separador, donde la movilidad es restringida por el tamaño de poro. La velocidad de migración o movilidad a través del campo eléctrico depende de varios factores como son: la intensidad de dicho campo; la carga neta, tamaño y forma de las moléculas; así como la fuerza iónica, viscosidad y temperatura del medio en el cual las moléculas se están moviendo.





Las condiciones fueron, gel condensador 4% y gel separador al 12.5%. La cantidad de muestra colocada por pozo en el gel de poliacrilamida contenía $\leq 30\mu\text{l}$ y $\leq 30\mu\text{g}$. Las condiciones de corrida fueron 150V, 50mA.

6.4.3.1.1 Tinción de peroxidasas

La solución para teñir la actividad peroxidasa consiste en una mezcla que contuvo Bencidina 3.6mM y H_2O_2 48mM en un amortiguador $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 2M pH 4.2.

6.4.3.1.2 Tinción de actividad AIAox/AIBox

El revelado de isoenzimas con actividad auxina oxidasa constó de 3 soluciones. La solución A (Fast Blue BB Base disuelto en etanol), la solución B (ácido *p*-cumárico, AIA/AIB y H_2O_2), y la solución C ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 2M pH 4.2), proporción 1:2:1. Concentración final: AIA 1mM, ácido *p*-cumárico 1mM, Fast Blue BB Base 3.3mM y H_2O_2 0.342mM en un amortiguador $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 0.5M pH 4.2, como lo reportado por Hoyle (1978) con algunas modificaciones.

6.4.3.1 Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE

Para estimar la eficacia de purificación, se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Dado que las peroxidasas de interés oscilan entre los 30-50kDA de masa molecular, se trabajó con geles de poro intermedio (12%). Al agregar SDS, las proteínas se cargan negativamente y la cantidad de detergente que se une a la proteína es directamente proporcional a su tamaño, es por eso que las proteínas son separadas en función de su masa molecular. Los pesos moleculares son determinados debido a la movilidad electroforética. La estimación del peso molecular fue calculada a partir de un marcador de proteínas estándar (PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder), midiendo la movilidad relativa R_f .

Las condiciones para los geles desnaturalizantes fueron las mismas que para las electroforesis nativas,





6.4.3.2.1 Tinción con azul de Coomassie

Para esta técnica se emplearon tres soluciones, la solución de fijación contuvo ácido acético glacial 7% [v:v] y metanol 40% [v:v]. El gel se cubrió con 50ml de esta solución y se mantuvo en agitación a una velocidad constante de 50 x g, durante 30 minutos a 20°C.

En la solución de tinción se mezcló azul de Coomassie G-250 al 0.1 % en metanol al 50% [v:v], y ácido acético 10% [v:v] dejando el gel en contacto con 50ml de la solución se mantuvo en agitación a una velocidad constante de 50 x g, durante 12-24 horas a 20°C.

Para desteñir el gel se colocó en una solución de metanol 40% [v:v] y ácido acético 10% [v:v]. El tiempo de decoloración varía, por lo cual se debe cambiar la solución para acelerar este proceso, posteriormente ésta solución se reemplazó por H₂O destilada hasta obtener el color deseado. En el caso de las muestras con muy baja concentración proteica se realizó la tinción con reactivo de Bradford al 16% de (NH₄)₂SO₄ durante 24 horas.

6.4.3.2.2 Tinción rápida de plata

Consta de la solución I-Fijadora (Metanol 40% [v:v], 0.5ml de Formol 37% [v:v], aforados a 1L), solución II (Na₂S₂O₃ 0.2% [m:v]), solución III-Desarrolladora (Na₂CO₃ 3% [m:v], Na₂S₂O₃ 0.0004% [m:v], agregando 0.5ml de Formol 37% [v:v] al instante), y solución IV-Ácido cítrico (12.8g en 25ml de H₂O), (Oakley, 1980).

6.4.3.2.3 Tinción para glicoproteínas

Las peroxidasas de clase III son glicoproteínas que poseen un porcentaje de glicosilación que oscila entre el 0-5 y 0-25%, respectivamente. Las cuales fueron identificadas utilizando Thermo Scientific Pierce Glycoprotein Kit (Sigma-Aldrich, Inc.), para la tinción de proteínas glicosiladas en geles de poliacrilamida utilizando el método ácido periódico de Schiff (PAS), que permite detectar restos de azúcares. Mediante la aplicación de soluciones para la oxidación, reducción y tinción.

El gel se fijó por completo en una solución agua/metanol 1:1 [v:v], y se mantuvo en agitación durante 60 minutos, la solución se reemplazó por H₂O y se colocó en agitación





durante 20 minutos (2 veces), el gel lavado fue transferido a la solución de oxidación y se dejó reaccionar 60 minutos, la solución se removió al lavar 2 veces con H₂O, posteriormente se adicionó el reactivo de Schiff para teñir el gel entre 1 y 2 horas, al producirse bandas magenta se reemplaza el reactivo por la solución reductora y se mantiene en esta por 2 horas, al final se realizaron lavados con H₂O y el gel se almacenó en ácido acético 5% [v:v]. El gel debe contener un control positivo un carril, en este caso se utilizó la Peroxidasa de rábano.

6.4.3.3 Ensayo de actividad Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa (G6PDH)

Todos los organismos vivos, sean levaduras o protozoos, plantas o animales, expresan la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). Debido a que ésta se encuentra en el citoplasma de las células vegetales, se buscó evidenciar que no hubiera contaminación de proteínas intracelulares y que las peroxidases de clase III se encuentran en el apoplasto (unidas a la pared celular o en la fracción soluble).

La actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) se evaluó en un volumen total de 3ml de la solución de ensayo, la cual contenía Tris-HCL, pH8.0 57mM, MgCl₂ 3.3mM, NADP 0.2mM, glucosa-6-fosfato (G6P) 3.3mM y 75µl de la muestra proteica (Kong *et al.*, 2010). El control positivo fue glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) 10µg/ml. La reacción se comenzó a medir una vez agregada la proteína a la solución de ensayo. La reducción de NADP fue monitoreada por el incremento de absorbencia a λ340nm durante cinco minutos. Una unidad de G6PDH es definida como a 1µmol de NADPH convertido por minuto a 20°C. Para determinar la actividad se utilizó la fórmula $C=A/\epsilon \times \text{cm}^{-1} \times \text{tiempo}$. A= cambio de absorbencia, ε= coeficientes de extinción molar del NADP (6.22 mM⁻¹ cm⁻¹)

6.4.4 Determinación de pI

Para conocer la pureza de una muestra enzimática es necesario ubicar las diferentes isoformas mediante isoelectroenfoque (IEF). Esta técnica separa las proteínas en función de su pI (punto isoeléctrico), es decir, el pH al cual la carga neta de la proteína es nula, de





modo que cuando la proteína se encuentra en su pI esta deja de moverse a lo largo del gel de anfolitos que se encuentra sometido a la acción de un campo eléctrico uniforme.

La muestra proteica contenía de 1-100µg, en 1-100µl, la cual se concentró con el kit 2-D Clean-Up, que ayuda a eliminar impurezas. Para la separación de proteínas por su pI se usó un sistema Ettan™ IPGphor™ (GE Healthcare, Sweden). El pellet obtenido de la fase anterior se resuspendió en un volumen adecuado de amortiguador de rehidratación para cargarlo en la 1ª dimensión, en este caso 125µl, que contenían Urea 8M, CHAPS 2% (m:v), 2% IPG amortiguador [m:v], azul de bromofenol 1% y 7mg de DTT por cada 2.5ml de solución, volumen que fue puesto en contacto con las tiras de anfolitos (Immobiline DryStrip gel length) de 7cm, sobre el Immobiline DryStrip Tray cubiertas con aceite, durante 24 horas. Las tiras rehidratadas con las muestras se colocaron sobre el colector haciendo coincidir los electrodos sobre las almohadillas. Las condiciones del IEF fueron.

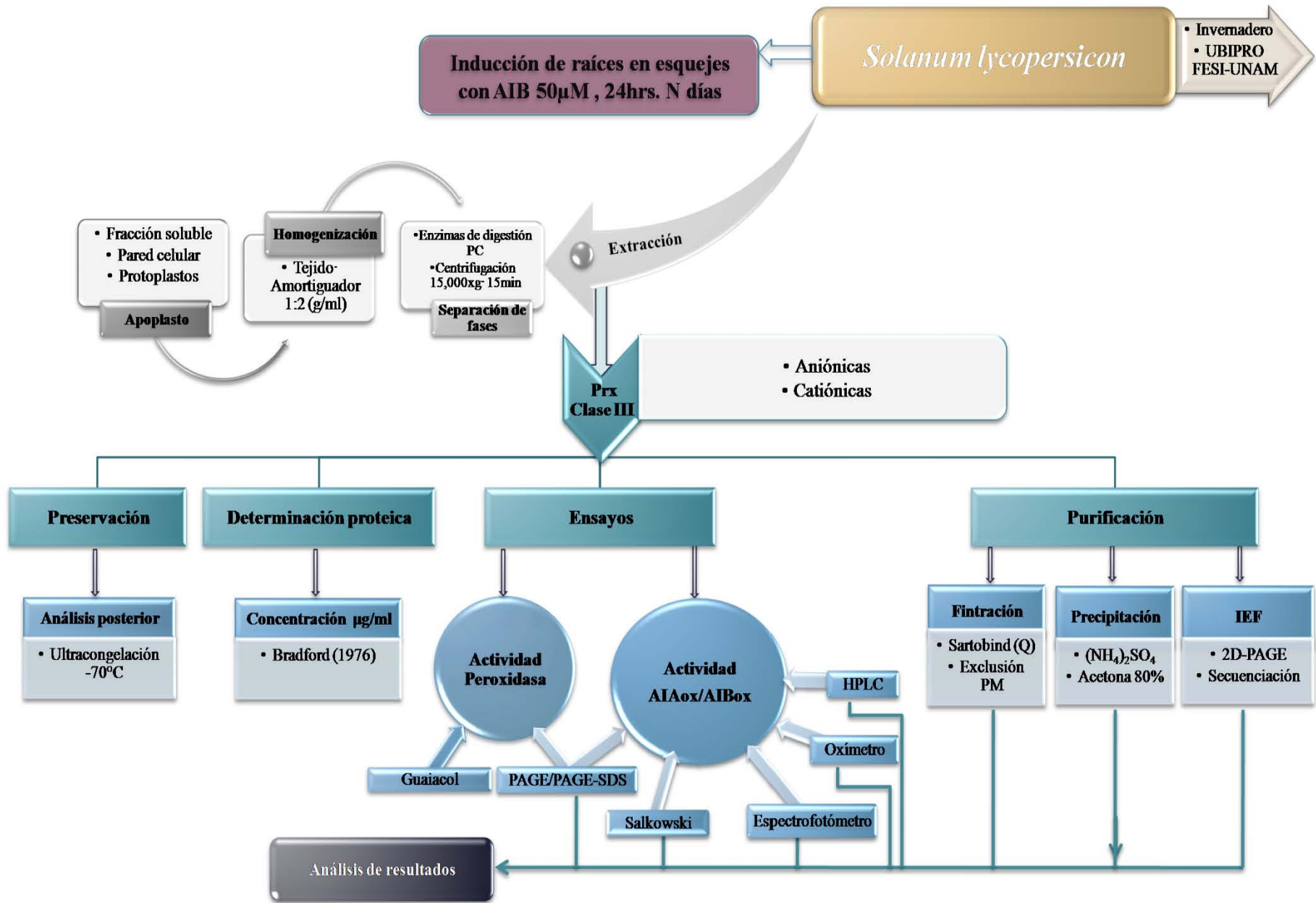
Paso 1: 300V (0:30, h:min), 0.2kVh, Paso 2: 1000V (1:30, h:min), 0.3kVh, Paso 3: 5000V (2:30, h:min), 4.0kVh, Paso 4: 1200V (0:30, h:min), 1.0kVh

Manteniendo condiciones de entre los 30 y 50mÅ. Terminados los diferentes pasos, las tiras pueden ser almacenadas a -70°C por un periodo prolongado de tiempo.

6.4.4.1 Electroforesis en segunda dimensión (2-D)

Esta técnica es empleada para el análisis de proteínas de acuerdo a dos propiedades independientes. El IEF, que separa las proteínas de acuerdo a su pI, y la segunda dimensión en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), para conocer el peso molecular de la proteína. Las tiras con las proteínas enfocadas fueron equilibradas con dos soluciones, la primera contuvo Urea 6M, Tris-HCl 75mM pH 8.8, Glicerol 29.3% [v:v], SDS 2% [m:v], azul de bromofenol 0.002% [v:v] y 100mg de DTT por cada 10ml de solución, volumen en el que se sumergieron cada una de las tiras manteniéndolas en agitación constante, durante 15 minutos a 20°C, la segunda solución contenía Urea 6M, Tris-HCl 75mM pH 8.8, Glicerol 29.3% [v:v], SDS 2% [m:v], azul de bromofenol 0.002% [v:v] y 250mg de yodoacetamida, realizando el mismo procedimiento. Para conocer los pesos moleculares se realizó una SDS-PAGE, solo preparando el gel separador al 12.5%. Las condiciones de corrida son 150V, 50mÅ. El gel debe teñirse de la misma manera que la electroforesis SDS-PAGE.





Esquema 2. Metodología de ensayos para determinar la ubicación de las peroxidasas de clase III y el catabolismo auxínico.



6.5 ANÁLISIS DEL CATABOLISMO AUXÍNICO

6.5.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

En este ensayo analítico las muestras enzimáticas se pusieron en contacto con un medio de reacción: sustrato (AIA-AIB) 0.5mM, ácido *p*-cumárico 0.5mM, H₂O₂ 0.034mM (Hoyle, 1978). El análisis se realizó por HPLC (HP 1100 series, USA) utilizando una columna Allsphere ODS-15u con flujo 1.5ml/min⁻¹. Las muestras fueron eluidas con una fase móvil de agua-ácido acético 1% / metanol 60:40 [v:v] (Martínez *et al.*, 2003), la columna debe ser purgada y equilibrada durante 30 minutos. La muestra se eluyó durante 15 minutos. La detección se realizó a 280 nm y 252nm y se determinaron los tiempos de retención de los compuestos involucrados en la reacción oxidasa al término de cero, 1.5, 3 y 30 minutos. La reacción se detuvo con MeOH [100%] y la concentración de los compuestos se determinó usando como control el medio de reacción sin enzima.

6.6 IDENTIFICACIÓN DE UNA ISOPEROXIDASA

Las proteínas ubicadas en los puntos isoeléctricos y pesos moleculares esperados fueron recortadas del gel de electroforesis SDS-PAGE teñido con azul de coomassie, las muestras fueron enviadas a la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología-UNAM para su identificación.

6.6.1 Espectrometría de masas

Las muestras fueron previamente reducidas con ditioneitol (DTT), alquiladas con yodoacetamida y digerida “in gel” con tripsina. Los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema LC-MS constituido de un cromatografo líquido de micro-flujo Accela (Thermo-Fischer Co. San Jose, CA) con “splitter” (1/20) y un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fischer Co., San Jose, CA) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). La calibración del espectrómetro fue realizado con una solución (Calmix) de 10 moléculas calibrantes, que permite determinaciones con exactitudes mejores que 5 ppm (partes/millón). En el sistema de cromatografía de líquidos se utilizó un sistema gradiente de 10-100% de solvente B (acetonitrilo/ácido acético 0.1%) en 120 minutos sobre una columna capilar PicoFrit Proteopep 2 C18 75 µm ID × 50 mm (New





Objective Inc., Woburn, MA). El flujo del sistema LC fue de 400 nanolitros/minuto. Para la fragmentación de los péptidos se utilizó los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High energy Collision Dissociation) donde solamente los iones con carga 2^+ y 3^+ fueron seleccionados para los eventos de fragmentación. Fueron desconsiderados los iones con cargas 1^+ , superiores a 4^+ y de cargas indefinidas. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 40 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 500 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 15 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 60 segundos. Los datos espectrométricos fueron sometidos a la búsqueda contra la base de datos del NCBI a través del programa ProteinProspector.

6.6.2 Análisis *in silico*

Los avances en la biología molecular y el surgimiento de un gran número de investigaciones sobre el genoma y proteoma de diferentes organismos han llevado a un crecimiento de la información biológica, la disciplina que ha permitido el manejo de estos datos es la bioinformática.

6.6.2.1 Proteína

Los rápidos avances conseguidos en la tecnología del DNA están permitiendo la secuenciación sistemática de los genomas de diversos organismos. Los proyectos de secuenciación a gran escala están proporcionando una ingente cantidad de secuencias de DNA. Sin embargo, aún se desconoce la función biológica de la mayoría de las proteínas codificadas por los genes detectados. Por lo que es importante la secuenciación de genomas a gran escala y el desarrollo de bases de datos de proteínas, el uso de técnicas de espectrometría de masas para analizar proteínas y péptidos y la separación de proteínas mediante 2D-PAGE con la introducción de los gradientes de pH inmovilizados (IPGs). Es





por eso que la proteómica es uno de los campos que puede ayudar a establecer una conexión entre las secuencias genómicas y su comportamiento biológico, constituyendo una herramienta importante en el análisis funcional de genes.

6.6.2.2 Estructura

La identificación de proteínas es esencial. Es el primer paso para otros estudios que suponen en última instancia la caracterización funcional. Además, en el caso de los geles bidimensionales, la identificación de las manchas conduce a la creación de mapas de referencia, que definen las proteínas expresadas por unos organismos o tejido en unas condiciones determinadas. Las proteínas pueden ser identificadas por diversos procedimientos, entre los que se incluyen la secuenciación del extremo N-terminal, detección con anticuerpos específicos, composición de aminoácidos, co-migración con proteínas conocidas, y sobre-expresión y delección de genes.

Debido a su rapidez y elevada sensibilidad, la espectrometría de masas se ha convertido en el método de detección para la identificación de proteínas a gran escala. También permite la caracterización de modificaciones post-traduccionales que presentan relevancia fisiológica, tales como la glicosilación y la fosforilación. La identificación a gran escala de proteínas mediante espectrometría de masas implica la conversión de los péptidos en iones en fase gaseosa mediante técnicas de ionización suave, la separación de los iones según su m/z en un analizador de masas, fragmentación opcional de los iones peptídicos, la identificación mediante huella peptídica (PMF: *peptide mass fingerprinting*) o mapeo peptídico utilizando un espectrómetro tipo MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization) o la identificación mediante fragmentación de péptidos obteniendo la secuencia total o parcial de los aminoácidos (etiqueta de secuencia) utilizando un espectrómetro de masas en tándem.

6.6.2.3 Identificación de proteínas utilizando bases de datos

Los datos generados en un espectrómetro de masas, son visualizados en forma de picos; a la representación gráfica de los datos se le denomina espectro de masas. Cada uno de los picos de un espectro de masas representa valores de m/z y la intensidad de cada señal. Definir la





identidad o secuencia de una proteína a partir de su espectro de masa es un procedimiento común en estudios de proteómica. Utilizando la información contenida en bases de datos es posible la identificar rápidamente un gran número de proteínas con gran precisión.

A partir de la secuencia parcial de aminoácidos, se pudo saber de qué proteína se trataba utilizando el programa informático BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), que comparó la secuencia de la proteína contra una gran cantidad de secuencias que se encuentran en la bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) servidor del cual se utilizó el programa protein BLAST que permitió alinear la secuencia de aminoácidos. La puntuación obtenida para la similitud se obtuvo por “scores” y se eligió la de mayor identidad.

El servidor ExPASy se utilizó para obtener algunos parametros fisicoquímicos a partir de la secuencia de aminoácidos de la enzima usando el programa ProtParam. El modelo 3D de la proteína se obtuvo usando Geno3D, este servidor busca los mejores templados (proteínas similares que se utilizan como moldes para generar la estructura terciaria) de acuerdo al alineamiento obtenido con el programa ClustalW. Los modelos de la estructura tridimensional que fueron generados se visualizaron utilizando el programa WebLab ViewerLite.

La búsqueda de las relaciones filogenéticas entre las secuencias de las diferentes peroxidasas de clase III reportadas para *Solanum lycopersicum* en la PeroxiBase se realizó obteniendo en formato FASTA la secuencia de aminoácidos, el servidor GenomeNet se utilizó para relizar la alineación de secuencias múltiples con el programa ClustalW y el procesamiento de los árboles se realizó con el programa Phylogeny analysis del servidor LIRMM (Laboratoire Informatique Robotique Microélectronique Montpellier) MAB (Méthodes et Algorithmes pour la Bio-informatique).

Para obtener más información de la enzima se obtuvo la secuencia del gen que la codifica.





7. RESULTADOS Y ANÁLISIS







7.1 PRODUCCIÓN DE MATERIAL VEGETATIVO

7.1.1 Propagación por esquejes

Del cultivo de semillas resultaron un 95% de semillas viables, lo que representó un total de 20 plantas. A partir de las cuales se realizaron las pruebas *in vitro*.

Con la propagación asexual se logró una rápida producción de plantas y se observó que la concentración de auxina AIB ($5 \times 10^{-5} \text{M}$) utilizada para la generación de raíces adventicias a partir de brotes axilares de *Solanum lycopersicum* estimuló en un periodo de corto tiempo la producción y desarrollo de las mismas, Fig. 2. Por lo que se determinó que en el día diez de enraizamiento el esqueje contaba con las características necesarias para poder establecerse sobre un sustrato.

Con este método de propagación asexual se lograron una alta frecuencia de inducción y diferenciación de brotes axilares, se puede considerar que el suprimir la dominancia apical así como la producción de flores induce e incrementa la producción de yemas axilares, ya que evita que la energía se dirija hacia estas partes de la planta. Otra de las finalidades respecto a la propagación por esquejes fue el poder determinar la actividad enzimática auxina oxidasa y peroxidasa en diferentes días de desarrollo y así proceder a la purificación de la isoforma más abundante para llevar a cabo su caracterización.



Figura 1. Tallos axilares de *Solanum lycopersicum* tratados con $5 \times 10^{-5} \text{M}$ de AIB, en periodo de incubación (0-10 días) durante el proceso de formación de raíces adventicias.





7.2 PEROXIDASAS DE CLASE III

7.2.1 Extracción de peroxidasas de clase III

La purificación se basó en la obtención de muestras enzimáticas con el máximo rendimiento, utilizando el proceso más corto y económico. Pretendiendo obtener proteínas de pureza elevada que permitieran caracterizar su estructura primaria y terciaria.

El proceso de purificación constó de tres etapas: el aislamiento y extracción; eliminación de contaminantes y concentración de muestra; y por último la determinación de una isoforma.

La extracción fue dirigida a tallos con y sin periodo de enraizamiento, aislando muestras de apoplasto completo, fracción soluble y pared celular, Fig. 2. La eliminación de contaminantes se realizó precipitando los protoplastos para separar el contenido citoplasmático, y la cromatografía de intercambio iónico para excluir las isoenzimas catiónicas; las técnicas de concentración que se utilizaron para reducir el volumen de muestra fueron la precipitación fraccionada con sulfato de amonio y para la etapa de obtención de proteína se realizó filtración por intercambio iónico y filtración exclusión molecular. En la última fase de purificación las muestras se precipitaron con acetona 80% y se obtuvieron bandas proteicas de geles PAGE/ SDS-PAGE.



Figura 2. Extracción de muestras enzimáticas de tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum*.





7.2.2 Caracterización de isoperoxidasas de clase III

La purificación de las diferentes isoperoxidasas de clase III partiendo directamente del material biológico es un proceso laborioso y bastante largo, dado que mantienen un rango muy cercano de pesos moleculares, pI, entre otros parámetros estructurales y fisicoquímicos, en el que además, durante las primeras etapas se trabaja con unos volúmenes de muestra muy grandes que lo hacen aún más tedioso. La diferencia de cargas entre ellas sirvió para su identificación mediante el revelado de la actividad auxina oxidasa en geles PAGE de electroforesis nativa, en los que fue reconocible el número de isoformas y su respectiva abundancia.

Las peroxidases de *Solanum lycopersicum* se obtienen de diferentes partes de la planta, en este caso se parte de un extracto de tallos de brotes axilares macerando el tejido para obtener una fracción con contenido proteico del apoplasto (fracción soluble e insoluble), agregando PVP para adsorber los polifenoles liberados durante la ruptura celular.

Con el fin de demostrar la capacidad de las isoperoxidasas para catalizar tanto H_2O_2 y algún sustrato (Guayacol, AIA o AIB) se prepararon PAGE nativos en primera dimensión seguidas de su respectiva técnica de tinción con lo cual se visualizó más claramente la isoenzima con mayor actividad, Fig.3.

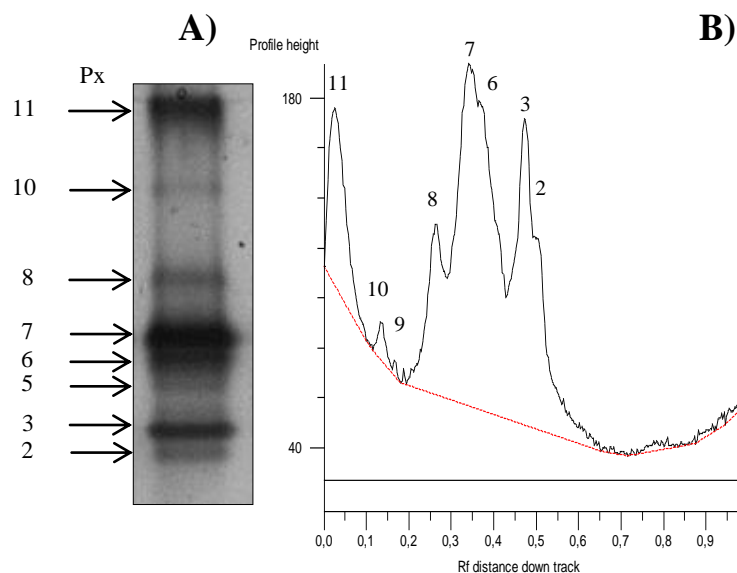


Figura 3. Isoperoxidasas de clase III de extracto de apoplasto (tallo) en *Solanum lycopersicum*, A) Gel de poliacrilamida mostrando las isoenzimas con actividad de auxina oxidasa separadas por electroforesis nativa, B) Perfil densitométrico del gel mostrado en "A".





Aunque muchos tejidos pueden sintetizar auxina, su transporte es complejo y altamente regulado. El transporte de AIA es necesario para el desarrollo vascular y de raíces laterales. La finalidad del uso de diferentes técnicas de extracción de peroxidadas de clase III fue conocer la disponibilidad de las mismas con respecto a la parte de la planta, la fracción del tejido vegetal y el amortiguador empleado, ya que hasta el momento no se han realizado trabajos que muestren alguna isoforma purificada y la ubicación de la misma, por esta razón se partió de la comparación de diferentes factores para poder elegir el método que mostrara la mayor actividad auxina oxidasa y que permitiera su posterior purificación.

Las proteínas unidas iónicamente y las solubles del apoplasto fueron extraídas con amortiguadores de baja fuerza iónica, mientras que las unidas covalente o iónicamente a la pared fueron liberadas con celulasa y pectinasa. Las isoformas fueron separadas por PAGE nativa y teñidas para actividad peroxidasa y auxina oxidasa. En el zimograma de la Fig. 4 se contabilizaron 11 isoperoxidadas de clase III, identificadas tanto en la fracción soluble del apoplasto como en la pared celular en tallo y raíz, difiriendo en la concentración proteica y afinidad por su sustrato, siendo más activas teniendo el ión fosfato en el medio de reacción.

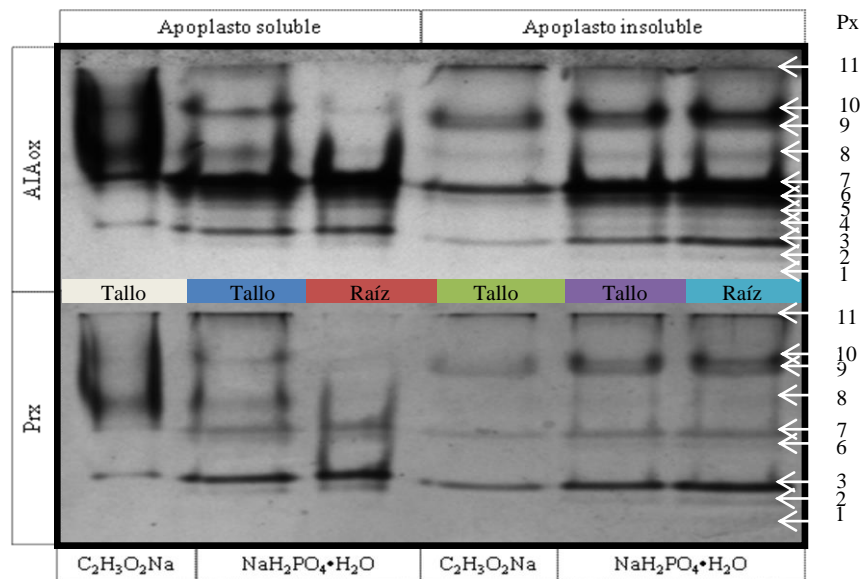


Figura 4. Separación de isoperoxidadas aniónicas y catiónicas presente en la fracción soluble e insoluble (pared celular) en tallos y raíz de brotes axilares de *Solanum lycopersicum* (día 10 de enraizamiento in vitro) extraídas con diferentes soluciones amortiguadoras. Tinción para actividad peroxidasa (Prx) y auxina oxidasa (AIAox).





Dado que las proteínas de nuestro interés son hidrosolubles, se enriqueció la cantidad de isoenzimas y se disminuyó el volumen por medio del fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; este soluto provoca la disminución en el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de las proteínas, puesto que compite por el agua y rompe los puentes de hidrógeno o las interacciones electrostáticas, de forma tal que disminuye su solubilidad y provoca su precipitación, en la tabla 1 se pueden observar los Rf de cada peroxidasa, y las bandas con las isoformas se muestran en la Fig. 5, haciendo énfasis en la concentración de proteína disponible en cada fracción, se presenta un densitograma de cada tratamiento.

Precipitación. Actividad AIAox						
40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		75% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		100% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		Px
cm	Rf	cm	Rf	cm	Rf	#
				0.1	0.0172	11
				0.5	0.0862	10
0.6	0.1034	0.6	0.1034	0.6	0.1034	9
0.8	0.1379	0.8	0.1379	0.8	0.1379	8
1.1	0.1896	1.1	0.1896			7
		1.2	0.2068			6
		1.5	0.2586			5
		1.6	0.2758			4
1.7	0.2931	1.7	0.2931	1.7	0.2931	3
1.8	0.3103	1.8	0.3103	1.8	0.3103	2
		1.9	0.3275			1

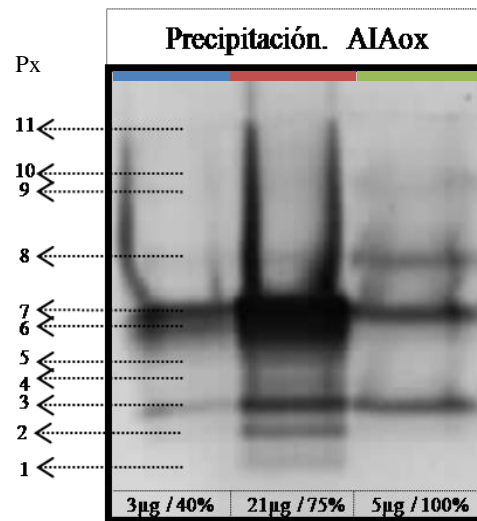


Tabla 1. Rf de cada peroxidasa; Figura 5: Fraccionamiento de isoperoxidasas de clase III de *Solanum lycopersicum* (décimo día de enraizamiento *in vitro*) con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, actividad AIAox.

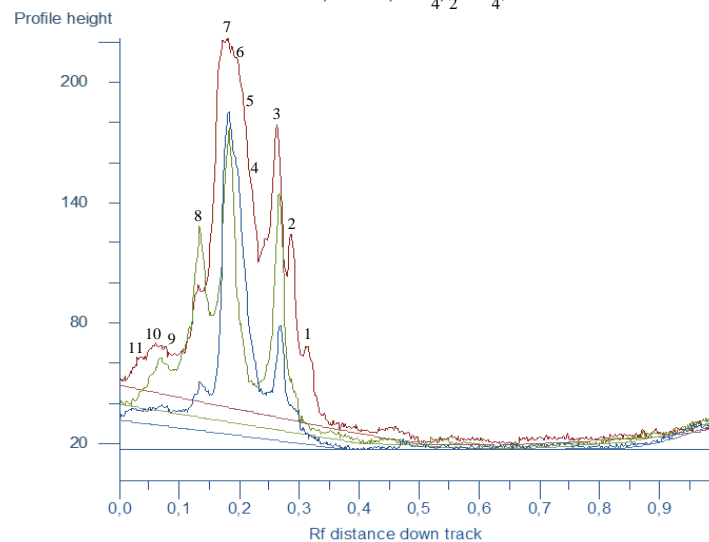


Figura 6. Densitometría del fraccionamiento de isoperoxidasas de clase III de *Solanum lycopersicum* (día diez de enraizamiento *in vitro*) con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, actividad AIAox. Los colores hacen referencia a los recuadros que se encuentran en la Fig. 5.





7.2.2.1 Efecto del amortiguador

Tanto el AIA como el AIB son auxinas que se encuentran naturalmente en las plantas, siendo el AIB el que se encuentra menos libre que el AIA, aunque no se han completado los estudios detallados que indiquen si esta tendencia se mantiene en todas las etapas de desarrollo, sin embargo se ha visto que los cambios en los niveles de AIA tienden a alterar de manera similar los niveles de AIB, lo que sugiere que el metabolismo de los dos compuestos auxínicos está vinculado. Debido a que el AIB también actúa como un precursor de AIA, el AIB podría funcionar de manera similar al AIA conjugado (Korasik *et. al*, 2013). Se ha sugerido también que el AIB se convierte en AIA en un proceso paralelo a la β -oxidación de ácidos grasos en el peroxisoma (Strader *et. al*, 2010).

De los diferentes procesos de extracción, se comparó la actividad auxina oxidasa utilizando dos sustratos indólicos, el ácido indol-3-acético y el ácido indol-3-butírico. En el gel de electroforesis nativa, Fig. 7, se observa el fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular, en el que se utilizaron membranas de 50-30kDa, pues la mayor parte de las peroxidases vegetales en condiciones desnaturalizantes tienen una masa molecular de 10-55kDa, debido al elevado porcentaje de glicosilación de las proteínas.

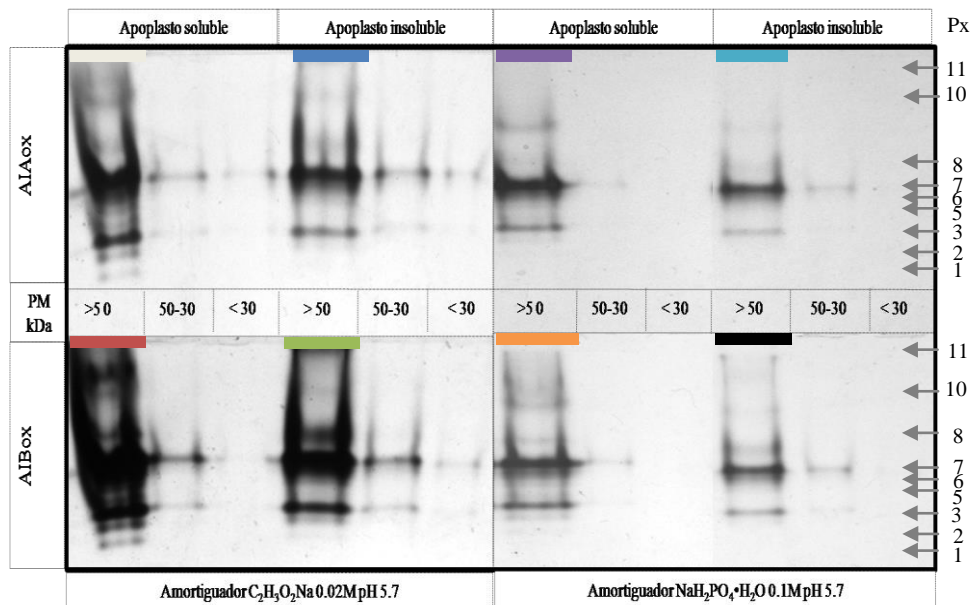


Figura 7. Muestras filtradas con membrana de exclusión por peso molecular (50, 30kDa) y comparación de la actividad auxina oxidasa (AIAox/AIBox) de isoperoxidasas de tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum* (día 10 de enraizamiento) en diferentes medios de reacción, in vitro.





Este ensayo buscaba detectar la actividad auxina oxidasa, utilizando el AIB como sustrato ya que en otros trabajos sólo se ha utilizado AIA, las condiciones de extracción fueron las mismas, se utilizaron dos amortiguadores en cada caso (acetato y fosfato de sodio), sin embargo se pudo detectar por densitometría, Fig. 8, que la actividad de la Px7 tiene el mismo comportamiento, sin embargo al comparar la actividad de las peroxididas Px3 y Px2 se observa una mayor afinidad por el AIB, que se hace más notoria al utilizar amortiguador de acetatos para remover a las enzimas del apoplasto. Es interesante ver como del mismo tallo del que fueron extraídas las proteínas solubles, se obtiene aproximadamente la misma concentración de proteína y consigo la misma actividad específica, lo cual quiere decir que hay momentos específicos en los que las peroxididas deben ser acumuladas para su posterior disponibilidad soluble y así realizar ciertas funciones metabólicas. Esto será analizado posteriormente respecto al proceso de enraizamiento.

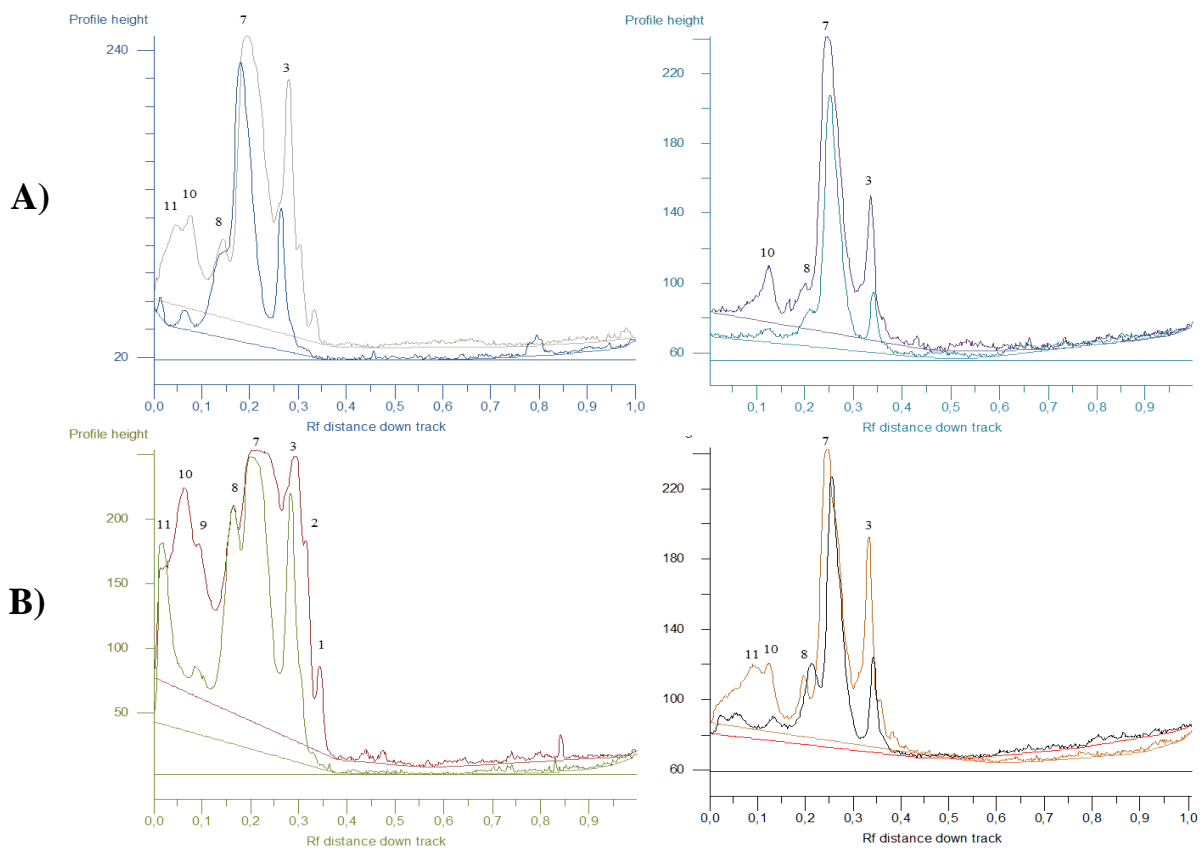


Figura 8. Densitometrías. A) actividad AIAox. B) actividad AIBox. Muestras filtradas con membrana de exclusión por peso molecular (50, 30kDa) y comparación de la actividad auxina oxidasa (AIAox/AIBox) de isoperoxidasas de tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum* (día 10 de enraizamiento) en diferentes medios de reacción, in vitro. Los colores hacen referencia a los recuadros que se encuentran en la Fig. 7.





7.2.2.2 Efecto del pH

La cromatografía de exclusión molecular como se describió anteriormente se realizó con membranas de corte de 50kDa y 30kDa y se compararon dos tratamientos con diferentes amortiguadores $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 0.02M pH 5.7 y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, la velocidad de paso de la muestra fue 1000 x g analizando el mismo volumen de muestra, el contenido proteico y la actividad enzimática utilizando Guayacol como sustrato, fueron determinadas por espectrofotometría siendo mayor la abundancia de proteína al digerir las paredes celulares Fig. 9 (A), puesto que se utilizan enzimas que degradan celulosa y pectinas, polisacáridos que conforman la pared celular vegetal, sin embargo la actividad específica fue más alta para para la muestra que contuvo proteínas del apoplasto soluble con tamaño 50kDa o menos (C50) Fig.9 (B), en la que se observa la variación directa sobre el bajo contenido proteico y la alta actividad específica, esto comprueba que la mayoría de las peroxidasa de clase III tienen un peso molecular igual o menor a 50kDa. Con este método nuevamente se observa que la influencia del amortiguador de fosfatos afecta positivamente a la actividad enzimática, así como para poner en solución a las mismas. Posteriormente se recurrió a utilizar el amortiguador de acetatos para evaluar otros parámetros puesto que mantenía más estables a las proteínas de interés en un rango amplio de pH, sin embargo el ión fosfato genera un buen medio de reacción para estas enzimas.

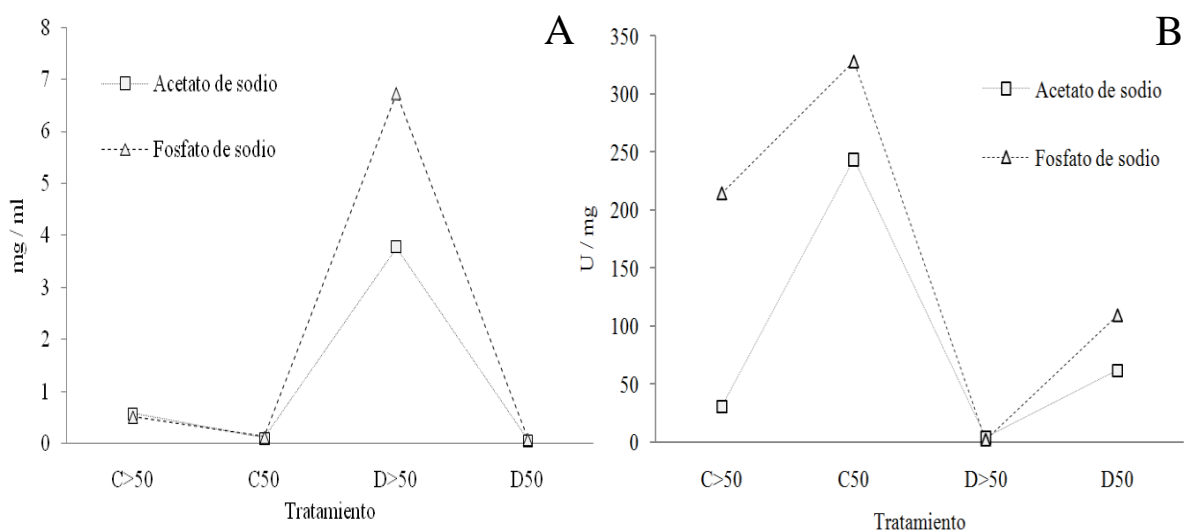


Figura 9. Cromatografía de exclusión molecular de proteínas extraídas con diferentes amortiguadores (Acetato y Fosfato de sodio). A, concentración proteica. B, Comportamiento cinético de la actividad peroxidasa al utilizar Guayacol como sustrato. Muestras concentradas 5:1 [v:v] por precipitación con acetona 80% [v:v].





La estabilidad estructural y la actividad enzimática de las peroxididas dependen del pH de la disolución; aunque las peroxididas de plantas han sido estudiadas durante muchos años la información sobre el efecto del pH en su comportamiento y extracción es bastante limitada. Para elegir un pH idóneo en el cual las isoformas se ponen en solución con mayor facilidad, se realizó un gradiente de pH aplicado sobre la fracción soluble e insoluble (pared celular) del apoplasto en tallos de tomate, esto simula lo que ocurre cuando la pared celular llega a acidificarse en su medio *in vivo*, Fig. 10. El pH sólo influyó en la extracción y no sobre la función enzimática puesto que todas las muestras desarrollaron la reacción en una solución $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 0.5M pH 4.2, sin embargo en la comparación de disposición de las peroxididas en los distintos pH se observa que a 5.7 son óptimamente removidas y puestas en solución.

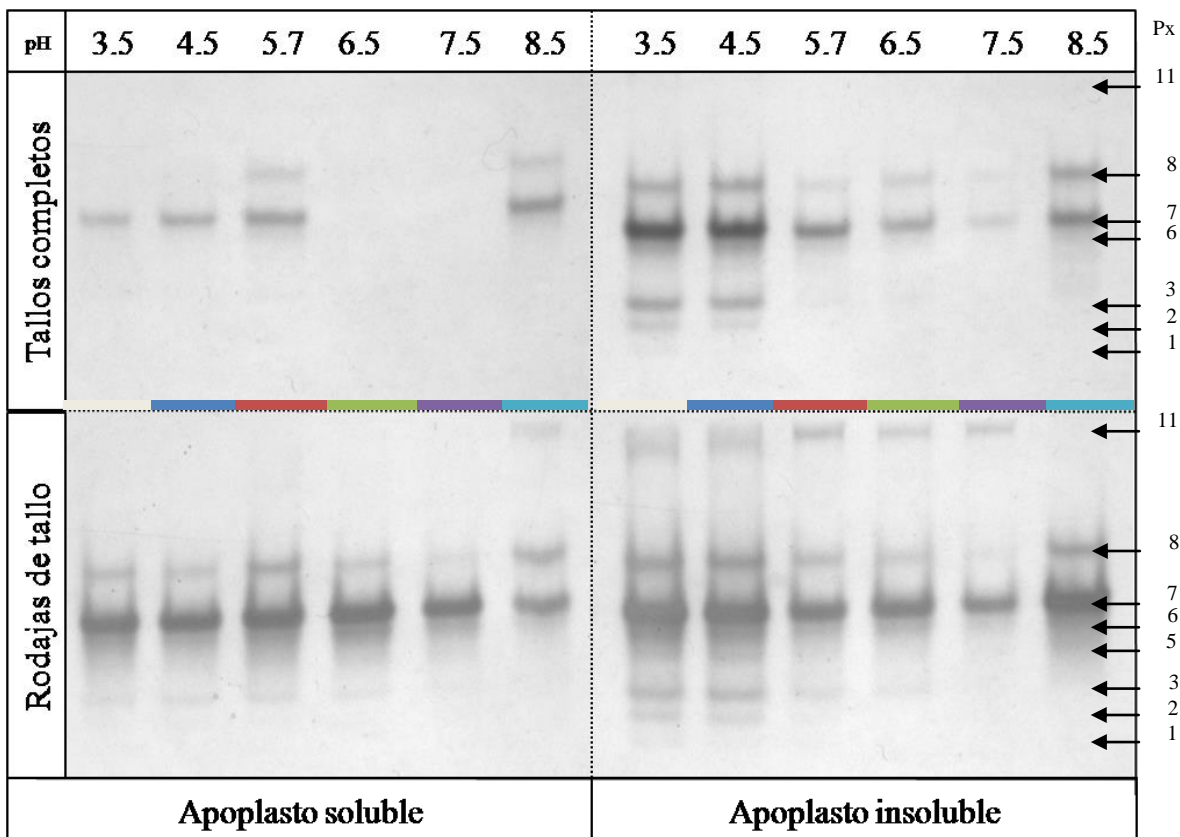


Figura 10. PAGE nativo, actividad enzimática usando AIA como sustrato en muestras extraídas de tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum* partiendo de un gradiente de pH ácido hacia un pH básico 3.5>8.5.





El apoplasto de los tallos de tomate contiene dos grupos de peroxididasas de acuerdo con su movilidad isoelectroforética como se ha venido observando: peroxididasas catiónicas que se mantienen dentro de la matriz de polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y pectinas) por interacciones iónicas y peroxididasas aniónicas que están entrecruzados por enlaces covalentes (Kukavica *et al.* 2012), aunque a lo largo de la experimentación se ha observado que pudiese haber isoformas que están ancladas a la pared celular a razón de su estructura tridimensional. El número de isoperoxidasas que se ponen en solución debido a la variación de pH, así como la concentración de cada una se muestra en los densitogramas de la Fig.11.

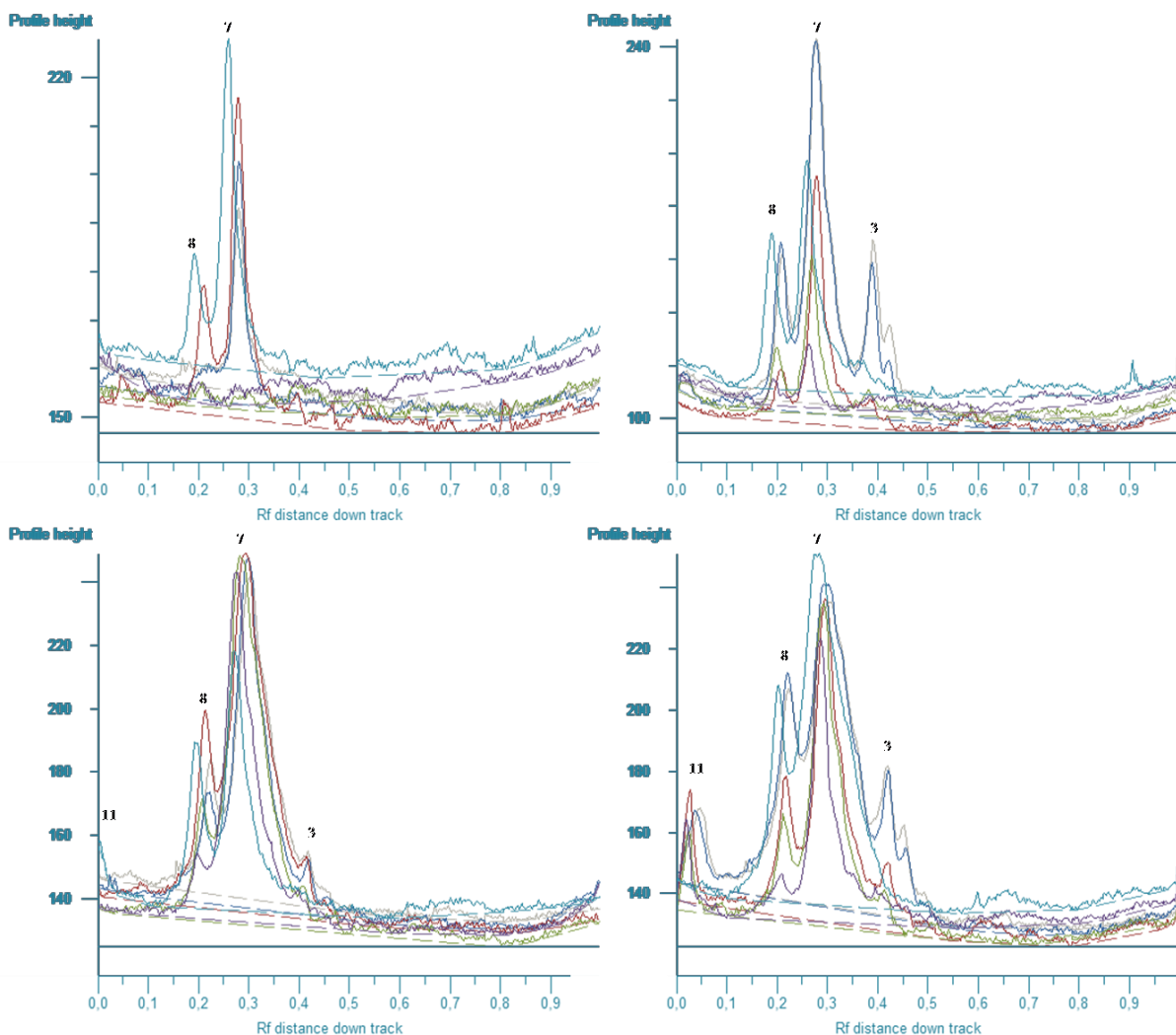


Figura 11. Densitometrías de zimogramas de la Fig. 10, actividad auxina oxidada usando AIA como sustrato en muestras extraídas de tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum* partiendo de un gradiente de pH ácido hacia un pH básico 3.5>8.5. Los colores de los gráficos hacen referencia a los recuadros que se encuentran en la Fig. 10.





En el presente estudio, fueron detectadas 1 isoforma catiónica y 10 isoformas aniónicas con valores de pI que van desde 3,7 hasta 5,2 con aparente peso molecular entre los 38 y 50 kDa. El patrón de isoformas difiere en función del tipo de unión a los constituyentes de la pared celular o a su ubicación subcelular en el líquido apoplástico. Entre los polisacáridos de la pared celular, la mayoría de ellos son de carácter neutral, sólo las pectinas proporcionan cargas negativas y establecen interacciones con proteínas básicas (isoperoxidasas catiónicas).

Tales interacciones pueden ser modificadas por el pH y por la concentración de Ca^{2+} , de igual manera la pectina de esterificación puede estar implicada en la regulación de distribución de peroxidasa dentro del apoplasto (Penel y Greppin, 1996). Tanto la exocitosis y endocitosis son a menudo sensibles a los niveles de calcio citosólico libre y está estrechamente acopladas a los gradientes internos y flujo transmembranal de varios iones. Además de Ca^{2+} , un importante cuerpo de datos electrofisiológicos y de imagen han asociado K^+ , H^+ , Y Cl^- con el crecimiento. Los estudios de pH de acuerdo con gradiente de protones intracelulares en mediciones de las corrientes extracelulares mostraron que este circuito de protones podría ser impulsado por la membrana plasmática H^+ ATPasas lo que implica presumiblemente que sea importante para el establecimiento de cualquier gradiente de pH. Aunque el gradiente de pH es generalmente reconocido por la acidificación de la pared celular. Este gradiente de protones es estrechamente asociado con la producción de especies reactivas de oxígeno (Foreman *et al.*, 2003) y relacionada con el estado de la nutrición (Shin *et al.*, 2005).

Las diferencias en las propiedades bioquímicas entre isoperoxidasas iónicamente y covalentemente unidas a la pared celular son su diferente movilidad electroforética, pesos moleculares y sus actividades oxidantes que tienen un papel específico en la fisiología de la raíz durante el desarrollo adventicio. Una carga distinta de estos dos grupos de isoformas enzimáticas, que están unidos a la pared celular podría implicar diferentes dominios dentro de la pared celular y, en consecuencia, una función fisiológica específica *in situ*.





Resultados y análisis

Las peroxidasas son enzimas con un amplio espectro de sustratos, capaces de oxidar derivados hidroxycinámicos y otros compuestos fenólicos con diferentes especificidades, lo cual es útil para analizar el tipo de reacción enzimática que cataliza y la fracción apoplástica en la que ocurre, así como la afinidad de la enzima hacia un sustrato.

En comparación con la tinción de actividad auxínica donde se pueden observar las once isoformas de peroxidasa, la tinción para actividad Px muestra sobre las mismas fracciones un comportamiento reducido llegando a mostrarse ausente. Haciendo referencia a cada peroxidasa sobre la movilidad en la que se encuentran, se puede ver que ciertas isoformas tales como la Px1, Px 2, Px 4, Px 5, Px 6 y Px 9 que sobre los geles de la Fig. 10 se encuentran visibles, comparativamente en los zimogramas de la Fig. 12 se puede observar que en estas isoenzimas la actividad peroxidasa utilizando *o*-dianisidina es nula, lo que denota la mayor afinidad por la vía de degradación auxínica.

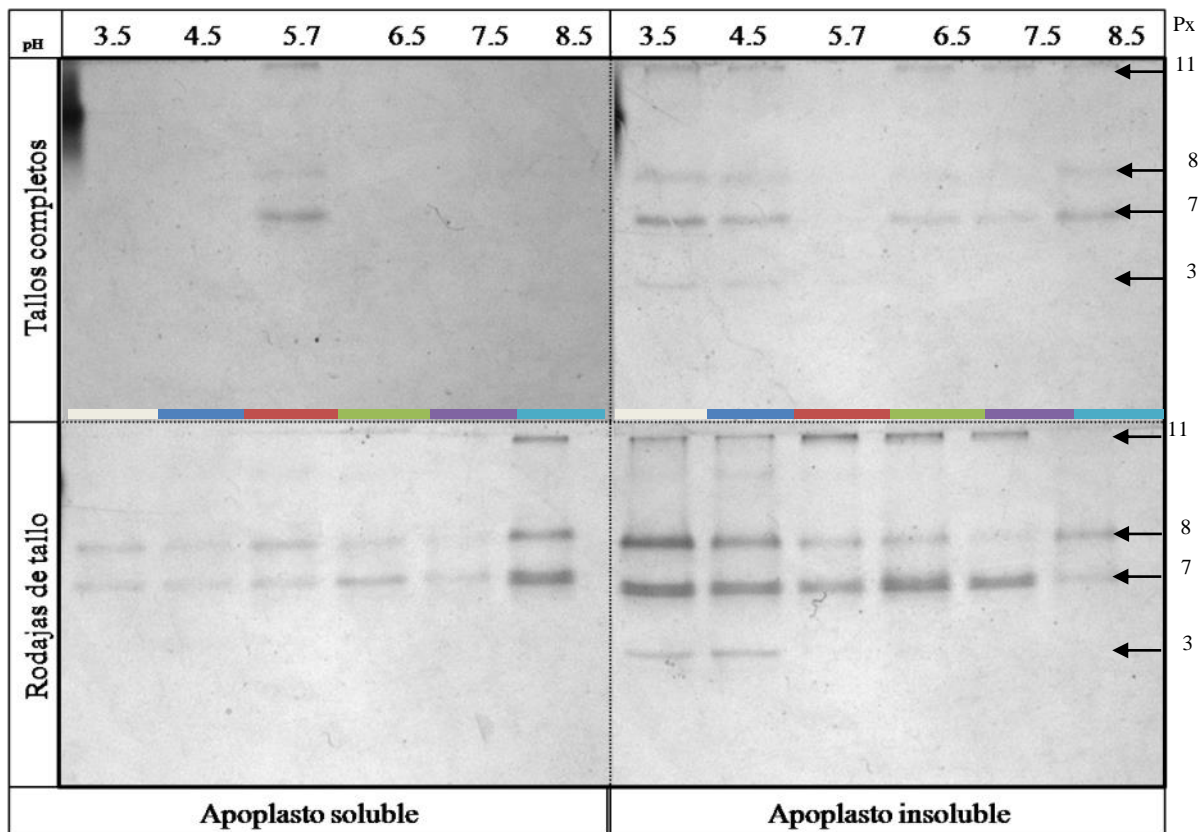


Figura 12. Page nativo, actividad enzimática usando *o*-dianisidina como sustrato en muestras extraídas de tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum* en un gradiente de pH ácido hacia un pH básico 3.5>8.5.



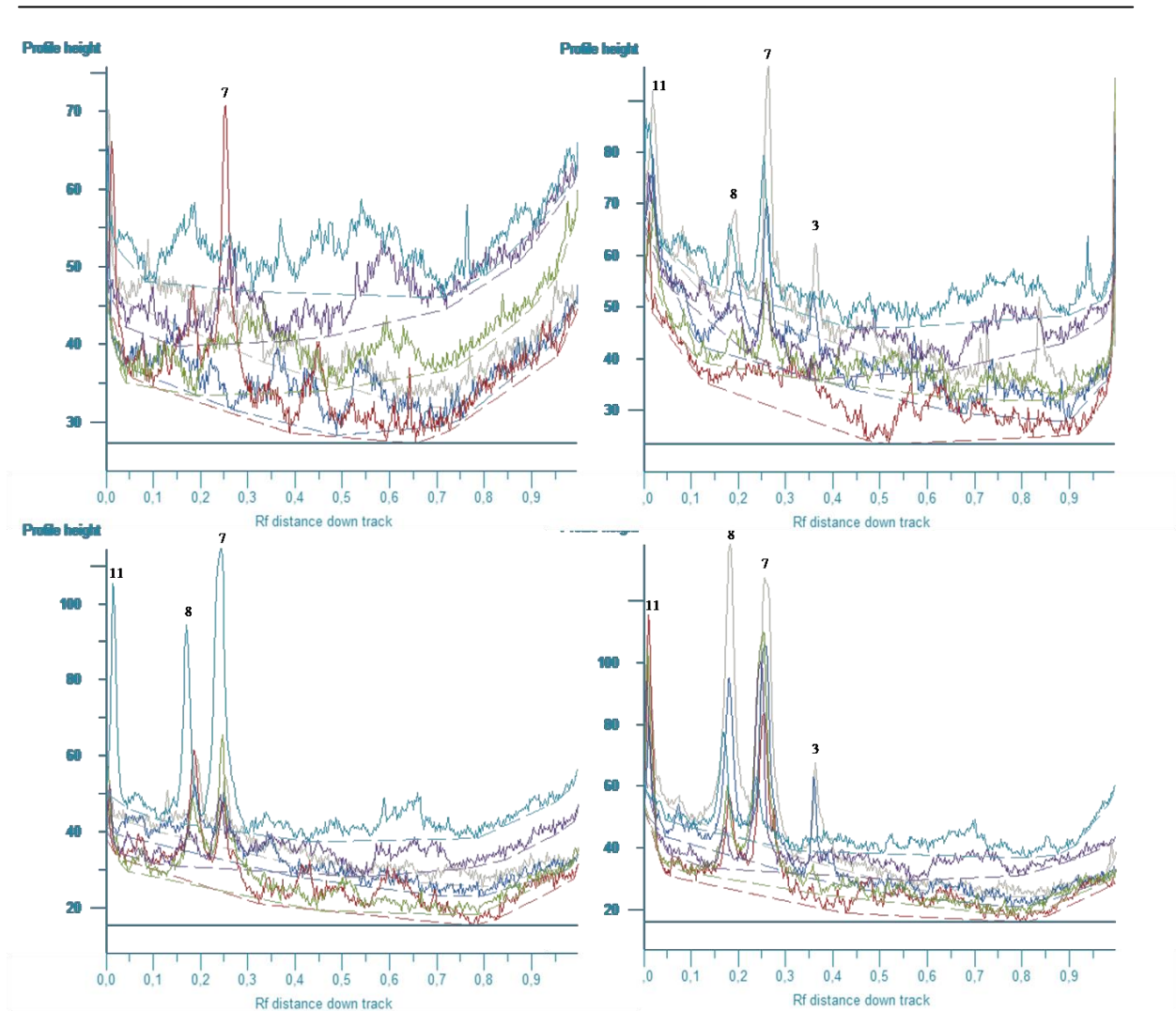


Figura 13. Densitometrías de zimogramas de la Fig. 10, actividad auxina oxidasa usando *o*-dianisidina como sustrato en muestras extraídas de tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum* partiendo de un gradiente de pH ácido hacia un pH básico 3.5>8.5. Los colores de los gráficos hacen referencia a los recuadros que se encuentran en la Fig. 10.

De las muestras de tallos completos se obtuvo la Px7 en pH 4.5 Fig. 10, con alta actividad específica y baja concentración proteica pues se halla libre de otras isoenzimas, a pH 5.7 las Px7 y Px3 tienen una actividad específica alta y se debe al alto contenido proteico en solución. En pH 5.7 y 8.5 se obtienen las Px7 y Px8, mientras que en los otros pH's la actividad oxidasa es nula, igual que en la actividad Px donde la única isoforma con actividad es la Px7 a pH 5.7, Fig. 12.





Por otra parte al analizar la fracción de los tallos completos expuestos a enzimas de digestión muestran como a pH 5.7 se libera un bajo contenido proteico y alcanza el máximo pico de actividad específica de estas muestras. Al analizar el efecto del amortiguador a pH 3.5 y 4.5, en el cual se encuentra una alta concentración proteica podemos deducir que se debe a la alta eficacia de las enzimas digestivas (pectinasa y celulasa) las cuales tienen un pH óptimo $3 > 4.5$ pudiendo liberar más fácilmente a las enzimas unidas a la pared celular (isoformas aniónicas), zimogramas de la Fig. 10 y Fig.12 para la actividad AIAox y Px respectivamente.

En la muestra de rodajas de tallos se puede observar la mayor actividad específica con la mínima concentración proteica, esto puede deberse a la mayor superficie de contacto con la fracción soluble del apoplasto cuando se tienen rodajas delgadas del tallo, los máximos picos de actividad AIAox se observan entre el pH 3.5 y 5.7, densitometría de la Fig. 11, en dicha muestra no hay diferencias significativas respecto a actividad oxidasa y peroxidasa, pero se puede observar que aparece la Px11 con las dos actividades enzimáticas.

La concentración proteica del extracto digerido de rodajas de tallos es la más alta, pues libera gran número de isoformas de la pared celular, aunque la pectinasa y celulasa forman parte del contenido proteico, la actividad específica muestra nuevamente al pH 4.5 con el pico más alto de actividad peroxidasa. Este método de extracción libera la mayor cantidad de isoformas Fig. 11, dentro de las cuales es evidente la presencia de la peroxidasa catiónica (Px11) que es más activa en el medio con pH 5.7, Fig. 10. Con esto podemos establecer una relación directa de las isoperoxidasas catiónicas con la pared celular, así como el hecho de que las isoenzimas iónicas establecen relación con la pared celular mediante enlaces fuertemente iónicos o llegando al carácter covalente en algunas de ellas que son muy aniónicas y que son sólo liberadas a pH ácidos, tal es el caso de las Px1 y la Px2, actividad AIAox, Fig. 10. Por otra parte la actividad peroxidasa muestra que las Px7 y Px3 son las más activas a pH 3.5 y 4.5.



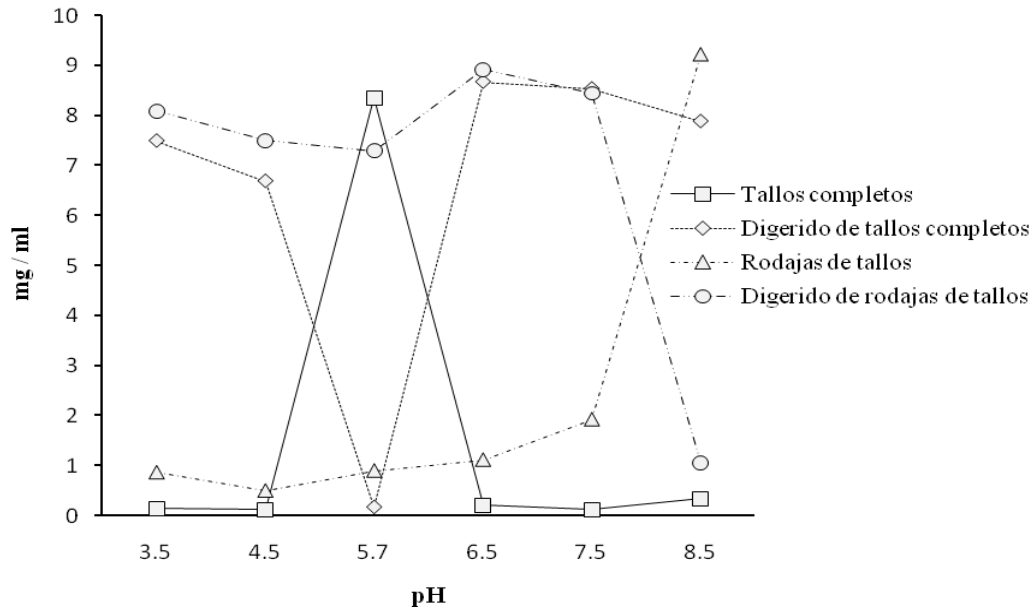


Figura 14. Contenido proteico de muestras extraídas de tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum* partiendo de un gradiente de pH ácido hacia un pH básico 3.5>8.5. Muestras concentradas 5:1 [v:v] por precipitación con acetona 80% [v:v]

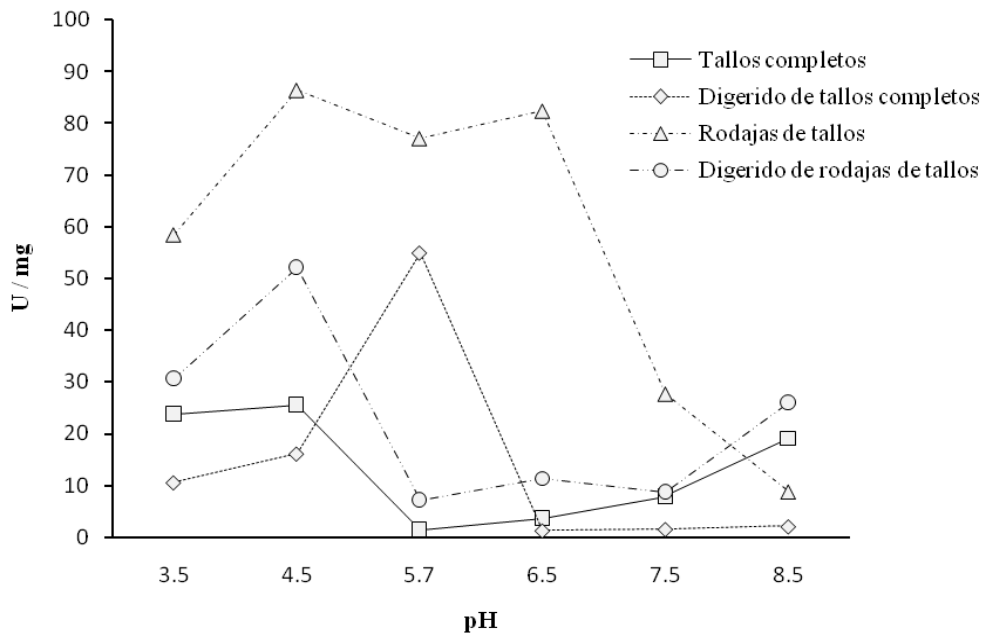


Figura 15. Cinética de actividad peroxidasa, utilizando Guayacol como sustrato en muestras extraídas de tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum* partiendo de un gradiente de pH ácido hacia un pH básico 3.5>8.5. Muestras concentradas 5:1 [v:v] por precipitación con acetona 80% [v:v].





7.2.2.3 Afinidad de sustrato

Para determinar la actividad de peroxidasa de clase III se han utilizado Guayacol, catecol, ácido ferúlico, pirogallol, o-dianisidina, o-fenilendiamina y ABTS, también es bien conocido que las condiciones óptimas catalíticas varían en función de la enzima, de los sustratos así como la concentración del tampón. Normalmente la mayor actividad aparece a concentraciones bajas, <0.05M por lo menos para los sustratos Guayacol, y o-dianisidina utilizados. Las variaciones mencionadas modifican la naturaleza química de los sustratos, por lo que alteran la estructura química que reacciona con el centro activo de la enzima.

La facilidad de la reacción de oxidación y la formación de compuestos coloreados son razones por las que la reacción de las peroxidases sea conocida desde hace muchos años, siguiendo un mecanismo clásico *ping-pong* (Alberty, 1953).

En el caso de las peroxidases de clase III de tomate se observa que cataliza la oxidación de una gran variedad de sustratos con peróxido de hidrógeno

Las diferencias entre el contenido enzimático en la fracción soluble del apoplasto con respecto a las adheridas a la pared celular fue evaluada al extraer las proteínas de tallos completo y rodajas de tallos al colocarlas en contacto con un amortiguador $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 20mM pH 5.7 durante diferentes periodos de tiempo. Este procedimiento sirvió como un método de rápida purificación, ya que partiendo del material biológico completo (C) se obtuvieron muestras que contenían a las isoperoxidasas Px7 y Px3 de manera abundante, evitando la desnaturalización o disminución de la actividad que pueden sufrir con procesos más largos. Esto permitió obtener grandes cantidades de las dos isoformas aniónicas más abundantes en un volumen menor y con mayor actividad específica. Se puede observar que dependiendo del sustrato las enzimas tienen diferentes comportamientos mostrándose más afines al AIB.

La comparación de zimogramas al utilizar diferentes sustratos se realizó para inferir la especificidad de sustrato utilizado y la manera en que se realiza la reacción de oxidación mayoritariamente se muestran afines por ése sustrato, Fig.



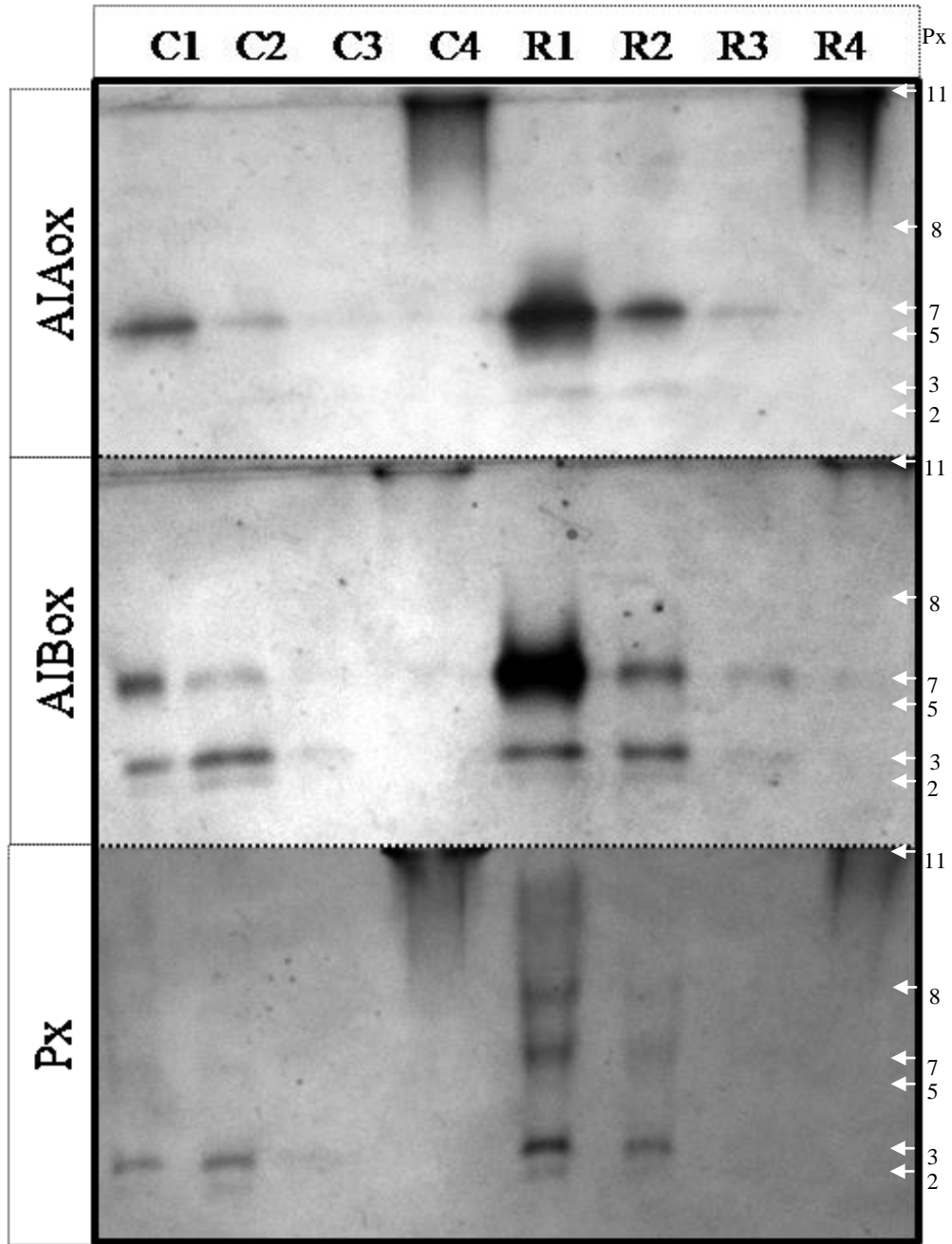


Figura 16. Diferencia en la afinidad hacia las diferentes actividades (peroxidasa y oxidasa) de las isoperoxidasas solubles de apoplasto de tallos completos (C) y rodajas de tallos (R) de brotes axilares de *Solanum lycopersicum* (día diez de enraizamiento) disueltas en $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 20mM pH 5.7, ultrafiltradas con membrana de corte de Peso Molecular (50-30kDa) y precipitada con Acetona al 80%. Tinción para actividad AIAox AIBox y peroxidasa.





7.2.3 Purificación de la Px7

Cuando se purifica una biomolécula, es necesario en primer lugar conocer el grado de pureza de la sustancia purificada. Una de las metodologías más utilizadas es la electroforesis (SDS-PAGE), con la que además de poder determinar el grado de pureza de la muestra, se puede conocer la masa molecular de la misma con un error del 10%. Las peroxidases son enzimas cuyas masas moleculares oscilan entre los 10-55kDa.

Se puede observar que la isoperoxidasa 7 (Suberization associated anionic peroxidase) tiene un elevado grado de pureza, la masa molecular obtenida por densitometría muestra que se encuentra alrededor de los 38kDa. Esta muestra fue obtenida de un extracto de la fracción soluble de tallos completos disuelta en $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 20mM pH 5.7, ultrafiltrada con membrana de corte de Peso Molecular (50-30kDa) y precipitada con Acetona al 80%, concentración final 10 μg .

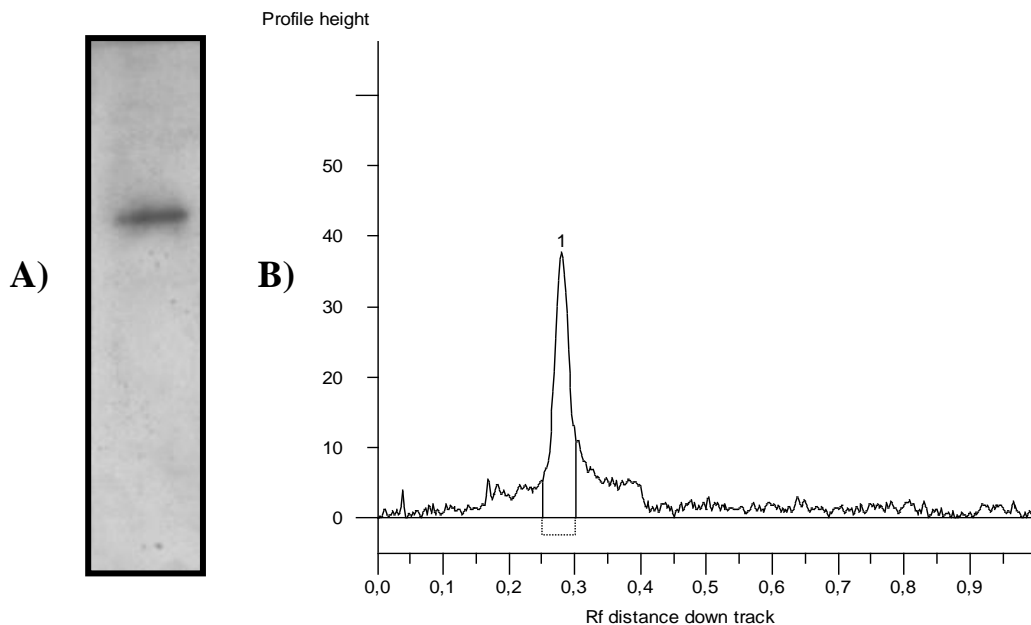


Figura17. A) SDS-PAGE al 12%, Suberization associated anionic peroxidase, B) Densitometría de proteína soluble de apoplasto de tallos completos de brotes axilares de *Lycopersicum esculentum*.

En la Fig. 17 se puede observar que la proteína LePrx76 (Suberization associated anionic peroxidase) o Px7, tiene un elevado grado de pureza. La masa molecular calculada es de $38\pm 1\text{kDa}$, masa típica para las peroxidases de plantas.





El IEF es una técnica con la que se puede determinar el punto isoeléctrico (pI) de una muestra, permite saber si se presentan diferentes isoenzimas, es decir diferentes formas de una misma enzima que suelen catalizar la misma reacción pero presentan diferencias en sus propiedades catalíticas, cinéticas, a veces en sus cadenas polipeptídicas, su carga eléctrica y su localización dentro del tejido vegetal. Este valor indica el pH al cual la proteína tiene una carga eléctrica neta nula. Es un dato importante para la elección de los pH's y amortiguadores en las diferentes etapas de fraccionamiento de una muestra, así como para el análisis cinético y de otros parámetros fisicoquímicos. Este valor fue determinado experimentalmente al realizar una electroforesis de segunda dimensión (2-D) en un gel PAGE-SDS, al mismo tiempo que el peso molecular de cada muestra como se muestra en las figs. 18-19.

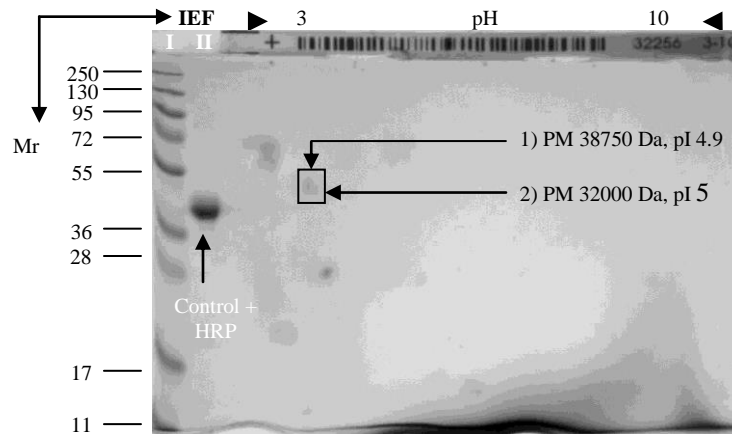


Figura 18. IEF, 2-D, muestra R₁ de Fig. 16, 45 µg en 300 µl. Tinción proteínas totales, Coomassie; Las flechas negras indican las muestras secuenciadas. Carril I: marcador estándar de peso molecular PageRuler™ y carril II: peroxidasa de rábano HRP.

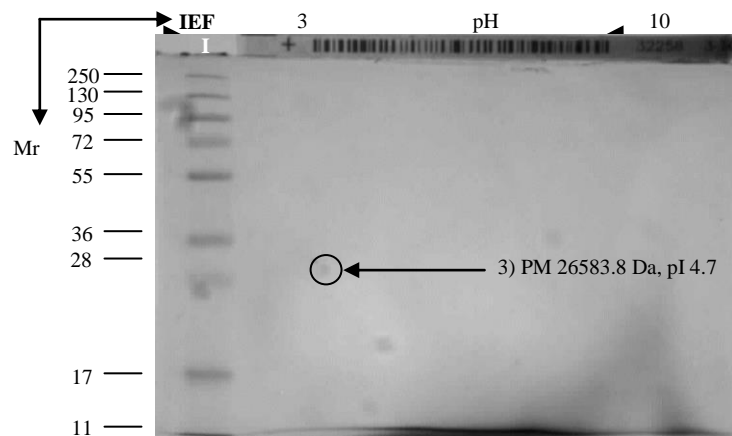


Figura 19. IEF, 2-D, muestra R₂ de Fig.16, 14.4 µg en 300 µl. Tinción proteínas totales, Coomassie; La flecha indica la muestra secuenciada. Carril I: marcador estándar de peso molecular PageRuler™.





El recorte de las bandas de interés sobre geles de poliacrilamida es una buena estrategia, pero la cantidad de proteína recuperada es mínima, Fig. 20.



Figura 20. Proteínas totales, tinción con nitrato de plata. Aisladas por recorte de bandas.

La secuencia de una proteína es importante para conocer la identidad de la misma, pues define su estructura primaria, que es fundamental para entender completamente su estructura y función. La relación entre la secuencia de aminoácidos y el DNA es directa, lo que permite la realización de estudios y análisis de Biología Molecular.

Las muestras enviadas a la Unidad de Proteómica, fueron tomadas de geles PAGE-SDS de electroforesis 2-D, muestra 1, 2 y 3 referidas en las figuras 18 y 19, recortadas de otros geles puesto que sólo fueron manipuladas para su envío y así evitar cualquier tipo de contaminación proteica. Se obtuvieron las secuencias de las muestras 1 y 3 Fig. 18 y 19 respectivamente, a partir del extremo N-terminal, la muestra 1 es correspondiente a la Px7 y la muestra 2 a la Px3, la cual por falta de material fue imposible secuenciar. Los resultados se muestran a continuación.

La Px7 fue parcialmente secuenciada y se pudo saber de qué proteína se trataba utilizando el programa informático BLAST en la base de datos del NCBI, GenBank: CAA33852.1, donde por semejanza en la secuencia de aminoácidos fue determinada, Suberization-associated anionic peroxidase.

Aunque la superfamilia de peroxidasas de plantas, en función de su origen biológico y secuencia primaria se divide en tres clases (I, II, III), todas ellas tienen elementos estructurales y plegamientos similares, tales como el grupo hemo y algunos residuos importantes del centro catalítico (His proximal, y Arg e His distales).



**Muestra-1**, Fig. 5 (N° 1).**1 Acc. #:** [129807](#) **Species:** SOLLC**Name:** RecName: Full=Suberization-associated anionic peroxidase 1

AltName: Full=TMP1

Flags: Precursor

Acc. #: [295815](#) **Species:** SOLANUM LYCOPERSICUM **Name:** peroxidase**Protein MW:** 38750.0**Protein pI:** 4.9**Protein Length:** 364

1 MGFRLSHLSL ALSFVALALA GVAIYRNTYE AIIMKNGSL KNVSPDFDSL ESGVASILT L NNNKKRNSDK YLRQQLTPEA
 81 CVFSAVR**AVV DSAIDAETRM** GASLIRLHFH DCFVDGCDGG ILLDDINGTF TGEQNSPPNA NSARGYEVIA QAKQSVINTC
 161 PNVSVSCADI LAAIARDSVA **KLGGQTYSSVA LGRSDARTAN** FSGAINQLPA PFDNLTVQIQ KFSKDNFTLR **EMVALAGAHT**
 241 **VGFA**RCSTVC TSGNVNPAAQ LQCNCSATLT DSDLQQLDTT PTMFDKVYYD NLNSNQGIMF SDQVLTGDAT TAGFVTDYSN
 321 DVNVFLGDFA AAMIK**MGDLP PSAGAQL**EIR DVCSRVNPTS VASM

Num Unique % Cov Best Disc Score Best Expect Val

4 14.8 2.66 9.6e-4

Secuencia primaria de aminoácidos

Muestra-2, Fig. 5 (N° 2). No identificada (poco material)**Muestra-3**, Fig. 5 (N° 3).**1 Acc. #:** [544010](#) **Species:** SOLLC**Name:** RecName: Full=Acidic 27 kDa endochitinase

Flags: Precursor

Acc. #: [19187](#)**Species:** SOLANUM LYCOPERSICUM**Name:** chitinase**Protein MW:** 26583.8**Protein pI:** 4.7**Protein Length:** 247

1 MVLCCVFLLF LTGSFAQDVG TIVTSDLFNE MLKNRNDDRC PAK**GFYTYDA FAIAANSFPG FGTTGDDTAR** KKEAIAFFGQ
 81 **TSHETTGGSL SADGPFAGGY CFVREGNQMG SGFYGRGPIQ LTGQSNYDLA GQAIGQDLVN NPDLVATDAT VSFK**TAIWF
 161 MTAQGNKPC HDVITGQWTP SAADASANR**Q PGYGVITNII NNGIECGKGQ** NPQVEDRIGF YRRYCTILNV **APGDNLDCYD**
 241 **QRNFAEA**

Num Unique % Cov Best Disc Score Best Expect Val

6 59.5 3.99 1.4e-6





Dentro de la célula vegetal existe una compartimentalización isoenzimática, la cual está relacionada con la funcionalidad de las enzimas. Las isoenzimas aniónicas ($pI < 7,0$) se encuentran normalmente solubles y su funcionalidad está relacionada con las reacciones enzimáticas que en el apoplasto se desarrollan. En cambio, las isoenzimas catiónicas ($pI > 7,0$) se encuentran en la pared celular y están implicadas en el control de su crecimiento y rigidez.

La tinción específica para glicoproteínas fig. 21 (B), revela que la LePrx76 tiene un contenido alto de carbohidratos en su estructura, como la mayoría de las peroxidasas de clase III, observando un elevado nivel de glicosilación. Las cadenas de glicanos unidas a la LePrx76 pudieran contener diferentes azúcares: N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), manosa (Man), fucosa (Fuc) y xilosa (Xyl), reportados en otras peroxidasas, ya que son muy pocas las estructuras de Rayos X en los que se han determinado las cadenas de oligosacáridos debido a su alta densidad, dificultando la cristalización total e impidiendo el conocimiento de su conformación.

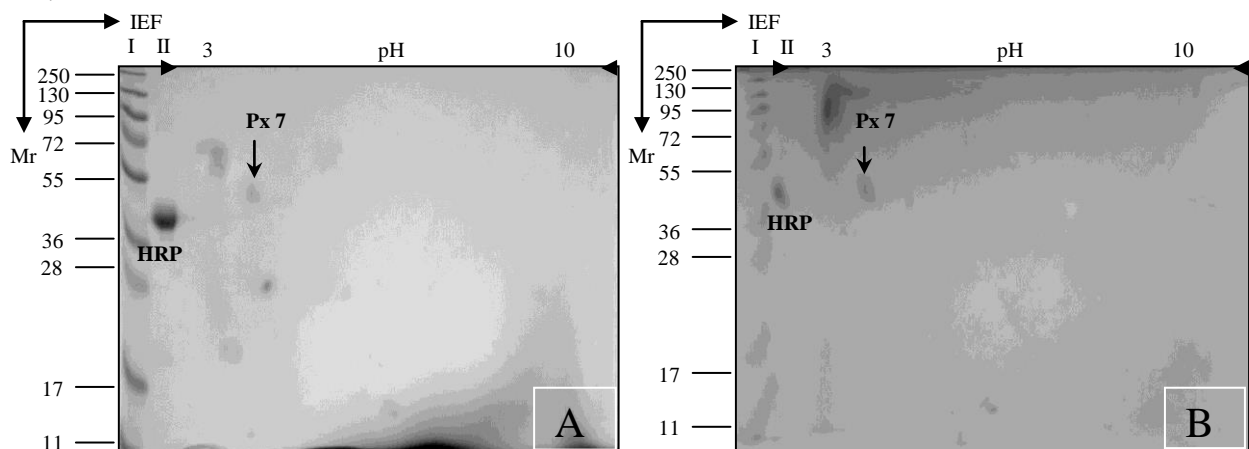


Figura 21. IEF, 2-D, perfil proteico de isoperoxidasas de clase III en tallos completos de *Solanum lycopersicum*. Purificación de la LePrx76 Suberization associated anionic peroxidase (Px7) de la muestra C1 que contenía 45 μ g de proteína. (A) Tinción para proteínas totales, Coomassie; (B) Tinción para glicoproteínas. Las flechas negras indican a la Prx7 que muestran pI 4.9 y PM 38750 Da específicos de las peroxidasas de clase III. Carril I: marcador estándar de peso molecular PageRuler™ y carril II: peroxidasa de rábano HRP.





La glicosilación es una modificación post-transcripcional relacionada con el reconocimiento celular y que está implicada directamente en la estabilidad y plegamiento proteico. Los glicanos hidrofílicos alteran las propiedades estructurales de las proteínas, aumentan su solubilidad en solventes acuosos y las protegen de la proteólisis. A veces, las diferentes configuraciones de los glicanos N-unidos proporcionan funciones específicas: mantenimiento de la producción proteica en el retículo endoplasmático (RE), transporte intracelular y transporte de la proteína madura al espacio extracelular.

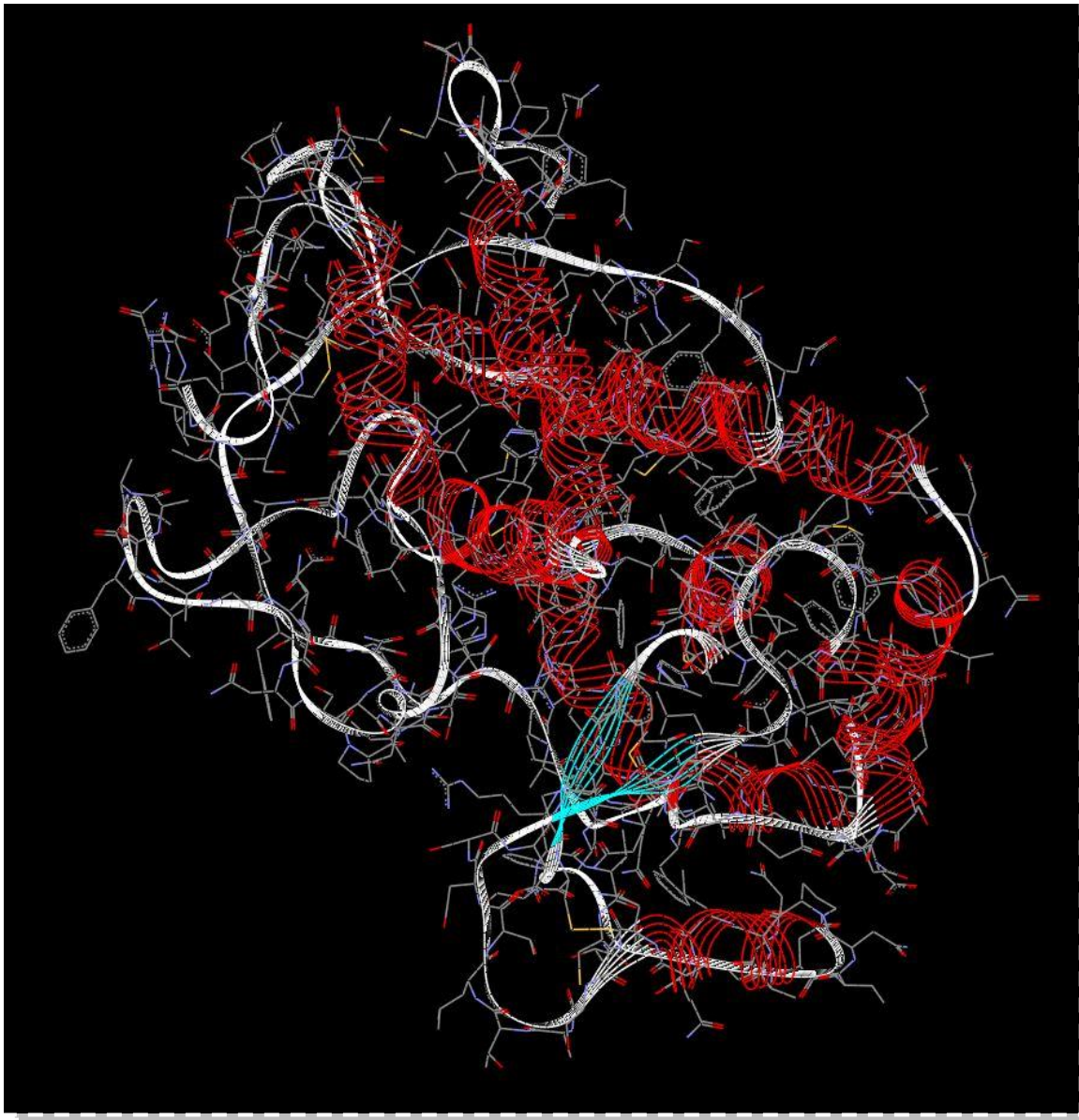


Figura 22. Modelo tridimensional de la LePrx76.





En base a la estructura primaria de la proteína y su estructura secundaria deducida de la secuencia, se elaboró un modelo tridimensional para la proteína LePrx76 utilizando como modelo la estructura cristalográfica de otras peroxidases. El modelo se analizó con el objeto de explicar las propiedades de esta peroxidasa, como ya habían hecho otros autores con otras peroxidases antes de que fueran cristalizadas

El modelo 3D de la proteína se obtuvo usando Geno3D, este servidor busca los mejores templados (proteínas similares que se utilizan como moldes para generar la estructura terciaria) de acuerdo al alineamiento obtenido con el programa ClustalW. Los modelos de la estructura tridimensional que fueron generados se visualizaron utilizando el programa WebLab ViewerLite, fig. 22. Esta deducción se formó a partir de la comparación de las secuencias de aminoácidos, de manera *in silico* ya que la disposición espacial de los aminoácidos no ha sido establecida, puesto que no ha sido cristalizada.

La peroxidasa LePrx76 Suberization associated anionic peroxidase (Px7) es una enzima aniónica y, por tanto, soluble en el apoplasto mayoritariamente. Esto se ha demostrado, además, observando que, en el proceso de purificación, el rendimiento no mejoró realizando una extracción con detergentes (Tritón X-100). La misma peroxidasa, además, se localizó unida a la pared celular.

El servidor ExPASy se utilizó para obtener algunos parámetros fisicoquímicos a partir de la secuencia de aminoácidos de la enzima usando el programa ProtParam.

Composición de aminoácidos:

Ala (A) 42	11.5%	Gly (G) 24	6.6%	Pro (P) 12	3.3%
Arg (R) 15	4.1%	His (H) 4	1.1%	Ser (S) 33	9.1%
Asn (N) 26	7.1%	Ile (I) 17	4.7%	Thr (T) 24	6.6%
Asp (D) 27	7.4%	Leu (L) 33	9.1%	Trp (W) 0	0.0%
Cys (C) 10	2.7%	Lys (K) 11	3.0%	Tyr (Y) 8	2.2%
Gln (Q) 16	4.4%	Met (M) 9	2.5%	Val (V) 28	7.7%
Glu (E) 8	2.2%	Phe (F) 17	4.7%	Pyl (O) 0	0.0%
Sec (U) 0	0.0%				





Número total de residuos cargados negativamente (Asp + Glu): 35

Número total de residuos cargados positivamente (Arg + Lys): 26

Índice de Inestabilidad: Se clasifica a esta proteína como estable.

La búsqueda de las relaciones filogenéticas entre las secuencias de las diferentes peroxidasas de clase III reportadas para *Solanum lycopersicum* en la PeroxiBase se realizó obteniendo en formato FASTA la secuencia de aminoácidos, el servidor GenomeNet se utilizó para relizar la alineación de secuencias múltiples con el programa ClustalW y el procesamiento de los árboles se realizó con el programa Phylogeny analysis del servidor LIRMM (Laboratoire Informatique Robotique Microélectronique Montpellier) MAB (Méthodes et Algorithmes pour la Bio-informatique). Con esto se pudo observar el establecimiento de las relaciones existentes entre este grupo de enzimas, Fig.24.

El árbol filogenético fue reconstruido utilizando el método de máxima verosimilitud aplicado en el programa PhyML (alrt v3.0). El modelo de sustitución de WAG fue seleccionado asumiendo una proporción estimada de sitios invariables (de 0.000) y 4 categorías tasa de gamma-distribuido a cuenta de la tasa de heterogeneidad entre los sitios, fig. 23. Durante el alineamiento múltiple con las secuencias de aminoácidos de las 88 peroxidasas de clase III de tomate, se observó que había un total de 54 aminoácidos de la Px7 que diferían de la Leprx76, pero esta fue la secuencia con mayor similitud de entre las peroxidasas examinadas. Las comparaciones de estructura en la secuencia proteica pueden contribuir a establecer las relaciones evolutivas entre las peroxidasas de tomate. Sin embargo, sus propiedades catalíticas están relacionadas con aspectos específicos de su arreglo.

Representación gráfica y edición de los árboles filogenéticos se realizaron con TreeDyn (v198.3), fig. 24. El agrupamiento obtenido sugiere que la Px7 es la misma que la LePrx76.



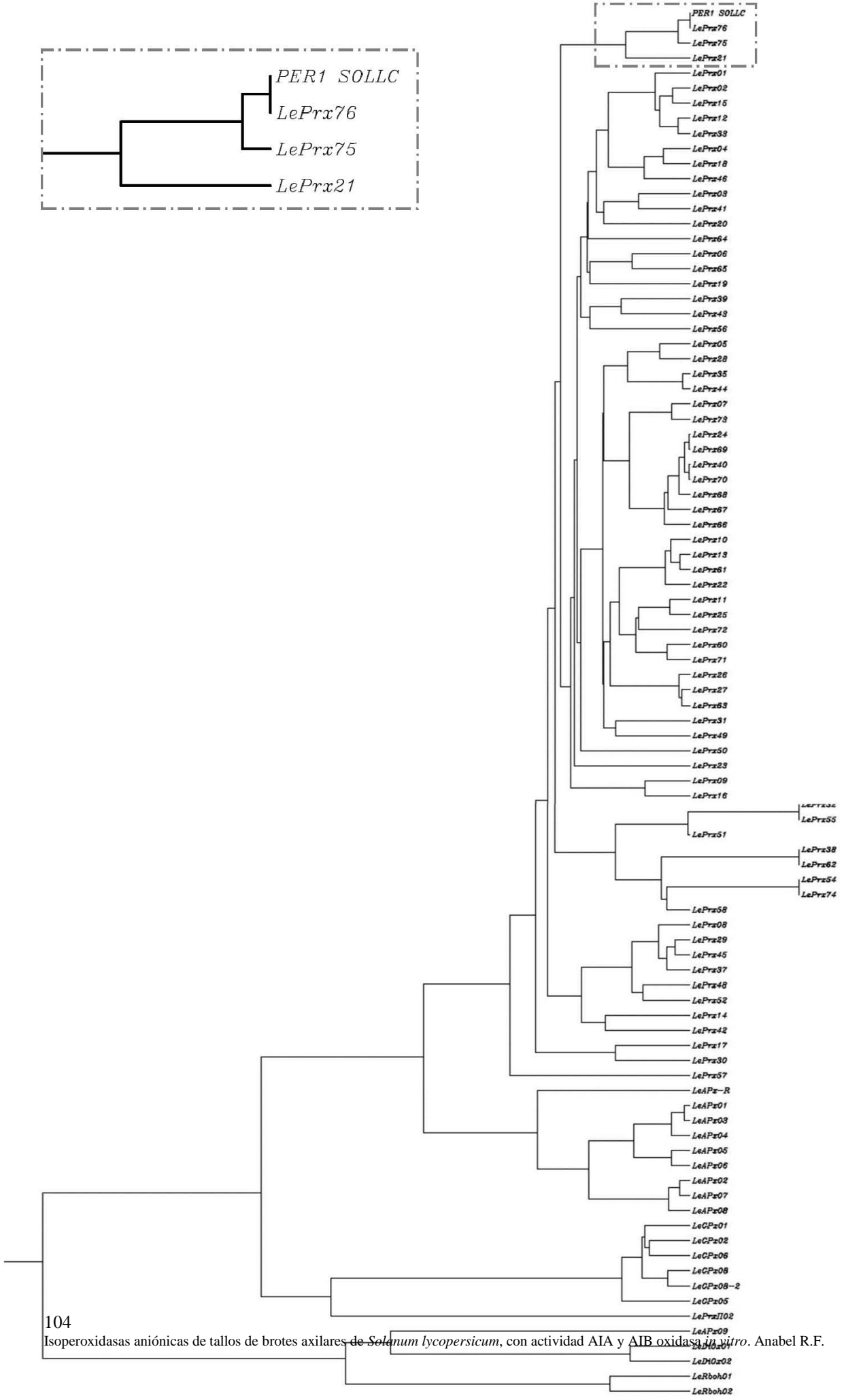


Figura 23. Comparación de las secuencias de aminoácidos de las peroxidasas de clase III de *Solanum lycopersicum*.

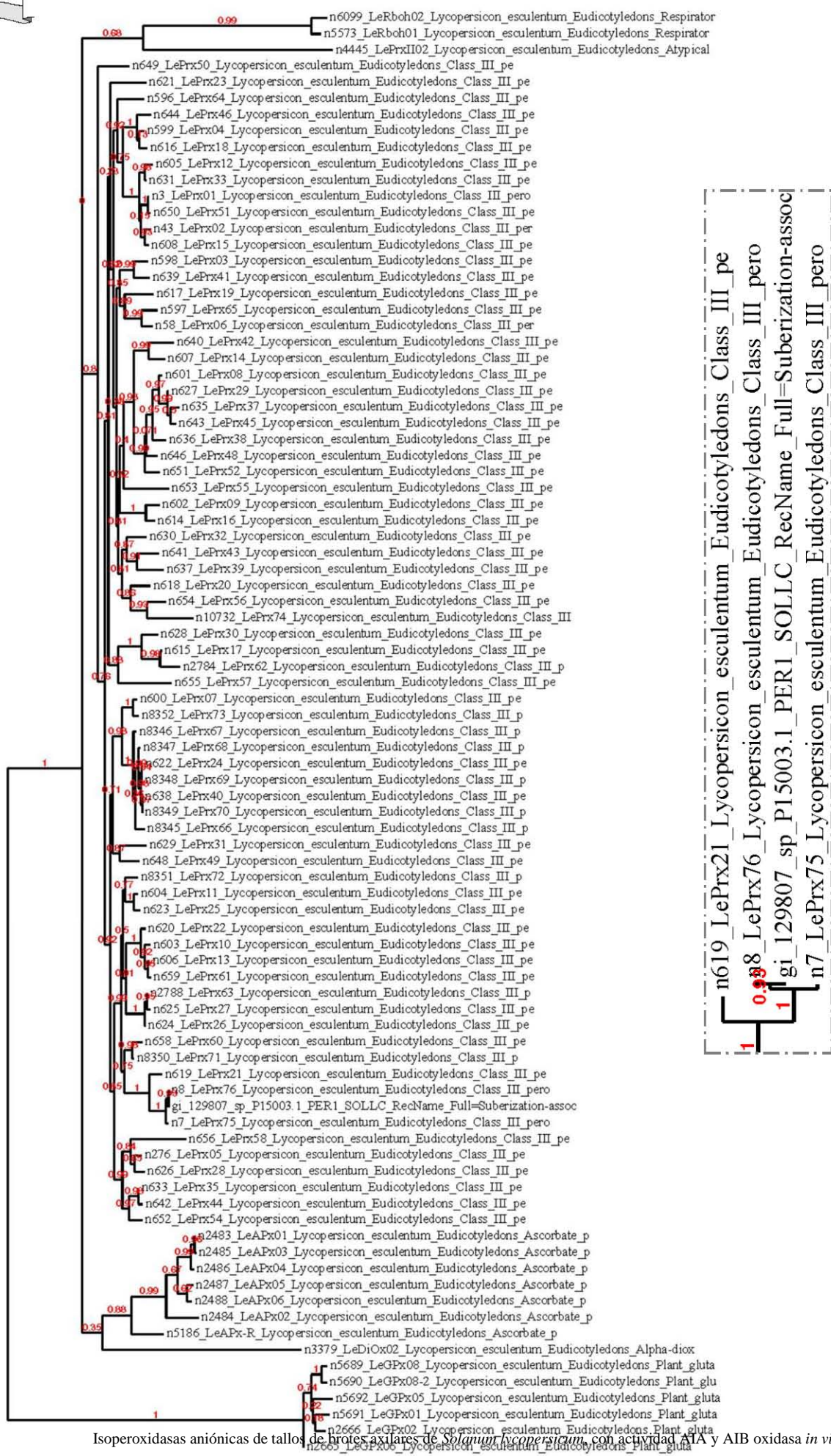


Figura 24. Árbol de las peroxidases de clase III de *Solanum lycopersicum*

Isoperoxidasas aniónicas de tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum*, con actividad AIA y AIB oxidasa *in vitro*. Anabel R.F.





7.3 CATABOLISMO AUXÍNICO

7.3.1 Colorimetría

La técnica Salkowski es un método colorimétrico que valora la actividad AIAox con respecto al consumo de AIA, al evaluar la reacción oxidativa después de diferentes periodos de tiempo de exposición, observando la mayor actividad cuando la concentración de H₂O₂ es muy baja, pudiendo pensar que este compuesto sea necesario para la activación de la enzima, y llegando a ser en altas concentraciones también un inhibidor.

En este ensayo se pudo observar un decremento significativo en la concentración inicial de AIA con respecto a la residual después de haber dejado actuar a la enzima

Muestra \ AIA	[] µg/ml Inicial	[] µg/ml Residual
1mM H ₂ O ₂	10.69	3.566
0.34mM H ₂ O ₂	7.506	3.976
Ausencia de H ₂ O ₂	10.677	1.458

Tabla 2. Actividad AIAox. Salkowski

Las peroxidasas son enzimas bifuncionales, que poseen la capacidad ya sea para catalizar reacciones de oxidación o peroxidación, que *in vitro* depende de la presencia de activadores (difenoles y Mn²⁺). La hipótesis es que las peroxidasas catiónicas y aniónicas difieren en su capacidad para obtener un ciclo oxidativo o hidroxílico, las catiónicas favorecen el ciclo oxidativo acoplado al peroxidativo, mientras que las aniónicas son involucradas preferencialmente en el ciclo hiroxílico.

7.3.2 Oximetría

La oxidación de AIA y AIB, es una reacción catalizada en este caso por peroxidasas de clase III de tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum*, la cual puede conllevar el consumo de oxígeno durante la reacción. La Fig.25 muestra el consumo de oxígeno al utilizar como sustratos el AIA y el AIB en ausencia de H₂O₂, donde se pueden observar diferencias en el comportamiento de las cinéticas, lo cual no es dependiente de la concentración de proteína, pues se mantuvo la misma concentración, siendo el sustrato el





factor que define la velocidad a la que ocurre la reacción, terminando ésta misma cuando el oxígeno en el medio se agota.

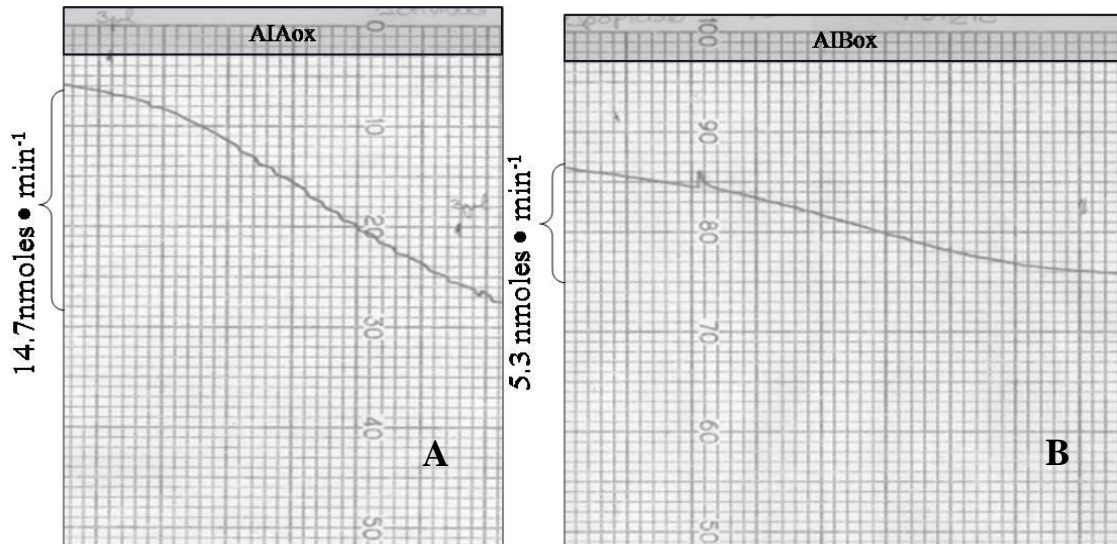


Figura 25. Actividad auxina oxidasa. A) AIAox es mayor que B) AIBox y a su vez es mayor que en las actividades sin H_2O_2 de la Fig.26, determinada por consumo de oxígeno, medio de reacción en ausencia de. H_2O_2 MnCl₂ 0.02mM, DCP 0.075 mM, AIA/AIB 0.60mM, Amortiguador de fosfatos 0.1M pH 5.7 20 μ g de proteína.

Al observar la figura 26 se pueden notar las diferencias en el comportamiento de las cinéticas cuando se cambia la concentración de H_2O_2 en la reacción, manteniendo la misma concentración de la enzima en los tres casos (1mM H_2O_2 , 0.34mM H_2O_2 y sin H_2O_2) tanto por AIA como AIB, Fig.26 A y B respectivamente, en la presencia de 1mM de H_2O_2 se observa el consumo de oxígeno lento y constante, cuando hay 0.34mM H_2O_2 en el medio de reacción la velocidad es superior y el oxígeno disminuye continuamente sin embargo este se agota más rápido, ambas muestran una afinidad por el H_2O_2 aunque al haber una alta concentración del mismo pudiera actuar como inhibidor; por otra parte en el catabolismo del compuesto indólico y el consumo de oxígeno en ausencia de H_2O_2 se pueden observar y distinguir tres fases: (i) el comienzo de la reacción después de un período de latencia; (ii) una disminución de la tasa de consumo de oxígeno después de aproximadamente 50 s; (iii) un aumento progresivo de la velocidad de reacción que crece a medida que las concentraciones de oxígeno disminuye.





A medida que se desarrolla la reacción y la concentración de oxígeno disminuye, pareciera que hay una mayor afinidad por el oxígeno, lo cual podría confirmar la existencia de dos vías diferentes en el mecanismo de oxidación de compuestos auxínicos (AIA-AIB), pudiendo operar las enzimas como oxidasa o peroxidasa.

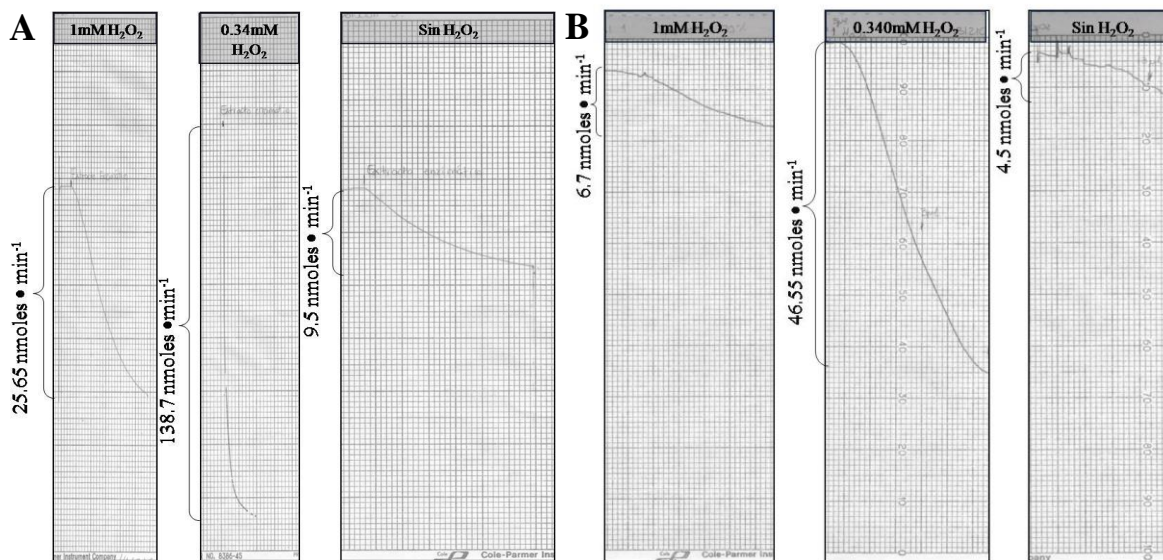


Figura 26. Actividad auxina oxidasa A) AIAox mayor que B) AIBox respectivamente a cada concentración de H₂O₂, consumo de oxígeno en presencia y ausencia de H₂O₂. Ác. *p*-cumárico 1mM, AIA/AIB 1mM Amortiguador de acetatos pH 4.2, 20µg de proteína.

7.3.3 Espectrometría

Durante la oxidación de AIA se puede dar una inactivación de enzimas, dado que las peroxidadas se convierten en un compuesto llamado verdohemoproteína inactiva (*P*-670, ~680nm). Se estima que el aumento en la absorbencia a 670 nm se da una vez que el oxígeno presente en el medio es agotado. Un aumento de la concentración de AIA disminuye la fracción inactiva de la enzima, lo que sugiere que el sistema se mantiene en una vía específica en la que Co-I y Co-II (características de la ruta inactivación) no participaría, Fig. 177.

El espectro de absorción en el UV-Visible de las peroxidadas de tomate presenta las bandas características de las peroxidadas de clase III, una banda a 403nm, en la zona visible aparece un umbral a 560nm y otro a 680nm, mismo efecto que aparece en peroxidadas de soja, de tabaco y palma real, entre otras de peroxidadas de clase III. Los picos en la zona





visible son indicativas del estado de oxidación y coordinación del hierro hémico en el centro activo, dado que el metal tiene un estado de oxidación III y esta pentacoordinado.

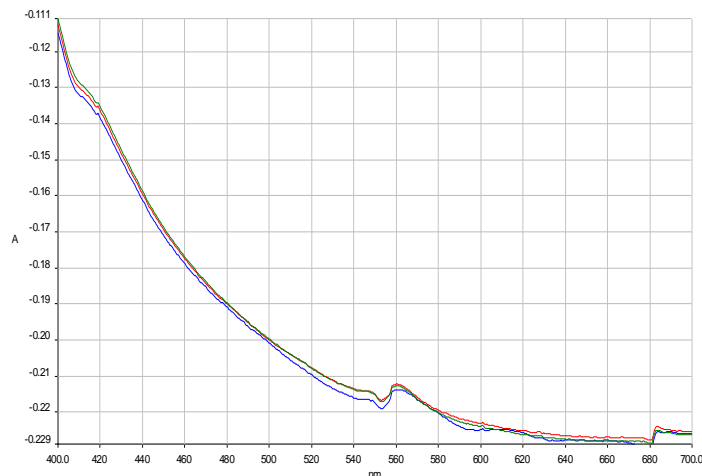


Figura 27. Formación de compuestos y verdohemoproteína.

En la Fig. 27 se puede observar la formación de compuestos de las peroxidasas de tomate con el tiempo, la línea azul representa el $t^0 =$ cero min, la roja $t^1 = 30$ min y la verde $t^2 = 60$ minutos, el barrido de absorbencias presenta su espectro máximo de absorción a 403 nm (banda Soret) e indica la evolución de la reacción catalítica, en la que las peroxidasas pasan por diferentes formas enzimáticas: CoI y CoII, apareciendo la forma CoIII cuando se somete a un exceso de peróxido, 413, 549 y 576 nm respectivamente, así como la verdohemoproteína inactiva P~670.

El CoIII de una peroxidasa se consigue sometiendo a la enzima a grandes excesos de peróxido de hidrógeno. Su formación puede ocurrir a través de dos mecanismos, los cuales operan simultáneamente. En el CoII, el hierro hémico se encuentra unido a un átomo de oxígeno, sin embargo en el CoIII se encuentra unido a una molécula de oxígeno. El primer mecanismo consiste en hacer un intercambio disociativo del oxígeno del grupo ferrilo por agua y, posteriormente, el hierro hémico vuelve a reaccionar con el peróxido de hidrógeno para formar el CoIII. Se forma un híbrido de resonancia, donde predomina la forma Fe (III)-superóxido. En el otro mecanismo, se forma un complejo enzimático intermedio que contiene agua y el superóxido formado, el cual se reestructura eliminando la molécula de agua y generando el Co III.



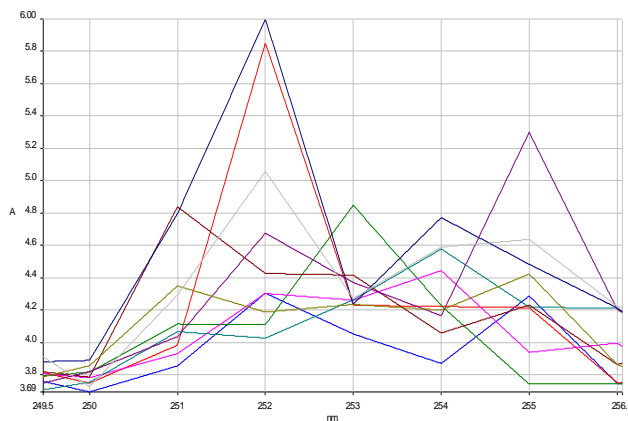


Figura 28. Pico máximo de absorción del grupo indólico

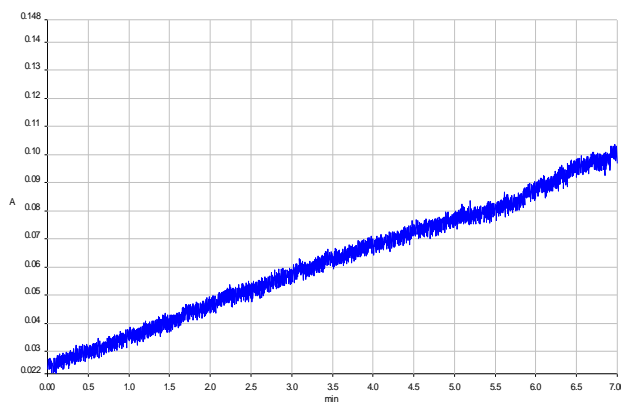


Figura 29. Espectrofotometría a 251 nm. Actividad auxina oxidasa, formación de oxindoles.

Las peroxididasas son enzimas que, presentan un espectro de absorción característico, debido al grupo hemo suele tener una absorbencia tres veces superior a la banda proteica característica de los aminoácidos aromáticos (280nm).

Una prueba para demostrar que la enzima funciona en una vía oxidasa es la cantidad de AIA o AIB oxidado al final de la reacción con respecto a la concentración inicial de los mismos, donde la cantidad de productos en este caso oxindólicos (251nm) después de un período de tiempo muestran un incremento, tal como lo muestra la Fig. 187. Los productos de oxidación también pueden ser determinados siguiendo la descarboxilación de los compuestos auxínicos. Las consideraciones cinéticas y aspectos espectrofotométricos junto con los ensayos oximétricos y cromatográficos permiten hacer estas conclusiones acerca del mecanismo del proceso de degradación auxínica.





El análisis proteómico de la compartimentación celular se realizó para conocer la procedencia de las diferentes isoperoxidasas. El aislamiento y purificación de las peroxidadas de clase III ha tenido ciertas dificultades y han planteado distintas hipótesis respecto a su ubicación, pueden mantener algún tipo de interacción con los polisacáridos de la pared celular tales como la celulosa, hemicelulosa o pectinas, pueden ser parte de las proteínas intracelulares o encontrarse solubles en el apoplasto. Para demostrar que estas proteínas no se encuentran en el contenido citoplasmático se verificó la ausencia de contaminación con proteínas intracelulares.

Se determinó la actividad G6PDH (enzima citoplasmática) en extractos de tallos macerados y la actividad resultó de 76 U/mg contrariamente a la actividad nula que presenta el extracto tratado con amortiguador y enzimas digestivas de pared celular, Fig. 30, la cual comprueba que las peroxidadas extraídas para este trabajo son secretadas y enviadas a otros sitios por señalización celular.

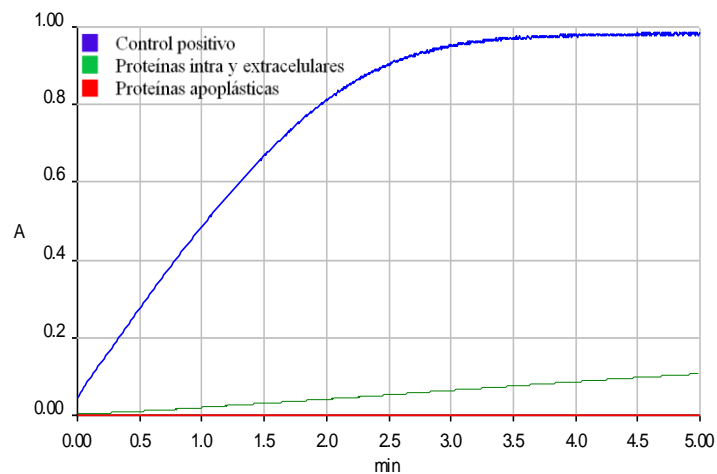


Figura 30., Ausencia de actividad Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa (G6PDH) en muestras de peroxidadas de Clase III, confirmación de la ubicación apoplástica.

El ensayo se realizó también para muestras extraídas por gradiente de pH de 3.5>8.5 del apoplasto de brotes de tallos axilares, lo cual sugiere que la alta o baja concentración de protones en el medio no causa daño o ruptura celular, puesto que la actividad G6PDH es nula en todas las muestras. Estos resultados fortalecen la idea de que las isoperoxidasas utilizadas en los diferentes experimentos realizados en este trabajo se encuentran ubicados en el apoplasto de la célula, pues se encuentran libres de contaminación citoplasmática.



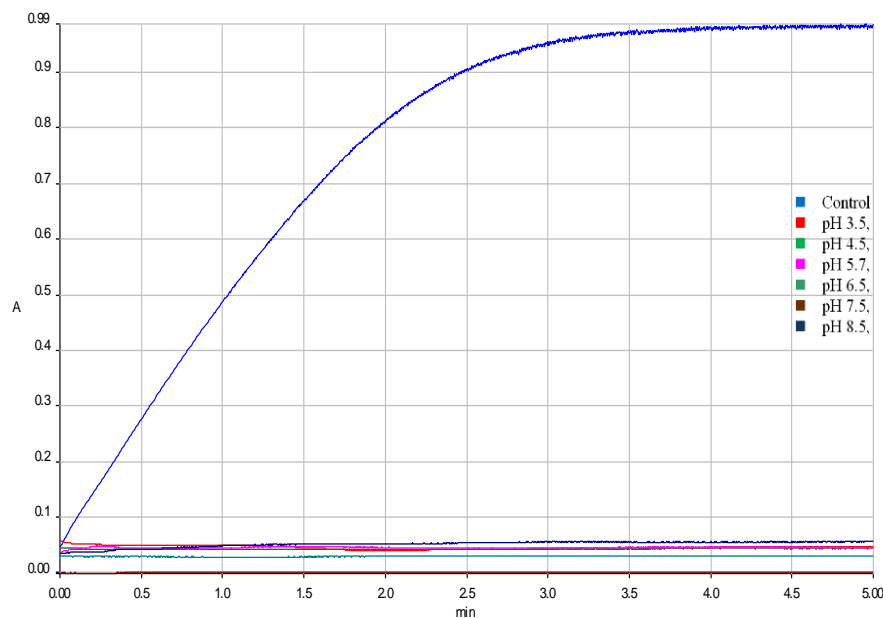


Figura 31., Ensayo de actividad Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa (G6PDH) en muestras extraídas por gradiente de pH 3.5>8.5 del apoplasto de brotes de tallos axilares.

6.4.3.2.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El análisis en HPLC de la muestra con isoenzima purificada Px7 (Leprx76) y la Px3 4:1 [μg] de día 10 de enraizamiento de tallos de brotes de tomate incubando la reacción durante $t_0 = \text{cero min}$, $t_1 = 1.5 \text{ min}$, $t_2 = 3 \text{ min}$ y $t_3 = 30 \text{ min}$ revelaron dos picos que contienen al grupo indólico que tiene un pico máximo de absorción a 280nm, AIA 5.52 min, AIB 12.57 min y los compuestos oxindólicos 3.15 min (251nm). La detección de compuestos indólicos para el ácido indol-3-acético y el ácido-indol-3-butírico muestran diferentes tiempos de retención: AIA 5.52 min, AIB 12.57 min. (Fig. 32 A y Fig. B respectivamente), donde se muestra la transformación de los compuestos auxínicos casi por completo después de 30 min de iniciada la reacción.

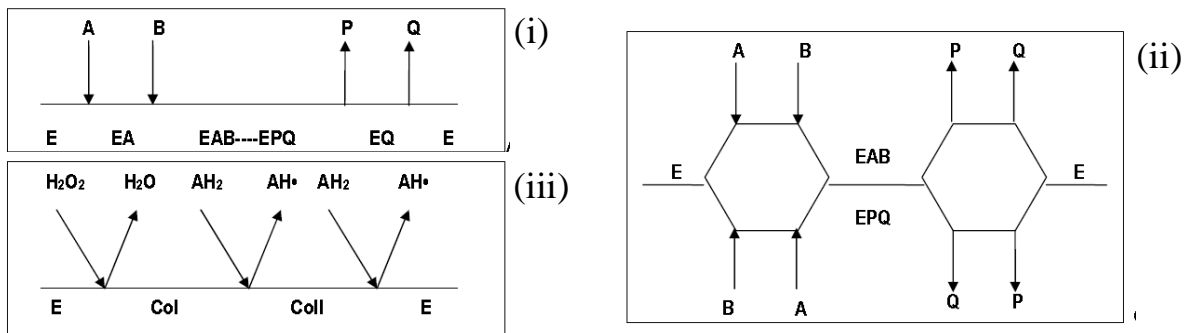
Se ha observado que las peroxidases catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos con peróxido de hidrógeno, de acuerdo con esto y observando el cromatograma se podría deducir el mecanismo enzimático bi-sustrato, en el que es evidente la actividad auxina oxidasa, ya que a medida que el AIA y AIB disminuyen en concentración, el pico de los compuestos oxindólicos aumentan por una reacción de oxidación en el anillo indólico.





Esto puede ocurrir mediante dos mecanismos generales de interacción sustrato-enzima: el mecanismo secuencial o el mecanismo *ping-pong* (Alberty, 1953).

En el mecanismo secuencial, ambos sustratos se combinan con la enzima para formar un compuesto ternario, antes de que ocurra la reacción catalítica. Los sustratos se pueden combinar de forma ordenada (i) o al azar (ii) para formar dicho compuesto. Del mismo modo, los productos formados pueden generarse de forma ordenada o al azar. En el mecanismo *ping-pong* (iii), no hay formación de ningún compuesto ternario, el primer sustrato se combina con la enzima para dar lugar a una forma enzimática modificada, generando el primer producto. La enzima modificada interacciona con el segundo sustrato para formar el segundo producto y generar otra forma enzimática distinta de las anteriores, que en una tercera reacción regenerara la enzima en estado nativo (Alberty, 1953; Cleland, 1970).



Tal vez el proceso que menos se entiende es AIA oxidación, que es la forma predominante de catabolismo de terminal en la mayoría de las plantas (Normanly, 2010).

La inactivación de AIA se produce a través de la oxidación irreversible a Ácido oxindol-3-acético, el primer precursor de la vía responsable para el catabolismo de la auxina AIA (Woodward y Bartel, 2005). La rápida acumulación de AIAox después del tratamiento con AIA sugiere que la enzima auxina oxidasa juega un papel importante en la regulación de AIA bioactivo, la modificación de estos derivados por conjugación de AIA con aspartato (Asp) o glutamato (Glu) conduce a la degradación (Ostin *et al.*, 1998), mientras que la conjugación con alanina (Ala), leucina (Leu), mio-inositol, o péptidos crea formas de almacenamiento temporal que pueden ser hidrolizados para liberar AIA cuando sea necesario (Park *et al.*, 2006). Sin embargo, los mecanismos celulares que controlan la degradación oxidativa de la auxina siguen siendo, hasta la fecha, mal entendido.



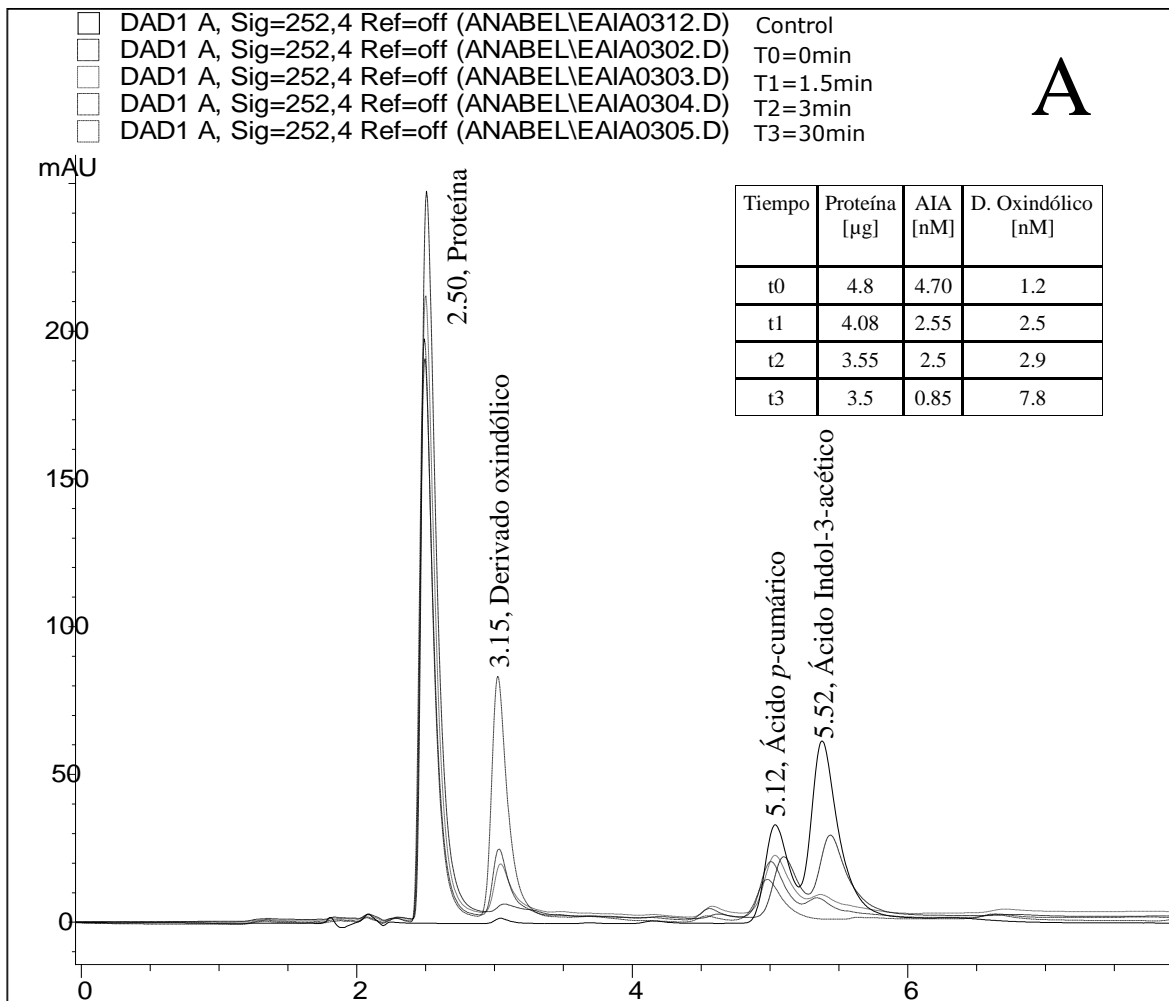


Figura 32. Cromatograma HPLC. A. Reacción oxidasa de ácido indol-3-acético con isoenzima purificada LePrx76 y Px3 4:1 [µg] de día 10 de enraizamiento. Tiempos de retención: Isoperoxidasa 2.50, Derivados oxindólicos 3.15 min, Ác. *p*-cumárico 5.12 min, AIA 5.52 min. Medio de reacción sustrato (AIA-AIB) 0.5mM , ácido *p*-cumárico 0.5mM , H2O2 0.034mM . Columna Allsphere ODS-15u eluída con 1% agua-ácido acético/metanol 60:40 [v:v].



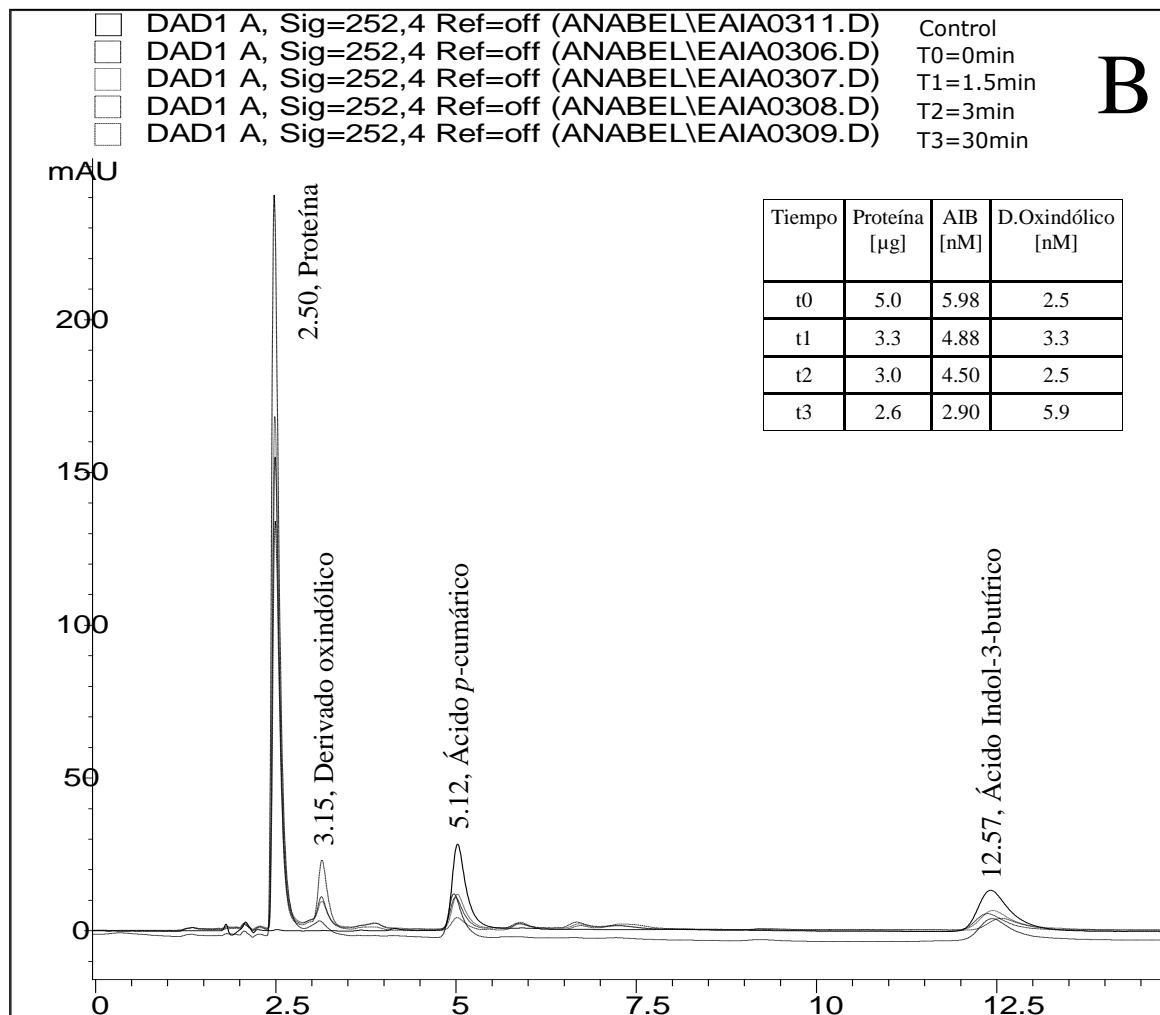


Figura 33. Cromatograma HPLC. B. Reacción oxidasa de ácido indol-3-butírico con isoenzima purificada LePrx76 y Px3 4:1 [μg] de día 10 de enraizamiento. Tiempos de retención: Isoperoxidasa 2.50, Derivados oxindólicos 3.15 min, Ác. *p*-cumárico 5.12 min, AIB 12.57 min. Medio de reacción sustrato (AIA-AIB) 0.5mM , ácido *p*-cumárico 0.5mM , H₂O₂ 0.034mM . Columna Allsphere ODS-15u eluida con 1% agua-ácido acético/metanol 60:40 [v:v].





7.4 ANÁLISIS FISIOLÓGICO DE LAS PEROXIDASAS DE CLASE III EN EL PROCESO DE ENRAIZAMIENTO ADVENTICIO

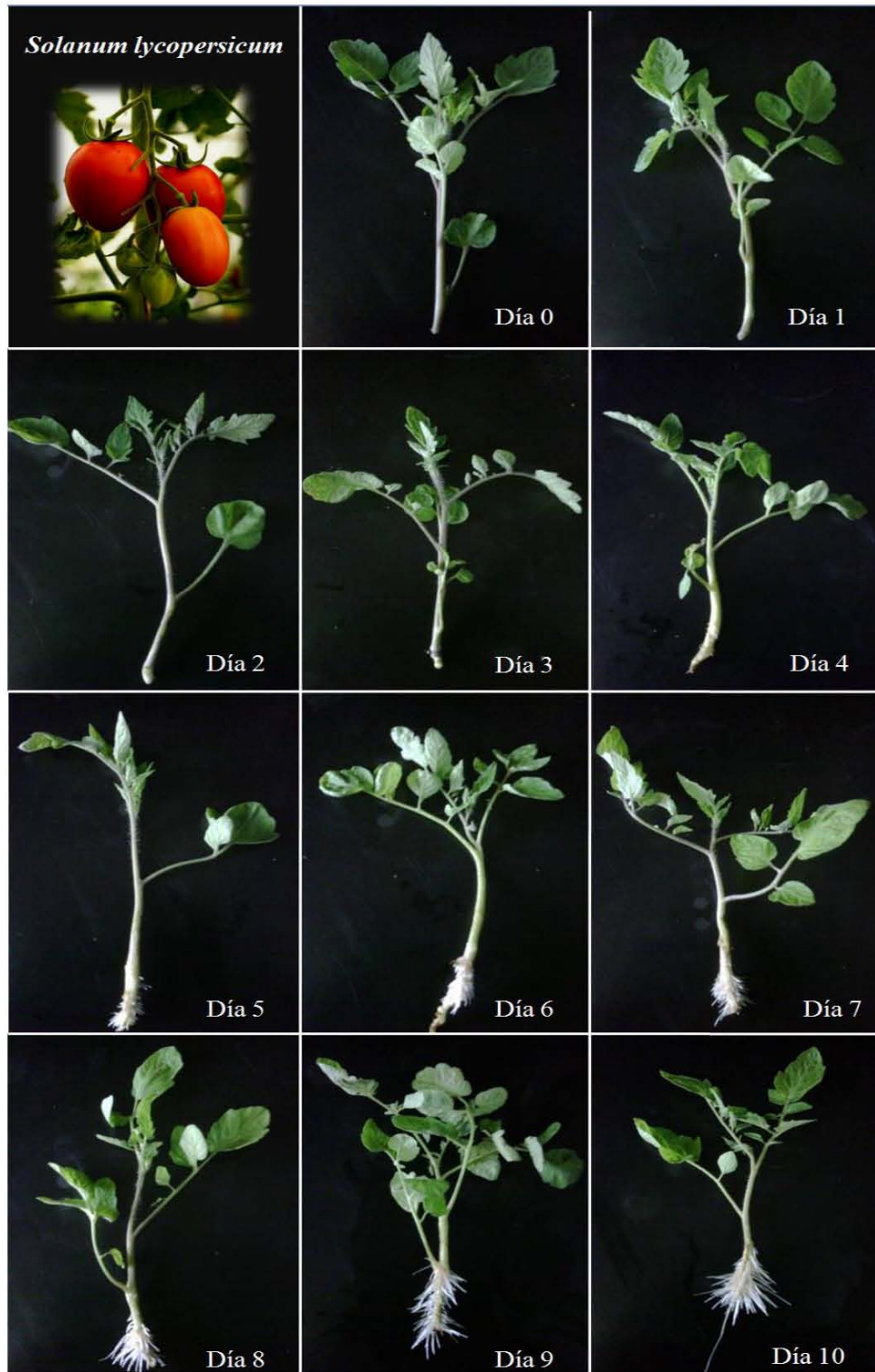


Figura 34. Formación de raíces adventicias (0-10 días) en brotes de tallos axilares de *Solanum lycopersicum* tratadas con $5 \times 10^{-5} M$ de AIB.



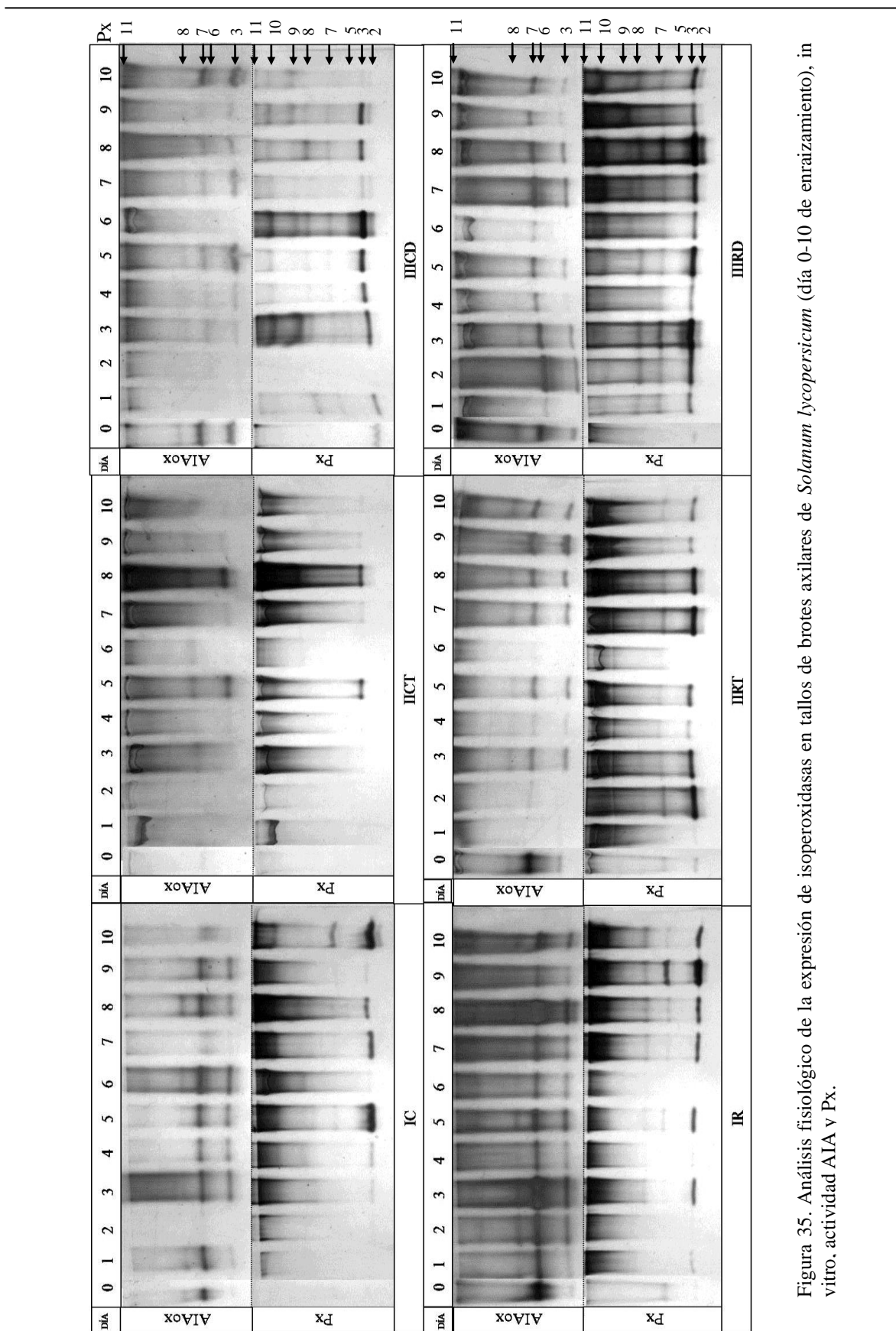


Figura 35. Análisis fisiológico de la expresión de isoperoxidasas en tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum* (día 0-10 de enraizamiento), in vitro, actividad AIA v Px.

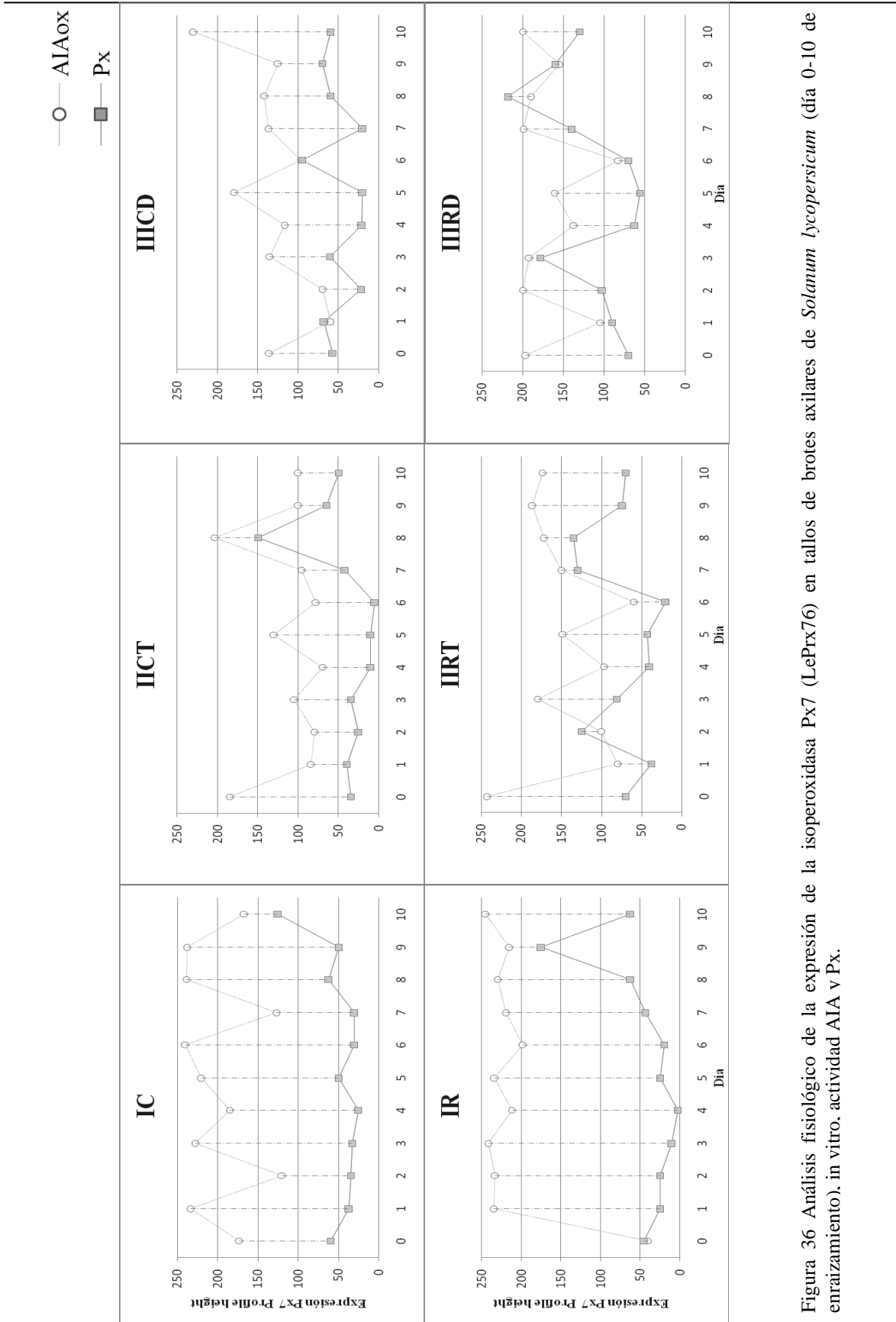


Figura 36 Análisis fisiológico de la expresión de la isoperoxidasa Px7 (LePrx76) en tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum* (día 0-10 de enraizamiento), in vitro. actividad AIA v Px.



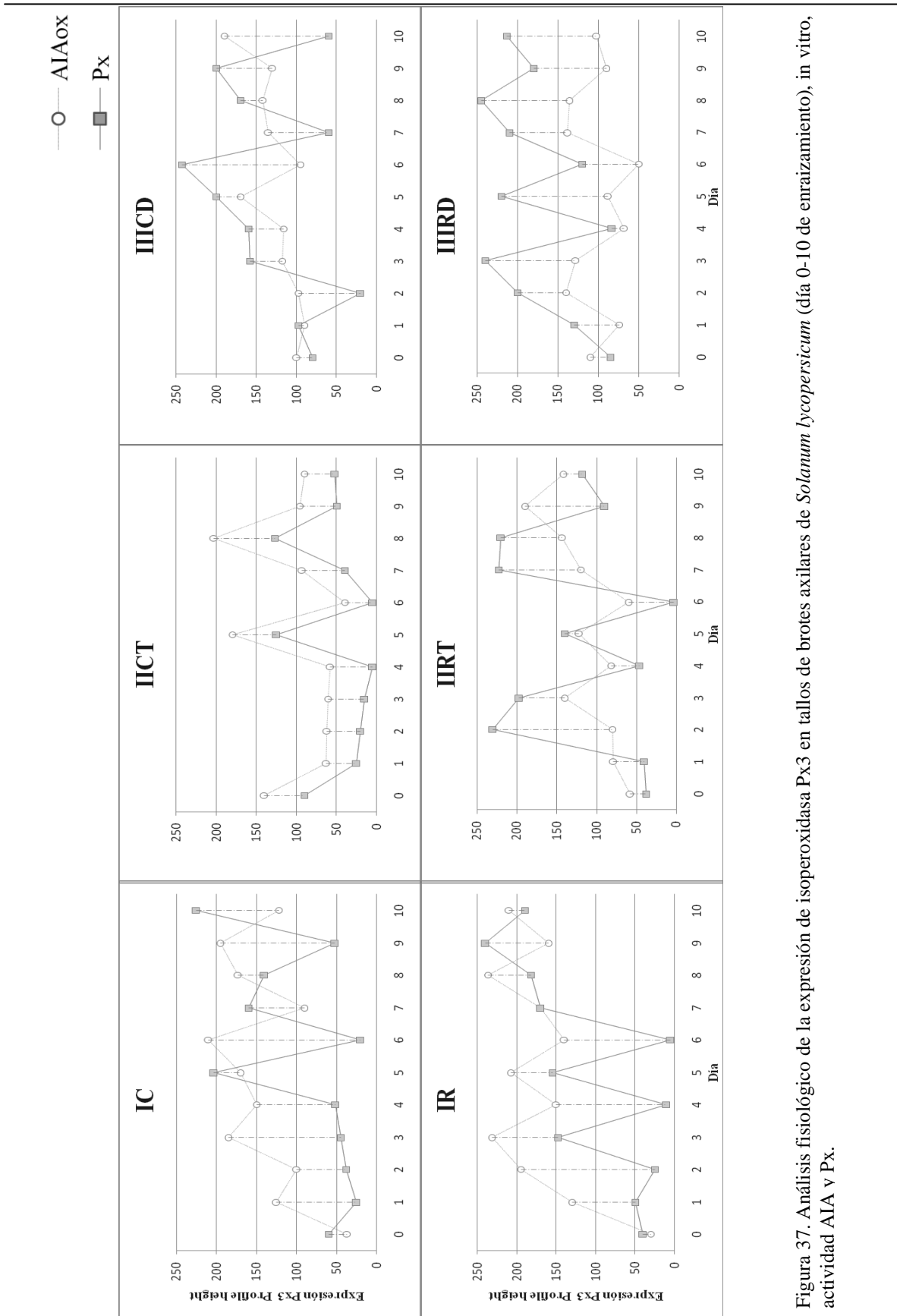


Figura 37. Análisis fisiológico de la expresión de isoperoxidasa Px3 en tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum* (día 0-10 de enraizamiento), in vitro, actividad AIA v Px.

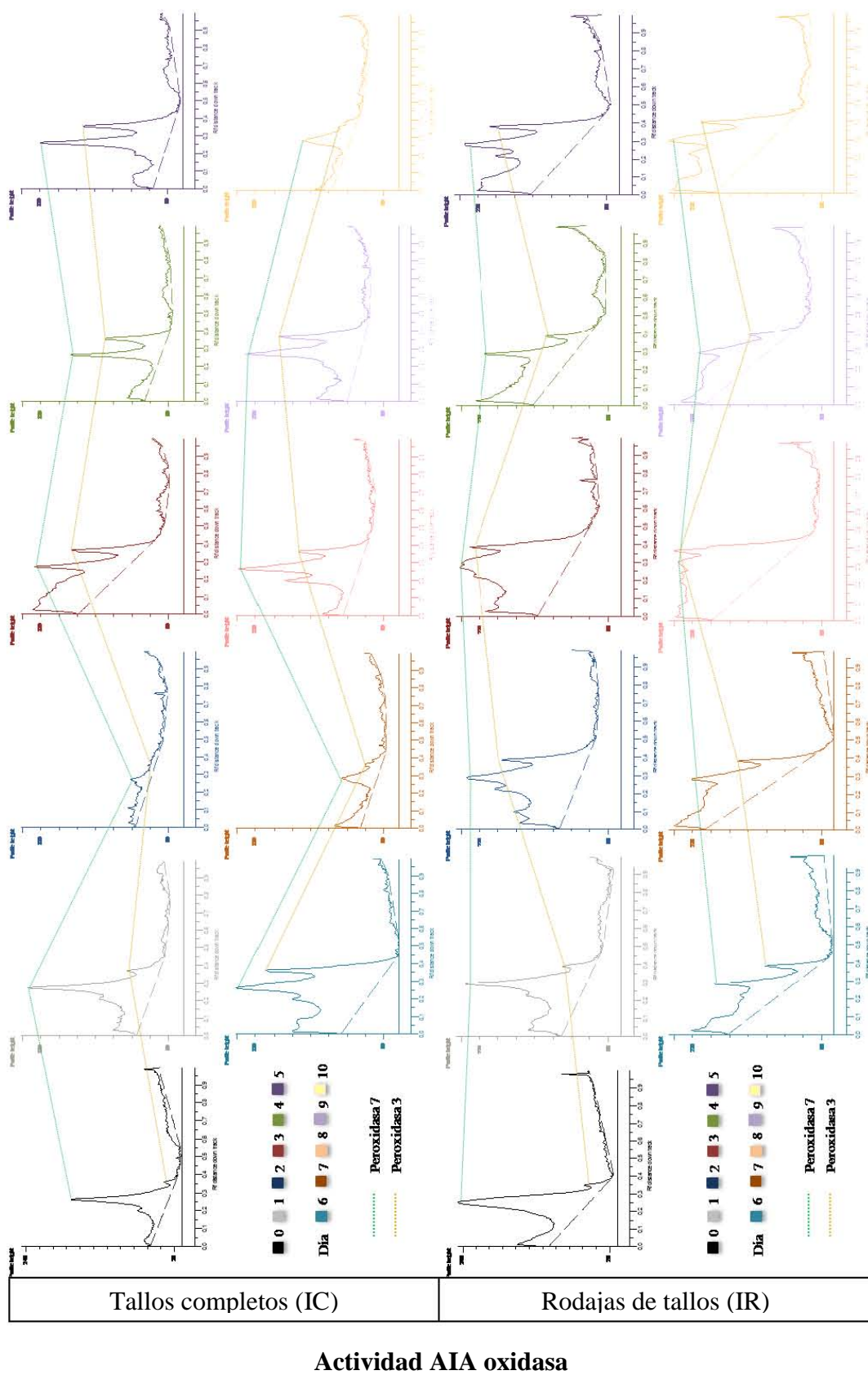


Figura 38. Análisis fisiológico de la expresión de isoperoxidasas en tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum* (día 0-10 de enraizamiento), in vitro, actividad AIA.

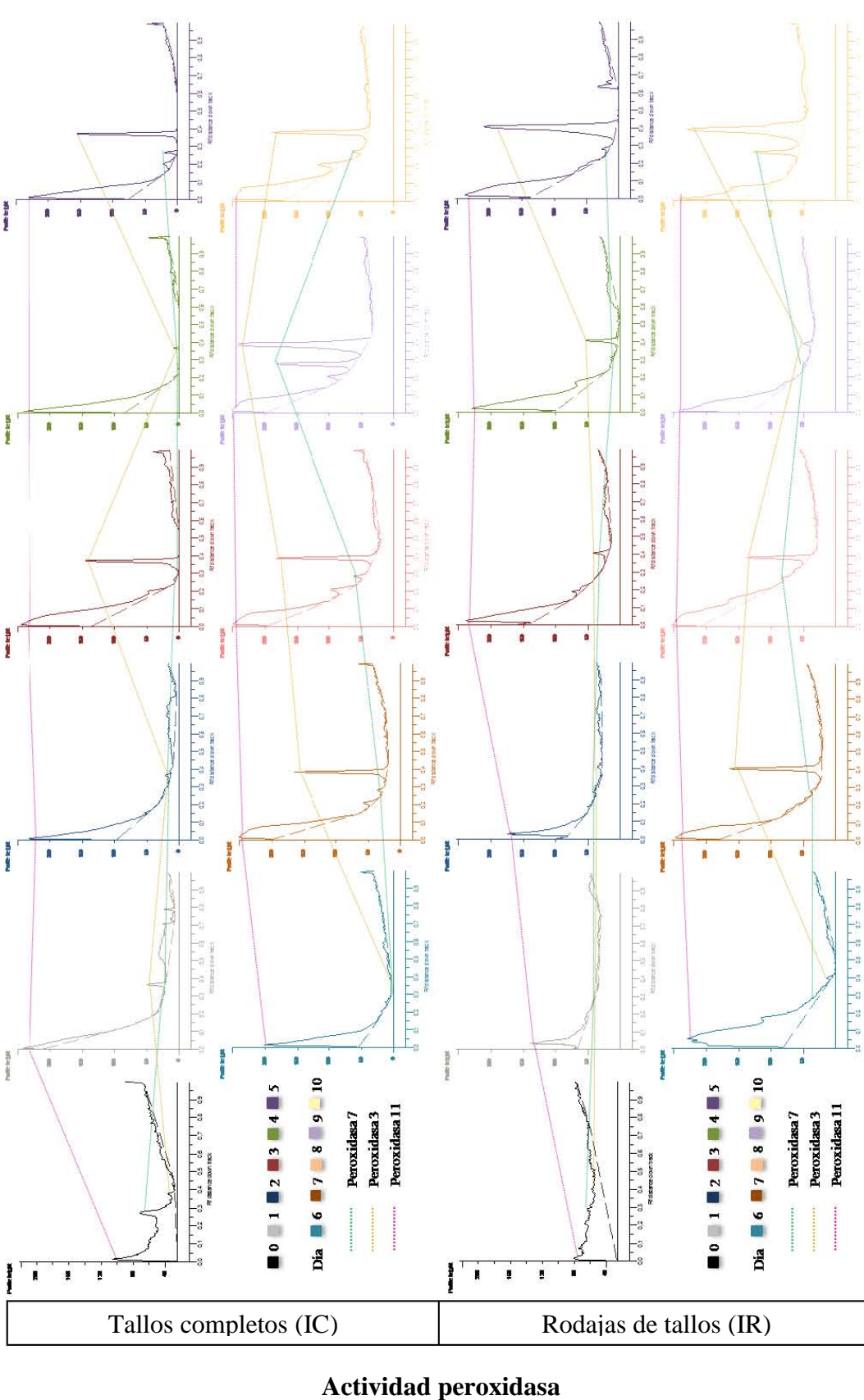


Figura 39. Análisis fisiológico de la expresión de isoperoxidasas en tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum* (día 0-10 de enraizamiento), in vitro, actividad AIA v Px.



Al utilizar Guayacol como sustrato, los valores de las cinéticas en los diferentes días del proceso de enraizamiento mostraron la actividad máxima en la fracción soluble de tallos completos (día 8), Fig. 41, día en el que se muestra la mayor actividad AIAox, Fig. 36 (IC), la cual es producida por un total de 4 isoformas (Px3, Px7, Px8 y Px11) Fig. 35, por lo que hay un elevado contenido proteico de 7mg/ml Fig. 40, siendo la Px7 (LePrx76) la isoforma aniónica más expresada y activa (actividad Px y AIAox), no sólo en éste día, sino a lo largo de los 10 días de enraizamiento, su ubicación esta dada en una distribución extracelular de 40.92% en la fracción soluble del apoplasto, 34.76% con interacción tipo anclaje a la pared celular y 24.31% unido más fuertemente a la pared celular (enlace iónico de alta fuerza o covalente), la actividad como AIAox se da preferencialmente en la fracción soluble y la actividad peroxidasa en la fracción que se propuso como anclada a la pared celular. La isoperoxidasa Px3 es la segunda de mayor importancia dentro de las isoformas aniónicas puesto que en el mismo día tiene su mayor expresión Fig.37, su distribución celular la ubica un 33.39% soluble en el apoplasto, 39.18% anclada en la pared celular y 27.41% con una interacción más fuerte a la pared celular, la actividad AIAox mayoritariamente se da en la fracción de anclaje a la pared celular y la actividad peroxidasa en la muestra unida fuertemente a la pared celular. Por todo lo anterior se podría conjeturar que es la LePrx76 es la de mayor importancia para mantener en equilibrio el contenido auxínico libre en la planta de tomate.

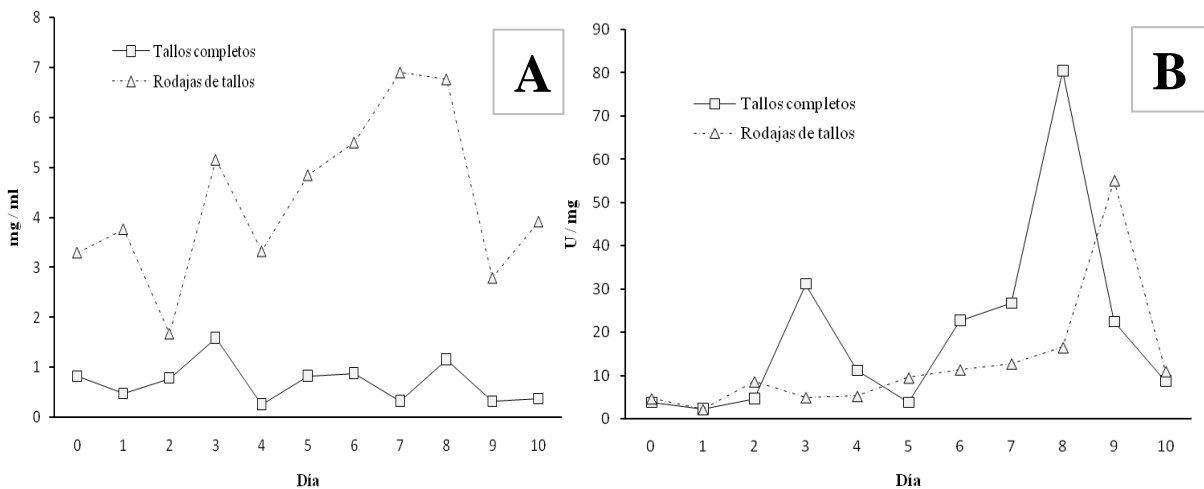


Figura 40. A. Contenido proteico a lo largo del proceso de enraizamiento adventicio (día 0-10), B. Cinética, utilizando Guayacol como sustrato en los diferentes días (0-10) del proceso de enraizamiento adventicio en tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum*. Muestras concentradas 5:1 [v:v] por precipitación con acetona 80% [v:v].





8. DISCUSIÓN







Las auxinas son un conjunto crítico de fitohormonas, el cual es confuso respecto a la regulación en su abundancia y transporte, dado que las plantas cuentan con un sistema intrincado respecto a la utilización de auxina, hormona que logra una amplia variedad de los propósitos en el desarrollo vegetal. Aceptando en general que las auxinas juegan un papel central en el proceso de formación de raíces, ya que inducen e influyen en su crecimiento. (Nordström *et al.*, 1991)

La técnica de cultivo *in vitro* de *Solanum lycopersicum*, logró una rápida producción de plantas genéticamente idénticas. Se estableció que, la concentración 5×10^{-5} M de AIB para la generación de raíces adventicias a partir de brotes axilares estimuló la producción y desarrollo de las mismas, mostrando que en el día diez de enraizamiento el esqueje contaba con las características necesarias para poder establecerse sobre un sustrato. Muchas investigaciones han demostrado que el AIB tiene una mayor capacidad para promover la formación de raíces adventicias en comparación con AIA (Ludwig-Müller, 2000). Además de que el AIB es más estable y menos sensible a la degradación por enzimas que lo hace una mejor fuente de auxina libre.

Los niveles y la distribución de la auxina ácido indol-3-acético activo (AIA) son estrechamente controlados a través de la síntesis, el almacenamiento, la inactivación, y el transporte (Korasik *et al.*, 2013). Sólo una pequeña fracción de auxina existe libre y se compone de una mezcla de auxina libre, auxinas conjugadas, el precursor inactivo de auxina AIB, y la forma inactiva éster metil de AIA, MeAIA. Cohen y Bandurski (1982) postularon que el almacenamiento de las formas de auxina existe para regular la homeostasis auxínica en el crecimiento y desarrollo: para influir en la sensibilidad auxínica, transporte y compartimentación.

Algunas formas de almacenamiento parecen comprender una vía de inactivación del AIA que no se puede convertir de nuevo al activo AIA. Esta es una forma de proteger a la planta contra la toxicidad de la auxina en la presencia de un exceso de auxinas. La desintoxicación de AIA se lleva a cabo a través de una ruta catabólica para la modificación irreversible de la AIA. (Korasick *et al.*, 2013)





Conjugación (Ludwig-Muller 2011, Woodward y Bartel, 2005) y la oxidación (Normanly 2010) se presentan como vías de inactivación. Tal vez el proceso es menos comprendido AIA oxidación como se sugiere por Peer *et al.* (2013)

La inactivación de AIA se produce a través de la oxidación irreversible, mediante la reacción AIAox. La rápida acumulación de AIAox en los días de enraizamiento adventicio sugiere que las peroxidasas de clase III, específicamente la LePrx76 juega un papel importante en la regulación de los niveles de auxina bioactivos. La modificación del AIA y AIB a compuestos oxindólicos o compuestos indólicos descarboxilados podrían ser los que mantienen un equilibrio auxínico, aunque un aspecto importante para la comprensión del metabolismo de las auxinas también es saber cómo recicla la planta estas moléculas.

Dado lo anterior, las moléculas de señalización deben incrementar sus niveles y volver a su concentración original pues el enraizamiento adventicio es un proceso de desarrollo en los que se necesitan auxinas. Los niveles endógenos de hormonas responsables de la formación de raíces adventicias (AIA y el AIB), varían según el nivel de actividad oxidasa auxina.

El estudio de la degradación auxínica se ha encargado de la caracterización enzimática en diferentes organismos, pero la ubicación subcelular no está clara, pues de igual manera no se tiene certeza sobre los sitios donde las auxinas puedan estar concentradas, puesto que son enviadas a diferentes partes de la planta, lo que sí se sabe es que la auxina aparentemente se encuentra soluble, lo que da pie a considerar que la mayoría de estas enzimas también se encuentran solubles en el apoplasto, ya que cuentan con una secuencia señal que las envía fuera de la célula. Este trabajo pretende contribuir acerca del metabolismo de los niveles endógenos de las hormonas AIA y AIB *in vitro*. En base a esto, la actividad oxidasa y peroxidasa fueron analizados comparativamente de extractos apoplásticos de tallos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum* en diferentes días del proceso de enraizamiento (0-10) y de raíces adventicias formadas a los diez días. Las peroxidasas encontradas se clasificaron por ubicación como: (1) solubles del apoplasto (proteínas de secreción ya que contienen un péptido señal), (2) o de anclaje a la pared celular, o (3) adheridas fuertemente a pared celular.





La composición de la pared celular primaria incluye celulosa, hemicelulosa y pectina, y proteínas incrustadas en la matriz formada por estos polisacáridos, la mayoría de ellos son de carácter neutral, sólo las pectinas proporcionan cargas negativas y establecen interacciones con proteínas básicas (isoperoxidasas catiónicas). Tales interacciones pueden ser modificadas por el pH y por la concentración de Ca^{2+} , de igual manera la pectina de esterificación puede estar implicada en la regulación de distribución de peroxidasa dentro del apoplasto (Penel y Greppin, 1996). Además debido a que el Ca^{2+} estabiliza las pectinas de las paredes celulares de la planta, el tratamiento con la acidez ($3.5 > 5.7$) o basicidad (8.5) de pH debería ayudar a remover las proteínas que se encuentran ancladas a la pared celular (isoperoxidasas iónicas) puesto que promueve la liberación proteica al debilitar la matriz de la pared celular (Letham, 1958; Hepler, 2005). Por todo ello, se puede concluir que, aunque la Px7 se muestra activa a lo largo del rango de pH ácido hacia el pH básico, a pH 5.7 se encuentra más activa, dato importante puesto que es el pH apoplástico.

De acuerdo con Verdonk *et al.* (2012) en la alfalfa las proteínas más abundantes de la pared celular son las peroxidases de clase III (EC 1.11.1.7). Las diferencias en las propiedades bioquímicas entre isoperoxidasas iónicamente y covalentemente unidas a la pared celular son su diferente movilidad electroforética, pesos moleculares y sus actividades oxidantes que tienen un papel específico en la fisiología de la raíz durante el desarrollo adventicio. Una carga distinta de estos dos grupos de isoformas enzimáticas, que están unidos a la pared celular podría implicar diferentes dominios dentro de la pared celular y, en consecuencia, una función fisiológica específica *in situ*.

Se identificaron 10 isoperoxidasas aniónicas y una catiónica en zimogramas de tallo y raíz, observando como rasgo principal un mayor número de isoperoxidasas de la fracción soluble en el tallo respecto a la raíz, en comparación, las que se encuentran adheridas a la pared celular son las mismas tanto en tallo como en raíz, al evaluar el efecto de los amortiguadores se observó una elevada actividad al utilizar $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en relación al $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ cuando el sustrato es AIA, pues en el ensayo para actividad Px no hay diferencias significativas, la concentración óptima de H_2O_2 se obtuvo de las variantes al realizar el ensayo oximétrico.





La oxidación de ácido indol-3-acético y ácido indol-3-butírico es catalizada por las isoperoxidasas de clase III (EC 1.11.1.7) y puede llevarse a cabo alternativamente por dos vías diferentes que corresponden a la actividad enzimática de tipo oxidasa o peroxidasa. La participación relativa de la enzima en las dos vías depende la relación enzima-sustrato-concentración de oxígeno. Los bajos niveles de oxígeno favorecen la vía oxidasa debido a la alta afinidad por el oxígeno de la ferropoxidasa, la forma enzimática que inicia esta vía. Algunos autores han informado en anteriores investigaciones la necesidad de que haya peróxido en el medio de reacción, en éste trabajo se muestran resultados diferentes ya que aunque hay un momento de retardo en que ocurra la reacción ésta sucede disminuyendo la concentración de oxígeno disponible. Es interesante comparar los parámetros cinéticos y la estabilidad enzimática, lo cual muestra que en la adición de $340\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ comienza un periodo rápido de oxidación auxínica acompañado de una reducción de O_2 , sin embargo, el ciclo oxidativo también cataliza compuestos auxina en ausencia de H_2O_2 , sin embargo, el ciclo oxidativo también cataliza compuestos auxina sin H_2O_2 . La oxidación aeróbica de AIA como de AIB puede ocurrir en ausencia de peróxido de hidrógeno añadido. En este trabajo, las características cinéticas del consumo de oxígeno durante la oxidación de los compuestos auxínicos demostró un comportamiento directo sobre los cambios de velocidad en la tasa de consumo de oxígeno sugieren la transición de la enzima entre las dos vías, teniendo una mayor actividad oxidasa que peroxidasa. Estas enzimas pueden oxidar auxina por la reducción de un electrón de oxígeno, por lo que se considera que están implicadas en el catabolismo de ácido indol-3-acético (Hinnman y Lang, 1965; Nakajima y Yamazaki, 1979; Brooks, 1986; Alba *et al.*, 1998).

El problema de la diferencia entre actividades oxidasa y peroxidasa entre las isoenzimas del tomate se resolvió parcialmente por tinción de geles. La intensidad de la tinción en una banda depende en parte de la concentración de la proteína no obstante la afinidad por un sustrato puede agudizar la banda, aunque la razón de la tinción diferencial de la actividad de las peroxidases entre los diferentes donantes de hidrógeno no es conocido. La observación nos hubiese llevado a datos erróneos por lo cual se obtuvieron densitometrías para evaluar las concentraciones de isoenzimas por intensidad de tinción, nuestros resultados muestran una tinción más abundante con AIB respecto a AIA y las anteriores





una mayor intensidad respecto a la *o*-dianisidina, por lo que podríamos decir que hay una mayor especificidad para los compuestos indólicos. Considerando los resultados de las tinciones, el análisis espectrofotométrico, el consumo de oxígeno y el método analítico HPLC, tenemos las evidencias necesarias para concluir que los dos tipos de catálisis (AIAox/AIBox y peroxidasa) residen en la misma biomolécula (isoperoxidasas de clase III).

Sin embargo otra aportación del trabajo es el haber mostrado la disposición extracelular de las isoformas, pues en trabajos anteriores sólo se ha trabajado con extractos crudos

La detección de la formación de compuestos de oxindol y la degradación auxínica se analizó por HPLC, observando por un lado el incremento de los derivados oxindólicos y la degradación de los compuestos indólicos (AIA y AIB).

Se identificaron 11 isoperoxidasas por zimogramas, la Px7 se purificó y se confirmó su localización extracelular sin actividad de G6PD en el medio de extracción. La pureza se evaluó por 2-D SDS / PAGE y análisis espectral, mostrando ser una glicoproteína 38,750Da, pI 4,9, Suberization-associated anionic peroxidase de acuerdo a un análisis de semejanza de secuencia de aminoácidos. Estructura primaria de la LePrx76, es una óxidorreductasa que posee 364 residuos y una masa molecular de 38750 Da. El centro activo esta constituido por un grupo hemo que posee un átomo de hierro centrado en el plano hémico, entre los dominios distal y proximal. Esta peroxidasa posee un alto contenido de glicanos, según la tinción para glicoproteínas. La mayoría de las biomacromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos) poseen determinada carga eléctrica con grupos aniónicos y catiónicos capaces de disociarse. La carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con pequeñas moléculas de iones u otras macromoléculas. De lo anterior se deduce que el pH influye sobre la velocidad de migración de las moléculas. En el punto isoeléctrico de la biomolécula, pH al cual su carga neta es 0, esta no migra. Por debajo del punto isoeléctrico tiene carga neta positiva y migra hacia el cátodo, y por encima del punto isoeléctrico tienen carga neta negativa y migra hacia el ánodo.





Mediante el aislamiento de las isoperoxidasas y su posterior visualización en zimogramas se pudo determinar su localización subcelular, para esto se utilizaron tres diferentes tipos de aminas aromáticas (AIA, AIB y *o*-dianisidina) y un compuesto fenólico con un grupo hidroxilo en su estructura (Guayacol). La diferente reactividad de las isoperoxidasas sobre los compuestos mencionados se debe a las diferencias en su secuencia de aminoácidos, que provocan las ligeras modificaciones en el centro activo, lo cual hace que cada sustrato presente distinta accesibilidad al centro activo lo cual las caracteriza por presentar un patrón de variación cualitativo y cuantitativo.

El proceso de enraizamiento se puede subdividir en fases independientes (inducción, iniciación y la aparición de raíces), esto ha sido un factor determinante para una mejor comprensión de rizogénesis adventicia (Nag *et al.*, 2001). Siempre hay un aumento temporal en el nivel endógeno de AIA libre durante la fase de inducción que corresponde a un nivel mínimo de la actividad tanto peroxidasa como auxina oxidasa, seguido por una disminución en los niveles de AIA a un mínimo en la fase de iniciación. En la fase inductiva la auxina es sensible a la respuesta metabólica de la planta con una alta actividad peroxidasa y oxidasa. La oxidación de AIA en esta etapa de enraizamiento (fase de iniciación) parece estar relacionada con la respuesta auxina. Por tal motivo se realizó un ensayo de la caracterización enzimática a lo largo de diez días de enraizamiento, determinando en el mismo la ubicación de las diferentes isoformas puesto que no se tiene clara. Se trabajó con una metodología que consta de tres fases: (i) poner en solución a las proteínas con amortiguador de acetatos, (ii) remover las proteínas ancladas a la pared celular adicionando amortiguador y Tritón X-100 al tejido remanente de la fase anterior, y por último (iii) obtener las proteínas adheridas a la pared celular tratando el tejido con enzimas de digestión (pectinasa y celulasa). Al analizar el comportamiento de la isoenzima Px7 su comportamiento en el extracto de tallos completos el día 8 muestra muestra la mayor actividad AIAox, en ése día de enraizamiento hay un elevado contenido proteico de 7mg/ml Fig. 40 que contienen 4 isopoformas, de los cuales 4mg corresponden a la Px7 (LePrx76) la isoforma aniónica más expresada y activa (actividad Px y AIAox), no sólo en éste día, sino a lo largo de los 10 días de enraizamiento, su ubicación esta dada en una distribución extracelular de 40.92% en la fracción soluble del apoplasto, 34.76% con





interacción tipo anclaje a la pared celular y 24.31% unido más fuertemente a la pared celular (enlace iónico de alta fuerza o covalente), la actividad como AIAox se da preferencialmente en la fracción soluble y la actividad peroxidasa en la fracción que se propuso como anclada a la pared celular. Por otra parte la Isoperoxidasa Px3 que es la segunda en abundancia de carácter iónico presenta una clara preferencia por el sustrato *o*-dinitrosidina (actividad peroxidasa).

Esta evaluación de tres procedimientos para aislar peroxidosas de clase III de las plantas de tomate mostró para tallos completos (C) que el extracto de proteínas solubles (I) contiene la mayor fracción de la proteína mayor concentración de peroxidosas (45%) aunque menos número de isoformas (4) respecto a las otras fracciones, el uso de un detergente iónico (Triton X-100) que es débilmente desnaturizante no altera la carga de las proteínas a las que se unen sólo modifica la forma de la proteína y pone en evidencia a las peroxidosas ancladas a las paredes celulares (3), un 25% de las peroxidosas corresponde a esta fracción, por lo que el 30% restante de las isoperoxidasas se encuentra adherida de forma fuertemente iónica o covalentemente a la matriz de polisacáridos, donde se observa el mayor número de peroxidosas, siete respecto a los otros tratamientos.

Todo lo anterior nos conduce a pensar que dentro de las peroxidosas iónicas halladas, la LePrx y la Px3 son aquellas en las que reside la mayor actividad auxina oxidasa y peroxidasa respectivamente.







9. CONCLUSIONES







Producción de material vegetativo

- La propagación asexual de *Solanum lycopersicum* a través de esquejes resultó ser efectiva con la utilización de auxinas (AIB $5 \times 10^{-5} \text{M}$), consiguiendo una talla para su trasplante en el día 10 de enraizamiento.

Peroxidasas de clase III

- La actividad enzimática sugiere un equilibrio entre asociación y disociación con la pared celular, sin embargo en protoplastos se muestra nula, corroborando la localización extracelular de las isoperoxidasas de clase III.
- El apoplasto reveló una isoforma catiónica y diez aniónicas.
- A lo largo del proceso de enraizamiento la expresión de las peroxidasas de clase III es irregular, mostrando la mayor actividad en los días 3 y 8.

Purificación de una peroxidasa

- El proceso de purificación más efectivo fue al poner los brotes de tallos completos inmersos en un amortiguador de acetatos con un pH 5.7.
- La secuencia de aminoácidos de la Px7 presenta la mayor identidad con la LePrx76.

Características de la LePrx 76

- Posee una masa molecular de 38750 Da.
- Es una isoenzima ácida, con un pI 4,9.
- Tiene un elevado contenido de glicanos en su estructura.
- Existe en el apoplasto con una distribución extracelular de 40.92% en la fracción soluble, 34.76% con interacción tipo anclaje a la pared celular y 24.31% unido más fuertemente a la pared celular (enlace iónico de alta fuerza o covalente).
- La actividad como AIAox se da preferencialmente en la fracción soluble y la actividad peroxidasa en la fracción que se propuso como anclada a la pared celular.

Características espectrales

- Presentan su espectro máximo de absorción a 403nm (banda Soret), y las bandas α y β aparecen a 540 y 670nm respectivamente.
- En la reacción catalítica forma diferentes formas enzimáticas: CoI y CoII, apareciendo la forma CoIII cuando se somete a un exceso de peróxido, 413, 549 y 576nm respectivamente, así como la verdohemoproteína inactiva P~670.





Estudios cinéticos

- Las isoperoxidasas de tomate oxidan una gran cantidad de sustratos orgánicos e inorgánicos en presencia y ausencia de H_2O_2 .
- Son muy reactivas con los sustratos con aminas aromáticas (AIA, AIB y *o*-dianisidina) y compuestos fenólicos con un grupo hidroxilo (Guayacol).

Ensayos oximétricos

- Se demostró la capacidad de las isoenzimas para catalizar el consumo de O_2 al utilizar AIA y AIB como sustratos en ausencia de H_2O_2 , acelerando la reacción con H_2O_2 0.34mM.
- Presenta un tipo de inhibición por la alta concentración de H_2O_2 .

Catabolismo auxínico

- La actividad auxina oxidasa *in vitro* mostró degradar AIA y AIB al evaluar la actividad por el método analítico HPLC (Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento).
- La reacción oxidativa sobre el anillo indólico muestra un decremento de los compuestos indólicos y la formación de derivados oxindólicos.

Las características encontradas en las enzimas estudiadas apoyan la idea que considera su importancia en el control de auxina libre





10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS





10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS





-
- Acosta, M., del Río, J.A., Arnao, M.B., Sánchez-Bravo, J., Sabater, F., García-Carmona, F. and García-Cánovas, F. 1988. Oxygen consumption and enzyme inactivation in the indolyl-3-acetic acid oxidation catalyzed by peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 955:194-202.
 - Akkara, J.A., Senecal, K.J., & Kaplan, D.L. 1991. Síntesis and characterization of polymers produced by horseradish peroxidase in dioxane, *J. Polymer. Sci: Part A: Polymer. Chem.* 29:1561-1574.
 - Alarcón V. A. L. 2005. Soluciones nutritivas y fertirriego. Consideraciones, manejo y diagnóstico en cultivo sin suelo. *Rev. Tecnoagro* 6.
 - Alberty, R.A. 1953. A short history of the thermodynamics of enzyme-catalyzed reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 75:1921-1926.
 - Almagro, L., Gómez Ros, L.V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A and Pedreño, M.A. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *J. Exp. Bot.* Vol. 60(2):377–390.
 - Ambriz G. J. 1995. Micropropagación de brotes de tomate (*lycopersicum esculentum* Mill.) partir de plantulas germinadas *in vitro*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de agronomía.
 - Arzanova, I.A., Ibragimov, F.A., Golubenko, Z., Veshkurova, O.N., Akhunov, A.A. and Salikhov, Sh. I. 2002. Identification of AIAoxidase in peroxidase isoforms from cotton leaves. *Chemistry of Natural Compunds* 38(5):458-461
 - Askerlund P, Larsson C, Widell S, Møller IM. 1987. NAD (P) H oxidase and peroxidase activities in purified plasma membranes from cauliflower inflorescences. *Physiol Plant* 71: 9–19
 - Beffa, R., Martin, H.V. and Pilet, P-E. 1990. In Vitro Oxidation of Indoleacetic Acid by Soluble Auxin-Oxidases and Peroxidases from Maize Roots. *Plant Physiol.* 94: 485-491.
 - Bethany K. Z., Michelle N. and Bonnie B. 2007. IBR3, a novel peroxisomal acyl-CoA dehydrogenase-like protein required for indole-3-butyric acid response. *Plant Mol Biol* 64:59–72.





- Bradford, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
 - Caboni, E., Tonelli, M.G., Lauri, P., Iacovacci, P. Kevers, C., Damiano, C. and Gaspar, T. 1997. Biochemical aspects of almond microcuttings related to *in vitro* rooting ability. *Biol. Plant.* 39:91-97.
 - Cleland, W.W. 1970. The enzymes, 3rd ed., Boyer, P.D., ed. Academic, New York, Vol. II, 1-65.
 - Cleland, W.W. 1990. The Enzymes, 3rd ed., Hackney, D.D., ed., Academic, New York, Vol. XIX, 99-158.
 - Cohen J. D., Banduski R. S. 1982. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annual Review of Plant Physiology* 33:403-430.
 - Converso D. A., Fernandez M. E. 1995. Peroxidase isozymes from wheat germ: purification and properties. *Phytochemistry* 40: 1341–1345
 - Cosio, C. and Dunand, C. 2009. Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany*, 60:391–408.
 - Criquet, S., Joner E.J. and Leyval, C. 2001. 2,7-Diaminofluorene is a sensitive substrate for detection and characterization of plant root peroxidase activities. *Plant Science* 161:1063–1066.
 - Cruces C. R. 1990. Lo que México aportó al mundo. Ed. Panorama. 2^a reimpresión. México, D.F. Pp 61-64.
 - Chaban, C., Waller, F., Furuya, M. and Nick, P. 2003. Auxin Responsiveness of a Novel Cytochrome P450 in Rice Coleoptiles. *Plant Physiology*, 133: 2000–2009.
 - Chamarro L. J. 2001. Anatomía y Fisiología de la planta. En> El cultivo del Tomate. F.Nuez Mundi Prensa. España. Pp 43-91.
 - Chattopadhyay, K., & Mazumdar, S. 2000. Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: effect of temperature and pH, *Biochemistry* 39:263-270.
 - Dharmasiri N., Dharmasiri, L. and Estelle, M. 2005. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*: 435:441
 - Dolan L. (1998). Pointing roots in the right direction: the role of auxin transport in response to gravity. *Genes Dev.* 12(14): 2091-2095.
-





-
- Dun, E.A., Brewer, P.B., Beveridge, C.A. 2009. Strigolactones: discovery of the elusive shoot branching hormone. *Trends in Plant Science*. 14(7): 364-372.
 - Dunand, C., Tognolli, M. Overney, S., Von Tobel, L., De Meyer, M., Simon, P., and Penel, C. 2002. Identification and characterization of Ca²⁺-pectate binding peroxidases in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol* 159:1165-1171.
 - Durán J. M., E. Martínez y L. M. Navas. 2000. Los cultivos sin suelo de la hidropónia a la aeropónia.
 - Evans, J. J. and Alldridge, N. 1965. The distribution of peroxidases in extreme dwarf and normal tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Phytochemistry* 4: 499-503.
 - Gajhede, M., Schuller, D.J., Henriksen, A., Smith, A.T., & Poulos, T.L. 1997. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution, *Nature Struct. Biol.* 4:1032-1038.
 - García M. J. 2002. Influencia de la aplicación de reguladores de crecimiento sobre la plasticidad fenotípica del *Pinus pseudostrobus* Lindl. (Pinaceae). Universidad de Colima. Ciencias agrícolas y forestales. Tecomán, Colima, México.
 - Gehring CA, Irving HR, Parish RW. 1990. Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9645–9649
 - González N. J. F. 2006. Avanzan los sistemas hidropónicos en México. Hortalizas, frutas y flores. Ed. Agro Sín. S. A de C. V. México, D.F.
 - Grebe M (2005) Plant biology. Enhanced: growth by auxin: when a weed needs acid. *Science* 310:60–61
 - Hartmann, H, D. Kester, F. Davies y R. Geneve. 2002. Plant propagation. Principles and Practices Prentice Hall. Upper Saddle River. New Jersey.
 - Hartmann, H., y D. Kester. 1995 Propagación de Plantas, Principios y Prácticas. Editorial Continental. México. 760p.
 - Henriksen, A., Schuller, D.J., Meno, K., Welinder, K.G., Smith, A.T., & Gajhede, M. 1998. Structural interactions between horseradish peroxidase C and the substrate benzhydroxamic acid determined by X-ray crystallography. *Biochemistry* 3: 8054-8060.
 - Hepler, P. 2005. Calcium: a central regulator of plant growth and development *Plant Cell* 17:2142–2155.
-





-
- Hilhorst, H.W.M., Groot S.P.C. and Bino RJ. 1998. The tomato seeds as model system to study seed development and germination. *Acta Botánica Neerlandica*. 47:169-18.
 - Hinman RL, Lang J. 1965. Peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *Biochemistry* 4:144-158
 - Hiraga, S., Sasaki, K., Ohashi, Y. and Matsui, H. 2001. A large Family of Class III Plant Peroxidases. *Plant Cell Physiology* 42(5):462-468.
 - Hoyle M. C. 1978. Optimum Conditions for Indoleacetic Acid Oxidase Extraction from *Betula* Leaves. *Physiol. Plant.* 42:315-320.
 - <http://www.infoagro.com/agrointernet/prensa>.
 - Huang, C.S., Lin, L.H. and Huang, S.P. 1971. Changes in peroxidase isoenzymes in tomato galls induced by meloidogyne incognita. *Nematologica* 17:52-60.
 - Jouili, H., Bouazizi, H., Rossignol, M., Borderies, G., Jamet, E. and El Ferjani, E. 2008. Partial Purification and characterization of a copper-induced anionic peroxidase of sunflower roots. *Plant Physiol. and Biochem.* 46:760-767.
 - Kanamori, A. 1995. Puesta a Punto de la Técnica para Cuantificación de Sustancias Fenólicas en Estacas Herbáceas de Chirimoyo según Swaim y Hillis (1959). Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Católica de Valparaíso. 146p.
 - Karcz W, Burdach Z. 2002. A comparison of the effects of AIA and 4-Cl-AIA on growth, proton secretion and membrane potential in maize coleoptile segments. *J Exp Bot* 53:1089–1098
 - Kokkinakis DM, Brooks JL, 1979. Tomato peroxidase. Purification, characterization, and catalytic properties. *Plant Physiol* 63:93-99
 - Kong, F. J., Oyanagi, A. y Komatsu, S. 2010. Cell wall proteome of wheat roots under flooding stress using gel-based LC MS/MS-based proteomics approaches. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1804:124-136
 - Krikorian, A. D. 1991. Propagación clonal *in vitro*. En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (Ed). *Cultivo de tejidos de la agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT. Colombia. Pp. 95-125.
 - Kukavica Biljana M., Veljovic´-Jovanovic Sonja D., Menckhoff Ljiljana and Luthje Sabine. 2012. Cell wall-bound cationic and anionic class III isoperoxidases of pea root:





-
- biochemical characterization and function in root growth. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 63(2):695–709.
- Kvaratskhelia M, Winkel C, Thorneley RNF. 1997. Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves. *Plant Physiol* 114:1237–1245.
 - Lamaire, F. *et al.*. 2005. *Cultivos en macetas y contenedores. Principios agronómicos y aplicaciones*. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa.
 - Leopold, C. 1964. *Plant Growth and Development*. Editorial Mc Graw – Hill. 466p.
 - Letham, D.S. (1958). Maceration of plant-tissues with ethylene-diamine-tetra-acetic acid. *Nature* 181:135–136.
 - Ludwig-Müller, J., 2000. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regul.* 32:219–230.
 - MacDiarmid, Alan. G. 1997. Polyaniline and polypyrrole: where are we headed?, *Synth. Met.* 84:27-34.
 - Martínez M. L. J., Soto U. L., Baca. E. B., Sánchez A. J. A. 2003. Indole-3-butyric acid (AIB) production in culture médium by wild strain *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*. 228:167-173.
 - Mika, A. and Lüthje, S. 2003. Properties of Guayacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes *Plant Physiol.* 132:1489-1498.
 - Miller, P. 1754. *The gardener's dictionary*, Abridged 4th ed. London: John and James Rivington.
 - Molaei Rad, A., Ghourchian, H., Moosavi-Movahedi, A.A., Kong, J. and Nazari, K. 2007. Spectrophotometric assay for horseradish peroxidase activity based on pyrocatechol-aniline coupling hydrogen donor. *Analytical Biochemistry*. 362:38-43
 - Morimoto, S. Tateishi, N., Inuyama, M, Taura, F., Tanaka, H. and Shoyama, Y. 1999. Identification and Molecular Characterization of Novel Peroxidase with Structural rprotein-like Properties. *J. Biol. Chem.* 274 (37):26192-26198.
 - Murakami, S., Takahara, H. and Shiraiwa, M. 2007. Purification and characterization of three neutral extracellular isoperoxidases from rye leaves. *Phytochemistry* 68:777-784.
-





-
- Nag, S., Saha, K., 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., 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.
 - Normally J. (1997). Auxin metabolism. *Physiol Plant.* 100:431-442.
 - Normanly J, Slovin JP, Cohen JD. 2004. Auxin biosynthesis and metabolism. In: *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Davies J (ed). Kluwer Acad. Pub. Dordrecht, The Netherlands.
 - Oakley, B. R.1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*105:361–363.
 - Oeller, P.W. and Theologis, A. 1995. Induction kinetics of the nuclear proteins encoded by the early indoleacetic acid-inducible genes, PS-AIA4/5 and PS-AIA6 in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant J.* 7:37-48.
 - Östin A, Kowalyczk M, Bhalerao RP, Sandberg G. 1998. Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 118:285–296.
 - Palmieri, S. Odoardi, M., Soressi, G.P. and Salamini, F. 1978. Indoleacetic oxidase activity in two high peroxidase tomato mutants. *Physiol. Plant.* 42:85-90.
 - Park S, Cohen JD, Slovin JP. 2006. Strawberry fruit protein with a novel indole-acyl modification. *Planta* 224:1015–1022.
 - Passardi F., Longet D., Penel C., Dunand C.2004. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry* 65:1879-1893.
 - Passardi, F., Bakalovic, N., Teixeira, F.K., Margis-Pinheiro, M., Penel, C., and Dunand, C. 2007. Prokaryotic origins of the nonanimal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. *Genomics* 89:567-579.
 - Penel C, Greppin H. 1994. Binding of plant isoperoxidases to pectin in the presence of calcium. *FEBS Letters* 343:51–55.





-
- Peralta, I. E., Knapp, S. y Spooner, D. M. 2006. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. Vol 26. Pp 1-12 University of Wisconsin, 1575 Linden Drive, Madison, Wisconsin 53706-1590, U.S.A.
 - Pérez, R. M. 2010. Mejoramiento genético en *Solanum lycopersicum* para la resistencia al pasador del fruto *Neoleucinodes elegantalis* Guenée (Lepidoptera: Crambidae). Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad nacional de Colombia.
 - Perrot-Rechenmann, C. and Hagen, G. Eds. Auxin Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers. ISBN 1-4020-0646-2. 178 pp.
 - Pina, D.G., Shnyrova, A.V., Gavilanes, F., Rodríguez, A., Leal, F., Roig, M.G., Sakharov, I.Y., Zhadan, G.G., Villar, E., and Shnyrov, V.L. 2001. Thermally induced conformational changes in horseradish peroxidase, Eur. J. Biochem. 268:120-126.
 - Pressey R. 1990. Anions activate the oxidation of indolacetic acid by peroxidases from tomato and other surces. Plant Physiol. 93:798-804.
 - Railén A. I., Mederos M. D., López M. M., 2011. Mosquita blanca en tomate. Control actual y perspectivas. 2000 AGRO Revista Industrial del Campo. 66 (2010-2011). p-12
 - Raitman, O.A., Katz, E., Buckmann, A.F., Willner, I. 2002. Integration of polyaniline/poly(acrylic acid) films and redox enzymes on electrode supports: an in situ electrochemical/surface plasmon resonance study of the bioelectrocatalyzed oxidation of glucose or lactase in the integrated ioelectrocatalytic systems. J. Am. Chem. Soc. 124(22):6487-6496.
 - Rodríguez, A., Pina, D.G., Yélamos, B., Castillo-León, J.J., Zhadan, G.G., Villar, E., Gavilanes, F., Roig, M.G., Sakharov, I.Y., & Shnyrov, V.L. 2002. Termal stability of peroxidase from the African oil palm tree *Elaeis guineensis*, Eur. J. Biochem. 269: 2584-2590.
 - Rodríguez, R. R., J. M. Tavares R. y J. A. Medina J. 2001. Cultivo moderno del tomate. Mundi-Prensa. Madrid, España. 255p.
 - Rojas, K. 1995. Enraizamiento de queule (*Gomortega Keule* (Mol.) Baillon) y su Relación con el Contenido y Tipo de Fenoles. Tesis Ingeniería Forestal. Universidad de Chile. Santiago. 85p.
 - Sakharov, I.Y. 2003. Palm tree peroxidases, Biochemistry (Moscú) 69:823-829.





-
- Sánchez-Rodríguez, C., Rubio-Somoza, I. Sibout, R. and Persson, S. 2010. Phytohormones and the cell wall in *Arabidopsis* during seedling growth. Trends in Plant Science. 15:291-301.
 - Schenck, D., Christian, M., Jones, A. and Lüthen, H. 2010. Rapid auxin-induced cell expansion and gene expression: A four decade-old question revisited. Plant Physiol. 152:1183-1185.
 - Schuller, D.J., Ban, N., van Huystee, R.B., McPherson, A., and Poulos, T. 1996. The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure* 4:311-321.
 - Secko, D. 2007. Auxin Receptor Hides in Plain Sight. The Scientist.com 21:69-72.
 - Segura, J. 1994. Concepto de Hormona Vegetal. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Editorial Mc Graw Hill. Madrid. 19:285 – 375.
 - Siegel, D. Z. and Galston, A. W. 1967. Indoleacetic acid oxidase activity of apoperoxidase. Science 157:1557-1559.
 - Strader L. C., Hendrikson Culler A., Cohen J. D., Bartel B. 2010. Conversion of endogenous indole-3-butyric acid to indole-3-acetic acid drives cell expansion in *Arabidopsis* seedlings. *Plan physiology* 153:1577-1587.
 - Tang, Y.W. And Bonner, J. 1947. The enzymatic inactivation of indoleacetic acid I. Some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings. Arch. Biochem. 13:11-25.
 - Terés, V. 2001. Relaciones aire-agua en sustratos de cultivo como base para el control del riego. Metodología de laboratorio y modelización. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid, Escuela técnica superior de Ingenieros Agrónomos. Departamento de producción vegetal. Fitotécnia.
 - Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H., Simon, P., 2002. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. Gene 288:129–138.
 - Tsurumi S, Wada S. 1980. Metabolism of indole-3-acetic acid and natural occurrence of dioxindole-3-acetic acid derivatives in *Vicia* roots. Plant Cell Physiol 21:1515-1525
 - Tyburski, J., Jasionowicz, P. and Tretyn A. 2006. The effects of ascorbate on root regeneration in seedling cuttings of tomato. Plant Growth Regul 48:157-173
 - Valério, L., De Meyer, M., Penel, C. and Dunand, C. 2004. Expresión análisis of the *Arabidopsis* peroxidase multigenic familia. *Phytochemistry* 65:1331-1342
-





-
- Verdonk J.C., Hatfield R. D. and Sullivan M. L. 2012. Proteomic analysis of cell walls of two developmental stages of alfalfa stems. *Frontiers in PLANT SCIENCE*. Plant proteomics, 3:279.
 - Villalobos, V. M. y T. A. Thrope. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En Cultivo de tejidos de la agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Colombia, 127-141.
 - Weaver, R. 1998. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. Editorial trillas. México, D.F.
 - Welinder, K.G. 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2:388-393.
 - Welinder, K.G. y Gajhede, M. 1993. Structure and evolution of peroxidases. In: Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology. (Eds.: Greppin, H., Rasmussen, S.K., Welinder, K.G. y Penel, C.), University of Copenhagen and University of Geneva, U Geneva, 35-42.
 - Woodward, A.W. and Bartel, B. 2005. Auxin: Regulation, Action and Interaction. *Ann. Bot.* 95:707-735.
 - Zago, M.K., Galván-Ampudia, C.S. and Offringa, R. 2008 Signaling in Auxin-Dependent Plant Development. *Plant Cell Monogr.* 10: 154-178.
 - Zamorano, L.S., Pina, D.G., Arellano, J.B., Bursakov, S.A., Zhadan, A.P., Calvete, J.J., Sanz, L., Nielsen, P.R., Villar, E., Gavel, O., Roig, M.G., Watanabe, L., Polikarpov, I., & Shnyrov, V.L. 2008. Thermodynamic characterization of the palm tree *Roystonea regia* peroxidase stability. *Biochimie* 90:1737-1749.
 - Zamorano, S.L. 2009. Caracterización químico-física de la peroxidasa de Palma real (*Roystonea regia*), una enzima con elevada estabilidad. Universidad de Salamanca. Facultad de ciencias químicas. Salamanca, España.
 - Zárate Nicolás B. N. 2007. Producción de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) hidropónico con sustratos, bajo invernadero. Tesis de maestría en ciencias de conservación y aprovechamiento de recursos naturales. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional- Unidad Oaxaca. Santa Cruz Xoxotlán, Oaxaca, México.





Referencias bibliográficas

-
- Zin – Huang, L., Ho – Yih, L. Y Hwei – Yi W. 1996. Effect of Light on Endogenous Indole – 3 – Acetic Acid, Peroxidases and Indole – 3 Acetic Acid Oxidase in Soybean Hypocotyls. Bot. Bull. Acad. Sin. 37:113 – 119.

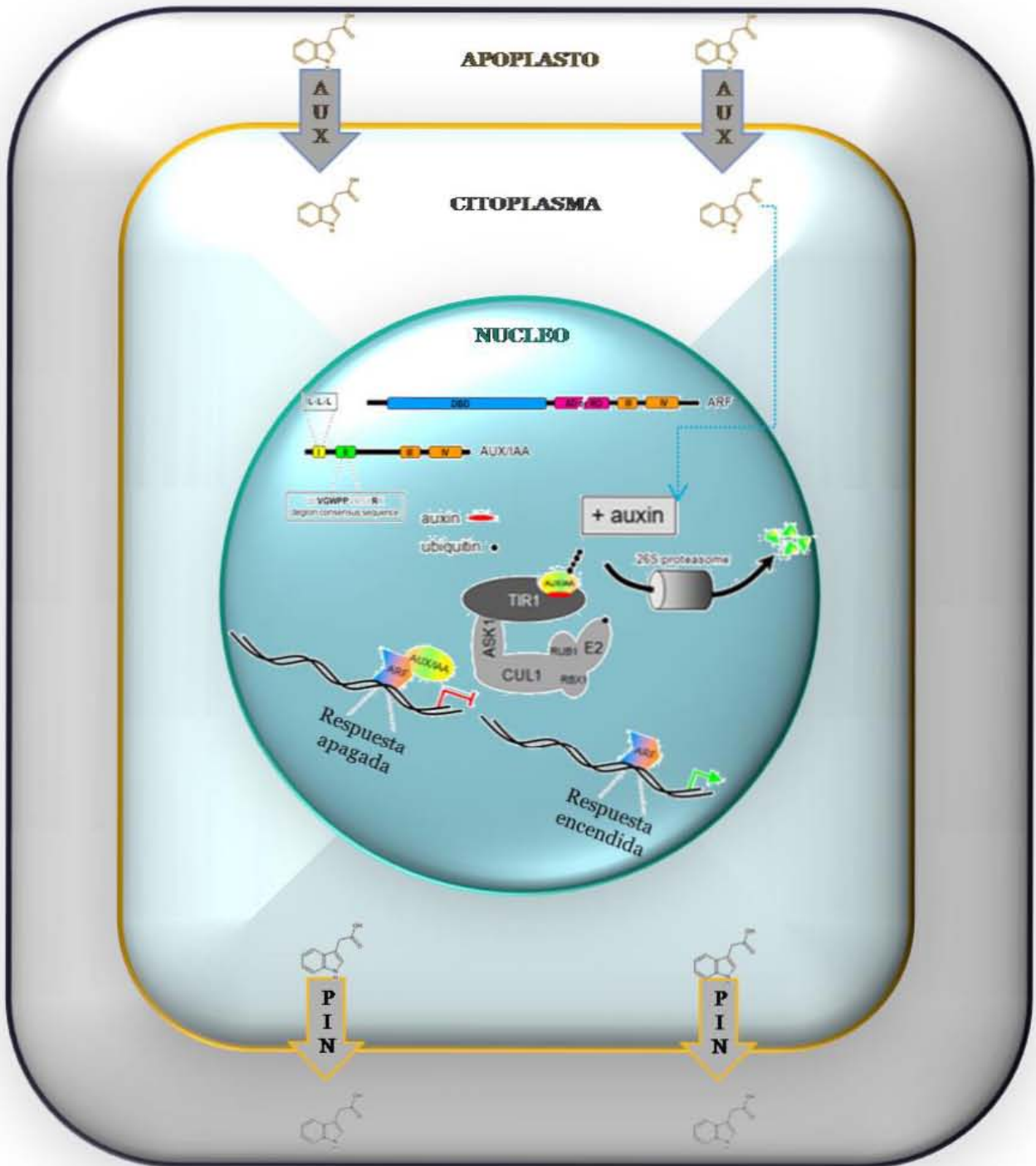




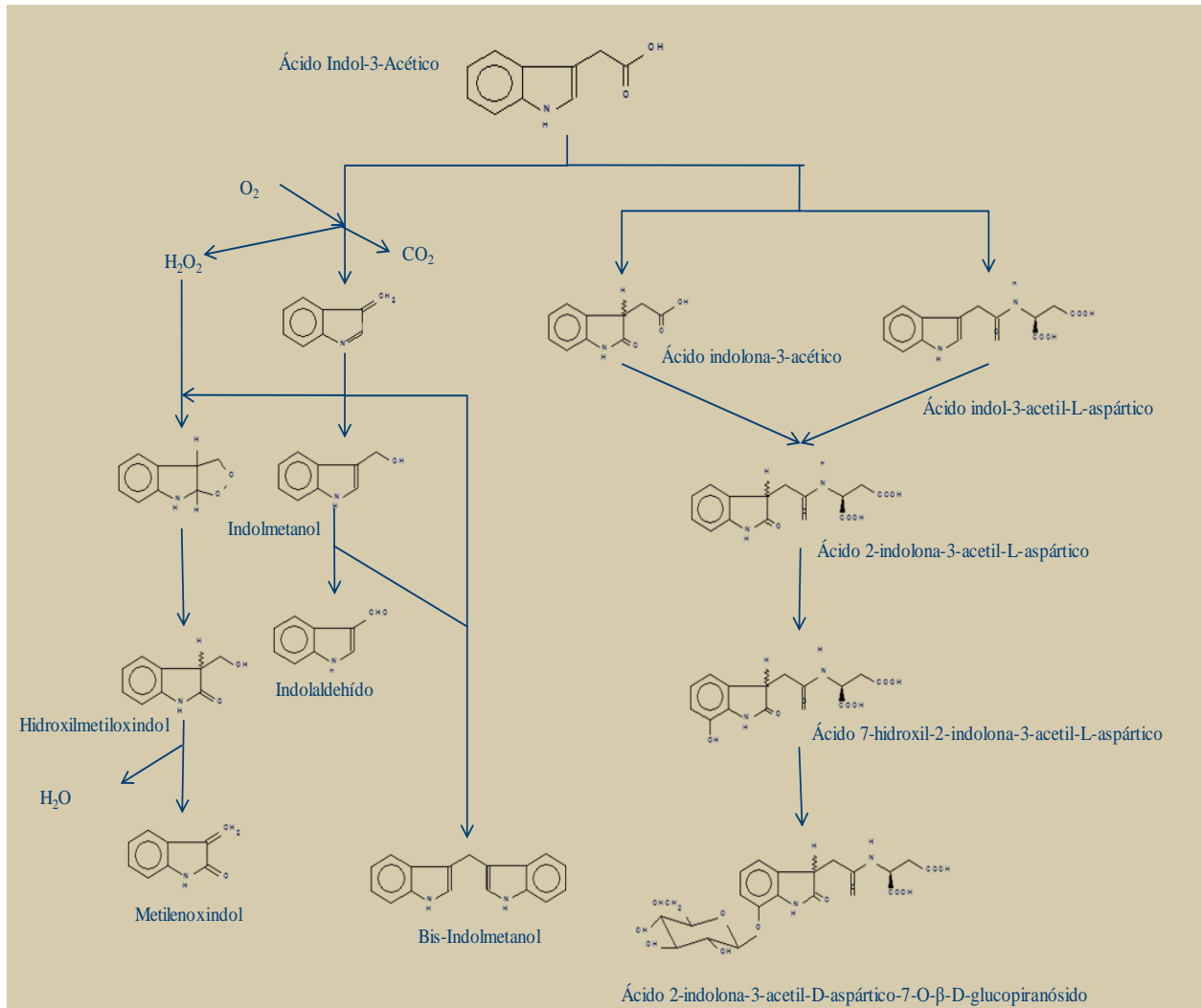
APÉNDICES





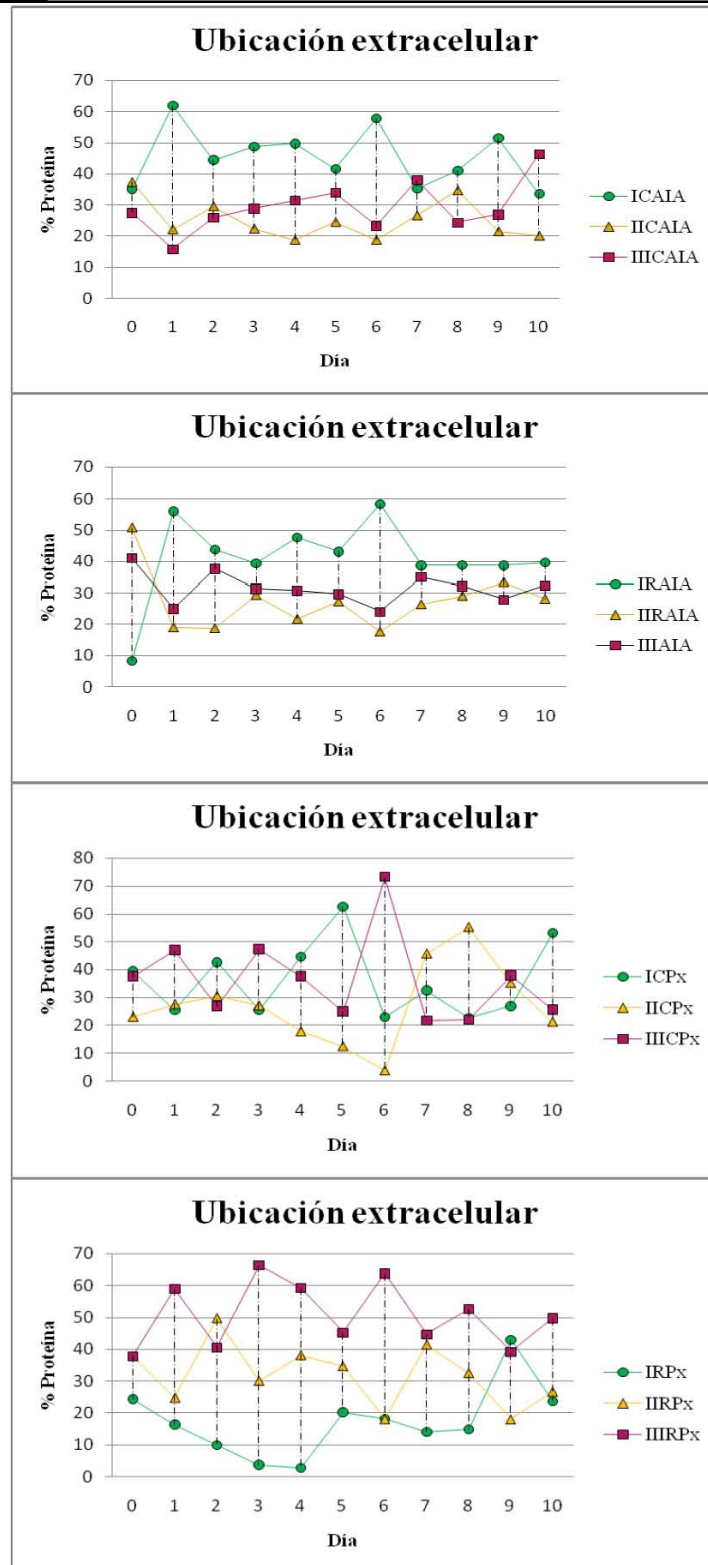


Metabolismo auxínico



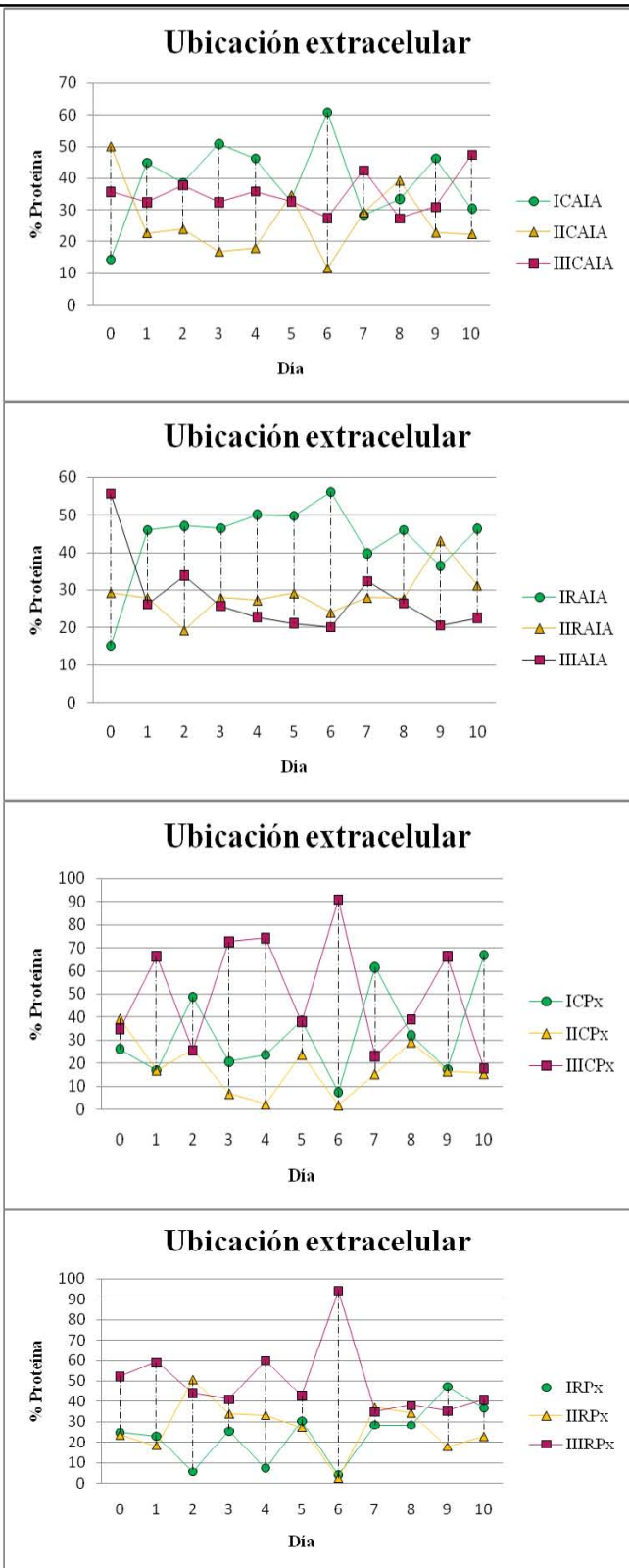
Catabolismo auxínico





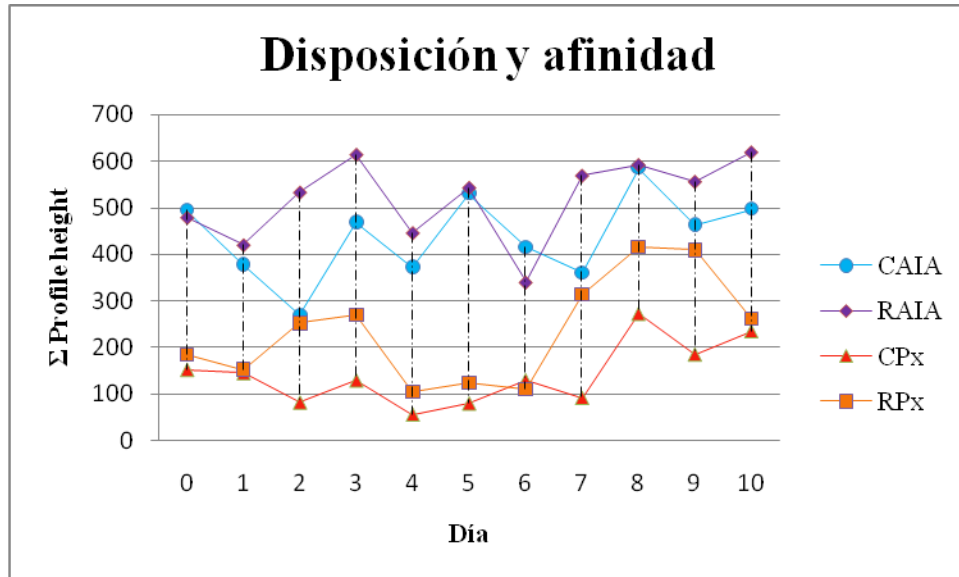
Porcentaje de disposición de la Px7 con los diferentes tratamientos de extracción y su respectiva actividad en tallos completos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum*



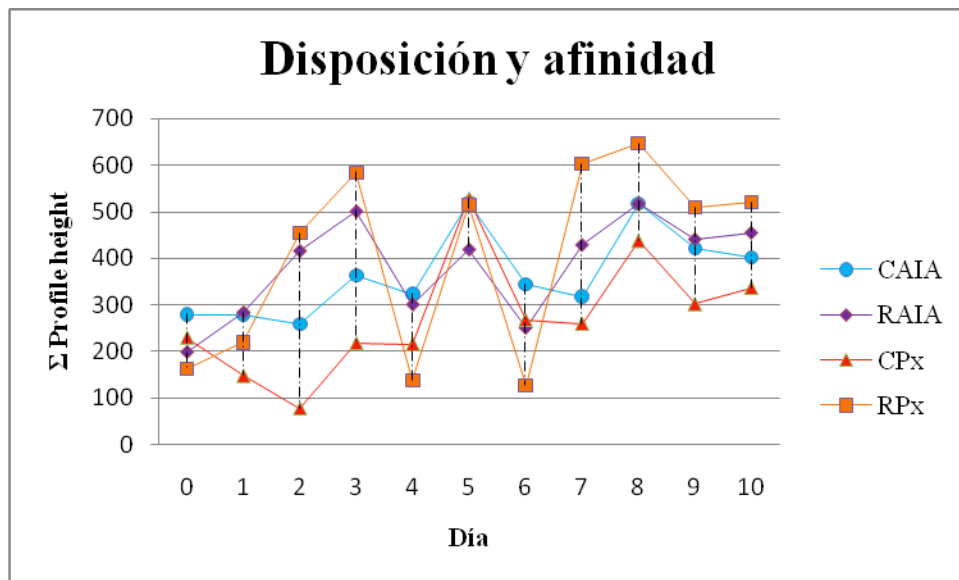


Porcentaje de disposición de la Px3 con los diferentes tratamientos de extracción y su respectiva actividad en tallos completos de brotes axilares de *Solanum lycopersicum*





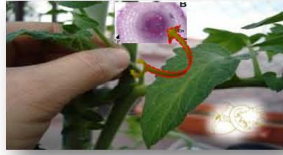
Disposición y afinidad de la Px7



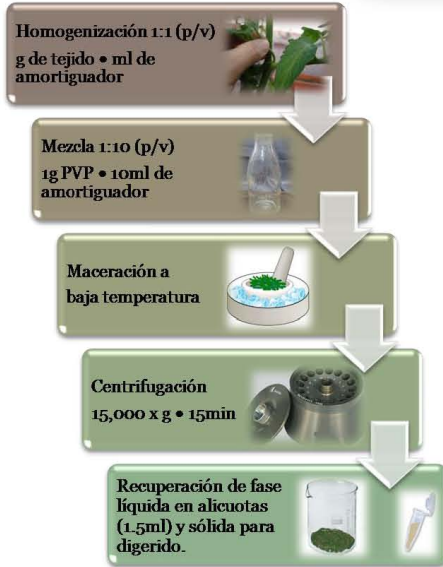
Disposición y afinidad de la Px3



Extracción



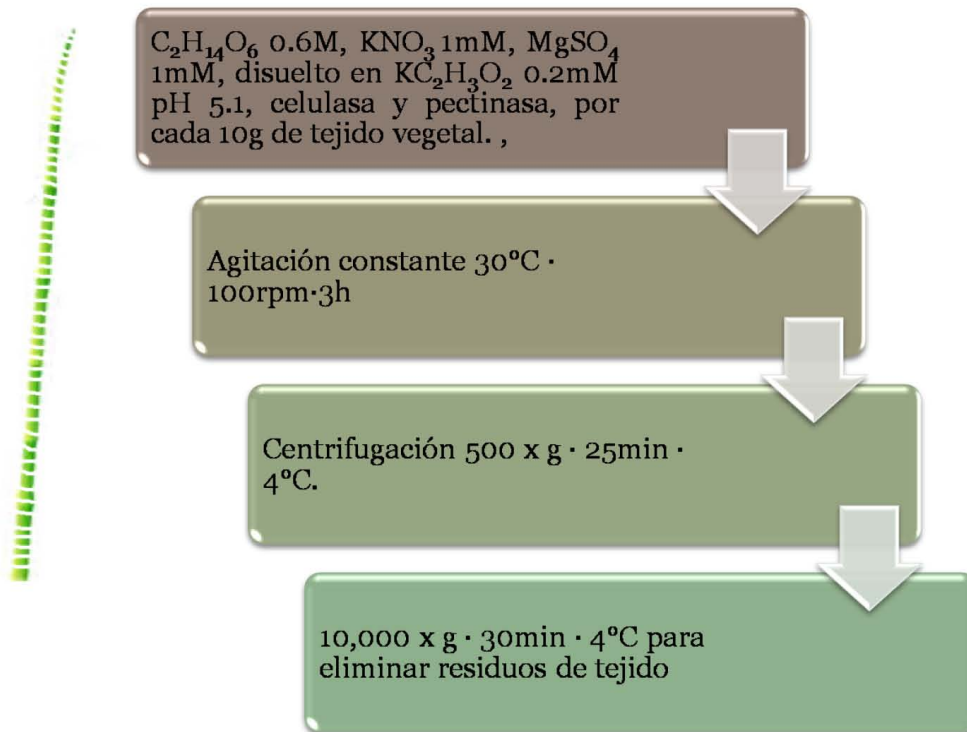
Crudo



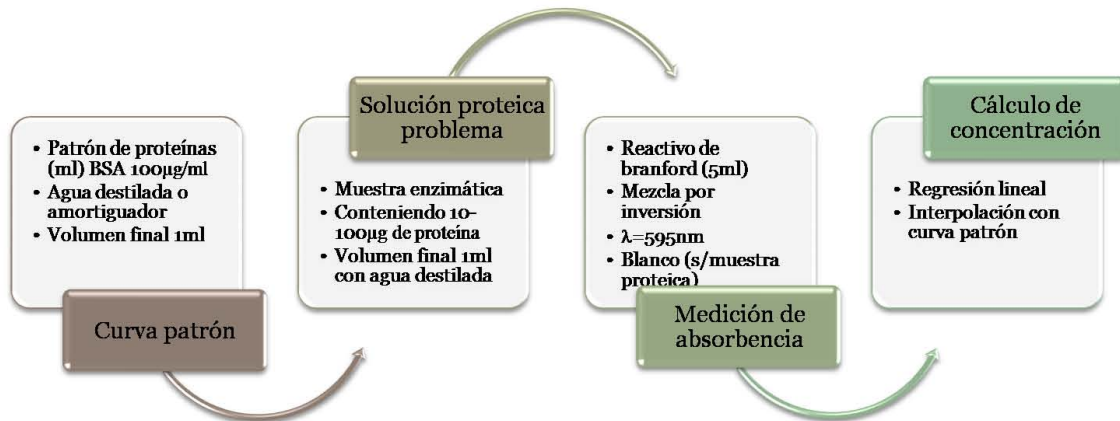
Digerido



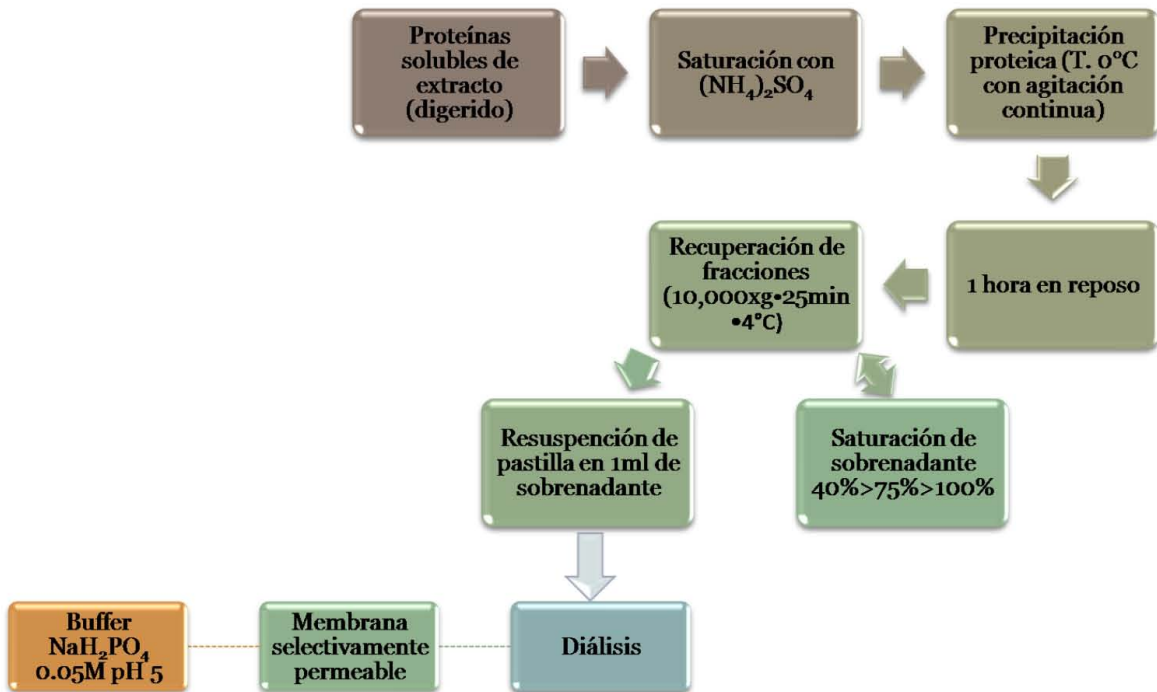
Separación de protoplastos



Determinación proteica



Purificación

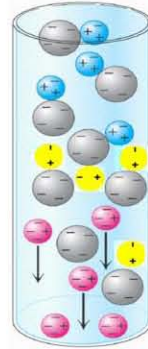


Columna de intercambio iónico

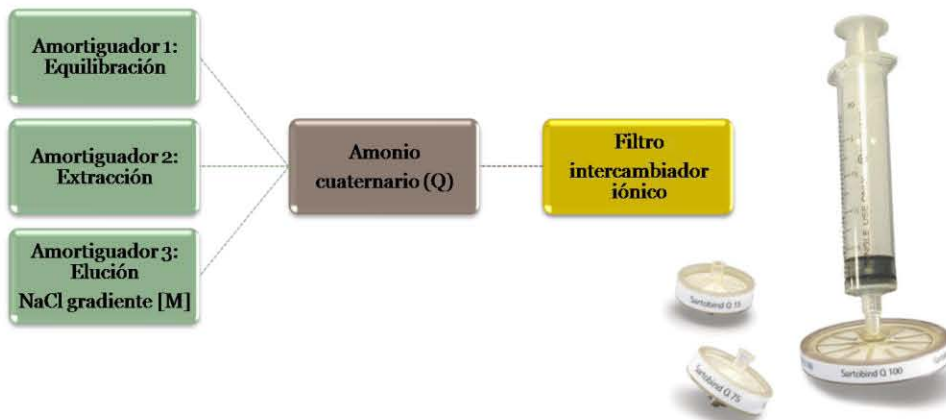
Fase estacionaria: +
Retiene sustancias: -

Deben competir con
los contraiones del
amortiguador

Sustancias + pasan a
través de la fase
estacionaria



Membranas de adsorción de Sartobind



Filtración por peso molecular

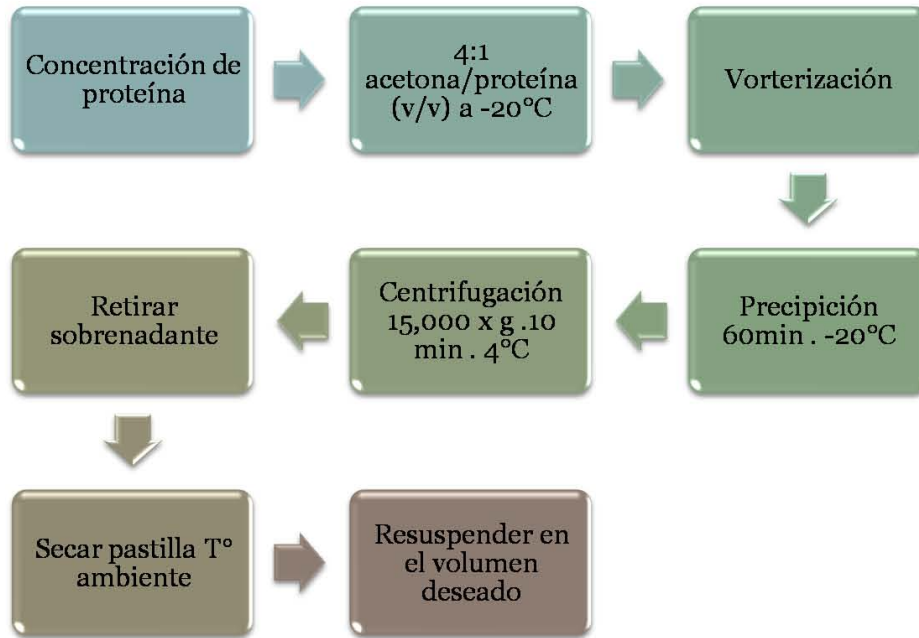


Exclusión por peso molecular

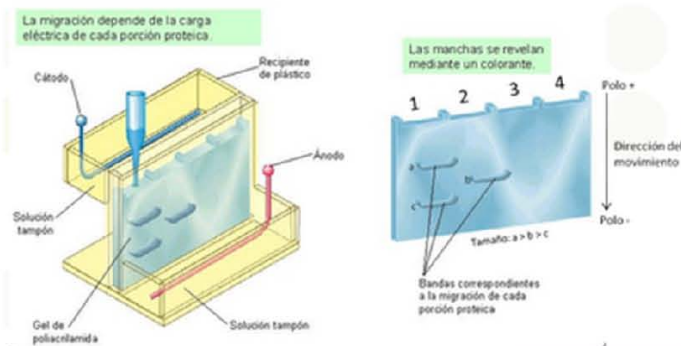
Definir el tamaño de poro

Centrifugación 1,000 g . 15min

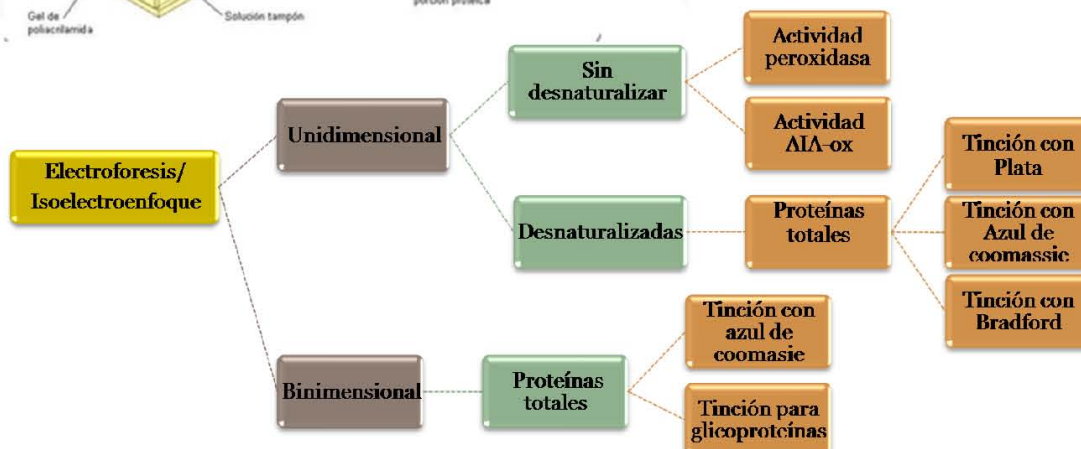
Precipitación con acetona



Electroforesis en gel de poliacrilamida



Electroforesis



Actividad peroxidasa



Actividad AIA

