



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULDADE DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA ANIMAL, BIOLOXÍA VEXETAL E ECOLOXÍA

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD
PEROXIDASA IMPLICADA
EN LOS PROCESOS DE LIGNIFICACIÓN
Y SU ESTUDIO EN LA INTERACCIÓN
Capsicum annuum L. var. *annuum*-*Verticillium dahliae* Kleb

FEDERICO POMAR BARBEITO

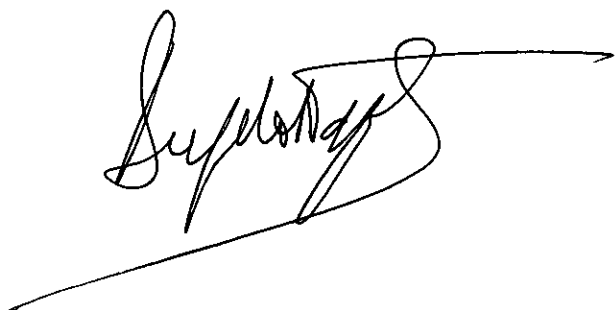
2000

Dña ÁNGELA NOGUEROL SEOANE, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA ANIMAL, BIOLOXÍA VEXETAL E ECOLOXÍA DE LA UNIVERSIDADE DA CORUÑA

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada "Caracterización de la actividad peroxidasa implicada en los procesos de lignificación y su estudio en la interacción *Capsicum annuum* L. var. *annuum-Verticillium dahliae* Kleb.", presentada por el licenciado FEDERICO POMAR BARBEITO para aspirar al grado de doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada en su totalidad en el Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología de la Universidade da Coruña y en el Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Murcia.

Y para que conste firma la presente certificación a 26 de Abril de dos mil.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ángela Noguero Seoane', with a long horizontal line extending to the right from the end of the signature.

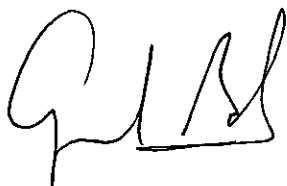
Fdo. Ángela Noguero Seoane

Dña M^a DE LOS ANGELES BERNAL PITA DA VEIGA Y Dña FUENCISLA MERINO DE CÁCERES PROFESORAS TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, BIOLOGÍA VEGETAL Y ECOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE A CORUÑA, Y D. ALFONSO ROS BARCELÓ CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

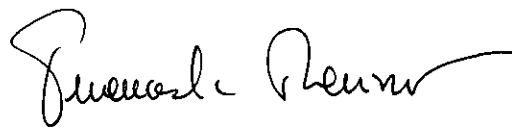
CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada "Caracterización de la actividad peroxidasa implicada en los procesos de lignificación y su estudio en la interacción *Capsicum annuum* L. var. *annuum-Verticillium dahliae* Kleb.", presentada por el licenciado FEDERICO POMAR BARBEITO ha sido realizada en el Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de A Coruña y en el Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Murcia bajo su dirección, y cumple las condiciones exigidas para aspirar al grado de doctor en Ciencias Biológicas.

Y para que conste firman la presente certificación a 26 de Abril de dos mil.



Angeles Bernal Pita da Veiga



Fuencisla Merino de Cáceres



Alfonso Ros Barceló

El presente trabajo ha sido financiado por la Xunta de Galicia, proyecto XUGA 10303A97, y por el Ministerio de Educación y Ciencia, proyecto PB97-1042.

El firmante de esta Memoria ha disfrutado durante su realización de una Beca Predoctoral de la Universidade da Coruña, y de una Bolsa para realizar estadias fuera de la Comunidad Autónoma de la Xunta de Galicia.

La Coruña, 26 de abril de 2000

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke at the bottom.

Federico Pomar Barbeito

Sin duda, los agradecimientos son una de las partes del trabajo más agradables y a la vez más complicadas de escribir. Corro el peligro de olvidarme de alguien, sobre todo de aquellas personas que me ayudaron al comienzo, por otra parte me es difícil expresar sentimientos por escrito y por último soy consciente de que si hay algo que todo el mundo va a leer, va a ser esta hoja. Así que, si inconscientemente me olvido de alguien le pido perdón y si el lenguaje es pobre, os aseguro que, por lo menos, va a ser sincero.

Como no, los primeros agradecimientos son para los directores de este trabajo, las doctoras Ángeles Bernal Pita da Veiga y Fuencisla Merino de Cáceres y el doctor Alfonso Ros Barceló, sin los cuales no habría sido posible la realización del mismo. Les agradezco especialmente su comprensión y tenacidad en los momentos más difíciles.

Quiero agradecer también, el cariño de todos mis compañeros de laboratorio, empezando por José, el primero con el que trabajé, Berta, M^a Carmen, Marta Varela, Ana, Carmen María, Marta Novo, Cristina, Carlos, Mary, María, Pablito, Olaya y las "Shakiras". Todos ellos han hecho que el laboratorio se convierta en el lugar ideal para trabajar, aunque no hayan acabado de apreciar mis cualidades como cantante.

A mis otros compañeros y amigos murcianos, M^a Ángeles Ferrer, M^a Ángeles Pedreño, Romualdo, Antonio, Tomás, Pepe y Pili responsables de algo inaudito: un gallego sin "morriña".

Agradezco a Ruth, Fernando, Miguel y Xabier, por haber sido los mejores compañeros de promoción que uno pueda tener.

A Luis, Pepín y José Luis, por colaborar en mantener alta mi autoestima, dejándome ganar al tenis.

A todos mis amigos, especialmente a Tino y María, por aguantarme durante estos últimos años y a mi "familia charrúa" por su cariño y los fantásticos asados veraniegos.

A mi hermano Tito, que ha sido siempre un gran ejemplo como persona e investigador, y a Zorica que nos descubrió la "excelente" cocina Yugoslava.

A mi hermana Bea y a Kieron, probablemente dos de las personas más fuertes que conozco, y como no al "sinvergüenza".

A mis padres y a mi abuela, verdaderos coautores de este trabajo y sin los cuales, nunca habría podido llegar hasta aquí.

También quiero agradecer a Juan Mayor, el haberme puesto en el camino de la biología, contagiándome su entusiasmo por aprender.

"Por último agradecerle a John Huston su forma de dirigir, consiguiendo sacar lo mejor que cada actor puede dar de sí."

A mi novia, Patricia

INDICE

INDICE

I.- Introducción	1
I.1.- La "tristeza" del pimiento	2
I.1.1.- <i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>annuum</i>	3
I.1.2.- <i>Verticillium dahliae</i> Kleb.	4
I.2.- Interacción planta-patógeno	6
I.2.1.- Estrategias defensivas de las plantas	6
I.3.- Peroxidasas.....	17
I.3.1.- Peroxidasas vegetales.....	17
I.3.2.- Nomenclatura y clasificación.....	17
I.3.3.- Determinación de la actividad enzimática	18
I.3.4.- Naturaleza y estructura.....	19
I.3.5.- Polimorfismo.....	20
I.3.6.- Ciclo catalítico.....	22
I.3.7.- Especificidad de sustrato	23
I.3.8.- Localización tisular y subcelular.....	25
I.3.9.- Papel fisiológico en la respuesta a patógenos	26
I.4.- Lignificación	28
I.4.1.- Naturaleza, composición y distribución de las ligninas.....	29
I.4.2.- Diferencias entre gimnospermas y angiospermas	34
I.4.3.- Métodos de estudio de las ligninas	35
I.4.4.- Biosíntesis de ligninas.....	43
II.- Objetivos	65
III.- Material y métodos	67
III.1.- Material instrumental	68
III.2.- Reactivos	69
III.3.- Estudio de la lignificación en hipocotilos de <i>Z. elegans</i>	71
III.3.1.- Material vegetal.....	71
III.3.2.- Detección histoquímica de ligninas	71
III.3.3.- Especificidad de la reacción con el floroglucinol	72
III.3.4.- Análisis de ligninas de <i>Z. elegans</i> por tioacidólisis.....	72
III.3.5.- Oxidación de alcoholes cinamílicos y cinamaldehídos por paredes celulares del hipocotilo de <i>Z. elegans</i>	74
III.3.6.- Obtención de la actividad peroxidasa presente en el apoplasto de <i>Z. elegans</i>	75
III.3.7.- Cinética de la oxidación de los alcoholes cinamílicos y los cinamaldehídos por la peroxidasa del apoplasto de <i>Z. elegans</i>	76
III.3.8.- Caracterización de la actividad oxidasa/peroxidasa presente en el hipocotilo de <i>Z. elegans</i>	77
III.4.- Interacción <i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>annuum</i> - <i>Verticillium dahliae</i> Kleb. ..	80
III.4.1.- Material biológico	80
III.4.2.- Proceso de inoculación con <i>V. dahliae</i> Kleb	81
III.4.3.- Reaislamiento del hongo en plantas infectadas	81
III.4.4.- Efecto de la inoculación con <i>V. dahliae</i> Kleb. sobre la actividad peroxidasa de <i>C. annuum</i> L. var. <i>annuum</i>	82

III.4.5.- Efecto de la inoculación con <i>V. dahliae</i> sobre las ligninas de <i>C. annuum</i>	87
III.4.6.- Caracterización de la actividad oxidasa/peroxidasa presente en los tallos de <i>C. annuum</i>	88
III.4.7.- Efecto de la inoculación con <i>V. dahliae</i> sobre los fenoles presentes en <i>C. annuum</i>	89
III.4.8.- Efecto de la inoculación con <i>V. dahliae</i> sobre los sistemas antioxidantes de <i>C. annuum</i>	93
III.4.9.- Caracterización de la actividad tetrametilbenzidina-oxidasa presente en el tallo de <i>C. annuum</i>	94
III.4.10.- Efecto del óxido nítrico sobre la peroxidasa de <i>C. annuum</i> y de <i>Z. elegans</i>	94

IV.- Resultados y discusión.....97

IV.1.- Estudio de la lignificación en hipocotilos de <i>Z. elegans</i>	98
IV.1.1.-Cinamaldehydos en el xilema lignificante de <i>Z. elegans</i>	98
IV.1.2.- Oxidación de los alcoholes cinamílicos y de los cinamaldehydos por las paredes celulares aisladas de hipocotilos de <i>Z. elegans</i>	120
IV.1.3.- Naturaleza de la actividad peroxidasa de las paredes celulares de <i>Z. elegans</i>	122
IV.1.4.- Oxidación de los alcoholes cinamílicos y de los cinamaldehydos por la peroxidasa de hipocotilos de <i>Z. elegans</i>	125
IV.1.4.1.- Cálculo de los coeficientes de extinción de los alcoholes cinamílicos y los cinamaldehydos y de sus respectivas reacciones de oxidación.....	125
IV.1.4.2.- Cinéticas de la oxidación de los alcoholes cinamílicos y de los cinamaldehydos por la peroxidasa de hipocotilos de <i>Z. elegans</i>	135
IV.1.4.3.- Afinidad de la peroxidasa de <i>Z. elegans</i> por los alcoholes cinamílicos y los cinamaldehydos.....	152
IV.1.4.4.- Reactividad de la peroxidasa de <i>Z. elegans</i> frente a los alcoholes cinamílicos y los cinamaldehydos.....	156
IV.1.5.- Estudio histoquímico de la actividad oxidasa/peroxidasa presente en el hipocotilo de <i>Z. elegans</i>	157
IV.1.5.1.- Oxidación de la siringaldazina por las paredes del xilema de <i>Z. elegans</i>	158
IV.1.5.2.- Efecto del ácido ferúlico sobre la oxidación de la siringaldazina por el xilema lignificante de <i>Z. elegans</i>	162
IV.1.5.3.- Efecto de la tropolona sobre la oxidación de la siringaldazina por el xilema lignificante de <i>Z. elegans</i>	166
IV.1.5.4.- Efecto del ferrocianuro potásico y del ferricianuro potásico sobre la oxidación de la siringaldazina por el xilema lignificante de <i>Z. elegans</i>	168
IV.1.5.5.- Efecto del ácido metacloroperoxibenzoico sobre la oxidación de la siringaldazina por el xilema lignificante de <i>Z. elegans</i>	172
IV.1.5.6.- Naturaleza de la actividad siringaldazina-oxidasa presente en el xilema lignificante de <i>Z. elegans</i>	175
IV.2.- Interacción <i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>annuum</i> - <i>Verticillium dahliae</i> Kleb.....	177
IV.2.1.- Efecto de la inoculación con <i>Verticillium dahliae</i> sobre el desarrollo de plantas de <i>Capsicum annuum</i>	177
IV.2.2.- Penetración y avance del patógeno a través de la planta.....	179
IV.2.3.- Efecto de la inoculación con <i>V. dahliae</i> sobre la actividad peroxidasa de <i>C. annuum</i>	181

IV.2.3.1.- Evolución de la actividad peroxidasa a lo largo del proceso de infección	181
IV.2.3.2.- Isoelectroenfoque analítico	184
IV.2.3.3.- Fraccionamiento subcelular	186
IV.2.3.4.- Evolución de la actividad peroxidasa frente a otros sustratos artificiales	187
IV.2.3.5.- Infiltración al vacío de tallos y hojas	190
IV.2.4.- Caracterización de la actividad peroxidasa responsable de la lignificación en <i>Capsicum annuum</i>	195
IV.2.5.- Efecto de la inoculación con <i>Verticillium dahliae</i> sobre las ligninas de plantas de <i>Capsicum annuum</i>	203
IV.2.5.1.- Variación en la cantidad de ligninas	204
IV.2.5.2.- Tioacidolisis de paredes celulares de plantas control e inoculadas	208
IV.2.7.- Efecto de la inoculación de plantas de pimiento con <i>V. dahliae</i> sobre los fenoles presentes en la planta	225
IV.2.8.- Sistemas antioxidantes en la interacción <i>Capsicum annuum</i> - <i>Verticillium dahliae</i>	231
IV.2.8.1.- Actividad catalasa	232
IV.2.8.2.- Actividad ascorbato-peroxidasa	234
IV.2.8.3.- Localización del H ₂ O ₂	236
IV.2.9.- Localización de la peroxidasa y el peróxido de hidrógeno en el tallo de <i>Capsicum annuum</i>	238
IV.2.10.- Efecto del óxido nítrico sobre la peroxidasa	244
V.- Conclusiones	253
VI.- Bibliografía	257

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- LA TRISTEZA DEL PIMIENTO

La "tristeza" o "seca" del pimiento es la enfermedad de origen criptogámico más importante y con mayor trascendencia económica en el cultivo de esta solanácea. Los síntomas característicos de la enfermedad son fundamentalmente la pérdida de turgencia de los tejidos, lo que se traduce en marchitamientos parciales o totales, la menor intensidad del color verde en los órganos aéreos y el menor desarrollo global de la planta (Palazón y Palazón, 1989) (Fig.I.1).

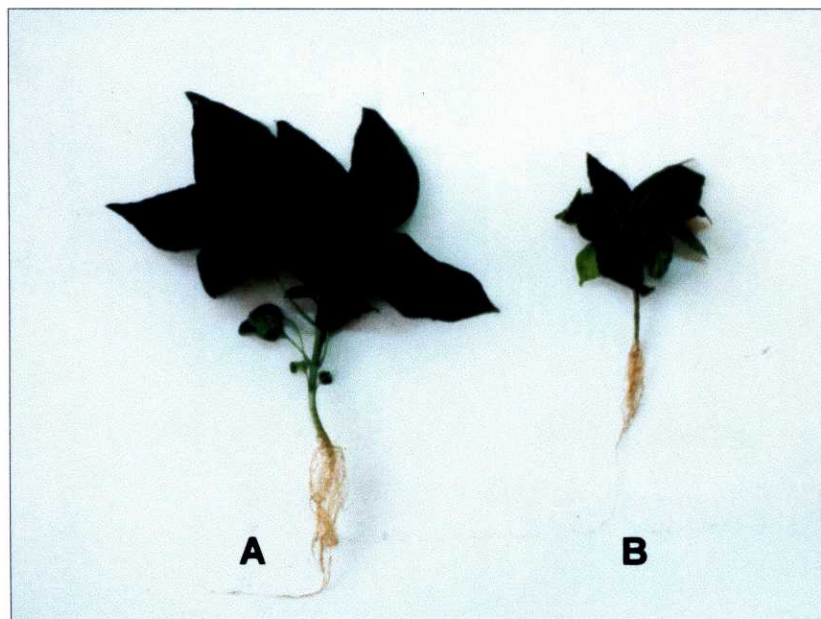


Figura I.1.- Aspecto de plantas de *C. annuum*, control (A) y enfermas por "tristeza" (B)

Los estudios etiológicos realizados por Palazón y col. (1978) han permitido determinar a los agentes responsables de las alteraciones que se pueden englobar dentro de lo que se conoce como "tristeza". Los tres agentes causales son la asfixia radicular y los hongos patógenos *Phytophthora capsici* Leon. y *Verticillium dahliae* Kleb.

I.1.1.- *Capsicum annuum* L. var. *annuum*

La mayor parte de los cultivos existentes de pimiento pertenecen a la especie *Capsicum annuum* L. variedad *annuum*, familia *Solanaceae*.

El pimiento es una planta anual, herbácea, con un sistema radicular pivotante y profundo, provisto y reforzado por un número elevado de raíces adventicias. El tallo es de crecimiento limitado y erecto, con un porte que varía entre 0,5-1,5 m. Las hojas son lampiñas, enteras, ovalanceoladas con el ápice muy pronunciado.

Las flores son hermafroditas, aparecen solitarias en cada nudo y son de inserción aparentemente axial, la corola simpétala de color blanco y el cáliz coriáceo y persistente en el fruto.

El fruto es carnoso, pluricarpelar sincárpico, unilocular y polispermo de placentación central, tratándose de una baya semicartilaginosa hueca. Las semillas redondas, ligeramente reniformes, de color paja y de entre 3 y 5 mm de longitud, se insertan en la placenta cónica de disposición central.

Casi todas las especies de pimiento son originarias de la zona tropical e intertropical de América del Sur, en la región comprendida entre Bolivia y Perú. Después del descubrimiento de América el pimiento llegó a España, y por sus especiales características fue muy pronto utilizado como substitutivo de la pimienta, que en estos tiempos todavía era un monopolio de los mercaderes italianos, y por lo tanto de precio muy elevado.

La introducción del pimiento en Galicia parece tener su origen en unas semillas traídas por los monjes Franciscanos a su casa de Misiones de Herbón, en el siglo XVII, extendiéndose su cultivo en el siglo XVIII, hecho motivado por su rápida aclimatación al suelo de Galicia y considerándose habitual en la dieta, desde entonces.

En la actualidad, esta variedad de *Capsicum annuum* es altamente apreciada por los consumidores; se cultiva en diferentes lugares de Galicia además de en la comarca de Padrón, en la de Bergantiños en la provincia de A Coruña y en la zona de Cambados y el Rosal en la provincia de Pontevedra.

I.1.2.- *Verticillium dahliae* Kleb.

Verticillium dahliae es un Deuteromiceto perteneciente al orden *Moniliales*, familia *Moniliaceae*, género *Verticillium*. La verticilosis es una enfermedad universalmente extendida, pero no suele ser grave, salvo en zonas de cultivo con temperaturas moderadas. En España, es considerada el principal problema patológico del pimiento en los cultivos al aire libre en el Valle del Ebro (Nuez y col., 1996).

Las condiciones óptimas de infección para *V. dahliae* son una temperatura de 24°C y agua abundante, con una gama de temperaturas favorables entre 21° y 27°C. Esta especie forma conidióforos que son erectos, septados y ramificados con las ramificaciones cortas formando verticilos (Fig.1. 2).

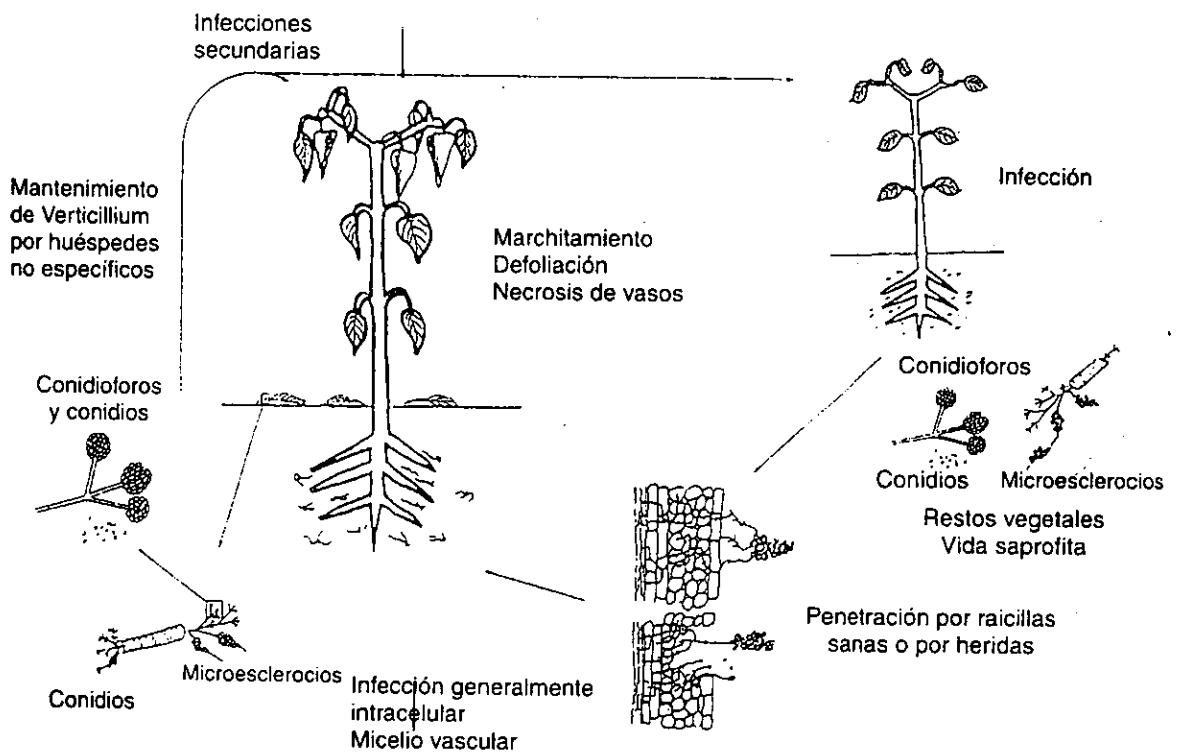


Figura I.2.- Ciclo de infección de *V. dahliae* en pimiento (tomado de Nuez y col., 1996)

Los conidios se forman en posición terminal y pueden encontrarse solos o formando pequeños grupos (Melouk, 1992). En condiciones adversas puede formar estructuras de resistencia, microesclerocios, que le van a permitir vivir durante muchos años en el terreno (Palazón y col., 1978)

Verticillium dahliae es un hongo de profundidad y su vía de entrada lo constituye el sistema radicular de la planta. Inicialmente se produce una ligera marchitez y un enrollamiento de las hojas adultas; el ápice y el borde de estas hojas se vuelven amarillos y más tarde pardos. Posteriormente, el marchitamiento afecta a toda la planta y las hojas amarillean y caen. El floema del tallo es ocluido por el hongo y presenta una coloración parda. Un síntoma típico es la marchitez unilateral en algunas ramificaciones de la planta, debido a infecciones sectoriales de los vasos, permaneciendo sanas el resto. Cuando la infección afecta a plantas muy jóvenes provoca enanismo y mal desarrollo de las plantas, sin que lleguen a morir en la mayoría de los casos (Nuez y col., 1996; Palazón y col., 1978).

Las características morfológicas de *V. dahliae* le confieren, mediante los microesclerocios, una especial adaptación a las condiciones de supervivencia, que puede producirse incluso en ausencia de huésped, llegando a sobrevivir hasta 14 años en el suelo (Palazón y Palazón, 1989).

I.2.- INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

El resultado de la interacción entre una planta huésped y un microorganismo patógeno depende tanto de la naturaleza de la planta como del microorganismo, sin olvidar el importante papel que juega el medio ambiente en el cual tiene lugar la interacción.

Si atendemos a la naturaleza del huésped, nos encontramos con plantas, conocidas como resistentes, que pueden detener el desarrollo de los patógenos aún cuando estos ya han penetrado, y otras que son incapaces de detener el desarrollo de la enfermedad y que se denominan susceptibles. Esta resistencia o susceptibilidad se ve condicionada por diversos factores como son la edad de la planta o su estado fisiológico.

Por su parte los patógenos, una vez que han sido capaces de penetrar en la planta, pueden llegar a producir la enfermedad, siendo considerados entonces virulentos, o no desarrollarla, siendo en este caso avirulentos. Estas categorías tanto del huésped como del patógeno no son más que los extremos de unos amplios rangos de comportamiento.

En resumen, dependiendo de la naturaleza tanto de la planta como del patógeno pueden aparecer interacciones donde se desarrolla la enfermedad, denominadas interacciones compatibles, y otras donde no se desarrolla, conocidas como interacciones incompatibles.

I.2.1.-Estrategias defensivas de las plantas

Las plantas, a lo largo de su vida, están sometidas a la presión de innumerables patógenos, sin embargo la mayoría permanecen en estado sano durante la mayor parte del tiempo, convirtiendo a las plantas enfermas en una verdadera excepción. Este hecho, unido al anteriormente citado de la existencia de plantas resistentes capaces de impedir el desarrollo de los patógenos, es un claro indicio de la presencia de ciertos mecanismos defensivos en las plantas. Estos mecanismos son tanto de naturaleza física

como química y pueden estar presentes en la planta antes del ataque del patógeno, considerándose entonces como un sistema pasivo de defensa o bien, ser inducidos por la invasión del microorganismo considerándolos en este caso como un sistema de defensa activo.

1.2.1.1.-Sistemas pasivos de defensa

La microflora típica de la superficie de la planta puede actuar como primera barrera ante un patógeno, ya que se encuentra perfectamente adaptada al medio y supondría una gran presión competitiva para el desarrollo del patógeno.

Sin embargo, la primera gran barrera, propia de la planta, que se encuentra el patógeno, es la cutícula. La cutícula es una capa de ceras y ésteres que aporta a la planta una superficie altamente hidrofóbica. Aunque habitualmente los patógenos aprovechan heridas o aberturas en la cutícula, como los estomas, para penetrar en la planta, se ha descrito en muchas especies la existencia de ciertas enzimas de carácter degradativo conocidas como cutinasas (Dickman y col, 1989).

1.2.1.1.1.- Sistemas bioquímicos preformados

Las plantas sintetizan una gran cantidad de metabolitos secundarios potencialmente tóxicos para los patógenos. Compuestos como los fenoles, alcaloides, saponinas, taninos y resinas poseen actividades antibióticas que podrían contribuir a la resistencia ante los patógenos.

Además de sustancias eminentemente tóxicas, las plantas presentan una serie de proteínas y enzimas preformadas, capaces de afectar a los hongos patógenos. Ejemplos de estas proteínas son las hidrolasas de tipo quitinasas o glucanasas que atacarían directamente a las paredes del hongo, o proteínas inhibidoras de las enzimas fúngicas que protegerían a la planta de la actividad lítica de estas.

I.2.1.2.- Sistemas activos de defensa

Los sistemas activos de defensa de las plantas incluyen una gran cantidad de mecanismos y estrategias distintas, desde la formación de barreras físicas hasta la síntesis *de novo* de sustancias con carácter tóxico.

El desarrollo o no de estos sistemas activos determinará el carácter compatible o incompatible de la interacción. Hay bastantes datos que apuntan a la posibilidad de que el reconocimiento que determina la susceptibilidad o la resistencia, tiene lugar poco después de la penetración. En relación con este reconocimiento, Flor en 1942 propuso la hipótesis "gen a gen", que aún hoy en día es reconocida como un sistema válido. Según la hipótesis "gen a gen", generalmente los genes de resistencia del huésped son dominantes (R) y los de susceptibilidad son recesivos (r), así mismo en el caso del patógeno los genes avirulentos son los dominantes (A) siendo los virulentos los recesivos (a). Este sistema de dos genes, daría como resultado cuatro combinaciones distintas, en tres de ellas R-a, r-A y r-a no se produce un reconocimiento y la consecuente respuesta por parte de la planta y la interacción es compatible, sólo en el caso R-A se produce el reconocimiento y respuesta y el proceso resulta incompatible.

Una vez producido el reconocimiento específico del patógeno por parte de la planta, cabe la posibilidad de que se desencadene una respuesta hipersensible o no. Esta respuesta provocaría en las plantas resistentes la muerte de las células invadidas, por medio de procesos de apoptosis, acompañados de cambios en el metabolismo oxidativo, con la generación de especies activas de oxígeno (AOS), síntesis de sustancias tóxicas, y lignificación de las paredes celulares. En el caso de plantas susceptibles esta muerte no se produce lo que proporciona al hongo el ambiente necesario para la obtención de nutrientes, y la respuesta bioquímica de las células adyacentes no se desencadena, con lo que el patógeno puede continuar su desarrollo invadiendo toda la planta y provocando la aparición de la enfermedad.

1.2.1.2.1.- Cambios en el metabolismo oxidativo, generación de AOS

El oxígeno molecular es poco reactivo en los sistemas biológicos, pero en algunos casos puede llegar a ser muy reactivo cuando su estructura electrónica se altera. La reducción monoelectrónica del O_2 da como resultado la formación de ión superóxido (O_2^-), que puede ser posteriormente reducido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y finalmente a agua.

El superóxido puede dismutar espontáneamente a H_2O_2 y a O_2 a pH neutro, o ligeramente ácido, o mediante la reacción catalizada por la superoxido dismutasa (SOD), dando lugar a la formación de cantidades importantes de H_2O_2 . El H_2O_2 es un oxidante relativamente estable, y menos reactivo con las moléculas biológicas que el O_2^- . Esta sustancia puede oxidar metales de transición como el Fe^{2+} , u oxidar moléculas orgánicas, generalmente en reacciones catalizadas por la peroxidasa.

El OH^\cdot se forma a través de la reacción de Haber – Weiss y su vida media es del orden de microsegundos. Como consecuencia de ello únicamente puede reaccionar con materiales localizados en el lugar de su generación.

Otra especie activa es el oxígeno singlete (1O_2), el cual resulta de la excitación fotoquímica del oxígeno (Baker y Orlandi, 1995).

Las especies activas de oxígeno son producidas de modo controlado dentro de compartimentos específicos y participan en el metabolismo de las plantas (Scandalios, 1993). Su acumulación aumenta por la exposición a estrés ambiental, químico y factores microbianos (Sutherland, 1991), y su sobreproducción conduce al estrés oxidativo y al daño celular (Scandalios, 1993). Mientras el radical hidroxilo y el oxígeno singlete son muy reactivos y su producción es minimizada, el ion superóxido y el peróxido de hidrógeno son sintetizados en altas concentraciones incluso en condiciones óptimas de la planta.

Por otro lado, las AOS participan de forma positiva en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Algunos estudios muestran la importancia del H_2O_2 , ya que participa en la polimerización de la lignina, en el entrecruzamiento de proteínas de la pared celular (Otte y Barz, 1996), en la regulación de la

expresión de genes relacionados con la patogénesis (Chen y col., 1995) y la estimulación de la respuesta hipersensible (Levine y col., 1994; Lamb y Dixon, 1997). Además, tanto el O_2^- como el H_2O_2 , actúan como agentes antimicrobianos (Peng y Kuc, 1992) y pueden jugar un papel significativo en la inducción de otros mecanismos de defensa (Levine y col., 1994).

La vida de las especies activas de oxígeno en el ambiente celular está determinado por el sistema antioxidante que suministra una protección crucial contra el daño oxidativo. En los organismos biológicos existen sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Halliwell y Gutteridge, 1989) que permiten controlar los niveles de estas especies activas de oxígeno. Estos sistemas tienden a impedir fundamentalmente la formación de los radicales nocivos hidroxilo (OH^\cdot), mediante la eliminación de sus precursores: los radicales superóxido y el peróxido de hidrógeno. Los sistemas antioxidantes enzimáticos incluyen a las metaloenzimas catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y la ascorbato peroxidasa (APX). La prevalencia e importancia de estos sistemas que detoxifican o eliminan especies activas de oxígeno delimitan el balance crítico entre estas sustancias y la supervivencia de las células.

Recientemente, se ha propuesto la participación de una nueva especie activa de nitrógeno en los procesos de respuesta de las plantas, el óxido nítrico (NO). El NO es un radical libre relativamente estable que juega un papel importantísimo en gran cantidad de procesos fisiológicos de animales. Su síntesis es debida a la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) (Knowles, 1997) y sus propiedades reguladoras se basan en su capacidad para unirse a hemoproteínas. Trabajos recientes apuntan a la posibilidad de que el NO tenga un importante papel como mensajero en la fisiología de los vegetales. Así, se ha visto como el NO promueve la acumulación de fitoaléxinas en la patata (Noritake y col., 1996), e incluso se ha propuesto que el NO juega un papel importante como señal en los procesos de resistencia de las plantas (Delledone y col., 1998; Durner y col., 1998).

1.2.1.2.2.- Síntesis de novo de sustancias con carácter tóxico (fitoalexinas)

El término fitoalexina fue usado por primera vez por Müller y Börger en 1940, para nombrar a una serie de sustancias defensivas que producían los tubérculos de la patata ante la infección por *Phytophthora infestans*, aunque actualmente la definición más ampliamente aceptada es la dada por Paxton en 1981: "Fitoalexinas son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular que se biosintetizan y se acumulan en células vegetales tras el contacto con microorganismos".

Sin embargo, algunas fitoalexinas pueden ya existir en las plantas antes incluso de la infección. Asimismo, su síntesis y acumulación no es sólo específica de infecciones por patógenos ya que otros tipos de estrés tanto químicos, y físicos como mecánicos, pueden provocar su síntesis (Friend, 1981).

La acción defensiva de las fitoalexinas está condicionada por la velocidad de su síntesis y por las concentraciones que alcancen. Para proporcionar protección contra los hongos patógenos, las fitoalexinas han de tener actividad fungitóxica pero además deben acumularse de forma rápida y en concentraciones lo suficientemente grandes.

El capsidiol es la fitoalexina conocida más importante sintetizada por *Capsicum annuum*. Actúa de manera fungistática inhibiendo el crecimiento de *P. capsici*. En un estudio llevado a cabo por Egea y col. (1996) se observa que la acumulación del capsidiol está directamente relacionada con la invasión fúngica y que la cantidad de la fitoalexina decrece en el tallo a medida que nos alejamos de la zona de necrosis. Esto confirma el papel del capsidiol en la inhibición del hongo y su relación con la resistencia a la enfermedad.

1.2.1.2.3.- Compuestos fenólicos

Un grupo de sustancias ampliamente distribuidas por todo el reino vegetal, y que se ha relacionado con la resistencia a enfermedades en las plantas, son los compuestos fenólicos (Dixon y Paiva, 1995). Algunos fenoles aparecen constitutivamente en la planta e inhiben el crecimiento de diferentes

patógenos. Otros se forman en respuesta al ataque del patógeno y su aparición es considerada como una parte activa de la respuesta de defensa (Nicholson y Hammerschmidt, 1992).

Numerosos estudios muestran que los fenoles de bajo peso molecular, tales como el ácido benzoico y los fenilpropanoides, se forman como respuesta primaria ante la infección. Los compuestos fenólicos se acumulan rápidamente durante la interacción huésped-patógeno y median en la supresión de la enfermedad por medio de la inactivación de enzimas, o mediante la formación de componentes estructurales de la planta. La inducción de ésteres de ferulato o ésteres fenólicos de la pared celular puede actuar directamente como compuestos de defensa, o indirectamente como precursores de la síntesis de lignina, suberina y otras barreras de polifenoles inducidos por las heridas.

Se ha comprobado que el contenido de ácido clorogénico en tubérculos de patata es más alto en cultivares resistentes a la enfermedad causada por *Streptomyces scabies* que en los susceptibles. Este compuesto se encuentra en los tejidos más externos donde se produce la multiplicación del patógeno, y en los tejidos que se encuentran alrededor de las lenticelas, que son los lugares donde se produce la infección (Oku, 1994). Según McLean y col. (1961) la cantidad de o-di-fenoles, principalmente de ácido clorogénico, en el córtex de tubérculos recién recolectados se relaciona con la resistencia en campo a *Verticillium*, encontrándose en las variedades susceptibles un contenido menor en fenoles.

También se ha visto que variedades de maíz con alto contenido en ácido ferúlico son más resistentes al ataque de *Sitophilus zeamais* que aquellas con un bajo contenido (McKeehen y Fulcher, 1997).

Los derivados polifenólicos tales como el ácido clorogénico, el ácido cafeico, las flavonas, etc., son fácilmente oxidados por enzimas oxidativas de las plantas o de los microorganismos. Debido a ésto, es difícil saber con exactitud si la actividad antibiótica de los fenólicos se debe a ellos mismos o a sus productos de oxidación.

En el mecanismo de actividad antimicrobiana de los polifenoles se ha demostrado que los productos formados por oxidación de los compuestos fenólicos inhiben enzimas importantes debido a la oxidación de grupos esenciales SH. La actividad inhibidora de los polifenoles sobre las enzimas pectolíticas de los hongos patógenos debe contribuir a proporcionar resistencia a la planta, impidiendo el crecimiento del patógeno (Oku, 1994).

En el pimiento de Padrón, *Capsicum annuum* L. var. *annuum* se ha observado la presencia de manera constitutiva de los ácidos clorogénico, ferúlico y cafeico (Díaz y col., 1997). Algunos autores han relacionado el contenido en estos y otros compuestos fenólicos con la resistencia a *P. capsici* (Candela y col., 1995; Díaz y col., 1998).

1.2.1.2.4.- Cambios en la pared celular

La primera respuesta detectable de una célula vegetal a un microorganismo invasor es, por lo general, una alteración de la morfología o propiedades de la pared celular. Los cambios más frecuentes que se han estudiado como respuesta a la infección son la deposición de calosa, la deposición de suberina, la deposición de fenoles oxidados como las melaninas, la acumulación de calcio, azufre o silicio, y la lignificación.

Al contrario de otras respuestas defensivas, como la síntesis de fitoalexinas, cuya acción se puede cuantificar *in vitro*, el papel de los cambios en la pared celular difícilmente puede ser valorado de una forma experimental directa.

El hecho de que una infección por un hongo provoque la formación de ciertas estructuras, conocidas como papilas, ha sido descrito ya hace mucho tiempo (DeBary, 1863). Estos depósitos están constituidos en su mayoría por carbohidratos de tipo celulosa y calosa, y actúan como barreras físicas, deteniendo el desarrollo de las hifas del hongo, e impidiendo el movimiento de nutrientes o toxinas entre las células del huésped y las hifas del hongo. En ocasiones estos depósitos contienen altas concentraciones de fitoalexinas,

actuando como una barrera fungitóxicas (Mansfield, 1982). En muchas ocasiones estas papilas tienen un alto contenido en lignina.

La lignina se puede acumular en respuesta a la penetración del hongo, provocando la aparición de una barrera física contra el avance del patógeno. La lignificación inducida provoca que las paredes celulares sean mucho más resistentes a una penetración mecánica e incluso a la degradación enzimática, ya que la lignina puede proteger físicamente a los polisacáridos de la pared de las enzimas degradativas del hongo. Así mismo, los precursores fenólicos de la lignina podrían presentar actividades antifúngicas.

Vance y Sherwood en 1976, observaron como la infección con *Helminthosporium avenae* provocaba en los tejidos de la planta un gran aumento en el contenido de lignina y un aumento en la actividad de enzimas relacionadas con su síntesis, como son la fenilalanina amonio liasa, la hidroxicinamil-coA ligasa y las peroxidases.

Recientemente, Smit y Dubery (1997) comprobaron que los hipocotilos de algodón endurecían su pared celular, tras el tratamiento con un elicitador de *Verticillium dahliae*. Tras la exposición al elicitador, se produce un aumento en la deposición de lignina y polímeros fenólicos similares a la lignina. Este aumento en la lignificación se ve acompañado de un aumento en la actividad de enzimas relacionadas con su síntesis. Comparando un cultivar resistente con uno susceptible, se vio que en el caso del primero la respuesta fue mucho más rápida y de mayor intensidad que en el segundo, tanto en lo que se refiere a las actividades enzimáticas, como a la deposición de ligninas. Smit y Dubery proponen a la vista de estos resultados que la efectividad de la respuesta de defensa depende tanto de la velocidad como de su intensidad. Los procesos y mecanismos de lignificación se tratan en mayor profundidad en el apartado 1.3.

1.2.1.2.5.- Proteínas y enzimas

Proteínas PR

Las proteínas PR, o proteínas relacionadas con la patogénesis, han sido ampliamente estudiadas en gran cantidad de interacciones entre plantas y

patógenos. Todas ellas comparten una serie de características comunes, entre ellas su gran estabilidad y resistencia a la degradación por parte de enzimas proteolíticas. Sin embargo, el descubrimiento cada vez más amplio de nuevas proteínas PR, ha hecho necesario su clasificación dentro de distintos grupos. Por su actividad enzimática es necesario destacar las PR-2, con carácter β -1,3-glucanasa, y las PR-3, con actividad quitinasa. Las glucanasas y las quitinasas son enzimas capaces de degradar β -1,3-glucano y quitina, respectivamente. Estos dos polímeros son los mayores componentes en las paredes celulares de los hongos patógenos. En ciertas plantas la expresión de las glucanasas y las quitinasas se produce coordinadamente tras la infección por un patógeno, formación de heridas o tratamiento con etileno, y su aparición se ha relacionado con procesos de resistencia (Vogeli y col., 1988).

Proteínas estructurales de pared

Estas proteínas juegan un papel fundamental tanto en la estructura de la pared celular y en el control de su desarrollo y crecimiento, como en procesos de resistencia a patógenos (Cassab y Varner, 1988).

Se han descrito tres grupos principales de proteínas estructurales de la pared: las proteínas ricas en prolina, las proteínas ricas en glicina y un tercer grupo, probablemente el más extensamente estudiado, constituido por las extensinas y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs).

Este último grupo son proteínas altamente glicosiladas y de naturaleza básica, y juegan un papel central en la organización de la pared celular, pero también se ha descrito su acumulación ante la invasión por patógenos o por la formación de heridas. Los polipéptidos de extensina se sintetizan en el interior de la célula, y son secretados a la matriz de la pared donde son progresivamente insolubilizados por la acción de las peroxidases.

Actividades enzimáticas

Durante todas las respuestas de las plantas ante los patógenos, se produce el incremento de gran cantidad de enzimas. Unas estarían implicadas

directamente en la defensa frente al hongo, como las glucanasas y quitinasas, y otras actuarían secundariamente en otros procesos. Este sería el caso de aquellas enzimas implicadas en la síntesis de fitoalexinas, o en la generación y control de las especies activas de oxígeno.

Entre todas estas enzimas, destacan por su gran plasticidad metabólica las peroxidasas. Las peroxidasas han sido implicadas en procesos de entrecruzamiento de proteínas en la pared celular, metabolismo de fenoles y su unión a la matriz de la pared, uso de AOS como el H_2O_2 y procesos de lignificación. Debido a esta gran importancia y a ser uno de los centros de nuestro estudio abordamos ahora un apartado dedicado a su naturaleza, estructura y modo de acción.

I.3.- PEROXIDASAS

I.3.1.-Peroxidasas vegetales

Las peroxidasas (POD EC. 1.11.1.7, H₂O₂: donador de hidrógeno: H₂O₂ oxidorreductasas), constituyen un grupo de enzimas cuya función primaria es la de oxidar diversos substratos a expensas del H₂O₂ en dos pasos consecutivos monoeléctricos.

El primer estudio de las peroxidasas se remonta a 1855, año en el que Schönbein observó como ciertos extractos procedentes de plantas y animales eran capaces de provocar la oxidación de compuestos orgánicos por medio de soluciones diluidas de H₂O₂ (Saunders y col., 1964).

Durante el periodo comprendido entre 1918 y 1931 la enzima fue caracterizada y purificada. Estudios posteriores demostraron que las peroxidasas se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas y se hallaron nuevos substratos susceptibles de ser oxidados (Saunders y col., 1964).

I.3.2.- Nomenclatura y clasificación

Las peroxidasas están ampliamente distribuidas en el Reino Vegetal, habiéndose encontrado en Clorofitas (Vanden Driessche y col., 1984; Weger, 1997), Euglenofitas (Shigeoka y col., 1980), Rodofitas (Collen y col., 1994), Briofitas (Matlok y col., 1989), Pteridofitas (Bakardjieva y col., 1996) y en todas las Espermatofitas estudiadas (Siegel, 1993).

Las peroxidasas se clasifican en dos grandes superfamilias, una que incluye las peroxidasas vegetales, fúngicas y bacterianas, y otra superfamilia no relacionada estructuralmente con la anterior constituida por las peroxidasas animales (Welinder, 1992). A su vez, dentro de la superfamilia de peroxidasas vegetales, fúngicas y bacterianas se han definido tres clases atendiendo a las diferencias estructurales existentes entre ellas (Welinder, 1992):

-Clase I: este grupo incluye la citocromo c peroxidasa mitocondrial de levaduras, la ascorbato peroxidasa cloroplástica y citosólica de plantas superiores y la peroxidasa bacteriana. No poseen naturaleza glicoproteica, están localizadas en cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y citosol, y muestran una moderada especificidad de sustrato para el ácido ascórbico. Adicionalmente, estas peroxidasas de la clase I son inhibidas por reactivos del grupo tiol, como el *p*-mercurobenzoato, y en general son consideradas como muy termolábiles.

-Clase II: constituida por todas las peroxidasas fúngicas de secreción (manganeso peroxidasas).

-Clase III: agrupa a todas las peroxidasas vegetales de secreción y muestran características distintas a otras peroxidasas vegetales. Son de naturaleza glicoproteica, están localizadas en las vacuolas y en las paredes celulares, muestran una baja especificidad de sustrato y presentan una gran estabilidad térmica. Todas estas características las distinguen de las ascorbato peroxidasas vegetales (clase I).

Las peroxidasas vegetales de secreción agrupadas en la clase III son las estudiadas en este trabajo y de ellas nos ocuparemos en lo sucesivo.

1.3.3.- Determinación de la actividad enzimática

Los métodos utilizados para la determinación de la actividad peroxidasa son sencillos, ya que se basan en la estimación espectrofotométrica directa de la aparición de productos de reacción coloreados. Son muchos los sustratos utilizados, entre los que cabe destacar el guayacol, el 4-metoxi- α -naftol (4-MN) el ácido 2,2'-azino-di-[3-etil-benzotiazolino-(6)-sulfónico] (ABTS), la tetrametilbenzidina (TMB) y determinadas aminas aromáticas como la o-dianisidina, la *p*-fenilendiamina o la mesidina (cada vez menos utilizadas por sus propiedades carcinogénicas).

1.3.4.- Naturaleza y estructura

Las peroxidasas vegetales de secreción son glicoproteínas cuyo peso molecular generalmente está comprendido entre 40 y 45 kDa. Contienen como grupo prostético una molécula de protohemina IX (hemo b) y en su estado nativo el átomo de hierro se encuentra en el estado de oxidación +3 [Fe(III)]. El hierro está pentacoordinado con los cuatro átomos de nitrógeno pirrólicos del grupo hemo y con un átomo de nitrógeno de un residuo de histidina de la proteína. El sexto lugar de coordinación permanece libre, lo que determina el estado de alto espín del hierro (Banci, 1997). El grupo prostético es esencial para la actividad enzimática puesto que su eliminación provoca la total inactivación de la enzima (Chibbar y col., 1984).

Estudios cristalográficos con una resolución de 3.1 Å han revelado que la isoenzima E5 de la peroxidasa de rábano presenta 10 hélices α (A-J), que encierran el grupo prostético, y cuatro puentes disulfuro.

En la estructura plegada se observa comúnmente la presencia de dos iones Ca^{2+} estructurales (Barber y col., 1995) necesarios para su estabilidad (Pappa y Cass, 1993). Además de estabilizar la estructura plegada, el Ca^{2+} también es considerado un activador de las peroxidasas vegetales de secreción (Iori y col., 1995; Converso y Fernández, 1996). En la peroxidasa catiónica de cacahuete se ha descrito la presencia de un ion de Mn^{2+} por molécula de enzima, ion aparentemente ausente en la isoenzima aniónica (Rodríguez-Marañón y col., 1994). La presencia adicional de Mn^{2+} en las isoperoxidasas básicas podría ser responsable del mayor potencial de reducción observado para el par Fe(II)/Fe(III) (Ricard y col., 1972), como ocurre con las manganeso-peroxidasas de hongos (Banci, 1997). Si la presencia de Mn^{2+} es una característica general de la mayoría de las peroxidasas básicas es una cuestión que merece estudios adicionales.

Los cADNs que codifican para la peroxidasa han sido aislados de varias especies vegetales incluyendo *Arabidopsis thaliana* (Ostergaard y col., 1996), *Zea mays* (Teichmann y col., 1997) e *Ipomoea batatas* (Huh y col., 1997).

Todos los genes de peroxidasas vegetales secuenciados hasta ahora tienen un péptido señal de entrada en el retículo endoplásmico y algunas, como en el caso de la peroxidasa de rábano C y la peroxidasa 1 de cebada, también poseen un propéptido carboxi-terminal que puede ser responsable de su deposición en las vacuolas (Welinder, 1992). No obstante, los péptidos señal presentes en la estructura primaria de las peroxidasas que condicionan su localización final en la célula vegetal (vacuola o pared celular) todavía están por determinarse completamente.

La glicosilación de la enzima varía entre el 0 y el 25 %, siendo los principales glúcidos N-acetilglucosamina, manosa, fucosa y xilosa; entre estos la manosa es frecuentemente la mayoritaria (Gray y col., 1996; Yang y col., 1996). La glicosilación es uno de los factores principales responsables de la gran estabilidad térmica de las peroxidasas vegetales de secreción (McEldoon y Dordrick, 1996) ya que las formas desglicosiladas frecuentemente muestran una menor estabilidad térmica (Sánchez-Romero y col., 1994). A su vez, la desglicosilación parcial de la enzima provoca un cambio en las constantes cinéticas, favoreciendo la activación por Ca^{2+} de la peroxidasa de aguacate (Sánchez-Romero y col., 1994).

1.3.5.- Polimorfismo

Las peroxidasas vegetales de secreción son un grupo de enzimas altamente polimórficas. Para el estudio de este polimorfismo se han usado gran cantidad de técnicas de separación. Debido a la baja resolución y problemas de convección de los sistemas electroforéticos sobre papel o sobre geles de almidón, y a los problemas de penetración de las glicoproteínas durante su electroforesis sobre geles de poliacrilamida (Jennings y Street, 1974), las técnicas de isoelectroenfoque han desplazado a las anteriores en los últimos años.

De acuerdo con su punto isoeléctrico (pI), las isoenzimas de peroxidasa se clasifican en:

-Ácidas ($pI < 7.0$)

-Básicas:

-Moderadamente básicas ($7.0 < pI < 9.0$)

-Fuertemente básicas ($pI > 9.0$)

Estos distintos grupos muestran una diferente localización subcelular pero una especificidad de sustrato similar (Ros Barceló y col., 1998). El elevado grado de polimorfismo, junto con las parecidas propiedades bioquímicas es uno de los factores que más desconcierta a la mayoría de los investigadores que estudian las funciones metabólicas de estas enzimas.

Entre las explicaciones a este gran polimorfismo se han apuntado mecanismos que operan a nivel del genoma, y que implican la transcripción diferencial de ARNs que codifican para cadenas polipeptídicas distintas (Scandalios, 1979).

Sin embargo, no todas las isoperoxidasas son producto de la expresión de distintos genes. Así, en rábano se han secuenciado nueve genes distintos, con una homología de entre el 50 y el 95 % (Welinder, 1992). Sin embargo, la resolución de isoenzimas de la peroxidasa de rábano por isoelectroenfoque revela la existencia de 42 isoenzimas (Hoyle, 1977). El gran polimorfismo observable por isoelectroenfoque indica que más de una de las posibles isoenzimas pueden originarse por modificaciones post-transcripcionales resultantes de diferentes patrones de glicosilación (Green y Oliver, 1991). Por otra parte, el polimorfismo y heterogeneidad de la enzima puede provenir por modificación covalente o alteraciones conformacionales, incluyendo interacciones alostéricas con componentes de bajo peso molecular, por ejemplo los fenoles presentes en la célula vegetal (Ros Barceló y col., 1987). Estas interacciones también pueden modificar sus propiedades catalíticas (Ros Barceló y Muñoz, 1989), ampliando así su papel metabólico.

1.3.6.- Ciclo catalítico

Las peroxidasas presentan una reactividad singular: como hemoproteínas, las peroxidasas guardan relación estructural con los citocromos (integrantes de las cadenas de transporte electrónico mitocondrial y cloroplástica) y con las proteínas que unen oxígeno molecular (mioglobina del músculo y hemoglobina sanguínea). De acuerdo con su similitud, las peroxidasas, como los citocromos, sufren reacciones redox entre las formas férricas y ferrosas de la enzima y, al igual que la hemoglobina y la mioglobina, son capaces de ligar oxígeno. Estas dos propiedades justifican su bien establecido mecanismo de acción.

El ciclo catalítico, propuesto inicialmente por Chance (1952) para la peroxidasa de rábano, se representa en la Figura 1.3.

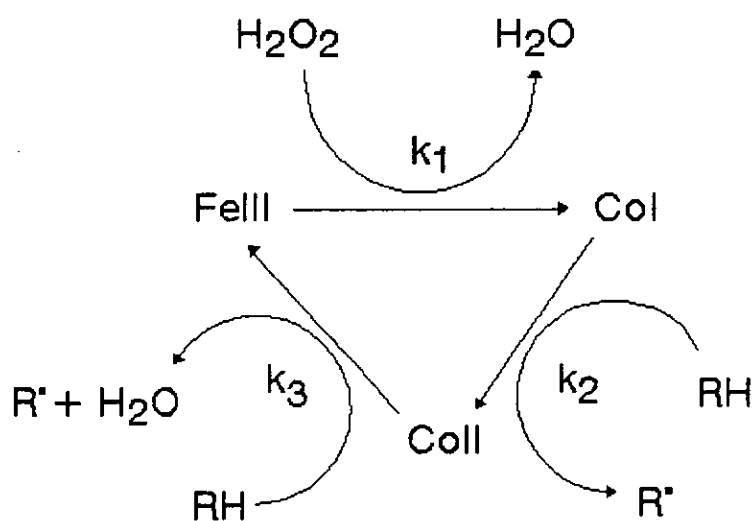


Figura 1.3. Ciclo catalítico de la peroxidasa (Chance, 1952).

El H_2O_2 oxida a la forma férrica de la enzima (FeIII) para dar el compuesto I (CoI), un intermediario de la enzima descrito como un catión radical de naturaleza oxiferril porfirina π (Fujita y col., 1983). A continuación, el CoI acepta un electrón y un protón de un sustrato produciendo su

correspondiente radical libre (R^*) y el intermediario hemo oxiferrilo conocido como compuesto II (Coll). Finalmente, la reducción monoelectrónica del Coll por una segunda molécula de sustrato regenera de nuevo la forma férrica, FeIII, cerrando, así, el ciclo catalítico de la enzima.

En ausencia de H_2O_2 , y presencia de un reductor de FeIII, el ciclo catalítico puede ser completado con otros intermediarios de la enzima, la ferroperoxidasa (Fell) (formado por reducción de la forma férrica) y el compuesto III (Coll), producto de la unión de la forma ferrosa con oxígeno molecular.

Una de las características de las reacciones catalizadas por las peroxidasas es la producción de radicales libres del sustrato. Estos radicales inestables pueden o bien dismutar, o generar por acoplamiento dímeros o polímeros u oxidar a otros sustratos secundarios en reacciones no enzimáticas.

1.3.7.- Especificidad de sustrato

Las peroxidasas son enzimas altamente inespecíficas, característica que está principalmente determinada por los altos potenciales de oxidación de los intermediarios activos de las peroxidasas, Col y Coll, que los convierte en agentes oxidantes adecuados para todos los compuestos químicos que donen un electrón o un átomo de hidrógeno. Así, las peroxidasas son capaces de oxidar a una amplia variedad de compuestos naturales, como la extensina de la pared vegetal (Brady y Fry, 1997; Brownleader y col., 1997), el ácido indol-3-acético (Normanly, 1997), porfirinas (Jacobs y col., 1996; Yamato y col., 1995) incluyendo la clorofila (Huff, 1982; Matile, 1980), terpenoides como la luteína (Matile y Martinoia, 1982), ácidos grasos insaturados como el linoleico (Adams y col., 1996), alcaloides (Bauer y col., 1992; Bernal y col., 1993a y b; Sottomayor y col., 1996) incluyendo betacianinas (Martínez-Parra y Muñoz, 1997), fenoles como ácidos benzoicos (Zapata y col., 1992), DOPA (Takahama y Oniki, 1991), cumarinas (Edwards y col., 1997), estilbenos (Morales y col.,

1997), catequinas (Richard y Nicolas, 1989), chalconas (Wong y Wilson, 1976), flavonoles (Takahama, 1988), isoflavonas (Hakamatsuka y col., 1992), alcoholes cinamílicos y ácidos cinámicos (Morales y col., 1993b; Otter y Polle, 1997), antocianinas (Grommeck y Markakis, 1964) y ácido ascórbico (Mehlhorn y col., 1996).

Puesto que la etapa limitante en las reacciones de oxidación catalizadas por la peroxidasa es la reducción del Coll a la forma nativa de la enzima, la constante k_3 es un parámetro adecuado para la comparación de la preferencia de sustratos naturales accesibles a la enzima *in vivo*.

La k_3 mostrada para el alcohol coniferílico por la peroxidasa de *Armoracia*, particularmente la de naturaleza ácida, es muy alta (Marklund y col., 1974), lo cual prueba que es un buen sustrato de las peroxidases vegetales de secreción. También son buenos sustratos otros fenoles, como el trans-resveratrol (estilbeno) ($k_3 \approx 11,9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Morales y Ros Barceló, 1997) y la quercetina y la miricetina (flavonoles) ($k_3 \approx 10^6\text{-}10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Morales y Ros Barceló, 1997). Y hay razones para suponer que otros fenoles ligados a componentes de la pared celular como la tirosina presente en la extensina (Otte y Barz, 1996) y restos feruloilo de las pectinas (Fry y Miller, 1987) deben ser también buenos sustratos de la peroxidasa. La posibilidad de que todos estos sustratos fenólicos lo sean de las peroxidases de secreción *in vivo* es avalada, además, por el hecho de estar co-localizados con las peroxidases en las paredes celulares y las vacuolas.

Los alcaloides (vindolina, catarantina y ajmalicina) no pueden ser considerados como buenos sustratos de la peroxidasa, puesto que sus constantes cinéticas son mil veces menores que las de los fenoles (Sottomayor y col., 1997 y 1998). Sin embargo, los alcaloides son acumulados en las vacuolas mediante un mecanismo de atrapamiento catiónico, habiéndose postulado una cierta organización espacial sobre el tonoplasto para promover las interacciones enzima-sustrato que favorezcan estas transformaciones metabólicas *in vivo* (Sottomayor y Ros Barceló, 1997).

El ácido indol-3-acético, como los alcaloides, es oxidado por la peroxidasa con una baja constante cinética (Yamazaki y Yokota, 1973) pero, al contrario que los alcaloides, es compartimentalizado en el citosol y cloroplastos debido a su mayor pH que la vacuola. Por esta razón, la participación de la peroxidasa en el catabolismo del ácido indol-3-acético es más que dudosa (García-Florenciano y col., 1992).

I.3.8.- Localización tisular y subcelular

Probablemente, para compensar su baja especificidad de sustrato, la peroxidasa es una enzima que presenta una compartimentalización tisular muy específica. Así, la enzima se encuentra localizada en tejidos meristemáticos (Crevecoeur y col., 1997), células epidérmicas (Goldberg y col., 1987; Hendriks y van Loon, 1990) y vasculares (Czaninski y Catesson, 1969). En las células vasculares, la peroxidasa puede estar localizada en el xilema (Ferrer y Ros Barceló, 1994) y, secundariamente, en las células del cambium y del floema. En los frutos, la peroxidasa está fundamentalmente localizada en las células epidérmicas y del xilema (Calderón y col., 1993), y en las hojas, la peroxidasa también está compartimentalizada en las células del mesófilo (Sottomayor y Ros Barceló, 1997).

En todos estos tejidos, la peroxidasa se encuentra localizada tanto en las paredes celulares como en las vacuolas. En las células meristemáticas (Crevecoeur y col., 1997), cambiales (Ros Barceló y col., 1991) y del mesófilo (Sottomayor y Ros Barceló, 1997), las peroxidases están principalmente localizadas en la vacuola, bien en forma soluble (Crevecoeur y col., 1997) o bien firmemente ligadas a la cara interna del tonoplasto (Sottomayor y Ros Barceló, 1997). En las células epidérmicas la peroxidasa está localizada principalmente en las paredes celulares, tanto en las paredes primarias (Goldberg y col., 1987) como en los engrosamientos secundarios (Ros Barceló, 1995).

La distinta compartimentalización celular incluye a las distintas isoenzimas de la peroxidasa. Así, mientras que el espectro completo de peroxidases (ácidas y básicas) se localiza en las paredes celulares, las fuertemente básicas solamente se encuentran localizadas en las vacuolas (Pedreño y col., 1993; Ros Barceló y col., 1998). Esta localización vacuolar frente a la localización en la pared celular de las isoenzimas de peroxidasa está de acuerdo con la mayoría de sus funciones fisiológicas aceptadas: la biosíntesis de ligninas (polimerización de los alcoholes cinamílicos) y el entrecruzamiento de la extensina y de los grupos feruloilo de las pectinas, procesos que tienen lugar en las paredes de la célula vegetal, y la biosíntesis y recambio de metabolitos secundarios (fenoles y alcaloides), que se compartimentalizan principalmente en la vacuola.

1.3.9.- Papel fisiológico en la respuesta a patógenos

El papel de las peroxidases en los procesos de respuesta de las plantas ante los patógenos es muy amplio, e incluye su papel regulador en la presencia de H_2O_2 , la insolubilización de la extensina y síntesis de suberina, los entrecruzamientos intermoleculares en la matriz de la pared celular y la síntesis de ligninas.

En el caso del control de la concentración de peróxido la peroxidasa actúa conjuntamente con otros sistemas, ya comentados como la catalasa o la ascorbato peroxidasa.

Las propiedades de la matriz de la pared celular, se pueden ver muy condicionadas por la existencia de una serie de entrecruzamientos intermoleculares; siendo numerosos los estudios que asignan a las peroxidases un papel fundamental en la formación de estos enlaces. Las peroxidases actuarían a nivel de la incorporación de proteínas ricas en hidroxiprolina a la matriz de la pared, pero también en la unión de diversos derivados del ácido p-cumárico, como pueden ser los ferulatos o los hidroxibenzoatos. Estos compuestos fenólicos se unen a los polisacáridos de

la pared, y en el caso concreto de las pectinas, éstas presentan un alto nivel de residuos ferulato.

El papel que juegan las peroxidasa en los procesos de polimerización de las ligninas se aborda en profundidad en el apartado 1.4.

I.4.- LIGNIFICACIÓN

La lignificación de la pared celular es un proceso extremadamente importante y complejo que tiene lugar de forma exclusiva en las plantas superiores. Dicho proceso supone la deposición de una serie de polímeros fenólicos, denominados ligninas (del latín **lignum**: leño), en la matriz polisacáridica extracelular, siendo su principal cometido el de fortalecer el cuerpo vascular de la planta.

Evolutivamente su importancia es fundamental, ya que sólo la existencia de paredes celulares lignificadas permitió la aparición de tallos rígidos, confiriendo así un soporte estructural a la planta. Además de todo esto, la presencia de ligninas aporta a los vasos del xilema la resistencia necesaria para soportar las altas tensiones que producen las columnas de agua en ellos contenidas, contribuyendo también a la impermeabilización de dichos vasos. Todo ello, unido al hecho de que las ligninas están ya presentes en las pteridofitas, las cuales son consideradas como las primeras plantas vasculares, hace que hoy día se piense que la adquisición de paredes celulares lignificadas fue uno de los principales factores que permitieron en el período Devoniano, hace más de 400 millones de años, la adaptación y la colonización del medio terrestre por parte de las plantas (Lewis y Davin, 1994; Wallace y Fry, 1994).

No obstante, la ausencia de un conocimiento casi total de las propiedades, o de las características, de las ligninas hace que esté aún por determinar cómo éstas afectan a las propiedades químicas, físicas y mecánicas de la pared celular.

Las ligninas son igualmente importantes desde un punto de vista cuantitativo ya que son el segundo grupo de compuestos orgánicos, tras la celulosa, más abundantes en la biomasa vegetal representando el 25% de dicha biomasa (Higuchi, 1990).

Las ligninas presentan también una gran importancia desde un punto de vista económico, ya que su eliminación de las maderas ocasiona importantes costos adicionales en industrias como la del papel, o incluso en la utilización de

forrajes en la alimentación del ganado. De la gran importancia económica que tienen las ligninas dan fe la cantidad de programas de investigación financiados en los últimos tiempos por la UE, destinados fundamentalmente a conseguir una modificación de la naturaleza de las ligninas mediante ingeniería genética. Las estrategias seguidas para alcanzar este objetivo han sido muy diversas, y algunas de ellas han sido revisadas por Dean y Eriksson (1992), Boudet y col. (1996) y Boudet y Grima-Pettenati (1995).

I.4.1.- Naturaleza, composición y distribución de las ligninas

Las ligninas son heteropolímeros amorfos, y aparentemente inactivos desde el punto de vista óptico. Resultan del acoplamiento oxidativo de tres alcoholes cinamílicos: el alcohol *p*-cumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico (Fig.I.4), que dan lugar dentro del polímero a las unidades H (hidroxifenilo), G (guayacilo) y S (siringilo).

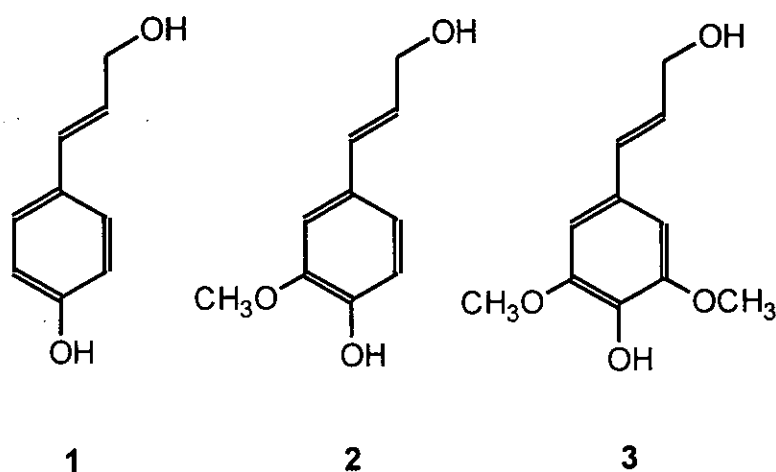


Figura I.4.- Estructuras del alcohol *p*-cumarílico (1), alcohol coniferílico (2), y alcohol sinapílico (3)

Un aspecto llamativo de las ligninas es su heterogeneidad, que es debida no sólo a las diferentes proporciones relativas de los tres constituyentes monoméricos, sino también a los distintos tipos de enlaces entre unidades, y a

la posible aparición dentro del polímero de unidades fenólicas no convencionales (Lapierre, 1993; Monties, 1985). Estos hechos se traducen en un alto grado de variabilidad estructural, que depende no sólo del tipo de especie y del tejido, sino también del tipo de célula.

El estudio de la naturaleza de las ligninas entraña una gran dificultad, en parte, motivada por no existir ningún método analítico capaz de proporcionarnos el dibujo completo de la estructura de las mismas. Esto ha propiciado que sea necesario el uso de diversos métodos, basados en principios muy diferentes, para alcanzar los conocimientos fragmentarios que se tienen actualmente sobre la estructura de las ligninas. Además, y como ya mencionaran Boudet y col. (1996), parece poco probable que en un futuro cercano se pueda disponer de ese método analítico capaz de desenmarañar la estructura completa de las ligninas.

Las ligninas son una compleja red hidrofóbica de unidades fenilpropanóicas que resultan del acoplamiento oxidativo de uno o más de los tres alcoholes cinamílicos (Fig.I.5). Dichas unidades fenilpropanoicas, se encuentran interconectadas mediante enlaces éter y carbono-carbono, dando lugar a diversos modos de enlace (Higuchi, 1990) que determinan varias subunidades estructurales (Fig.I.6), entre las cuales las más importantes son: la unidad guayacil glicerol- β -aril éter, la unidad fenilcumarano, la unidad diarilpropano, la unidad resinol, la unidad bifenilo y la unidad éter difenilo, pudiendo encontrarse además otras de menor importancia.

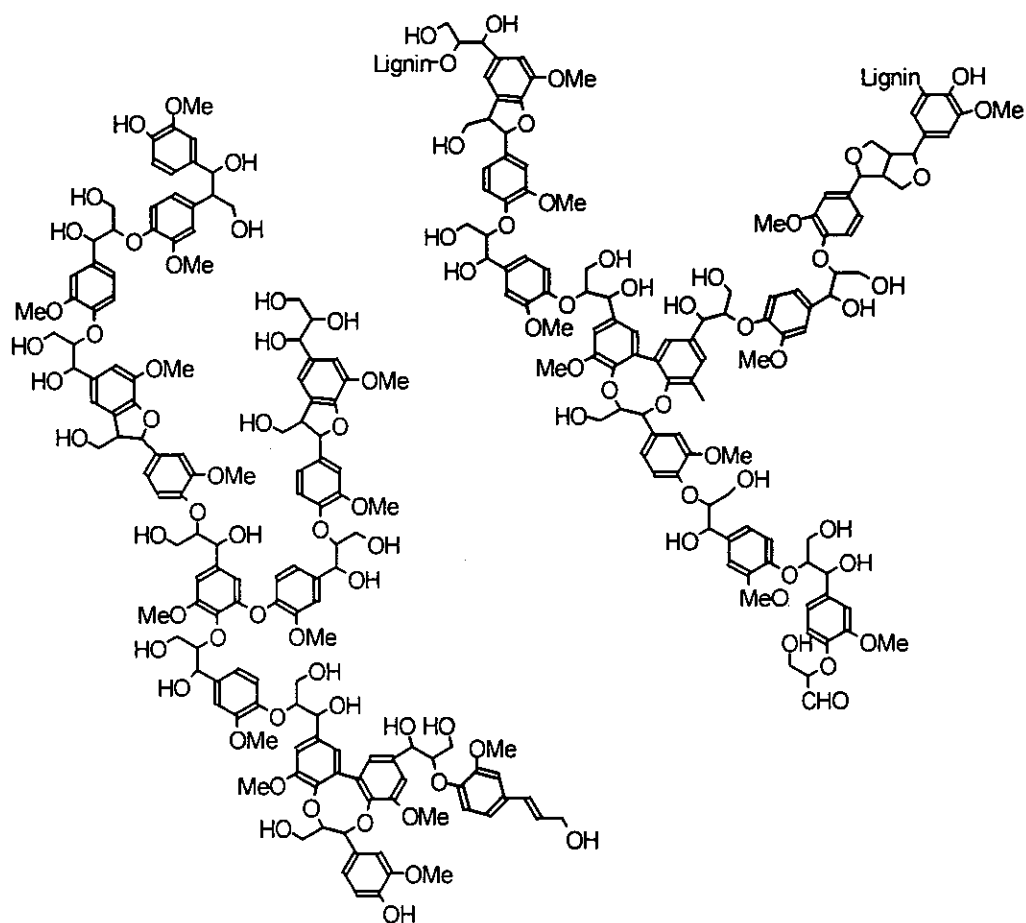


Figura 1.5.- Estructura de un fragmento de lignina

Estas subunidades estructurales surgen de diferentes tipos de enlaces y, de entre todos ellos, los enlaces β -O-4 de la subestructura guayacil glicerol- β -aryl éter son los más abundantes. También se incluyen los enlaces β -5, típicos de la subunidad fenilcumarano, los enlaces β -1 en la subunidad resinol, los enlaces 5-5 en la subunidad bifenilo y los enlaces 5-O-4 en la subunidad difenil éter. Al margen de éstos, existen otros enlaces de menor importancia, como pueden ser los enlaces α -O-4 bencil-éter no cíclicos (Lapierre y col., 1995), o los enlaces β -6 presentes en las estructuras fenilcromano. La resistencia de estos enlaces frente a la degradación no es la misma en todos los casos, siendo los enlaces β -O-4, además de los más abundantes, los menos

resistentes, y son por ello el blanco teórico más apropiado en la mayoría de los procesos de despolimerización. No obstante, existe cierta controversia sobre la importancia de los tipos de enlace β -1 y α -O-4 bencil-éter no cíclicos ya que, en ciertos casos, han sido considerados como meros artefactos de los métodos de aislamiento de las ligninas (Ede y Brunow, 1990).

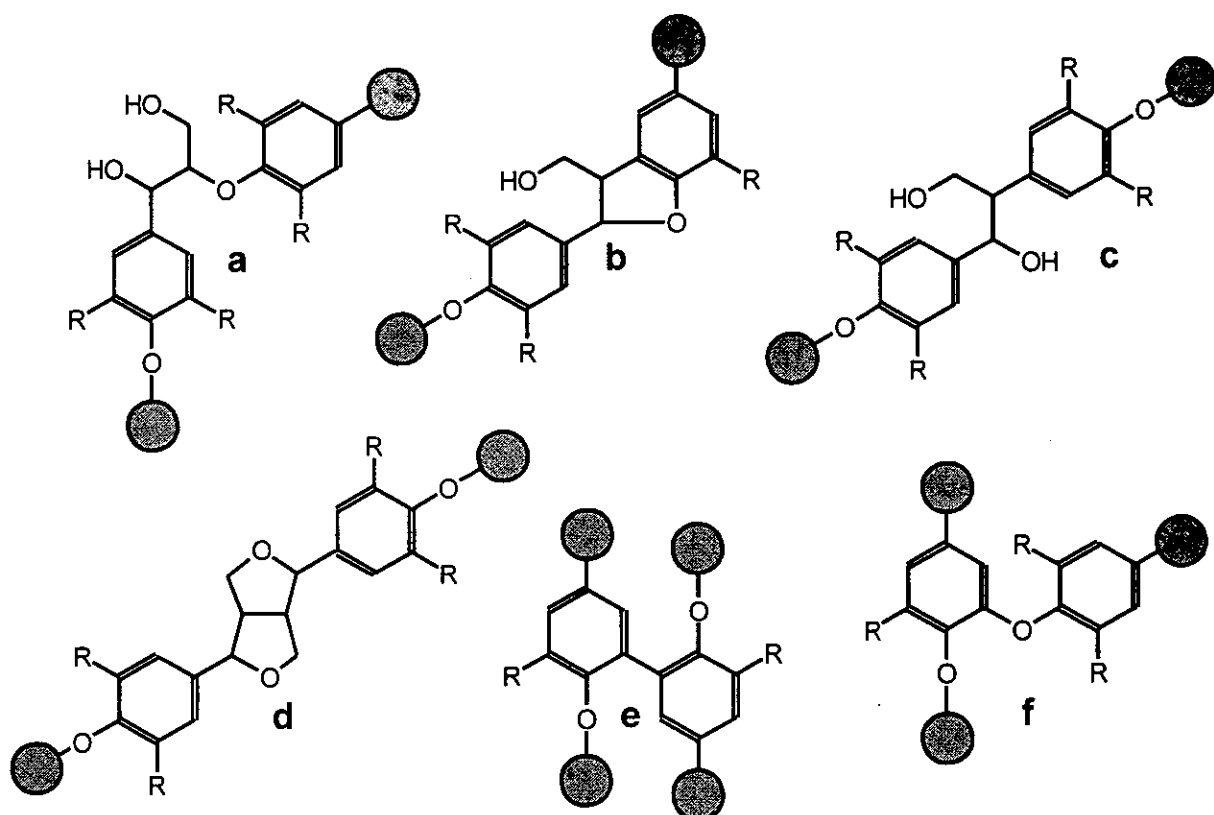


Figura 1.6.- Principales unidades estructurales en las ligninas nativas: unidad guayacil glicerol- β -aril éter (a), unidad fenilcumarano (b), unidad diarilpropano (c), unidad resinol (d), unidad bifenilo (e), y unidad éter difenilo (f). Las estructuras pino-, medio- y siringa-resinol incluyen unidades 2G, 1G/1S y 2S. R: H o OCH_3 .

A escala química, las ligninas pueden considerarse polímeros poco definidos cuya composición monomérica es enormemente variable, del mismo modo que lo es la naturaleza de sus enlaces entre unidades. Los tres monómeros constituyentes de las ligninas difieren en el grado de metoxilación, pudiendo dar lugar durante la polimerización a una gran variedad de

subestructuras. Por este motivo en las ligninas naturales podemos encontrar una enorme diversidad de estructuras químicas (Boudet y col., 1995), hecho que hace más adecuado el uso del término "ligninas" que el de "lignina".

Las ligninas se encuentran presentes en las paredes celulares de todas las plantas vasculares verdaderas, los helechos y probablemente en los musgos, aunque en este último caso no pueda afirmarse con rotundidad (Lewis y Yamamoto, 1990). No obstante, las ligninas están ausentes en los musgos carentes de traquéidas, las algas y los microorganismos (Wardrop, 1971; Lewis y Yamamoto, 1990). Desde el punto de vista botánico, y en función de los datos mencionados, podría considerarse que la lignificación está asociada con el desarrollo del sistema vascular del cuerpo de la planta.

En cuanto a su localización, las ligninas se encuentran presentes en grandes cantidades en todas las plantas vasculares, depositadas mayoritariamente en las paredes celulares de un número limitado de tipos de células como son las traquéidas, los vasos, las fibras del xilema y del floema y las esclereidas. No obstante, las ligninas pueden encontrarse en cantidades menores en la pared celular de las células epidérmicas y endodérmicas, donde forman parte de la suberina. La naturaleza de las ligninas varía según el tipo de célula. Este hecho se observa de forma clara en el xilema de *Arabidopsis*, en el cual predominan las ligninas de tipo guayacilo, mientras que en las células altamente lignificadas y adyacentes del esclerénquima existen fundamentalmente ligninas de tipo siringilo (Chapple y col., 1992).

De forma análoga, pueden apreciarse variaciones en la naturaleza de las ligninas encontradas dentro de una misma pared celular, siendo esta heterogeneidad observada durante la deposición de ligninas en la pared celular secundaria, apareciendo diferencias tanto en el contenido como en la composición monomérica media. En cuanto a variaciones en el contenido, Donaldson (1985a), encontró que la concentración de ligninas era del 16-27% en la pared celular secundaria, mientras que en la lámina media de coníferas era del orden del 38-88%. En lo referente a la composición monomérica, las ligninas depositadas en la lámina media y esquinas celulares son ricas en

unidades H, predominando las unidades de tipo G en los engrosamientos secundarios (Terashima y Fukushima, 1989).

1.4.2.- Diferencias entre gimnospermas y angiospermas

El contenido relativo de unidades S/G varía entre gimnospermas y angiospermas. Generalmente las ligninas de gimnospermas están típicamente compuestas por unidades G, aunque también pueden encontrarse unidades H pero en menor proporción. En las ligninas de angiospermas predominan las unidades G-S (Higuchi, 1990). No obstante, también se encuentran excepciones, tanto en gimnospermas, en las que en algunos casos abundan las unidades S, como en ciertas angiospermas, en las cuales predominan las unidades G (Lewis y Yamamoto, 1990). Estos hechos sugieren que deben tomarse ciertas precauciones en el uso de la composición de ligninas con función taxonómica.

El contenido relativo de unidades S/G no es la única diferencia que puede apreciarse entre angiospermas y gimnospermas, observándose, así mismo, variaciones en la abundancia de los tipos de entrecruzamiento en el núcleo de las ligninas. En este sentido, Lapierre y col. (1995) han demostrado, mediante la técnica de la tioacidólisis, que las ligninas de las angiospermas leñosas difieren en la proporción de fragmentos lineales unidos por enlaces β -O-4 de las ligninas presentes en las gimnospermas leñosas y en las herbáceas. Aproximadamente el 60-65% de los bloques C_6C_3 en las ligninas de angiospermas leñosas se caracterizan por presentar enlaces β -O-4. Este valor se ve reducido a un 30% en el caso de las gimnospermas leñosas, siendo dicho porcentaje aún menor en las herbáceas. Por tanto, las ligninas de las gimnospermas leñosas están más ramificadas mediante enlaces carbono-carbono que las ligninas de las angiospermas leñosas.

En el caso de las gramíneas, Ralph y col. (1994a) han detectado cantidades significativas de ácido *p*-cumárico esterificando las ligninas. Estos datos sugieren la posible existencia de enlaces éster y éter del ácido *p*-

cumárico en las ligninas de gramíneas. Billa y col. (1996) han propuesto la presencia de un núcleo G-S en las ligninas de las herbáceas similar al encontrado en las ligninas estándar de las angiospermas. En conjunto, todos estos datos apuntan a que, durante el transcurso de la evolución, la complejidad química de las ligninas ha aumentado desde las pteridofitas y las gimnospermas hasta las herbáceas, de modo que las plantas más evolucionadas muestran una composición y una estructura mucho más compleja.

1.4.3.-Métodos de estudio de las ligninas

Existen innumerables métodos para el estudio de las ligninas, unos orientados a detectar su presencia, o determinar su localización, y otros a determinarla cuantitativamente o bien a estudiar en profundidad su estructura y composición.

1.4.3.1.- Pruebas histoquímicas y citoquímicas en la detección de las ligninas

Las ligninas, debido a su número extraordinariamente elevado de grupos funcionales, son capaces de reaccionar con muy diversos reactivos químicos para dar lugar a un amplio espectro de reacciones de color, que han sido utilizadas en su detección cito e histoquímica. Así, entre los test histoquímicos más comúnmente utilizados, cabe destacar la reacción con azul de toluidina O, el test de Wiesner (específico para grupos cinamaldehído) y la reacción de Mäule (específica para grupos siringilo) (Strivastava, 1966). Una característica propia de las ligninas es su autofluorescencia azul cuando se iluminan con luz de 330-380 nm. Todas estas características han sido utilizadas para poder detectar y estudiar la presencia de lignina en distintos tejidos vegetales (Fig.1.7.).

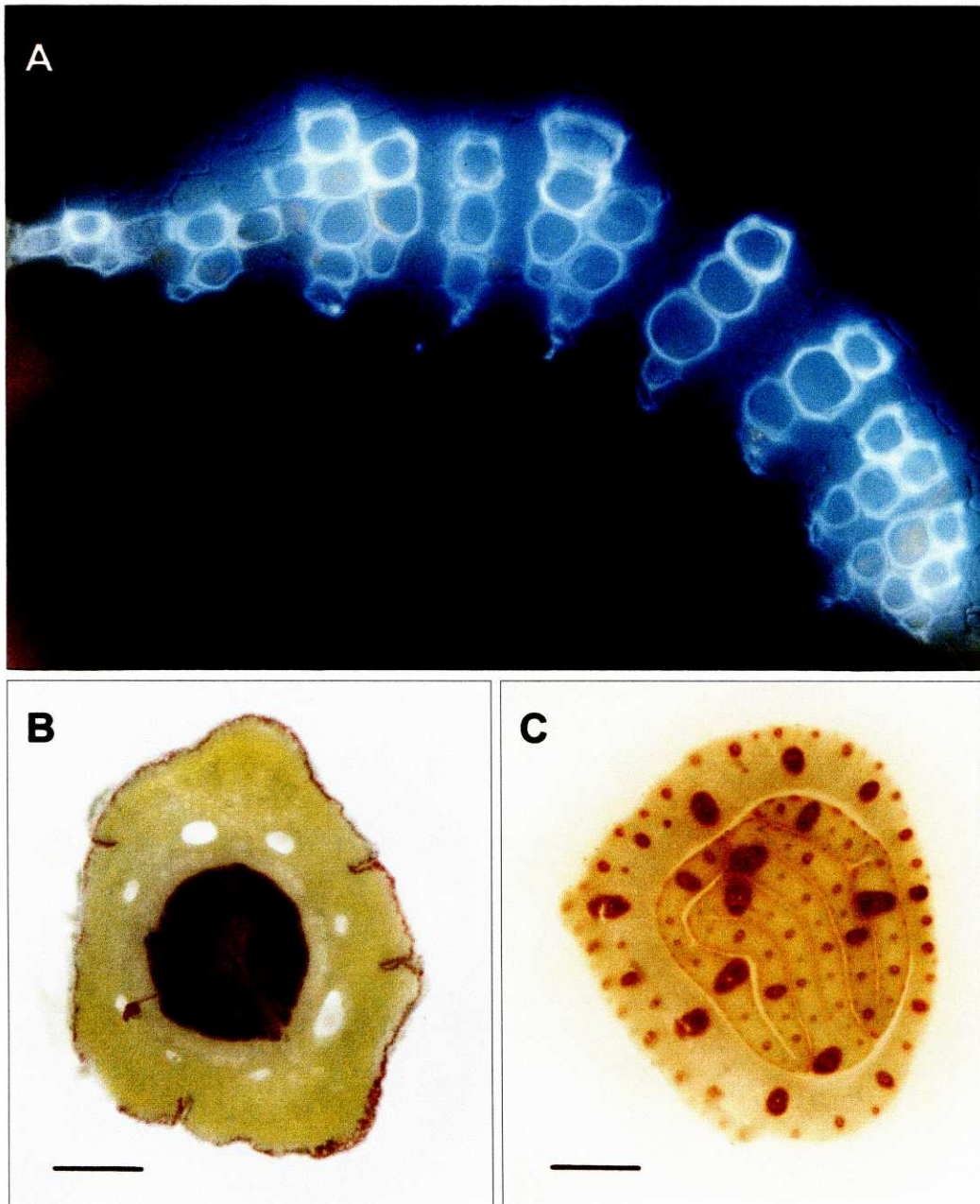


Figura 1.7.- Visualización de ligninas: A) autofluorescencia azul de tejidos vasculares de *Catharantus roseus* tras iluminar con luz UV de 340 nm (cortesía de M. Sottomayor, IBMC, Universidad de Porto), B) tinción del tallo de *Pinus halepensis* con el reactivo floroglucinol en medio ácido, C) tinción del mesocotilo de *Phoenix dactylifera* con el reactivo floroglucinol en medio ácido. (B y C tomados de Ros Barceló, 1998). Barra= 600 μ m

1.4.3.2.- Métodos degradativos y analíticos en el estudio de las ligninas

Probablemente uno de los métodos más usados sea el ensayo con acetil-bromuro, desarrollado por Johnson y col. (1961) para permitir de una forma rápida y fácil la determinación de ligninas en muestras pequeñas de paredes (3-6 mg). Sin embargo, este método presenta algunos problemas como es el hecho de que el acetil-bromuro al degradar los xilanos, polisacáridos muy abundantes en todas las plantas lignificadas, produce un aumento en la absorbancia en la región de 270-280 nm, región en la que se cuantifican las ligninas, y hace que la cantidad de ligninas presentes en la muestra se vea sobrevalorada (Hatfield y col., 1999). Esta sobrevaloración puede evitarse bajando la temperatura de reacción a 50°C y aumentando su duración de 2 a 4 horas, pequeños cambios que reducirían la degradación de los xilanos y la consecuente interferencia en la cuantificación de las ligninas (Hatfield y col., 1999). A pesar de este problema el método, por su rapidez y sencillez, es bastante adecuado para el estudio rutinario de pequeñas muestras.

Como ya se mencionó anteriormente, en la estructura de la lignina existen una serie de enlaces que unen las diferentes subunidades presentes. Entre ellos, los enlaces éter β -O-4 son muy numerosos y bastante lábiles, por lo cual son el objetivo de muchos procesos de despolimerización. Sin embargo, los enlaces carbono-carbono son muy resistentes, especialmente los enlaces 5-5 bifenilo, enlaces propios de unidades guayacilo, lo que explica que las maderas de coníferas, ricas en unidades guayacilo, sean difícilmente despolimerizadas (Adler, 1977). Así mismo, otros enlaces como los β -5, β -1, β - β o 4-O-5 son mucho más resistentes a la degradación que los β -O-4.

La conversión de los polímeros de la lignina en fenoles de bajo peso molecular, por métodos degradativos, permite un método analítico de estudio de la composición de las ligninas, e incluso nos aporta información sobre la estructura de los polímeros originarios. Estos procesos degradativos, sin

embargo, poseen bajos niveles de efectividad debido, sobre todo, a la existencia de enlaces muy fuertes. En este punto las ligninas se diferencian de otros biopolímeros como las proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos, los cuales contienen uniones lábiles, susceptibles de romperse bien química o enzimáticamente. Además, durante el proceso de degradación se pueden liberar gran cantidad de compuestos fenólicos que darían lugar a resultados engañosos o incluso a artefactos.

Aunque los métodos degradativos han sido muy criticados por sus bajas eficacias y por la formación potencial de artefactos, las descripciones más completas de los patrones de unión dentro de las ligninas se han conseguido gracias a procesos como la tioacetolisis, acidolisis, oxidación con permanganato o hidrogenolisis (Lapierre y col., 1995).

Probablemente el método degradativo más usado sea el de la oxidación en medio alcalino, usando nitrobenzeno u óxido cúprico. La oxidación con nitrobenzeno es bastante efectiva, pero todas las oxidaciones alcalinas tienen el problema de acortar las cadenas laterales de las ligninas y no proporcionan información ninguna sobre sus grupos funcionales, ni sobre sus interconexiones. Además con muestras suberizadas, o con complejos lignina-celulosa, existe un alto riesgo de interferencia entre las ligninas y otros fenoles de pared que derivan en productos similares.

El método de la acidolisis preserva los esqueletos C_6C_3 aportando mayor cantidad de información y menos interferencias; sin embargo el rendimiento es relativamente bajo debido a reacciones colaterales. Estos problemas se solventan en la tioacidolisis, en la cual se reemplaza el agua usada en la acidolisis por ethanethiol y el HCl por BF_3 eterato.

La tioacidolisis es una despolimerización ácida, que actúa mediante la escisión de los enlaces β -O-4. El método combina la acción de un ácido fuerte el BF_3 eterato y un nucleófilo EtSH. Sólo las unidades de ligninas implicadas en subestructuras arilglicerol- β -aril éter, muy abundantes en las ligninas nativas, proporcionan monómeros fenilpropano C_6C_3 con las cadenas laterales tioetioladas.

Como la tioacidolisis degrada las ligninas a estructuras que mantienen características de las cadenas originales, la determinación de los monómeros obtenidos y sus cantidades nos permiten obtener gran cantidad de información sobre los grupos funcionales y la estructura de las ligninas. Los grupos benzaldehído, cinamaldehído y cinamil alcoholes implicados en enlaces β -O-4 pueden ser estimados a partir de sus productos específicos de degradación (Fig I.8, I.9, I.10 y I.11.).

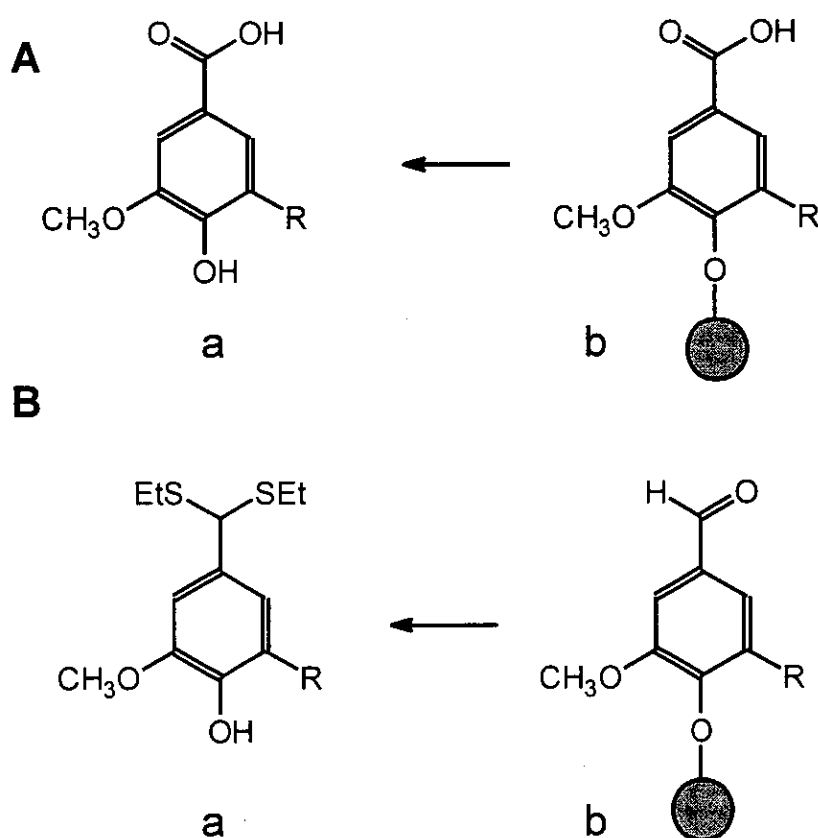


Figura I.8.- Estructura de los productos de tioacidolisis de las ligninas naturales. A) Grupos terminales de ácido benzoico: producto de tioacidolisis (a), estructura original en la lignina (b). B) Grupos terminales *p*-hidroxibenzaldehído: producto de tioacidolisis (a), estructura original en la lignina (b)

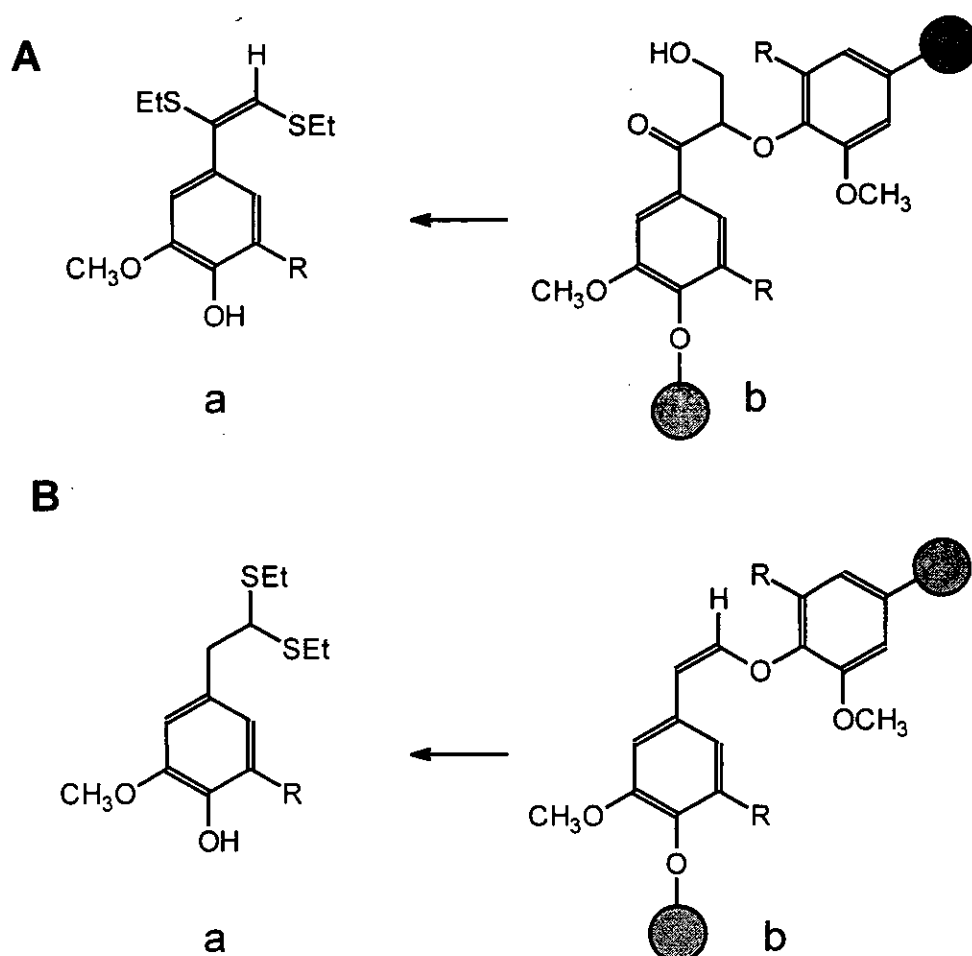


Figura I.9.- Estructura de los productos de tioacidolisis de las ligninas naturales. A) Grupos C_6C_3 β -ariléter: producto de tioacidolisis (a), estructura original en la lignina (b). B) Grupos C_6C_2 enoléter: producto de tioacidolisis (a), estructura original en la lignina (b)

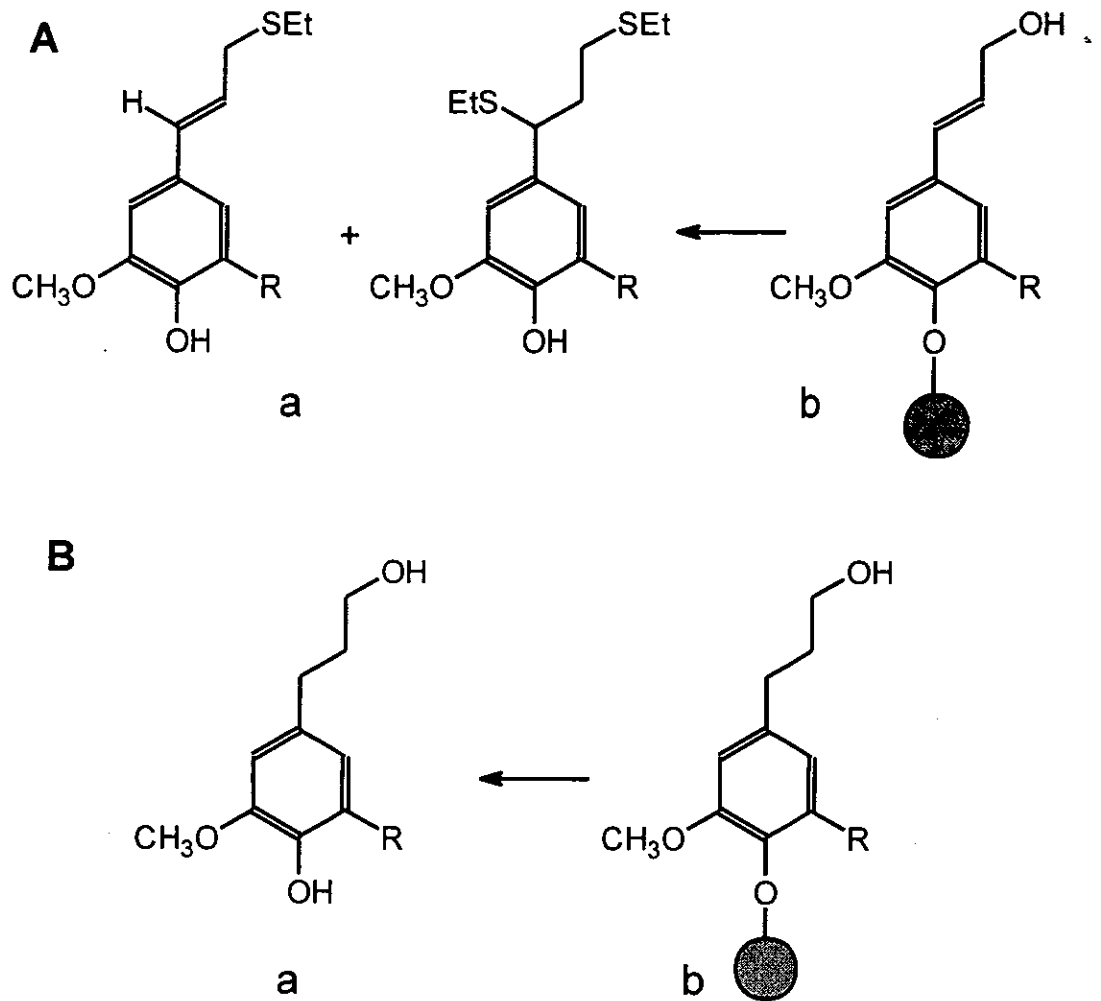


Figura 1.10.- Estructura de los productos de tioacidolisis de las ligninas naturales. A) Grupos terminales de alcohol cinámico: producto de tioacidolisis (a), estructura original en la lignina (b). B) Grupos terminales de alcohol dihidrocínámico: producto de tioacidolisis (a), estructura original en la lignina (b)

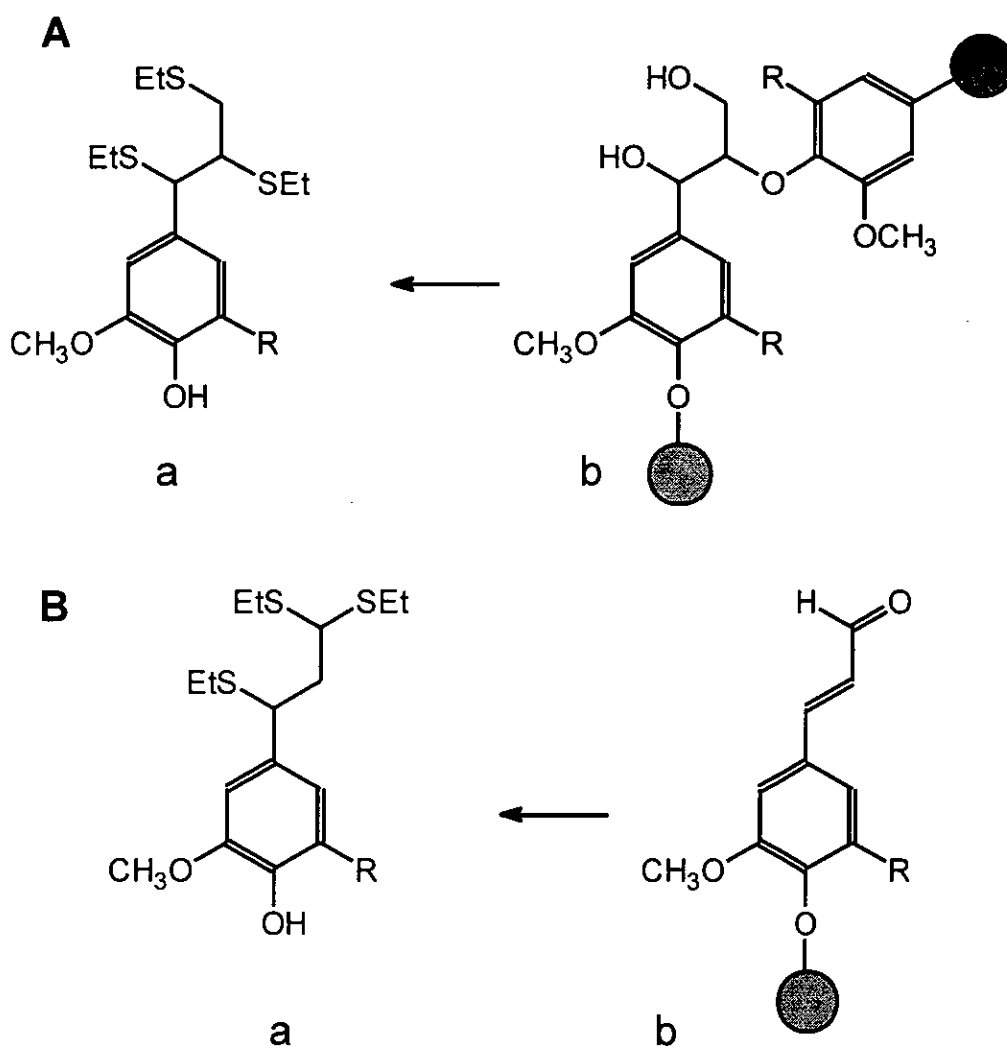


Figura I.11.- Estructura de los productos de tioacidolisis de las ligninas naturales. A) Grupos C_6C_3 arilglicerol β -ariléter: producto de tioacidolisis (a), estructura original en la lignina (b). B) Grupos terminales de cinamaldehydos: producto de tioacidolisis (a), estructura original en la lignina (b)

La tioacidolisis permite además acoplar reacciones complementarias como la premetilación de las ligninas con CH_2N_2 , lo cual nos permitiría detectar grupos terminales libres guayacilo o siringilo, aportando una información

importantísima sobre la arquitectura de la lignina. Así mismo, la desulfuración de las muestras una vez tioacidolizadas permitiría el análisis y determinación de la presencia de dímeros.

Sin duda, la más importante limitación de la tioacidolisis es su aplicación a ligninas con baja proporción de enlaces β -O-4, ya que los resultados obtenidos difícilmente podrían ser extrapolables al conjunto del polímero. En estos casos el uso complementario de la oxidación con nitrobenzeno constituye una herramienta muy útil.

1.4.4.- Biosíntesis de ligninas

El proceso en sí de la lignificación, y la ruta de biosíntesis de las ligninas, presenta numerosas cuestiones aún sin resolver referentes fundamentalmente al orden de la ruta y a los mecanismos implicados en el mismo. Algunas de dichas cuestiones ya fueron planteadas por Neish en 1968. Este desconocimiento parcial del proceso puede justificarse, en parte, si se considera la gran dificultad que entraña de por sí su estudio, hecho éste que queda patente teniendo en cuenta la observación realizada por Sederoff y col. (1994), quienes puntualizaron que no existe un tejido de una planta, o especie, donde se haya caracterizado completamente la ruta entera de la biosíntesis de las ligninas. Todo ello motiva que los conocimientos que se tienen actualmente sobre dicho proceso sean fragmentarios, y han sido inferidos del estudio concreto de ciertos pasos específicos en diversas especies y tejidos vegetales.

Generalmente, se considera que la biosíntesis de las ligninas tiene su inicio en la formación de fenilalanina y tirosina a través de la ruta del siquimato. Seguidamente, la ruta general conocida como fenilpropanoide conduce desde la fenilalanina (y/o tirosina) a los ésteres CoA de los ácidos cinámicos y, por último, la ruta específica de la biosíntesis de ligninas encauza los ésteres CoA de los ácidos cinámicos hacia la síntesis de alcoholes cinamílicos (Whetten y Sederoff, 1995).

Esta conversión desde la fenilalanina hasta los alcoholes cinamílicos implica a un gran número de enzimas que catalizan procesos de desaminación, hidroxilaciones, uniones de coA, metilaciones y reducciones. La existencia de todo este complejo enzimático provoca que la biosíntesis de lignina suponga uno de los procesos metabólicamente más costosos en el reino vegetal.

1.4.4.1.- Ruta general fenilpropanoide

Fenilalanina amonio-liasa (PAL)

La fenilalanina amonio-liasa (PAL; EC 4.3.1.5), cataliza la desaminación de la fenilalanina para dar como resultado la aparición del cinamato (Fig.1.12.).

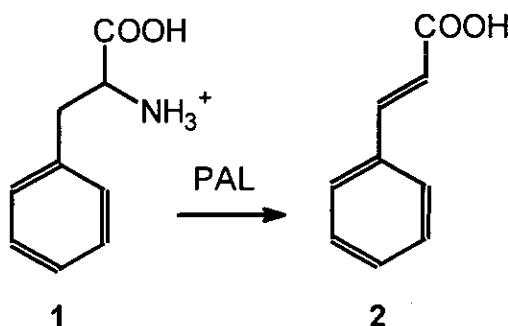


Figura 1.12.- Desaminación de la fenilalanina (1) por medio de la fenilalanina amonio-liasa (PAL) para dar cinamato (2).

Sin duda, la PAL es una de las enzimas vegetales más estudiadas debido a su gran importancia en la biosíntesis de metabolitos fenilpropanoides. En angiospermas, esta enzima es codificada por una familia de genes (Wanner y col., 1995), los cuales presentan unos patrones de expresión específicos en los distintos tejidos (Shufflebottom y col., 1993); sin embargo, en gimnospermas parece que su aparición es debida a la acción de un solo gen (Boudet y col, 1995).

Si tenemos en cuenta que la lignina supone más de un 30% del peso seco en los tejidos de las plantas vasculares, y que para su síntesis se necesitan cantidades equivalentes de los intermediarios fenilalanina y/o

tirosina, se hace necesario que el nitrógeno que se desprende en la desaminación mediada por la PAL se reutilice a través de algún ciclo metabólico, posiblemente mediante la acción de la glutamina sintetasa y la regeneración del arogenato (Lewis y Davin, 1999).

Hidroxilasas

Las actividades hidroxilasas aparecen a distintos niveles en la ruta de síntesis de las ligninas (fig.1.14.). Implican la participación de oxígeno molecular del cual un átomo se incorpora al anillo aromático y el otro se reduce a agua.

La cinamato-4-hidroxilasa (C4H) es una monooxigenasa citocromo P-450 que cataliza la hidroxilación del ácido cinámico a p-cumárico y que está asociada a una reductasa dependiente de NADPH (Fig. 1.13.)

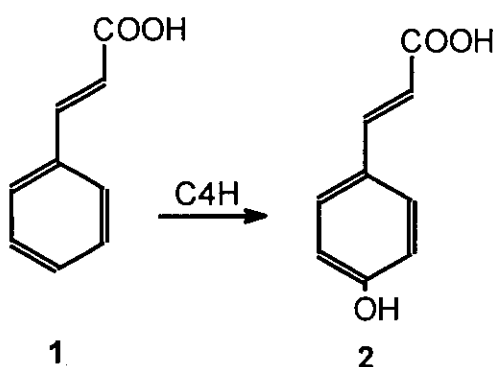


Figura 1.13.- Hidroxilación del ácido cinámico (1) por medio de la cinamato-4-hidroxilasa para dar p-cumárico (2)

La cumarato-3-hidroxilasa (C3H) cataliza la hidroxilación del ácido p-cumárico a ácido cafeico y probablemente se trate de la hidroxilasa menos conocida de las que participan en la síntesis de las ligninas. El proceso de hidroxilación del ácido p-cumárico podría también tener lugar a nivel del éster coenzima A, por la acción de una p-cumárico coenzima A 3-hidroxilasa.

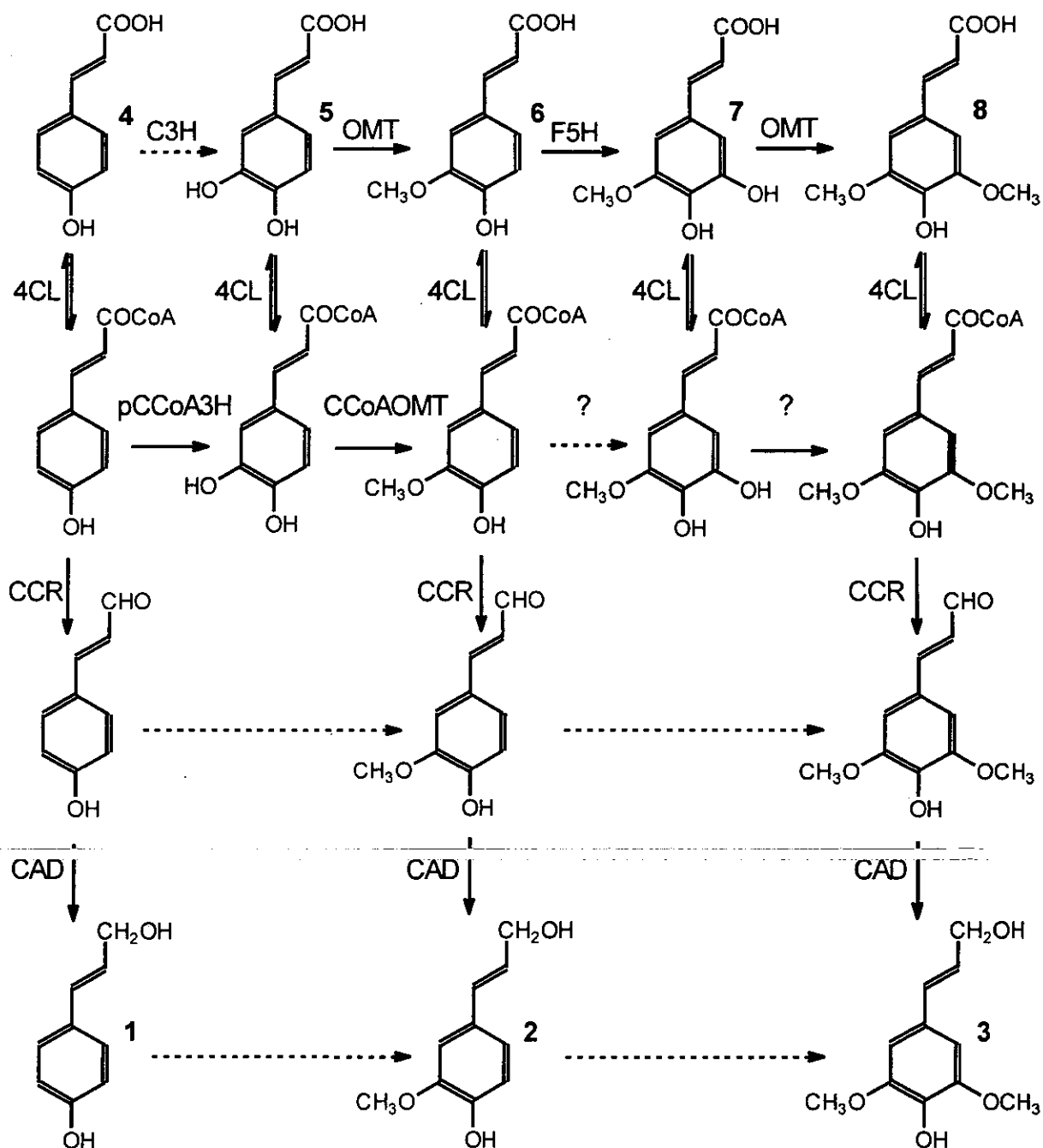


Figura I.14. Posibles rutas para la biosíntesis de los alcoholes *p*-cumárico (1), alcohol coniferílico (2), y alcohol sinapílico (3) desde el ácido *p*-cumárico (4), el ácido caféico (5), el ácido ferúlico (6), el ácido 5-hidroxiferúlico (7), y el ácido sinapílico (8) y sus correspondientes cinamoil-CoAs. Las flechas discontinuas muestran aquellos pasos donde la actividad enzimática aún no se encuentra bien determinada

La ferulato-5-hidrolasa (F5H) es también una monooxigenasa al igual que la C4H, que cataliza el paso de ácido ferúlico a 5-hidroxiferúlico. La F5H puede estar implicada en las diferencias de composición de las ligninas de angiospermas y gimnospermas. Su actividad es necesaria para la hidroxilación del ácido ferúlico, paso este fundamental para la aparición del alcohol sinapílico. Es posible que los bajos niveles de la F5H en gimnospermas sean insuficientes para permitir la síntesis de niveles significativos de alcohol sinapílico y en consecuencia de ligninas de tipo siringilo (Whetten y Sederoff, 1995).

O-Metil-Transferasas (OMT)

Las O-Metil-Transferasas catalizan la metilación del ácido cafeico a ferúlico y del 5-hidroxiferúlico a ácido sinapílico, usando para ello S-adenosil-metionina como donador del grupo metilo. Las OMT de diferentes especies presentan distinta especificidad de sustrato. Así las OMT de gimnospermas son más efectivas en la metilación del ácido cafeico que en la del 5-hidroxiferúlico, esta observación llevó a numerosos autores a aplicar esta diferente efectividad para explicar la distinta composición de monoligninas de angiospermas y gimnospermas (Grisebach, 1981). Sin embargo, las diferencias en la relación V/k_M para la metilación del ac. cafeico y del ac. 5-hidroxiferúlico son menores de un orden de magnitud, y por lo tanto insignificantes (Lewis y Davin, 1999a), por lo que parece más probable que las diferencias entre angiospermas y gimnospermas sean debidas a la F5H, como se comentó anteriormente. Recientemente se ha apuntado la posibilidad de que algunos precursores de las ligninas no sean metilados a nivel de los ácidos cinámicos, sino en pasos posteriores, bien a nivel de los ésteres coenzima A (Ye y col., 1994) o incluso a nivel de los cinamilaldehídos o de los alcoholes cinamílicos (Matsui y col., 1994).

Hidroxicinamoil CoA-ligasa (4-cumarato, 4CL)

Estas enzimas catalizan la conversión de los ácidos hidroxicinámicos a

sus correspondientes tioésteres coenzima A. Estos ésteres pueden derivar hacia la formación de las ligninas, o bien hacia la síntesis de otros metabolitos secundarios como los flavonoides, estilbenos o ácidos benzoicos.

Trabajos recientes apuntan a la posibilidad de la existencia de diferentes isoenzimas en distintas plantas (Grand y col., 1983; Lozoya y col. 1988). Estas enzimas presentan distinta efectividad a la hora de ligar la coenzima A dependiendo de si es al ácido p-cumárico, ácido cafeico o al ácido sinápico. Esto implicaría que estas distintas isoenzimas desarrollarían funciones fisiológicas distintas.

1.4.4.2.- Ruta específica de la síntesis de lignina

Cinamil-coenzima A reductasas (CCR)

La conversión de los tioésteres de coenzima A a sus respectivos hidroxicinamaldehídos, es mediada por las cinamil-coenzima A reductasas, en una reacción dependiente de NADPH. Este es el primer paso específico en la síntesis de las ligninas, lo cual ha provocado que la CCR se considere como un punto clave en la regulación de los procesos de lignificación. Esta regulación vendría dada por un control del flujo de fenilpropanoides que se incorporasen a la formación de las ligninas, sin embargo no existen datos concretos sobre la naturaleza o importancia de este control.

Cinamil-alcohol deshidrogenasa (CAD)

Esta enzima es la responsable del último paso en el proceso de conversión desde la fenilalanina hasta la obtención de los alcoholes cinamílicos. La CAD cataliza el paso de conversión de los hidroxicinamaldehídos a sus respectivos alcoholes (Fig. 1.15), en una reacción dependiente de NADPH y de carácter reversible. Estudios realizados con una isoenzima de *Forsythia suspensa* (Mansell y col., 1974) indican que en condiciones fisiológicas la reacción se inclina hacia la formación de los alcoholes. Los valores de la constante de Michaelis para los cinamilaldehídos

oscilaban entre 1,7 y 9,1 μM , de 3 a 11 veces menores que para los correspondientes alcoholes (11-57 μM), así mismo la constante de equilibrio, que viene dada por la siguiente ecuación:

$$k = \frac{[\text{cinamilaldehído}][\text{NADPH}][\text{H}^+]}{[\text{cinamilalcohol}][\text{NADP}^+]}$$

tenía un valor de $2,8 \pm 1,1 \times 10^{-9}$. Sin embargo, en condiciones fisiológicas donde la relación NADPH/NADP se vea modificada, la tendencia podría dirigirse hacia la acumulación de cinamaldehydos.

La enzima esta ampliamente distribuida en el reino vegetal y en las angiospermas aparece como una enzima polimórfica; sin embargo, en las gimnospermas aparentemente estaría codificada por un solo gen. Así mismo, en estas últimas presentan una baja afinidad por el sinapilaldehído, mientras que las de las angiospermas poseen similar afinidad para todos los aldehídos (Boudet y Grima-Pettenati, 1995).

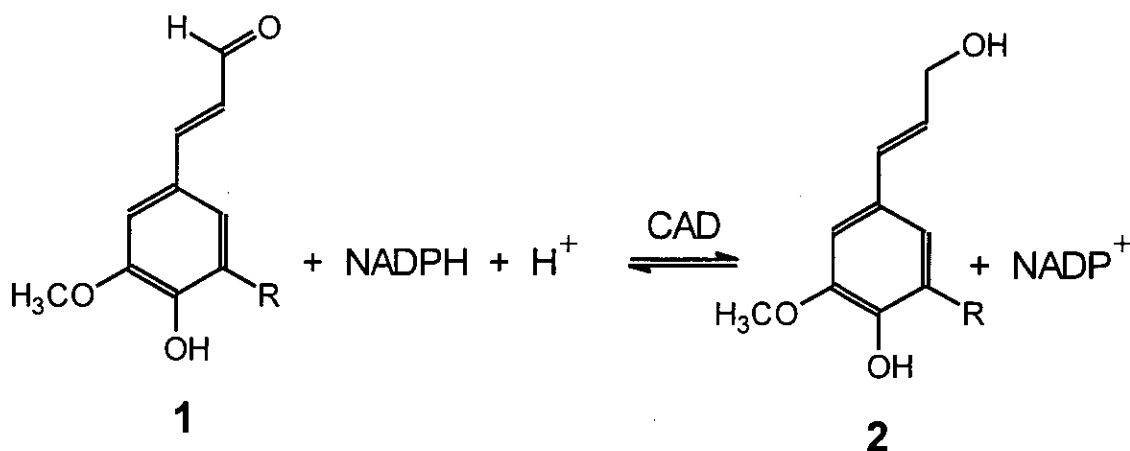


Figura I.15.- Reacción de deshidrogenación de los cinamilaldehídos (1) catalizada por la cinamilaldehído deshidrogenasa (CAD) para dar alcoholes cinamílicos (2)

El análisis de la composición monomérica en plantas transformadas, que poseen bajos niveles de expresión de la CAD, muestra un incremento tanto del coniferilaldehído como del sinapilaldehído en los polímeros de lignina (Halpin y col., 1994; Hibino y col., 1995). Con la inclusión de los cinamaldehydos en los lugares de los alcoholes, el polímero de lignina resultante ve alterados sus

enlaces intermoleculares y su reactividad química.

1.4.4.3.- La etapa de polimerización

La etapa de polimerización es el último paso en el complicado proceso de la biosíntesis de las ligninas a partir de los alcoholes cinamílicos. Consiste en la oxidación de los alcoholes cinamílicos a radicales 4-O-fenoxilo, que polimerizan espontáneamente para dar oligómeros y, en etapas subsecuentes, un polímero creciente de lignina (Higuchi, 1990; Hapiot y col., 1994). Dichos radicales fenoxilos pueden acoplarse entre ellos dando lugar a los diferentes bloques estructurales que aparecen en las ligninas naturales (Fig.1.16).

De forma general se ha considerado hasta muy recientemente que las peroxidases son las enzimas principales implicadas en esta etapa, ya que presentan una correlación tanto espacial como temporal con la lignificación de la pared celular. No obstante, los resultados de diversos estudios realizados en los últimos años, han motivado un resurgimiento de aquellas teorías en las que se sugería que otras enzimas, tales como las lacasas, podrían desempeñar un papel clave en los procesos de polimerización de los alcoholes cinamílicos (O'Malley y col., 1993; Dean y Eriksson, 1994).

Lewis y Yamamoto (1990) han establecido cuatro criterios básicos que deberían cumplir aquellas enzimas que se encuentran implicados en la polimerización de los alcoholes cinamílicos en la pared celular. Estos criterios son: i) mostrar una especificidad de substrato por los alcoholes cinamílicos, ii) presentar una localización subcelular en la pared celular, iii) conocerse su estructura primaria y iv) presentar una correlación temporal con las fases de lignificación activa de la pared celular. A estos cuatro criterios, Ros Barceló (1997) ha añadido dos nuevos criterios: que la enzima presente una extensa distribución dentro de todas las especies de plantas vasculares hasta ahora conocidas, y que la enzima presente una alta afinidad para los alcoholes cinamílicos durante su oxidación a compuestos de tipo lignina.

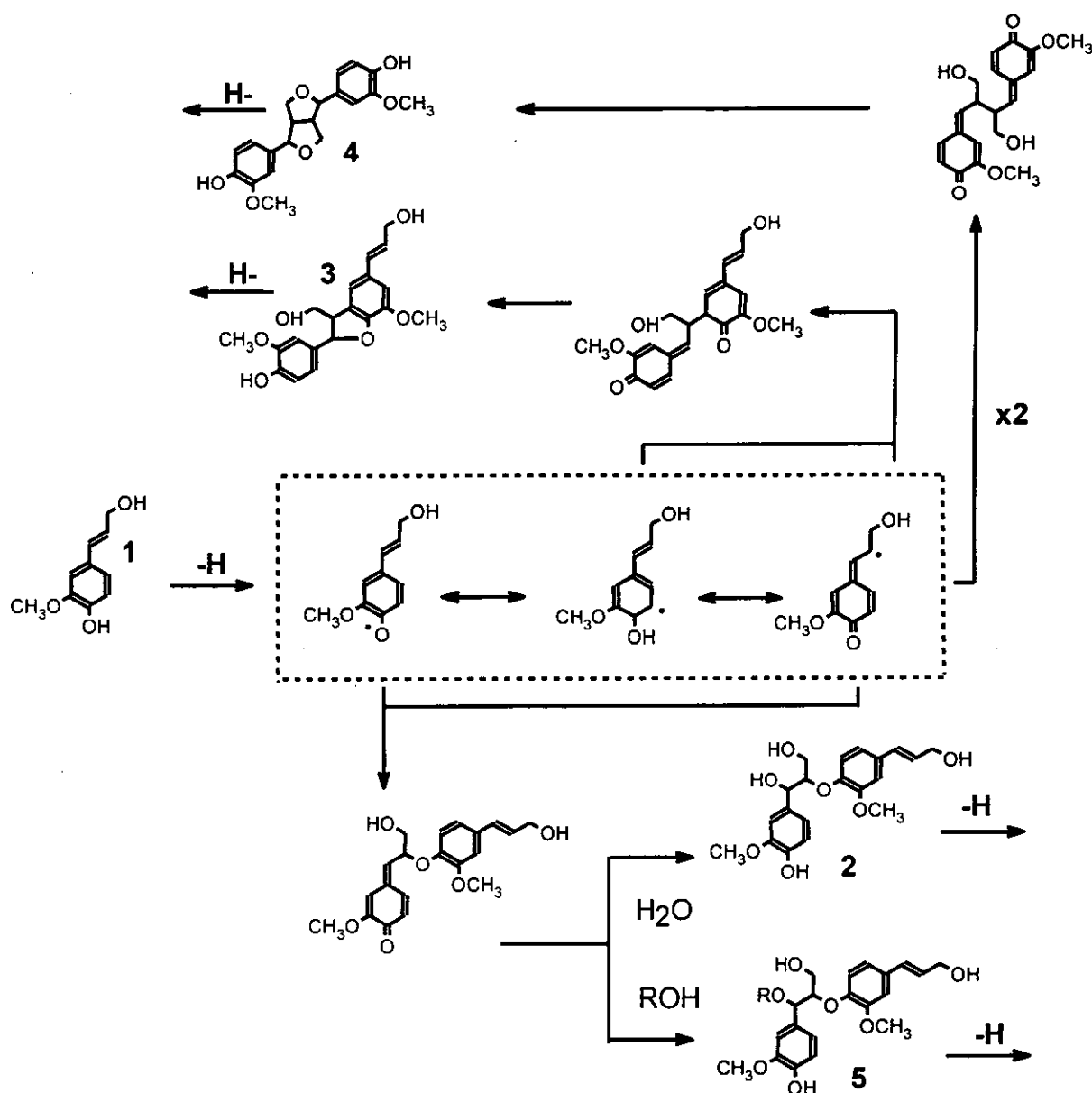


Figura I.16.- Radical fenoxilo formado por la oxidación del alcohol coniferílico (1) por la peroxidasa o la lacasa, y formación de los dímeros alcohol guayacilglicerol-β-O-coniferil éter (2), alcohol dehidroconiferílico (3), y pinosinol (4) vía quinona metiluros. Esta figura muestra también cómo las quinonas metiluros pueden reaccionar con los grupos hidroxilo de los polisacáridos (ROH) para dar lugar a puntos de anclaje de las ligninas sobre la matriz polisacáridica de la pared celular (5)

Ninguna de las enzimas que actualmente se cree que pueden estar implicadas en la lignificación (lacasas y peroxidadas) reúne todos estos requisitos antes mencionados. En el caso de las lacasas, éstas presentan una

baja afinidad por los alcoholes cinamílicos, una incapacidad manifiesta de formar compuestos altamente polimerizados de tipo lignina y, en muchos casos, una falta de correlación cuantitativa entre los niveles de la enzima y la lignificación (Alba y col., 1996). En el caso de las peroxidasas resulta difícil imaginar que una única isoenzima sea la responsable exclusiva de un proceso tan complejo y organizado como es la polimerización de los alcoholes cinamílicos a ligninas. No obstante, las peroxidasas reúnen bastantes de los requisitos previamente definidos. Así, estas enzimas muestran una gran afinidad por los alcoholes cinamílicos durante su oxidación a compuestos de tipo lignina, muestran una correlación cuantitativa con la lignificación de la pared celular y, por último, están presentes en altos niveles en los tejidos lignificantes de todas las plantas vasculares.

Lacasas

Las lacasas (*p*-difenol: O₂ oxidoreductasa E.C. 1.10.3.2.) son proteínas que contienen cobre y que catalizan la oxidación de fenoles a expensas de O₂. Desde el punto de vista histórico, se trata de las primeras enzimas que fueron relacionadas con la polimerización de los alcoholes cinamílicos a ligninas en base, fundamentalmente, a los estudios realizados por Freudenberg y col. (1958). Sin embargo, con el transcurso del tiempo la posibilidad de que las lacasas desempeñaran un papel esencial en la lignificación fue cayendo en el olvido. Este hecho fue debido a los resultados obtenidos en relación con la incapacidad que tienen las lacasas purificadas de las plantas para formar ligninas sintéticas (Nakamura, 1967), así como a las evidencias mostradas por Harkin y Obst (1973) en favor de la participación exclusiva de las peroxidasas en este proceso. Junto a ello, el hecho de que las lacasas se encuentren fuertemente unidas a la pared celular (McDougall y col., 1994a), en la cual hay un gran exceso de peroxidasas en relación con las lacasas, ha dificultado su estudio. En determinadas ocasiones, se ha apuntado como dato justificante de la falta de detección de las lacasas en tejidos lignificantes la alta sensibilidad de estas enzimas a la congelación (Dean y Eriksson, 1994). Este hecho podría

explicar por qué en ciertos casos (Harkin y Obst, 1973) no han podido detectarse actividades de tipo lacasa en algunas especies. Todos estos hechos motivan una gran incertidumbre en cuanto al papel que dichas enzimas puedan jugar en la lignificación.

Las lacasas de las plantas superiores pertenecen al grupo de las oxidasas de cobre azul (BCO), al que también pertenecen otras enzimas como, por ejemplo, la *L*-ascorbato oxidasa (E.C. 1.10.3.3.). Tanto en el caso de las lacasas, como en el caso de la ascorbato oxidasa, se trata de enzimas glicosiladas, asociadas a la pared celular (Lin y Varner, 1991; O'Malley y col., 1993), similares en el contenido de cobre y en el tamaño molecular, y mostrando ambas la capacidad de oxidar tanto al ácido ascórbico como a los fenoles (Bao y col., 1993). Estas similitudes, que pueden encontrarse en cuanto a sus propiedades físicas y catalíticas, provocan que sea extremadamente difícil diferenciar ambas enzimas. Dicha situación se ve aún más agravada por el hecho de que secuencias de cDNA aisladas de una librería de cDNAs de pino, y que supuestamente codifican para tres lacasas (Bao y col., 1993) muestran un porcentaje de identidad entre el 51.8 y el 53.5 en relación con la ascorbato oxidasa de *Cucumis sativus* (pepino) (O'Malley y col., 1993).

Todos estos datos muestran la gran dificultad intrínseca que conlleva el trabajo con las lacasas vegetales, hecho que es debido también a la dificultad de poder diferenciarlas de otras fenoloxidasas como la catecol oxidasa. De hecho, y aunque las lacasas se diferencian de las catecolasas (*o*-difenol: O₂ oxidoreductasa, E.C. 1.10.3.1) tanto en base a la especificidad de sustrato como a la sensibilidad frente a inhibidores específicos (Mayer, 1987), dicha diferenciación no es tan clara en todos los casos.

A pesar de todo esto, es un hecho difícilmente cuestionable que las lacasas deben jugar un papel más o menos importante en la biosíntesis de las ligninas en las plantas vasculares. Así, mediante la utilización de métodos inmunocitoquímicos, Driouich y col. (1992) han demostrado la presencia de lacasas en los engrosamientos secundarios de los vasos del xilema lignificante del sicómoro. Mediante el uso de métodos histoquímicos directos, Liu y col.

(1994) y Bao y col. (1993), han demostrado la presencia de lacasas en los tejidos vasculares lignificantes de tallos de *Zinnia* y de pino. Además, las lacasas purificadas de plantas superiores conservan la capacidad de oxidar los alcoholes cinamílicos (Sterjiades y col., 1992, 1993; Bao y col., 1993) y, recientemente, se ha comentado (Carpita y col., 1996) que la inhibición de la expresión de la lacasa usando construcciones de cDNA antisentido, provoca un 10% menos de lignina en las plantas transgénicas. Sin embargo, se han observado resultados contradictorios en lo concerniente a la capacidad de las lacasas para producir polímeros de deshidrogenación de los alcoholes cinamílicos *in vitro* (Bao y col., 1993; Okusa y col., 1996).

No obstante, es posible que algunos métodos histoquímicos directos hayan sobrevalorado la importancia de las lacasas en los tejidos lignificantes (De Pinto y Ros Barceló, 1997). Así mismo, existe un cierto desacuerdo entre los datos que informan de la presencia de lacasas en el cuerpo vascular de determinadas plantas (Bao y col., 1993; Liu y col., 1994) y aquellos que aparecen de sus respectivos cultivos *in vitro* (Nose y col., 1995; Sato y col., 1995).

Para intentar superar estas aparentes dificultades a la hora de asignar un claro papel a las lacasas dentro del proceso de la lignificación, Sterjiades y col. (1993) han sugerido recientemente que la lacasa podría tener un papel esencial en la polimerización inicial de los alcoholes cinamílicos en dímeros y trímeros, mientras que las peroxidasas serían las responsables de catalizar las siguientes reacciones que conducen desde esos dímeros y trímeros a productos de polimerización altamente condensados. Dicha hipótesis está de acuerdo con los datos obtenidos por Okusa y col. (1996), quienes encontraron que las lacasas son capaces de formar dímeros de alcohol coniferílico, pero son incapaces de formar DHPs (polímeros de deshidrogenación). Aunque esta hipótesis puede tener su grado de certeza, Sterjiades y col. (1992, 1993) no aportan valores de k_M que nos permitan tener una idea de la afinidad que presentan las lacasas por los alcoholes cinamílicos. La única información al respecto puede encontrarse en el trabajo de Bao y col. (1993), los cuales citan

valores de k_M para el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico del orden de 12 y 25 mM respectivamente. Considerando la magnitud de estos valores de k_M , se hace difícil imaginar las concentraciones de alcohol cinamílico que deberían alcanzarse en las paredes celulares lignificantes para que se produjese la saturación de las lacasas durante la oxidación de dichos alcoholes a ligninas.

Pese a que algunos grupos de investigación han conseguido obtener de forma completa, o parcial, secuencias de cDNA para las lacasas de plantas superiores (Boudet y col., 1995a; LaFayette y col., 1995), es conveniente mencionar que actividades de tipo lacasa no son detectables en células lignificantes de *Pinus contorta* (Dharmawardhana y col., 1995), *Pinus taeda* (Nose y col., 1995), *Lupinus albus* (Ros Barceló, 1995) o *Z. elegans* (Sato y col., 1995), datos que parecen reforzar los argumentos dados por Higuchi en 1959, quien consideraba que, debido a la distribución limitada de las lacasas en plantas superiores, éstas son un candidato poco probable como agente de polimerización único de los alcoholes cinamílicos a ligninas.

Desde el punto de vista evolutivo puede considerarse a las monocotiledóneas como las plantas vasculares más evolucionadas, pudiéndose resaltar que en ellas se detecta característicamente una ausencia de lacasas (Lewis y Davin, 1994). A partir de estas observaciones, Ros Barceló (1997) ha sugerido la hipótesis de que la presencia de lacasas en gimnospermas y angiospermas dicotiledóneas es sólo un residuo evolutivo reminiscente y/o recalcitrante. Así, y a favor de esta hipótesis puede mencionarse que las lacasas están ampliamente distribuidas en hongos (Mayer, 1987), decreciendo su importancia de gimnospermas a monocotiledóneas, en las cuales pueden considerarse ausentes. Por otra parte, dichas enzimas parecen jugar un papel muy importante en la síntesis de las melaninas en los hongos (Mayer 1987) (polímero que desempeña en los hongos una función similar a la de las ligninas en las plantas vasculares superiores), siendo estas melaninas especialmente abundantes en los rizomorfos (Dean y Eriksson, 1994), que son órganos especializados en translocar agua y nutrientes hacia las porciones distales del hongo, y que

pueden considerarse un modelo primitivo de estructura vascular durante la evolución del reino vegetal.

De esta forma, y de acuerdo con Ros Barceló (1997), es probable que las lacasas tuvieran una función importante en la síntesis de ligninas en las plantas vasculares primitivas, en las cuales las peroxidasas podrían estar ausentes, siendo las lacasas las responsables de la oxidación de los alcoholes cinamílicos a compuestos de bajo peso molecular de tipo lignina. De la misma forma, es probable que, durante la evolución de las plantas vasculares las lacasas fueran desplazadas de realizar su función original como consecuencia de la adquisición evolutiva de las peroxidasas (enzimas más eficientes en la síntesis de las ligninas). Dicho proceso tuvo que ser extraordinariamente importante durante la evolución vegetal ya que la lignificación de las paredes celulares contribuyó a la sustentación vigorosa de las partes aéreas de aquellas plantas primitivas que emergían del agua.

Así, Ros Barceló (1997) considera a las lacasas actuales presentes en plantas superiores como un residuo evolutivo, que ha degenerado en formas enzimáticas con características intermedias, y que mantienen sólo algunas de sus propiedades originales. Dicha hipótesis planteada por este autor, referente a la evolución degenerativa de las lacasas de plantas superiores, se sustenta en la identificación de numerosas fenoloxidasas de pared celular en plantas superiores (Savidge y Udagama-Randeniya, 1992; McDougall y col., 1994a; Chabanet y col., 1994) que conservan algunas de las propiedades originales de las lacasas, todavía presentes en las lacasas de los hongos, pero que no pueden considerarse como verdaderas lacasas en sentido estricto.

Peroxidasas

Mientras que las peroxidasas básicas se localizan simultáneamente tanto en la pared celular como en las vacuolas, las peroxidasas ácidas están localizadas normalmente en la pared celular, mostrando una mayor afinidad y reactividad por los alcoholes cinamílicos que las básicas (Ros Barceló y col., 1997), aunque existen ciertas excepciones.

El papel que desempeñan las peroxidasas en la polimerización de los alcoholes cinamílicos ha sido descrito desde numerosas aproximaciones experimentales. Así, tejidos lignificantes de tabaco, (Lagrimini y col., 1987), tomate (Mohan y col., 1993) y *Populus kitakamiensis* (Osakabe y col., 1994) expresan tanto los promotores del gen de la peroxidasa, como una acumulación de sus transcritos. Del mismo modo, estudios histoquímicos (Ferrer y Ros Barceló, 1994), citoquímicos (Hepler y col., 1972; Czaninski, 1978) e inmunocitoquímicos (Kim y col., 1988; Smith y col., 1994) han mostrado que la peroxidasa está localizada en las paredes celulares lignificantes de los elementos del xilema, fundamentalmente a nivel de las esquinas celulares y la lámina media, y a nivel de los engrosamientos secundarios (Fig. I.17).

Las peroxidasas presentan la capacidad de oxidar los tres alcoholes cinamílicos (Sterjiades y col., 1993; Dean y col., 1994; Takahama, 1995) dando lugar a polímeros de deshidrogenación altamente condensados (Weymouth y col., 1993; Okusa y col., 1996; Saake y cols., 1996). Cuando se aumenta la complejidad de las condiciones de polimerización para que el proceso *in vitro* sea más parecido al proceso *in vivo*, se ha podido observar que los DHPs formados presentan una mayor similitud con las ligninas naturales (Tollier y col., 1991; Terashima y col., 1995, 1996; Grabber y col., 1996). De cualquier modo, este hecho no es sorprendente ya que hay numerosos parámetros físico-químicos, tales como el pH, la velocidad de suministro de substratos, la concentración relativa de monómeros fenólicos y oligómeros, la presencia de desactivadores de radicales libres, y la naturaleza de la matriz polisacarídica, entre otros, que parecen controlar la naturaleza del proceso de polimerización de los radicales fenólicos y su posterior encauzamiento hacia subestructuras de tipo lignina (Terashima, 1990). De hecho, ésta parece ser la razón de que las ligninas sintéticas, preparadas artificialmente a través de la polimerización peroxidativa de los alcoholes cinamílicos, sólo se parezcan en un cierto grado a las ligninas nativas (Terashima, 1990).

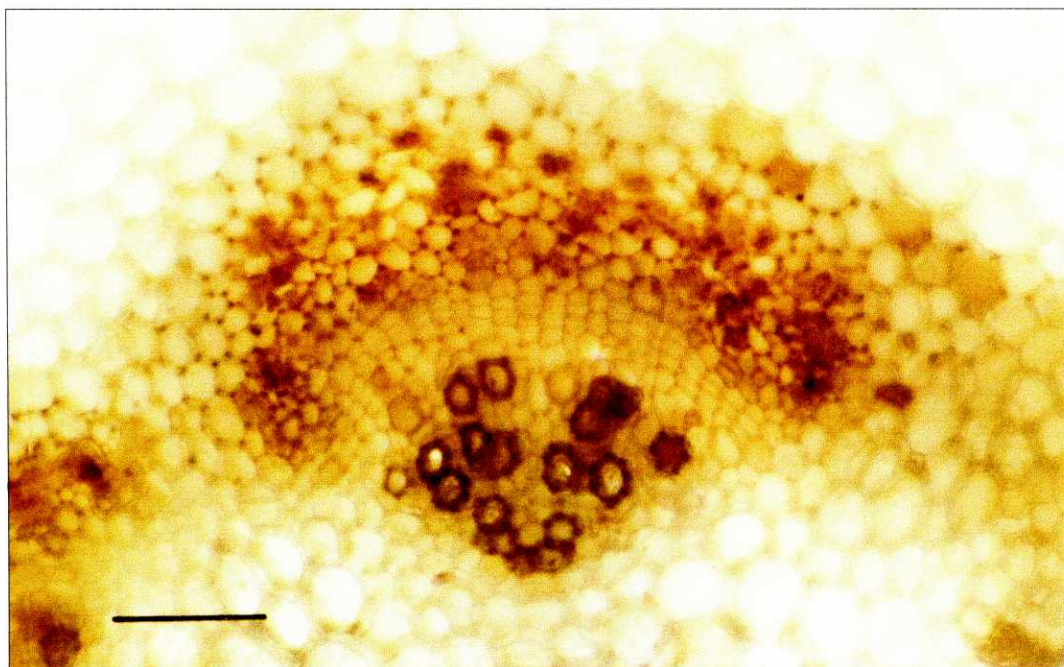


Figura I.17.- Localización de la actividad peroxidasa en tejidos vasculares del hypocotilo de *Lupinus albus* usando como sustrato 3,3'-diaminobenzidina (tomado de Ferrer, M.A., y Ros Barceló, A., 1994). Barra=200 μm

Cuando se ha estudiado las afinidades de varias peroxidasas aisladas de tejidos lignificantes por los alcoholes cinamílicos, es decir los valores de k_M , se han podido observar valores de k_M del orden de 10-400 μM (Takahama, 1993; Ros Barceló y col., 1998). Estos valores de k_M mostrados por las peroxidasas son menores que los mostrados por las lacasas vegetales (12 mM) (Bao y col., 1993), y se encuentran dentro del orden (5-500 μM) de los valores de afinidad mostrados por las enzimas precedentes en la ruta biosintética, como son la CCR, la CDA, y las β -glucosidasas (Grisebach, 1981; Dharmawardhana y col., 1995). En este punto no se debe de olvidar que los valores de k_M de las peroxidasas con respecto al alcohol coniferílico presentan una cierta dependencia de la concentración de peróxido de hidrógeno, siendo proporcionalmente menores al descender la concentración de peróxido de hidrógeno (Ros Barceló y col., 1998). Por otra parte, no cabe esperar que las concentraciones de peróxido en los vasos del xilema lignificantes sean muy altas (Schopfer, 1994). De hecho, los valores de k_M mostrados para el H_2O_2 por

muchas peroxidasas, cuando se usan concentraciones de alcohol coniferílico entre 30 y 160 μM (Takahama, 1993; Ros Barceló y col., 1998), sugieren que dichas enzimas se encuentran muy bien adaptadas a trabajar en presencia de bajas concentraciones de H_2O_2 .

Debido a la necesidad que tienen las peroxidasas del peróxido de hidrógeno para su actuación, es lógico pensar que para que las peroxidasas tuvieran un papel activo en la lignificación de la pared celular, no sólo es indispensable que éstas se encuentren localizadas en las mismas áreas de la pared celular que lignifica, sino que también es necesario que en ellas las peroxidasas permanezcan activas. Por ello, es conveniente, aunque no indispensable (véase por ejemplo Ferrer y col., 1990), que dichas áreas de la pared celular muestren una producción de peróxido de hidrógeno a fin de favorecer la actividad de las peroxidasas (Fig I.18). Sin embargo, dichos estudios sobre la localización cito/histoquímica del peróxido de hidrógeno no son fáciles de interpretar, siendo dicha dificultad y variabilidad ya demostrada por Schopfer (1994), quien estudió la localización del peróxido de hidrógeno en diversos tejidos vegetales a través de tinciones histoquímicas. A pesar de ello, diferentes estudios citoquímicos (Czaninski y cols., 1993) e histoquímicos (Olson y Varner, 1993), han demostrado altos niveles de H_2O_2 en los tejidos del xilema lignificantes, conclusiones que sustentan la hipótesis previa de que las peroxidasas y el H_2O_2 se encuentran íntimamente relacionados con la lignificación de la pared celular (Catesson y col., 1978) (Fig. I.19). En este sentido, es importante mencionar un trabajo reciente de Nose y col. (1995), quienes han descrito que agentes secuestradores del H_2O_2 inhiben la lignificación de suspensiones celulares de *Pinus taeda*, datos que refuerzan la idea de que la síntesis de ligninas es totalmente dependiente de la producción de H_2O_2 , pudiendo tener éste, en cierta medida, un papel regulador.

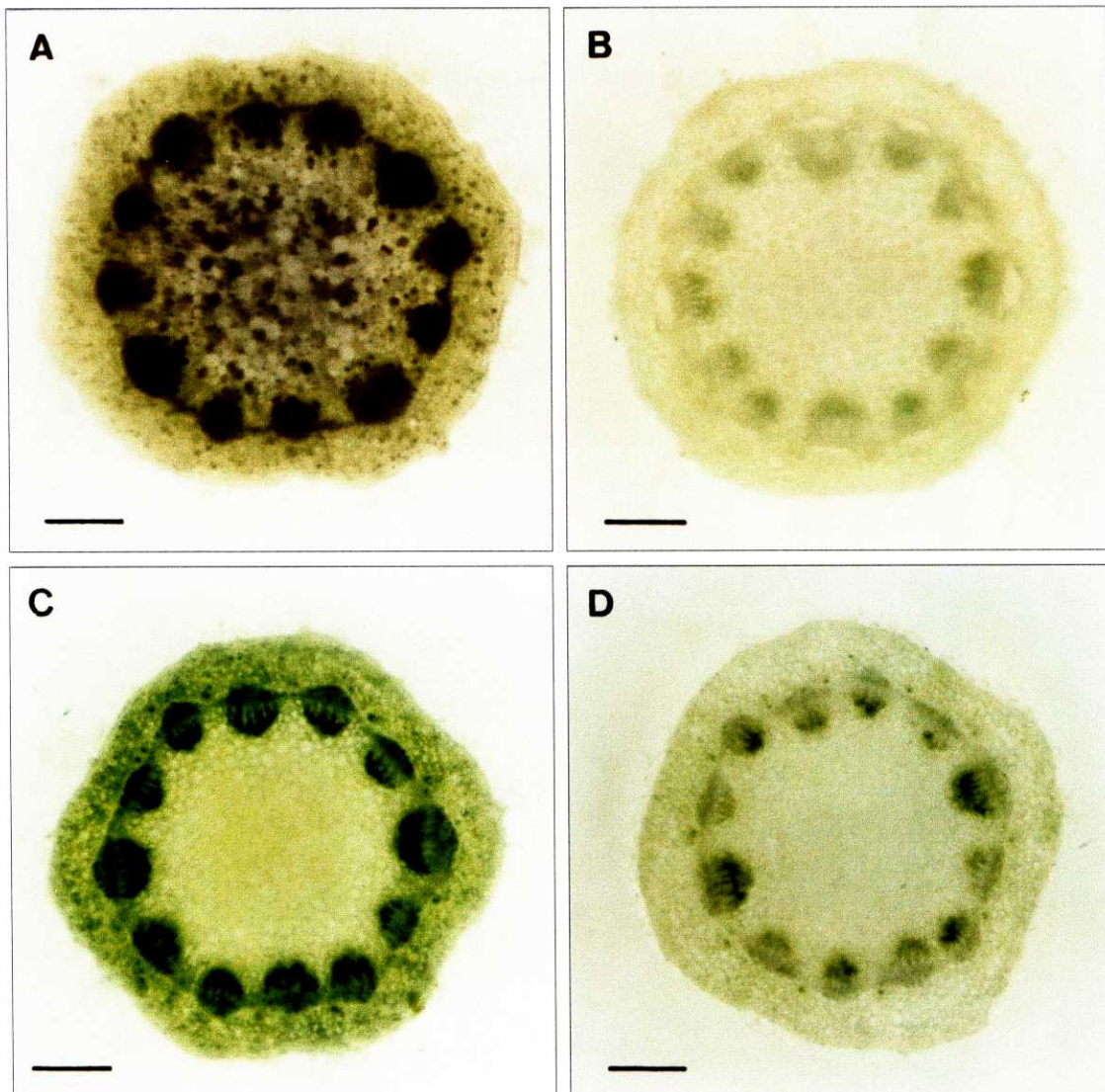


Figura 1.18.- Producción de H_2O_2/O_2^- por el xilema de *Z. elegans*. A) Sección control teñida con el reactivo IK/almidón. B) Sección teñida con el reactivo IK/almidón en presencia de 200 U/ml de catalasa. C) Sección teñida con el reactivo NBT. D) Sección teñida con el reactivo NBT en presencia de 250 U/ml de SOD. Barra= 300 μ m (tomado de Ros Barceló, 1999)

Aunque en un principio puede considerarse que las peroxidasas son las candidatas más adecuadas para realizar el proceso de polimerización de los alcoholes cinamílicos, diversos estudios realizados con plantas transgénicas de tabaco muestran que una reducción significativa en la expresión de una isoenzima ácida de la peroxidasa no está acompañada de una reducción de la lignificación (Lagrimini, 1991) y arrojan ciertas dudas sobre la participación

exclusiva de las peroxidadas ácidas en este proceso.

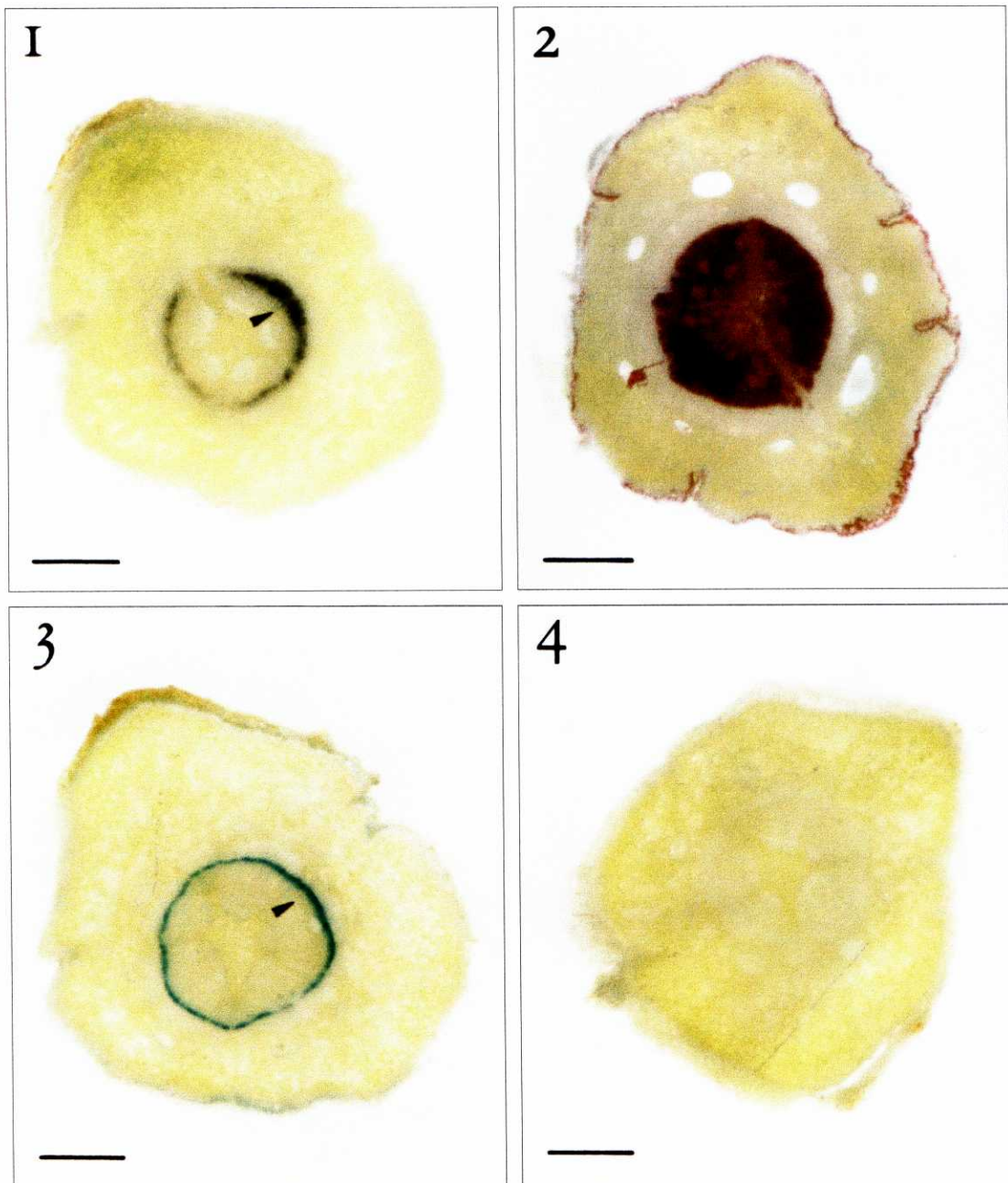


Figura 1.19.- 1) Tinción del tallo de *Pinus halepensis* con el reactivo IK/almidón para detectar la presencia de H_2O_2 . 2) Tinción con el reactivo floroglucinol en medio ácido para detectar ligninas. 3) Tinción con TMB para detectar la presencia conjunta de H_2O_2 y peroxidasa. 4) Control en presencia de 1.0 mM de ácido ascórbico. Barra= 600 μ m (tomado de Ros Barceló, 1998)

Otro aspecto que deberían cumplir las enzimas que participasen en la polimerización de los alcoholes cinamílicos es la de presentar una correlación

cuantitativa con la lignificación. En el caso de las peroxidasas, esta correlación ha sido frecuentemente descrita en la literatura, como por ejemplo en el caso del endocarpo de melocotón (Abeles y Biles, 1991), en fibras de lino (McDougall, 1992), en álamo (Baier y col., 1993), en agujas de picea noruega (Polle y col., 1994) y en células en suspensión de *Zinnia* inducidas a diferenciarse en traqueidas (Sato y col., 1995). Sin embargo, en ninguno de los casos anteriormente citados ha sido una sola peroxidasa, ya sea básica o ácida, la única implicada en esas correlaciones. De todos estos estudios se desprende la conclusión de que más de una isoenzima parece estar implicada en la polimerización de los alcoholes cinamílicos. Estos estudios podrían explicar por qué la reducción en la expresión de una isoenzima de peroxidasa individual no está acompañada por una reducción en la lignificación de la pared celular.

Este hecho, más que una desventaja, podría ser una ventaja ya que la aparente redundancia en la función biológica mostrada por las isoenzimas de la peroxidasa podría ser la causa de la microheterogeneidad mostrada por las ligninas dentro de las diferentes áreas de la pared celular (Ros Barceló, 1997). Así, es bien conocido que las isoenzimas de la peroxidasa pueden mostrar una cierta especificidad de sustrato y fuertes diferencias en su reactividad con los alcoholes cinamílicos (Ros Barceló y col., 1997). Del mismo modo, las isoenzimas de la peroxidasa pueden mostrar una localización específica en la pared celular, bien en paredes celulares primarias o en engrosamientos secundarios (ver Ros Barceló y col., 1997), siendo las pectinas uno de los factores que contribuirían a esa localización específica de las diferentes isoenzimas de la peroxidasa en los diferentes dominios de la pared celular (Ros Barceló y col., 1988). Es por ello que la propia redundancia biológica mostrada por las peroxidasas podría explicar ciertas cuestiones que aún permanecen por resolver. Entre ellas se encuentran las razones que motivan que las ligninas no sean depositadas uniformemente dentro de la pared celular, y la propia heterogeneidad mostrada por las mismas.

Sin embargo, quizás el mayor enigma que persiste hoy día sea saber

cual es el mecanismo a través del cual se genera el peróxido de hidrógeno necesario para activar a las peroxidasas durante la oxidación de los alcoholes cinamílicos. Aunque se han propuesto posibles sistemas generadores de H_2O_2 , tanto a nivel de la pared celular como a nivel de la membrana plasmática, sólo existen ciertas evidencias, más o menos directas, que puedan confirmar que alguno de ellos pueda ser realmente funcional en células lignificantes (Ros Barceló, 1998; Ogawa y col., 1997).

Hacia 1976, se propuso la primera hipótesis sobre la existencia de un sistema generador de H_2O_2 en la pared celular. Así, Elstner y Heupel sugirieron que las peroxidasas de la pared celular podrían generar el H_2O_2 durante la oxidación de NADH, siendo usado posteriormente ese mismo H_2O_2 , por las propias peroxidasas, para oxidar los alcoholes cinamílicos a ligninas. Dicha teoría, que recibió algunos apoyos experimentales (Halliwell, 1978; Mäder y col., 1980; Goldberg y col., 1985), es cuestionable debido a los bajos niveles de NADH que se pueden encontrar en las paredes celulares. Argumentos similares pueden darse también para excluir otros sistemas generadores de H_2O_2 propuestos por la bibliografía, como por ejemplo, aquellos que implican a la di(poli)amina oxidasa (Angelini y Federico, 1989) o a la oxalato oxidasa (Zhang y col., 1995), sistemas enzimáticos que, en algunos casos (ver Liu y col., 1995), muestran muy poca asociación con tejidos vasculares en lignificación.

Estudios recientes, parecen apuntar la idea de que dicho sistema generador de peróxido de hidrógeno podría estar localizado a nivel de la membrana plasmática (Fig. I.20), e implicaría a una NAD(P)H oxidasa que usaría NADPH citoplasmático (Ros Barceló, 1998; Ogawa y col., 1997), y que a su vez, parece ser la responsable de la producción de H_2O_2 durante las respuestas de defensa de algunas plantas a la infección por micro-organismos (Auh y Murphy, 1995; Desikan y col., 1996) (Fig I.21).

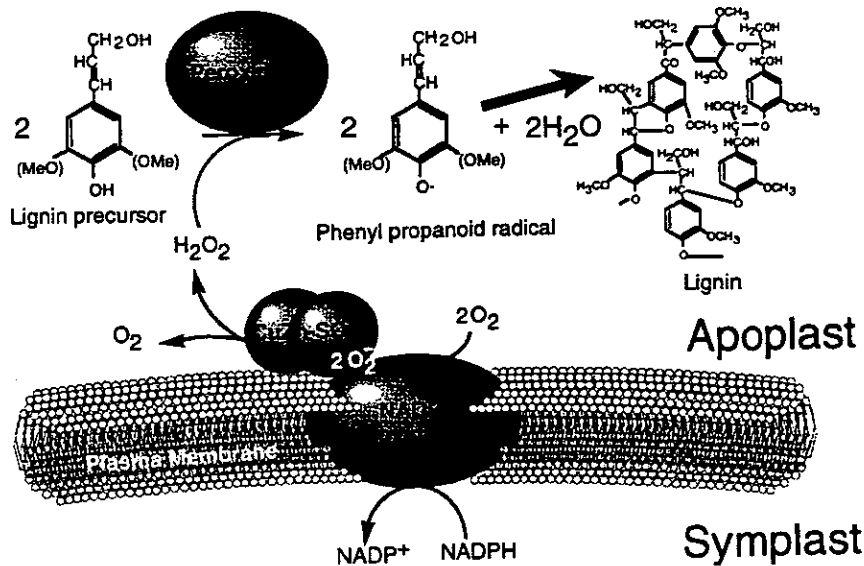


Figura 1.20.- Esquema propuesto para la generación del H_2O_2 implicado en la biosíntesis de lignina

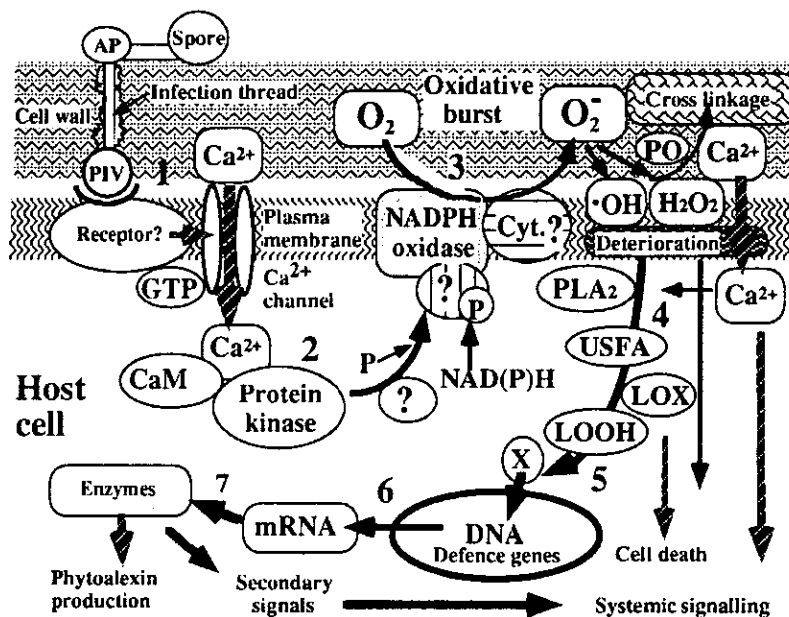


Figura 1.21.- Explosión oxidativa que ocurre en células vegetales invadidas por patógenos incompatibles, o tratadas con elicitores fúngicos, y transducción de la señal durante la inducción del mecanismo de defensa. 1) reconocimiento del patógeno por un receptor; 2) flujo de Ca^{2+} a través de un canal de Ca^{2+} , y activación de una protein quinasa dependiente de calmodulina, que provoca la activación de una NADPH oxidasa; 3) sistema de transferencia de electrones desde el citocromo b a la molécula de oxígeno, y producción del anión superóxido, radical OH, y H_2O_2 ; 4) activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) e inducción de la peroxidación de lípidos (tomado de Doke y col, 1996).

II.- OBJETIVOS

Cuando un patógeno invade una planta desencadena en ella una serie de respuestas de tipo metabólico, que tienen como objeto proteger a la planta del ataque de ese agente. De todas estas respuestas destaca la síntesis de lignina, que suele ir acompañada de un incremento en la expresión de ciertas enzimas del metabolismo secundario, entre las que se encuentran las peroxidasas. Para determinar la extensión en la que las peroxidasas están implicadas en la síntesis de las ligninas, se utilizó la especie *Zinnia elegans*, usada habitualmente como modelo en los estudios de lignificación de la pared celular. A partir de estos estudios se determinará la importancia de la lignificación en la interacción *Capsicum annuum* L. var. *annuum*-*Verticillium dahliae*. En base a lo cual se plantean los siguientes objetivos concretos:

- Estudio del proceso de la oxidación de los alcoholes cinamílicos y cinamaldehídos por la peroxidasa de *Zinnia elegans*.
- Análisis por métodos histoquímicos de la actividad enzimática responsable de la polimerización de las ligninas en el hipocotilo de *Zinnia elegans*.
- Efecto de la inoculación de *Verticillium dahliae* en plantas de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* sobre la actividad peroxidasa y la lignificación.
- Estudio del metabolismo oxidativo en la interacción *Capsicum annuum* L. var. *annuum*-*Verticillium dahliae*.

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

III.1.- MATERIAL INSTRUMENTAL

Agitador magnético SBS A-06

Arcón congelador Ignis

Balanza electrónica AND FY-3000

Balanza de precisión Denver Instrument Co. XE Series model 50.

Baño Selecta Univeba-401

Batidora Hamilton

Bomba de vacío Telstar MD-5

Cámara fría 4°C Koxka P-33014

Centrífuga refrigerada de alta velocidad Beckman J2-21

Centrífuga refrigerada Heraeus Sepatech.

Cubeta de isoelectroenfoque Multiphor II Pharmacia-Biotech

Equipo fotográfico Olympus

Equipo fotográfico Pentax

Espectrofotómetro UV/Visible Varian, Cary 3E

Espectrofotómetro UV/Visible Uvikon

Fuente de alimentación de electroforesis Pharmacia-Biotech EPS-3500

Lupa Olympus B071

Microcentrífuga Microfuge E Beckman

pHmetro Crison 2001

Rotavapor

Transiluminador de SBS IV-I

Ultracentrífuga Beckman L8-70M

III.2.-REACTIVOS

Acido ascórbico	Sigma A-7631
Ácido metacloroperoxibenzoico	Aldrich 27,303-1
Ácido ferúlico	Sigma F-3500
Alcohol coniferílico	Sigma C-9548
Alcohol sinapílico	Aldrich 40,458-6
Almidón	Sigma S-9765
Azida sódica	Merck R:28-32
BF ₃ (trifluoro de boro dietileterato)	Aldrich 21,660-7
Bolsas de dialisis	Sigma D-9777
BSTFA Kit (N,O-bis(trimetilsilil)trifloroacetamida)	Supelco 3-3024
Celulasa	"Onozuka" R-10
Columna PD-10 Sephadex G-25	Pharmacia Biotech
Diclorometano	Panreac Cód. 131254
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Merck 2931
1,4-Dioxano	Scharlau Di 1284
DL-Ditiotreitol	Sigma D-0632
Docosano	Aldrich 13,445-7
E-64	Sigma E-3132
EDTA (ácido etilen-diamin-tetraacético)	Sigma ED2SS
Etanol	Panreac 131086
Etanotiol	Aldrich E3,70-8
Eter etílico	Panreac 141313
Ferrocianuro potásico	Sigma P-3289
Floroglucinol	Aldrich P3,800-5
4-Hidroxi-3-metoxicinamaldehído	Aldrich 38,205-1
Metanol	Panreac 211091
4 - Methoxy-1-naphthol	Aldrich 17,455-6
Nitroprusiato sódico	Sigma S-0501
n-Octanol	Merck

Permanganato potásico	Probus
Peróxido de hidrógeno	Merck
Patata dextrosa agar	Sigma P-2182
PTIO(2-fenil-4,4,5,5-tetrametil-imidazolona-1-oxil)	Sigma P-5084
PVPP (Polivinilpoli-pirrolidone)	Sigma P-6755
Queroseno	
Reactivo de Folin & Ciocalteau	Merck 9001
Sacarosa	Probus 176820
Siringaldazina	Sigma S-1130
3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina	Sigma T-8788
Trans-3,5-dimetoxi-4-hidroxi-cinamaldehído	Aldrich 38,215
Tris(hidroximetil) amino-metano	Sigma T-1378
Tritón X-100	Sigma T-6878
Tropolona	Sigma T-7387
Yoduro potásico	Sigma P-4286

El resto de los reactivos y disolventes empleados fueron de la máxima pureza disponible.

III.3.- ESTUDIO DE LA LIGNIFICACIÓN EN HIPOCOTILOS DE *Z. elegans*

III.3.1.- Material vegetal

Las semillas de *Zinnia elegans* fueron suministradas por w.r.vanderschoot (Hillegom, The Netherlands). Las semillas se sembraron en humus, (Humus King™, tipo 3, Imprá S.L., El Ejido, Almería, España), que contenía un 30% de C orgánico, un 0.5% de N orgánico, y un 52% de materia orgánica total, siendo el pH 5.5-6.0. Los niveles de fertilizantes presentes en dicho humuseran de 120-160 mg/L de N, 100-130 mg/L de P₂O₅ y 150-200 mg/L de K₂O.

Las plantas crecieron en invernadero bajo condiciones de luz naturales y a 25°C, utilizándose para todos los experimentos, hipocotilos de 30 días de edad.

III.3.2.- Detección histoquímica de ligninas

III.3.2.1.- Reacción de Maüle

La reacción de Maüle, una tinción específica para los grupos siringilo de las ligninas, se realizó de acuerdo con Atanassova y col. (1995), incubando las secciones en MnO₄K al 1% en agua, durante 5 minutos. A continuación se realizó un lavado-desteñido con ácido clorhídrico al 30%, y finalmente se observaron en una solución de amoníaco.

Las tinciones histoquímicas se realizaron sobre secciones de grosor comprendido entre 100 y 300 µm. Las observaciones y fotografías se realizaron con una lupa Olympus B071.

III.3.2.2.- Test de Wiesner

La determinación histoquímica de ligninas usando el test de Wiesner, que es específico para grupos cinamaldehído, se realizó como describe Ros Barceló (1998), incubando las secciones con floroglucinol al 1% (p/v) en HCl/EtOH (25:75) (v/v) durante 10-15 minutos.

III.3.3.- Especificidad de la reacción con el floroglucinol

Para estudiar la especificidad del test de Wiesner, se prepararon medios de reacción compuestos por el reactivo floroglucinol al 1% (p/v) en HCl/EtOH (25:75) (v/v), y una concentración final de 20 μ M de los distintos sustratos: alcohol coniferílico, alcohol sinapílico, coniferilaldehído y sinapilaldehído.

En el caso de la reacción con los polímeros de deshidrogenación, éstos se obtuvieron previamente incubando durante una hora los distintos sustratos en presencia de H₂O₂ y peroxidasa de *Z. elegans*, añadiendo a continuación el reactivo de floroglucinol al 1% (p/v) en HCl/EtOH (25:75) (v/v). Se realizaron controles en ausencia de H₂O₂ y de peroxidasa.

En todos los casos se siguió la reacción a través de los espectros de absorbancia de los medios de reacción entre los 300 y los 700 nm.

III.3.4.-Análisis de ligninas de *Z. elegans* por tioacidolisis

III.3.4.1.- Obtención de paredes celulares

10 gramos de tejido fresco se homogeneizaron en un mortero con agua destilada, centrifugando el homogeneizado a 3000g durante 10 minutos, después de lo cual se descartó el sobrenadante. El precipitado obtenido se lavó con una solución al 1% de Tritón X-100, volviéndose a centrifugar de nuevo en las mismas condiciones. Seguidamente, el precipitado de esta última

centrifugación se lavó con agua, hasta conseguir la total eliminación del Tritón X-100, y a continuación se realizaron cuatro lavados con etanol absoluto.

El precipitado final se filtró a vacío sobre un disco de celulosa, realizándose varios lavados con eter etílico, hasta conseguir el secado total de las paredes celulares.

III.3.4.2.- Tioacidolisis

10 mg de las paredes celulares antes obtenidas se mezclaron con 10 ml de la siguiente disolución: BF_3 eterato 0,2 M en una mezcla 8,75/1 (v/v) dioxano/EtSH, añadiéndose 1 ml de una solución 0,25 mg ml⁻¹ de docosano en diclorometano como estándar interno. La tioacidolisis se realizó en un tubo de vidrio con tapón de teflón en un baño de aceite mineral a 100°C durante 4 horas, agitando suavemente cada cierto tiempo.

Una vez transcurridas 4 horas, se añadieron 30 ml de agua con el fin de detener la reacción y enfriar la mezcla. Seguidamente, se ajustó el pH de la mezcla a un valor entre 3,0 y 4,0, con una solución 0,4 M de carbonato sódico.

Una vez ajustado el pH, se procedió a la extracción con 30 ml de diclorometano, usando para ello un embudo de decantación. Esta extracción se realizó tres veces, tras lo cual los volúmenes obtenidos se juntaron, añadiéndose sulfato sódico para eliminar el agua arrastrada. A continuación se procedió a la evaporación del diclorometano en un rotavapor a 40°C. El residuo final se disolvió en 1 ml de diclorometano.

Finalmente, 5-10 µl de la solución se mezclaron con 100 µl de BSTFA y 10 µl de piridina (grado GC), y los trimetil-silil derivados se analizaron con un equipo de CG-espectroscopía de masas.

III.3.4.3.- Análisis de los trimetil-silil derivados en cromatografía de gases-espectrometría de masas

Para el análisis de las muestras anteriormente obtenidas, se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard 590 Series II, equipado con una columna HP5, Hewlett Packard, de 30 metros x 0,25 mm de diámetro interno, usando Helio como gas portador a una presión de 0,69 bar.

El programa de temperatura fué desde 90°C hasta 270°C, a una velocidad de 5°C/minuto,

El cromatógrafo estaba acoplado a un detector de masas HP 5972, que trabajaba con una intensidad de impacto electrónico de 70 eV.

III.3.5.- Oxidación de alcoholes cinamílicos y cinamaldehídos por paredes celulares del hipocotilo de *Z. elegans*

III.3.5.1.- Obtención de las paredes celulares

Los hipocotilos de *Z. elegans* se homogeneizaron en un mortero con arena a 4°C, y usando como tampón en la proporción 1/2 (p/v), 50 mM Tris HCl pH 7,5.

El homogeneizado se filtró a través de una gasa de celulosa de 0,2 mm de diámetro, descartándose el material retenido. El eluido se centrifugó a 1000g durante 5 minutos. A continuación, el precipitado se resuspendió en Tritón X-100 al 1%, en tampón Tris HCl 50 mM pH 7,5, volviéndose a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente, se realizaron tres lavados con Tris HCl 50 mM pH 7,5, considerándose el último precipitado obtenido como una fracción purificada de paredes celulares.

III.3.5.2.- Oxidación de alcoholes cinamílicos y cinamaldehydos

Para la medida de la oxidación de los alcoholes cinamílicos y los cinamaldehydos por paredes celulares aisladas de hipocotilos de *Z. elegans*, se prepararon medios de reacción que contenían paredes celulares, equivalentes a 0,2 gramos de tejido, 0,5 mM de H₂O₂, y 0,05 mM de sustrato en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. Se realizaron controles en ausencia de H₂O₂.

Los medios de reacción se incubaron durante dos horas a 25°C, y se centrifugaron a 1000g durante 5 minutos. La extensión de la oxidación de los alcoholes cinamílicos y los cinamaldehydos por las paredes celulares se determinó a partir de las caídas en absorbancia a λ_{max} de los sobrenadantes.

III.3.6.- Obtención de la actividad peroxidasa presente en el apoplasto de *Z. elegans*

Hipocotilos de *Z. elegans* se cortaron en secciones de 5 mm y se lavaron con agua destilada. Posteriormente, se sometieron a infiltración a vacío durante un período de 5 minutos a 1,0 KPa, y a 4°C en tampón Tris-acetato 50 mM pH 5,0, que contenía KCl 1,0 M y CaCl₂ 50 mM.

Una vez realizada la infiltración, se escurrieron las secciones y a continuación se centrifugaron en una jeringuilla dentro de un tubo de centrifuga a 1000 g durante 5 minutos a 4°C.

La fracción protéica obtenida se purificó por cromatografía sobre Sephadex G-25, equilibrada en tampón Tris-acetato 5 mM pH 5,0 utilizando una columna PD-10 de Pharmacia.

III.3.7.- Cinética de la oxidación de los alcoholes cinamílicos y los cinamaldehídos por la peroxidasa del apoplasto de *Z.elegans*

III.3.7.1.- Cálculo de los coeficientes de extinción molar

Los coeficientes de extinción de los sustratos se calcularon a partir de disoluciones de distinta concentración midiendo la absorbancia a λ_{max} . Los coeficientes de extinción de los productos se calcularon a partir de la diferencia de absorbancia, antes y después de la oxidación por la peroxidasa de *Z. elegans* y el H_2O_2 .

Para el cálculo de estos coeficientes de extinción se incubaron los distintos sustratos a una concentración de 0,075 mM en presencia de peroxidasa y de un exceso de H_2O_2 , en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0 a 25°C. Se realizaron también controles en ausencia de H_2O_2 y en ausencia de peroxidasa.

El curso de la reacción se siguió por medio de espectros consecutivos del medio de reacción tomados a intervalos de 1 minuto.

III.3.7.2.- Medidas de la oxidación de los distintos sustratos

Las medidas de oxidación de los alcoholes cinamílicos y los cinamaldehídos se realizaron a 25°C en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0, en presencia de distintas concentraciones de H_2O_2 y de sustrato, realizándose controles en ausencia de peroxidasa y de H_2O_2 . Las concentraciones utilizadas fueron:

-Alcohol coniferílico: 6,25 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M;
 H_2O_2 : 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M. Las medidas de la oxidación se realizaron a 262 nm utilizando un coeficiente de extinción de 9,75 mM^{-1} .

-Alcohol sinapílico: 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M;
 H_2O_2 : 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M. Las medidas de

la oxidación se realizaron a 271 nm utilizando un coeficiente de extinción de $4,14 \text{ mM}^{-1}$.

-Coniferilaldehído: 6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM ;
 H_2O_2 : 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM , 500 μM . Las medidas de la oxidación se realizaron a 341 nm utilizando un coeficiente de extinción de $13,44 \text{ mM}^{-1}$.

-Sinapilaldehído: 6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM ;
 H_2O_2 : 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM , 500 μM . Las medidas de la oxidación se realizaron a 340 nm utilizando un coeficiente de extinción de $11,95 \text{ mM}^{-1}$.

III.3.8.- Caracterización de la actividad oxidasa/peroxidasa presente en el hipocotilo de *Z. elegans*

III.3.8.1.- Localización histoquímica del H_2O_2

La determinación histoquímica del peróxido de hidrógeno se realizó incubando las secciones directamente con el reactivo IK/almidón, compuesto por IK 0,1 M y almidón al 4% (p/v) (Olson y Varner, 1993), ajustando el pH a 5,0 con KOH. Las secciones se incubaron con dicho reactivo durante toda la noche antes de ser observadas y fotografiadas.

III.3.8.2.- Localización histoquímica de la actividad peroxidasa

La determinación histoquímica de la actividad peroxidasa se realizó incubando las secciones directamente con siringaldazina 50 μM disuelta en dimetilsulfoxido, en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0 durante 15-20 minutos a 25°C . Se realizaron controles en presencia de catalasa que se utilizó a una concentración de 200 U ml^{-1} .

III.3.8.3.- Efecto de los distintos inhibidores sobre la velocidad de oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa del apoplasto de *Z. elegans*

La actividad siringaldazina oxidasa de la peroxidasa del apoplasto de *Z. elegans* se determinó a 25°C en un medio de reacción estándar compuesto por siringaldazina 50 µM, H₂O₂ 0,5 mM en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0, usando un coeficiente de extinción molar a 530 nm de 27 mM⁻¹ cm⁻¹.

III.3.8.3.1.- Efecto del ácido ferúlico y la tropolona

El efecto del ácido ferúlico se estudió preparando medios de reacción que contenían ácido ferúlico a la concentración de 0,1 µM, 10 µM, 100 µM y 1000 µM. En el caso de la tropolona se comprobó su efecto a la concentración 1 mM. Los inhibidores se añadieron al medio 1 minuto antes de iniciar la reacción con la adición de la siringaldazina.

III.3.8.3.2.- Efecto del ferrocianuro potásico y del ferricianuro potásico

El efecto del ferrocianuro potásico se estudió preparando medios de reacción que contenían ferrocianuro potásico a la concentración de 10 µM, 50 µM, 100 µM y 1000 µM. En el caso del ferricianuro potásico se comprobó su efecto a la concentración 1 mM. Los inhibidores se añadieron al medio 1 minuto antes de iniciar la reacción con la adición de la siringaldazina.

III.3.8.3.3.- Efecto del ácido metacloroperoxibenzoico

El efecto del ácido metacloroperoxibenzoico se estudió preparando medios de reacción que contenían ácido metacloroperoxibenzoico a la concentración de 0,5 mM, 1 mM y 2,5 mM. El inhibidor se añadió al medio 1 minuto antes de iniciar la reacción con la adición de la siringaldazina.

III.3.8.4.- Efecto de distintos inhibidores sobre la oxidación de la siringaldazina por el xilema de *Z. elegans*

El efecto de los distintos inhibidores sobre la oxidación de la siringaldazina por el xilema de *Z. elegans* se realizó incorporando las siguientes concentraciones al medio de reacción: ácido ferúlico 1mM, tropolona 1mM, ferrocianuro potásico 1mM, ferricianuro potásico 1mM y ácido metacloroperoxibenzoico 2,5 mM. Después de la infiltración en vacío de las secciones en presencia de los efectores se añadió la siringaldazina a una concentración final de 50 μ M, observando y fotografiando las secciones después de incubar 15-20 minutos.

III.4.- INTERACCIÓN *Capsicum annuum* L. var. *annuum*-*Verticillium dahliae* Kleb.

III.4.1.- Material biológico

III.4.1.1.- *Capsicum annuum* L. var. *annuum*

Se utilizaron semillas de pimiento de Padrón de cosecha propia, las cuales fueron desinfectadas mediante una inmersión de 30 minutos en una disolución al 1-2% de lejía comercial (hipoclorito sódico 50 mg/ml). A continuación se retiraba dicha disolución y se realizaban sucesivos lavados de las semillas con agua destilada, para finalmente dejarlas en agua destilada toda la noche. Al día siguiente se sembraban en bandejas usando como sustrato vermiculita estéril. Al cabo de 8-11 días las plantas emergían del sustrato, y se consideró ese momento como tiempo cero.

Desde el momento de la siembra el crecimiento se realizó en cámaras de cultivo en las cuales se controlaron tanto la temperatura como el fotoperiodo: 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 25°C.

III.4.1.2.- *Verticillium dahliae* Kleb.

El hongo *V.dahliae* se hacía crecer en placa con medio PDA, alternándolo con el medio pobre agua-agar, con objeto de mantener la virulencia del hongo; asimismo esporádicamente se infectaban plantas para seguidamente reaislar el hongo, con el mismo objetivo de mantener la virulencia. Todas las placas se guardaban en oscuridad manteniendo la temperatura constante a 25°C.

III.4.2.- Proceso de inoculación con *V. dahliae* Kleb.

Los conidios se obtuvieron a partir de placas con medio PDA en donde había estado creciendo *V. dahliae* durante 15 días. La suspensión de conidios fue preparada mediante la adición de agua destilada estéril a la placa, sometiéndola a una agitación muy suave y recogiendo dicha suspensión. El recuento se llevó a cabo con una cámara Thoma y el inóculo fue ajustado a una concentración de 10^6 conidios/ml añadiéndole agua destilada estéril (Melouk,1992) .

La inoculación se realizó con plantas de 15 días que se encontraban creciendo en vermiculita estéril. Se sacaron las plantas de la vermiculita y se lavaron sus raíces. A cada planta se le practicó un pequeño corte en las raíces para eliminar aproximadamente 1 cm de la raíz, y se introdujeron en el inóculo durante 45 minutos. Paralelamente se hizo un control en el cual las plantas eran introducidas, también previo corte en las raíces, en agua estéril durante 45 minutos. A continuación las plantas fueron transplantadas a bandejas con celdas usando como substrato tierra vegetal y vermiculita estériles en una proporción 2:1. A partir de este momento las plantas se conservaban en la cámara de cultivo con las condiciones controladas: 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 25°C . Se recogieron muestras tanto de plantas control como inoculadas a las 12, 24 y 48 horas, y a los 7,14, 21 y 28 días. Las muestras se separaban por órganos, pesándolas y congelándolas hasta su posterior uso.

III.4.3.- Reaislamiento del hongo en plantas infectadas

Con el fin de comprobar que la infección ha tenido lugar, y poder observar la velocidad de invasión del hongo, se realizaron reaislamientos del mismo a partir de plantas infectadas. Para ello, se tomaban plantas control e infectadas y se desinfectaba su superficie, para lo cual se introdujeron en agua con hipoclorito sódico en una proporción del 10%, durante 5 minutos en agitación continua, lavándose seguidamente en agua destilada dos veces

durante otros 5 minutos y también en agitación. Finalmente se introducían en la cámara de flujo, sobre papeles previamente esterilizados en el autoclave y bajo luz ultravioleta. En estas condiciones permanecían hasta que se secaban y a continuación, con ayuda de un bisturí, se troceaban y se introducían los fragmentos de planta en un medio de cultivo sólido de PDA suplementado con penicilina y estreptomycin (100 mg L⁻¹). A continuación las placas se cultivaban en oscuridad a 25°C.

III.4.4.- Efecto de la inoculación con *V. dahliae* Kleb. sobre la actividad peroxidasa de *C. annuum* L. var. *annuum*

III.4.4.1.- Extracción de la peroxidasa total

Las muestras de los distintos órganos eran homogeneizadas a 4°C, en un mortero con arena y tampón de extracción en una proporción 1:2 (p/v). El tampón estaba compuesto por EDTA 1mM, KCl 1mM, Tris 50mM, ajustando el pH con HCl a 7,5. En el momento de la homogeneización del tejido se añadía 1mg de bisulfito sódico por mililitro de tampón y 0,5gr de PVPP por cada 10 gramos de tejido. A continuación se filtró a través de dos gasas, previamente enfriadas, descartándose el material retenido. El eluido se centrifugó a 27000g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante de esta centrifugación se purificó por cromatografía sobre Sephadex G-25, equilibrada en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 utilizando una columna PD-10 de Pharmacia. El resultado de esta purificación se consideró como peroxidasa total.

III.4.4.2.- Fraccionamiento subcelular

III.4.4.2.1.- Homogeneización

Los tejidos se homogeneizaron, por separado, en un mortero con arena, en una proporción 1:2, p/v en un tampón de extracción compuesto por

sacarosa 0,25M, $(\text{AcO})_2\text{Mg}$ 1mM y Tris HCl 50mM pH 7,5. En el momento de la homogeneización se le añadía al tampón PVPP $0,1 \text{ g ml}^{-1}$. La homogeneización se realizó manteniendo la temperatura a 4°C .

El homogeneizado se filtró a través de dos gasas, previamente enfriadas, descartándose el material retenido. El eluido de la filtración se centrifugó durante 15 minutos a 1000g en una centrifuga refrigerada. El precipitado de esta centrifugación se consideró como fracción primaria de paredes, y el sobrenadante se sometió a una última centrifugación a 27000g durante 20 minutos, considerándose este precipitado como fracción de membranas y el sobrenadante como fracción soluble.

III.4.4.2.2.- Extracción de la enzima enlazada a membranas

La solubilización de la actividad peroxidasa enlazada a membranas, se realizó de acuerdo con la técnica desarrollada por Ros Barceló y Muñoz, (1988).

Para solubilizar la enzima iónicamente enlazada a la fracción de membranas, se incubaron éstas con CIK 1M durante 30 minutos, centrifugándose a continuación a 27000g durante 20 minutos. Se consideró al sobrenadante obtenido como fracción de peroxidasas iónicamente ligadas a membrana. Este proceso se repitió tres veces para recuperar la mayor cantidad de enzima posible.

III.4.4.2.3.- Extracción de la enzima enlazada a paredes

El proceso de extracción de la enzima ligada a paredes, se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Ros Barceló y col. (1987). Para ello, la fracción primaria de paredes celulares, se resuspendió con Tritón X-100 al 1% y n-octanol al 0,2% en tampón Tris HCl 5 mM pH 7,5 y, a continuación, se centrifugó a 1000g durante 10 minutos. El nuevo precipitado se lavó con el mismo tampón para eliminar restos membranosos y una vez centrifugado se

volvió a lavar en tres ocasiones con tampón Tris HCl 50 mM centrifugándose, después de cada lavado, en las mismas condiciones. El precipitado obtenido al finalizar los lavados se consideró fracción ligada a paredes.

Para solubilizar la enzima iónicamente ligada a la fracción de paredes, se incubó la fracción con ClK 1M durante 30 minutos, centrifugándose a continuación a 1000g durante 10 minutos y considerándose al sobrenadante de esta centrifugación como fracción de peroxidasas iónicamente enlazadas a la pared. Este proceso también se realizó tres veces para recuperar la mayor cantidad de enzima posible. Con el fin de solubilizar la actividad peroxidasa covalentemente enlazada a paredes, el precipitado resultante de la extracción de la peroxidasa iónicamente enlazada se resuspendió en tampón acetato 0,1 M pH 5 suplementado con Celulasa R-10 al 1%. Después de una incubación de 24 horas a 25°C se centrifugó a 1000g durante 10 minutos, considerándose el sobrenadante como la fracción covalentemente ligada a la pared.

Por último, todas las fracciones obtenidas durante los anteriores procesos de extracción se dializaron durante 12 horas en tampón Tris HCl 50 mM pH 7,5.

III.4.4.3.- Obtención de la actividad peroxidasa presente en el apoplasto de *Capsicum annuum* por infiltración al vacío

Se obtuvo la peroxidasa presente en el apoplasto tanto de hojas como de tallos de *C. annuum*, por medio de la técnica de infiltración al vacío, realizándose esta como se describe en el apartado III.3.6.

III.4.4.4.- Determinación de la actividad peroxidasa

La actividad peroxidasa de las distintas muestras se determinó a 25°C usando para ello un medio de reacción en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0, con H₂O₂ 0,5 mM y distintos donadores de electrones: 4-metoxi- α -naftol 1 mM ($\epsilon_{595} = 21,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), tetrametilbenzidina-HCl 0,1 mg ml⁻¹ ($\epsilon_{652} = 39,0 \text{ mM}^{-1}$

cm⁻¹), siringaldazina 50 μM ($\epsilon_{530} = 27,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), alcohol coniferílico 0,1 mM ($\epsilon_{262} = 9,75 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), alcohol sinapílico 0,1 mM ($\epsilon_{271} = 4,14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), coniferilaldehído 0,1 mM ($\epsilon_{341} = 13,44 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y sinapilaldehído 0,1 mM ($\epsilon_{340} = 11,95 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

III.4.4.5.- Isoelectroenfoque analítico

III.4.4.5.1.- Preparación de los geles y de la cubeta

Para el isoelectroenfoque se utilizaron geles comerciales de poliacrilamida, Ampholine PAGplate de Pharmacia-Biotech, con una concentración T= 5% y C= 3% y un rango de pH de los geles de 3,5-9,5. El gel se cortaba a un tamaño de 65 x 110 mm.

Para llevar a cabo el enfoque se utilizó un sistema Multiphor II de Pharmacia, manteniendo la temperatura constante a 10°C mediante un circuito cerrado de refrigeración conectado a un estabilizador de temperatura Multitemp III de Pharmacia-Biotech. En el interior de la cubeta se colocaron dos frascos con una solución de NaOH 1M con objeto de que permitiesen la disolución del CO₂ desprendido durante el isoelectroenfoque, ya que este CO₂ puede provocar variaciones en el gradiente de pH deseado.

III.4.4.5.2.- Cargado de las muestras e isoelectroenfoque

Los geles, en su soporte de plástico, eran colocados sobre la placa de porcelana del Multiphor II de Pharmacia depositándose entre el plástico y la placa una gota de queroseno para facilitar una temperatura homogénea en toda la superficie del gel. Seguidamente, se colocaban unas bandas de isoelectroenfoque de Pharmacia empapadas en soluciones electrolíticas, NaOH 1M para la banda del cátodo y ácido fosfórico 1M para la banda del ánodo. A continuación se depositaban 10μl de muestra sobre los papeles de aplicación de Pharmacia, de 5 x 2 mm de tamaño, colocados encima del gel. Por último,

se sometía al gel a las condiciones adecuadas: 1500 V, 8 mA, 2 W durante 110 minutos. El desarrollo del enfoque era seguido por medio de rojo de metilo que era cargado en el gel a modo de muestra.

III.4.4.5.3.- Revelado de los geles

Una vez finalizado el isoelectroenfoque se retiraban los papeles de las muestras y se revelaban los geles incubándolos 25°C en un medio de tinción compuesto por: 4-metoxi- α -naftol 1mM, H₂O₂ 0,5mM en un tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. Asimismo se revelaron geles con siringaldazina 50 μ M, y con tetrametilbenzidina 0,1 mg ml⁻¹, en lugar del 4-metoxi- α -naftol.

III.4.4.5.4.- Cálculo del punto isoeléctrico

Para el cálculo del punto isoeléctrico de la enzima se construyó una recta de calibrado a partir de proteínas con pI conocido y de la distancia al ánodo de cada una de ellas tras el electroenfoque. El patrón de proteínas utilizado fue el IEF Mix 3,6-9,3 de Sigma compuesto por:

Proteína	pI
Tripsinógeno	9,30
Lectina básica de lenteja	8,65
Lectina neutra de lenteja	8,45
Lectina ácida de lenteja	8,15
Mioglobina básica	7,35
Mioglobina ácida	6,85
Anhidrasa carbónica humana B	6,55
Anhidrasa carbónica bovina B	5,85
β -lactoglobulina	5,20
Inhibidor de tripsina de soja	4,55
Aminoglucosidasa	3,50

Este patrón se tiñó para proteínas según el método descrito por Mikhailov y Pásaro (1995) con una solución de azul de Coomassie (CBB) R-250 en metanol al 25% y ácido acético al 10%, manteniéndolo en ella 24 horas. Sucesivamente se cambió a soluciones de concentración decreciente de CBB donde permanecía de 6 a 8 horas. Finalmente los geles se fijaron en ácido acético al 10%.

III.4.5.- Efecto de la inoculación con *V. dahliae* sobre las ligninas de *C. annuum*

III.4.5.1.- Detección histoquímica de ligninas en el tallo de *C. annuum*

La detección histoquímica de ligninas en los tallos de pimiento se realizaron por medio del test de Wiesner y el reactivo de Maüle, de igual manera que se hizo para *Z. elegans* (III.3.2).

III.4.5.2.- Cuantificación de ligninas usando el método del bromuro de acetilo/ácido acético

III.4.5.2.1.- Obtención de las paredes celulares

Las paredes celulares se obtuvieron del mismo modo que en el apartado III.3.4.1.

III.4.5.2.2.- Determinación de la cantidad de lignina

Se tomaron 5 mg de muestra de paredes obtenida en el paso anterior, a los cuales se les añadió 5 ml de una mezcla de bromuro de acetilo/ácido acético en la relación (1:3) sometiéndolas a 70°C durante 30 minutos. Una vez enfriadas las muestras se añadió 4,5 ml de NaOH 2N. A continuación se centrifugó durante 5 minutos a 1500g, descartando el precipitado.

Seguidamente se añadió 0,5 ml de hidroxilamina 7,5 M, se filtraron las muestras a través de un filtro de jeringa de 0,45 μm y se ajustó el volumen final a 10 ml usando para ello ácido acético.

Por último se midió la absorbancia a 280 nm usando como blanco 5 ml de bromuro acetilo/ácido acético (1:3), 4.5 ml de NaOH 2N y 0.5 ml de hidroxilamina 7,5 M .

III.4.5.3.- Tioacidolisis de paredes de tallos de *C. annuum*

Se realizó tioacidolisis de las paredes de tallos de plantas de pimiento control e inoculadas con *V. dahliae* tras 21 días desde la inoculación. Todo el proceso de tioacidolisis y análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas, se realizó igual que en el caso de *Z. elegans* (III.3.4.2.), con la salvedad de que en el caso del pimiento las muestras fueron previamente liofilizadas.

III.4.6.- Caracterización de la actividad oxidasa/peroxidasa presente en los tallos de *C. annuum*

III.4.6.1.- Efecto de distintos inhibidores sobre la velocidad de oxidación de la siringaldazina por peroxidasa del apoplasto de *C. annuum*

El efecto de los distintos inhibidores sobre la velocidad de oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa del apoplasto de *C. annuum*, se realizó de manera idéntica a como se hizo con *Z. elegans* (III.3.8.3.). En esta ocasión los inhibidores y sus concentraciones fueron: azida sódica 1 μM , 10 μM , 100 μM y 1000 μM ; ácido ferúlico 1 μM , 10 μM , 100 μM y 1000 μM ; tropolona 1000 μM ; ferrocianuro potásico 10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM y 1000 μM .

III.4.6.2.- Efecto de distintos inhibidores sobre la actividad siringaldazina-oxidasa del xilema de *C. annuum*

El efecto de los distintos inhibidores sobre la actividad siringaldazina-oxidasa presente en secciones de tallos de *C. annuum*, se estudió del mismo modo que en el caso del hipocotilo de *Z. elegans* (III.3.8.4.). En el caso del pimiento, los inhibidores usados fueron: ferúlico 1 mM, tropolona 1 mM, ferrocianuro potásico 1 mM y ferricianuro potásico 1 mM.

III.4.7.- Efecto de la inoculación con *V. dahliae* sobre los fenoles presentes en *C. annuum*

III.4.7.1.- Extracción de los componentes fenólicos

Las muestras eran homogeneizadas en metanol al 80% e incubadas durante 15 minutos a 80°C. A continuación eran centrifugadas a 500g durante 10 minutos y el sobrenadante se evaporaba a 80°C. Por último se resuspendían y filtraban a través de un filtro de 0,45 µm, considerándose las fracciones así obtenidas como fenoles libres. Para obtener la fracción ligada, los precipitados se incubaban con 4 ml NaOH 4N durante 4 horas a 37°C. A las 4 horas se dejaban a temperatura ambiente y se acidificaban con aproximadamente 1,5 ml HCl al 35%, hasta alcanzar un pH 1-2. Dado que la reacción es muy exotérmica, se dejaban enfriar los tubos y seguidamente se les añadía dietiléter, para extraer los fenoles. Las muestras se agitaban ligeramente y se centrifugaban a 500g durante 5 minutos, recogiendo las fases fenólicas. Las muestras así obtenidas se dejaban evaporar a 37°C toda la noche y se resuspendían en 1 ml de metanol. Finalmente se filtraban en un filtro de 0,45 µm, ajustándose el volumen y considerando a esta fracción como fenoles ligados.

III.4.7.2.- Medida de los componentes fenólicos.

Tanto los compuestos fenólicos libres como los ligados de cada una de las muestras fueron determinados por el método de Singleton y Rossi (1965), modificación del desarrollado por Folin y Ciocalteau (1927), midiéndose la absorbancia de cada una de las muestras a 760nm.

Los valores de absorbancia de las muestras se transformaron en equivalentes de ácido ferúlico basándose en la recta de calibrado obtenida con soluciones de diferentes concentraciones de dicho ácido.

III.4.7.3.- Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC

Las muestras eran analizadas utilizando un sistema cromatográfico Waters LC616 equipado con un inyector automático Waters 717 plus, un módulo de control de temperatura Waters y un detector de selección fotodiódico en batería Waters 996. La estación de control y procesado de datos se realizaba mediante software Millenium (Waters) versión 2.15.

La fase reversa HPLC se llevó a cabo sobre una columna Spherisorb ODS2 C₁₈ (5 µm de tamaño de partícula, 150 mm x 46 mm) Tracer analítica (Teknokroma), provista de una precolumna Spherisorb ODS2 C₁₈. La detección se llevó a cabo entre 225 y 400 nm, y la longitud de onda seleccionada para la cuantificación fué de 280 nm, a la cual los compuestos analizados presentaban una absorbancia adecuada. El volumen de inyección utilizado fue de 10 µl, siendo la temperatura de la columna de 25°C, la temperatura de inyección de 4°C y el flujo de 1 ml minuto⁻¹.

La separación cromatográfica de los compuestos fenólicos se llevó a cabo utilizando el sistema 2 propuesto por Treutter (1988) con modificaciones.

La fase móvil era un gradiente lineal compuesto por dos disolventes:

A: metanol, B: agua (acético 5 %)

Tiempo	Flujo	Gradiente	Solvente A	Solvente B
0 -10	1	isocrático	17	83
15	1	lineal	24	76
23	1	lineal	40	60
33	1	lineal	90	10

Se utilizaron como patrones los compuestos señalados en la Tabla II.1, En la figura II.1 aparecen los espectros de absorción de todos los patrones a 280 nm.

Tabla III.1.- Relación de los compuestos inyectados con sus tiempos de retención

	Tiempo retención	Compuesto
1.	3,32 ± 0,03	Ácido protocatéquico
2.	5,59 ± 0,04	Ácido clorogénico
3.	7,64 ± 0,04	Ácido cafeico
4.	10,34 ± 0,02	Vanillina
5.	14,05 ± 0,01	Ácido cumárico
6.	18,09 ± 0,03	Ácido ferúlico

La identidad de los compuestos fenólicos se determinó de dos maneras: por comparación de los tiempos de retención de los picos de las muestras con los del patrón (Tabla III.1) y analizando el espectro de absorción de los picos y los de los patrones (Fig. III.1). La cuantificación de las sustancias detectadas se realizó mediante el método del patrón externo.

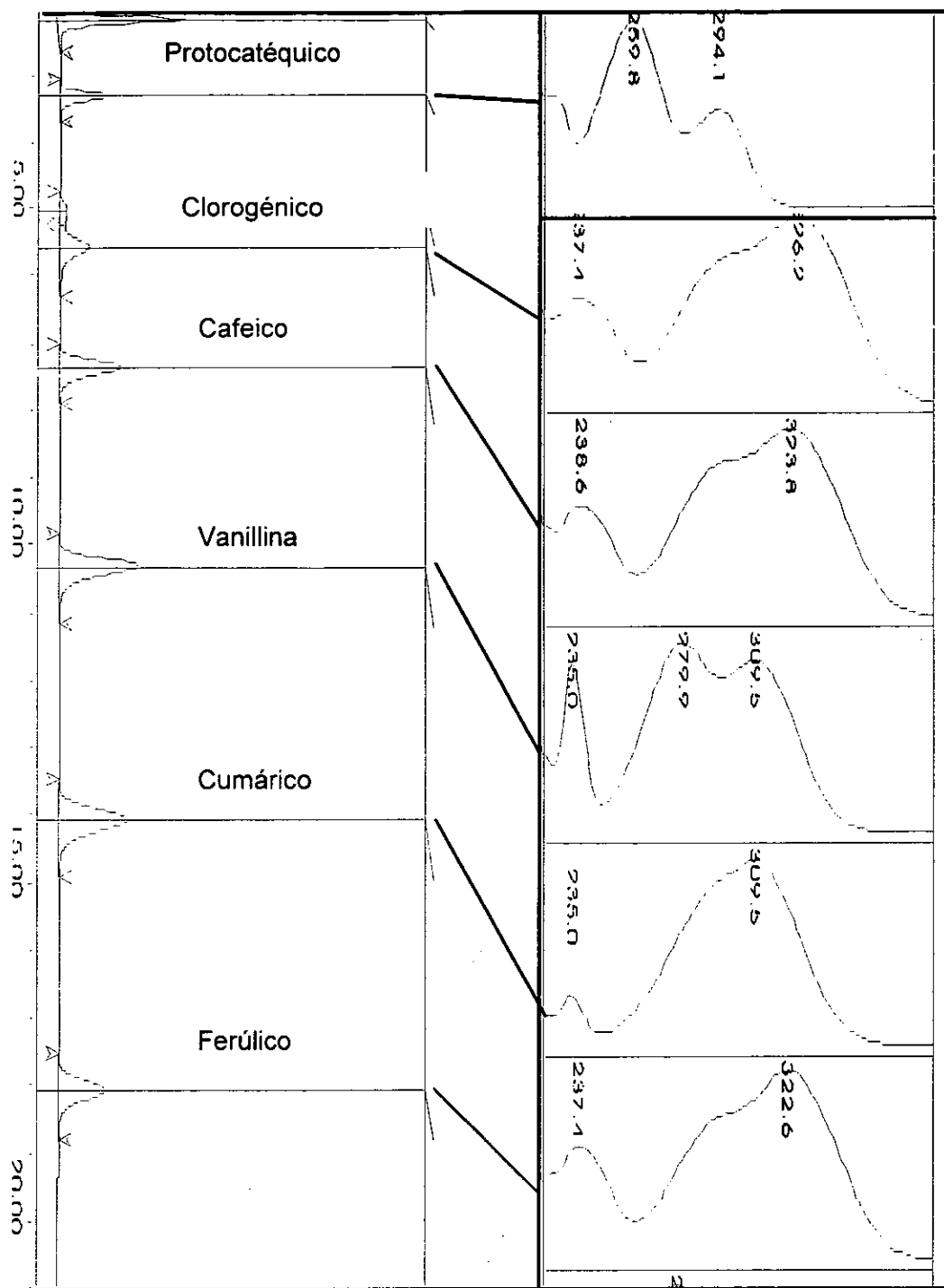


Figura III.1.- Espectros de absorción de los distintos patrones utilizados en el análisis de fenoles por HPLC

III.4.8.- Efecto de la inoculación con *V. dahliae* sobre los sistemas antioxidantes de *C. annuum*

III.4.8.1.- Actividad catalasa y ascorbato peroxidasa

La extracción de la actividad catalasa y de la ascorbato peroxidasa se realizó utilizando un mismo tampón, compuesto por fosfato potásico 50mM, ácido ascórbico 1mM, EDTA 1mM pH7 y centrifugando el homogeneizado a 14000g durante 30 minutos.

La actividad ascorbato peroxidasa se ensayó espectrofotométricamente según el método descrito por Asada y col. (1994) que consiste en la medida a 290nm de la oxidación del ácido ascórbico. La mezcla de reacción contenía tampón fosfato potásico 50mM, ácido ascórbico 0,5 mM, H₂O₂ 0,1mM y 50µl de muestra. El ensayo se efectuó a 25°C usando un coeficiente de extinción molar 2,8 mM⁻¹cm⁻¹ (Hossain y Asada, 1984).

En el caso de la actividad catalasa, esta se determinó de acuerdo con el método de Aebi (1984) con ligeras modificaciones, basado en la medida de la disminución de la absorbancia a 240 nm motivada por la desaparición del H₂O₂. La mezcla de reacción contenía tampón fosfato potásico 50mM pH7, H₂O₂ 10.6 mM y 100 µl de muestra. El ensayo se efectuó a 25°C usando un coeficiente de extinción molar para el H₂O₂ de 39,58 M⁻¹cm⁻¹.

III.4.8.2.- Localización histoquímica del H₂O₂ y la peroxidasa

Las secciones de tallo se incubaron directamente con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina 0,1 mg ml⁻¹ en tampón Tris-acetato 0,1 M a pH 5,0, durante 15-20 minutos a temperatura ambiente, de acuerdo con el procedimiento descrito por Ros Barceló (1998).

III.4.9.- Caracterización de la actividad tetrametilbenzidina-oxidasa presente en el tallo de *C. annuum*

III.4.9.1.- Efecto de distintos inhibidores sobre la velocidad de oxidación de la TMB por la peroxidasa del apoplasto de *C. annuum*

El sistema utilizado fue el mismo que para la siringaldazina, tomando en este caso como medio de reacción estándar el compuesto por H_2O_2 0,5 mM, tetrametilbenzidina $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ y peroxidasa de pimienta en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. En esta ocasión se usaron los siguientes inhibidores: azida sódica 10 μM , 100 μM , 1000 μM , ácido ferúlico 0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 100 μM , 1000 μM , tropolona 1000 μM y ferrocianuro potásico 10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM , 1000 μM .

III.4.9.2.- Efecto de la azida sódica sobre la actividad TMB-oxidasa del xilema de *C. annuum*

El efecto de la azida sódica sobre la actividad TMB-oxidasa se estudió de forma idéntica a la de otros inhibidores sobre la actividad siringaldazina-oxidasa, usando en esta ocasión azida sódica 1 mM.

III.4.10.- Efecto del óxido nítrico sobre la peroxidasa de *C. annuum* y de *Z. elegans*

III.4.10.1.- Efecto inhibitor del nitroprusiato sódico, y su reversión por PTIO, sobre la velocidad de oxidación de la TMB por la peroxidasa de *Z. elegans*

Se realizó de la misma manera que en el caso de pimienta pero en esta ocasión sólo a la concentración de 5 mM, ensayando también la reversión del

efecto inhibitor con el uso del PTIO a una concentración de 150 μM , incorporando éste a la mezcla antes que el nitroprusiato sódico.

III.4.10.2.- Efecto inhibitor del nitroprusiato sódico, y su reversión por PTIO, sobre la oxidación de la TMB en el tallo de *Z. elegans*

El efecto inhibitor del nitroprusiato sódico sobre la tinción con TMB del tallo de *Z. elegans* se estudió de forma similar al efecto de otros inhibidores. En este caso la reversión con PTIO se estudió incorporando éste al medio de reacción a una concentración de 150 μM .

III.4.10.3.- Estudio de la enzima óxido nítrico sintetasa en tallos de *Z. elegans*

III.4.10.3.1.- Extracción de la enzima

Los tallos de *Z. elegans* se homogeneizaron en una proporción 1:2 (p/v), con un tampón de extracción compuesto por: Hepes 10 mM pH 7,4 (ajustado con KOH), EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM y los inhibidores de proteasas: E-64 10 μM , fenil-metil-sulfenil 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$, leupeptina 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y pepstatina 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$. En el momento de la homogeneización se añadían 0,05 gramos de PVPP por cada gramo de tejido, y sacarosa a una concentración final de 0,32 M.

Una vez homogeneizado el tejido se centrifugaba a 3500g durante 15 minutos, descartando el precipitado obtenido y volviendo a centrifugar el sobrenadante, esta vez a 40000g durante 20 minutos usando para ello una ultracentrífuga. Por último la muestra se purificaba a través de una columna Sephadex G-25 PD-10 de Pharmacia.

III.4.10.3.2.- Medida de la actividad NOS

Las medidas de la actividad NOS se realizaron en un medio de reacción que contenía tampón HEPES 100 mM pH 7,5, y los siguientes reactivos: L-arginina 1 mM, diacetato magnésico 1 mM, cloruro cálcico 1mM, calmodulina 50 unidades, FAD 4 μ M, NADPH 100 μ M, H₄B 10 μ M, oxihemoglobina 8 μ M y 100 μ l de muestra.

Para la obtención de la oxihemoglobina se mezclaban 37,5 mg de hemoglobina en 3 ml de tampón HEPES con unos pocos cristales de hidrosulfito sódico, agitando hasta que se producía un cambio de color a un rojo más claro. A continuación se purificaba la oxihemoglobina a través de una columna PD-10 de Pharmacia. Por último se calculaba la concentración de oxihemoglobina obtenida a partir de la siguiente ecuación:

$$[\text{HbO}_2] (\mu\text{M}) = [1,013 (\text{Abs}_{576}) - 0,3269 (\text{Abs}_{630}) - 0,7353 (\text{Abs}_{560})] \times 10^2$$

La curso de la reacción se seguía por las variaciones de absorbancia observadas a 401 nm, 421 nm y el valor del isosbético a 411 nm.

III.4.10.4.- Efecto inhibitor del nitroprusiato sódico sobre la velocidad de oxidación de la siringaldazina y la TMB por la peroxidasa de *C. annuum*

El efecto inhibitor del nitroprusiato se estudió de forma idéntica al de los otros inhibidores anteriores, con la salvedad de que las disoluciones de nitroprusiato se preparaban 15 minutos antes de su uso. Las concentraciones usadas fueron: 0,1 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1.- ESTUDIO DE LA LIGNIFICACIÓN EN HIPOCOTILOS DE *Z. elegans*

Zinnia elegans es una planta anual perteneciente a la familia de las Asteraceas, subfamilia Asteroideas, de origen mejicano y ampliamente cultivada como planta ornamental.

La familia de las Asteraceas se considera filogenéticamente como una de las familias más evolucionadas dentro de las dicotiledóneas. Asimismo, las especies de *Zinnia* son unos magníficos modelos para los estudios de los procesos de lignificación (Liu y col., 1994; Sato y col., 1995 y Ye y col., 1994). Es por ello, que hemos utilizado *Zinnia elegans* como objeto de nuestros estudios de lignificación.

IV.1.1.-Cinamaldehídos en el xilema lignificante de *Zinnia elegans*

El hipocotilo lignificante de *Zinnia elegans* muestra una fuerte reacción con el reactivo de Maüle, dando lugar a la formación de un producto rojo intenso-púrpura, que se acumula en los vasos del xilema así como en los elementos del floema.

Esta tinción es de menor intensidad en las células externas del xilema, aquellas más próximas a las células del cambium vascular, donde el proceso de lignificación es activo, pero la cantidad de ligninas es menor. Sin embargo, en las células internas del xilema, dónde la lignificación ya ha tenido lugar, la tinción es mucho más intensa (Fig. IV.1.).

La reacción de Maüle, basada en la formación de quinonas por medio del uso de MnO_4K , es específica de los grupo siringilo debido a que éstos al reaccionar con el MnO_4K forman 3-metoxi-5-alkil-o-quinonas, compuestos responsables de la aparición del color rojo-púrpura. Sin embargo, en el caso de los grupos guayacilo, cuando reaccionan con el MNO_4K , dan lugar a la formación de 5-alkil-o-quinonas compuestos que muestran un leve color anaranjado (Meshitsuka y Nakano, 1978 y 1979). Esta especificidad hacia los grupos siringilo ha provocado que el test de Maüle haya sido usado

habitualmente para diferenciar entre maderas duras (hardwood) y maderas blandas (softwood), ya que las primeras presentan un grupo siringilo en su estructura, con lo que reaccionarían positivamente frente al reactivo de Maüle.

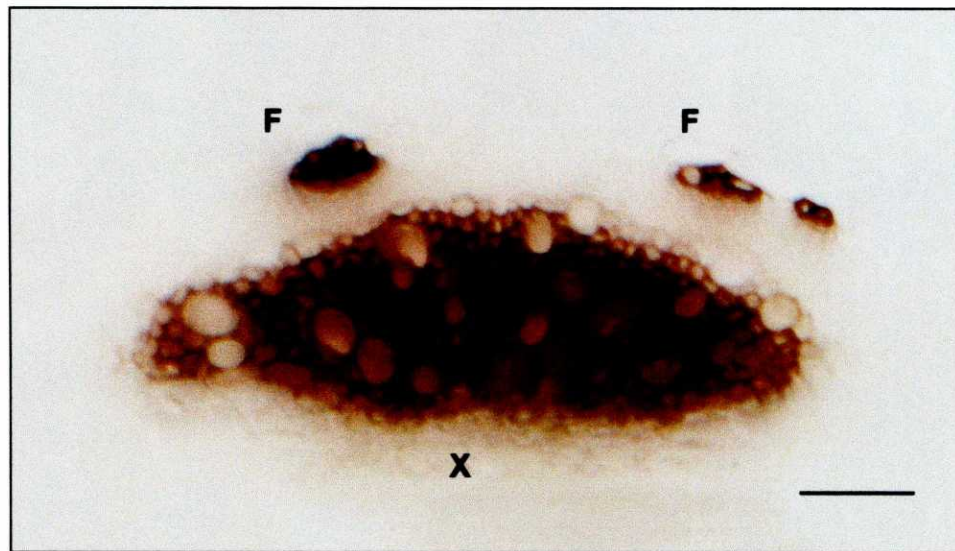


Figura IV.1.- Localización histoquímica de ligninas usando la reacción de Maüle con MnO_4K . X: xilema, F: floema. Barra=100 μm

Por medio del test de Wiesner, observamos un resultado similar. En los tejidos vasculares de *Zinnia elegans* se produce la aparición de un producto rojo-rosado que se acumula a nivel de los vasos del xilema y de los elementos del floema. Igual que en el caso de la reacción de Maüle, observamos un gradiente de lignificación centripeto, ya que en las filas de células externas la tinción es de menor intensidad, lo que revela una menor cantidad de ligninas. En estas zonas el proceso de lignificación es todavía activo, y en las células internas aparece una tinción mucho más intensa, debido a la presencia de una mayor cantidad de ligninas (Fig. IV.2). El test de Wiesner, basado en la reacción del reactivo de floroglucinol con las ligninas en medio ácido, revela la presencia de grupos cinamaldehídos en las ligninas (Geiger y Fuggerer, 1979).

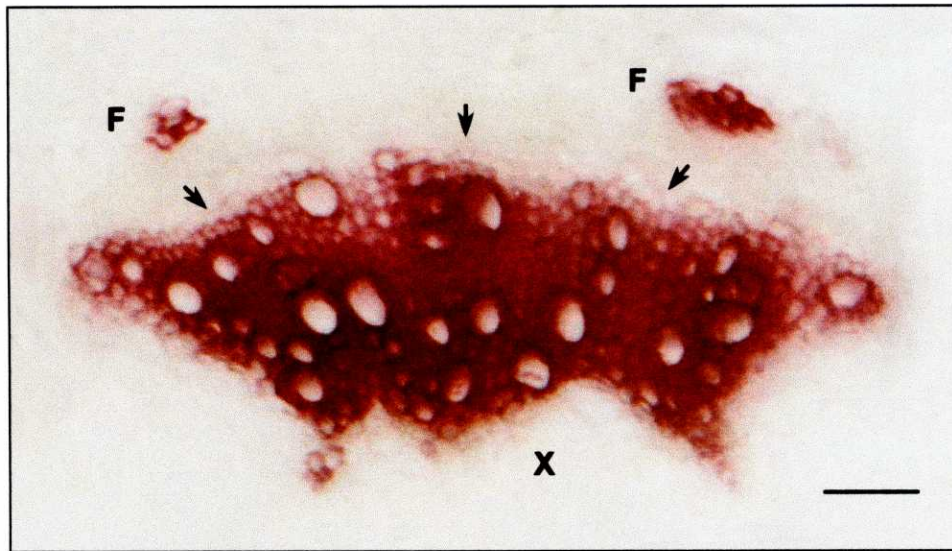


Figura IV.2.- Localización histoquímica de ligninas usando el test de Wiesner con el reactivo floroglucinol en medio ácido. X: xilema, F: floema. Las flechas muestran la zona más próxima al cambium vascular, donde la tinción es de menor intensidad. Barra= 100 μ m

En resumen, estas dos pruebas histoquímicas nos permiten concluir que el xilema lignificante de *Zinnia elegans* es rico en grupos siringilo, y además presenta ciertas cantidades de grupos cinamaldehídos en su matriz, probablemente debidas al coniferilaldehído y al sinapilaldehído. La presencia de los grupos siringilo era previsible, ya que las angiospermas, grupo al cual pertenece *Zinnia elegans*, se caracterizan por presentar en las ligninas unidades de tipo G-S (Higuchi, 1990).

Una vez comprobado que el test de Wiesner reacciona con el xilema de *Zinnia elegans*, indicando la presencia de grupos cinamaldehído, nos propusimos estudiar la especificidad de la reacción. Para ello, seguimos espectrofotométricamente la formación de color al poner en contacto, en medio ácido, al reactivo de floroglucinol con el coniferilaldehído y con el sinapilaldehído.

Como se observa en la Figura IV.3. ambos aldehídos reaccionaron con el reactivo de floroglucinol. Esta reacción dio lugar a la aparición de un pigmento rosado inestable.

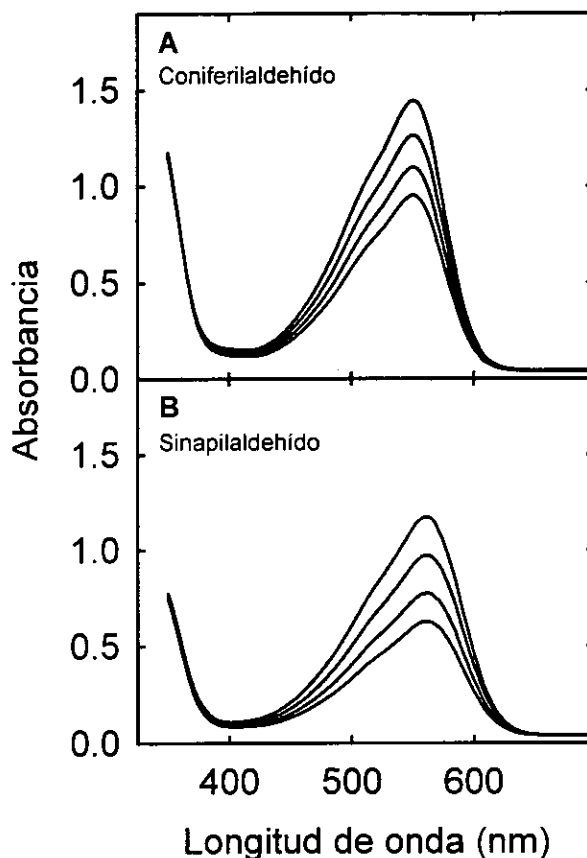


Figura IV.3.- Espectros consecutivos de la reacción entre el reactivo de floroglucinol y el coniferilaldehído (A), y el sinapilaldehído (B), en medio ácido. Los espectros se tomaron a intervalos de un minuto

Los espectros consecutivos realizados en las mezclas de reacción mostraron como con el paso del tiempo, la absorbancia disminuía, lo que indica la ya comentada inestabilidad del pigmento formado. En el caso del coniferilaldehído se obtuvo un máximo de absorbancia a 550 nm apareciendo este máximo a 561 nm en el caso del sinapilaldehído, manteniéndose estas longitudes de onda como máximos en los sucesivos espectros. Estos valores de absorbancia máximos obtenidos espectrofotométricamente están de acuerdo con los encontrados por Yoshizama en 1999, que al usar la técnica de microespectrofotometría aplicada a paredes celulares lignificantes teñidas con

el reactivo de floroglucinol, observó que estos valores variaban entre en el rango de 550-570 nm.

Una vez estudiada la reacción del floroglucinol con los cinamaldehidos, nos propusimos comprobar la posible reacción con los alcoholes cinamílicos y con los productos de deshidrogenación tanto de estos alcoholes como de los aldehidos antes estudiados. Para la obtención de estos productos de deshidrogenación, incubamos los distintos substratos con peroxidasa de *Zinnia elegans* y peróxido de hidrógeno.

Como se puede observar en la Figura IV.4., correspondiente al ensayo con los grupos guayacilo, el alcohol coniferílico no reacciona con el reactivo de floroglucinol (A) ya que en los espectros consecutivos no se observa ningún pico de absorbancia. Así mismo, sus productos de deshidrogenación tampoco producen reacción apreciable (B). Estos resultados no están de acuerdo con algunos trabajos en los cuales observan que los productos de deshidrogenación del alcohol coniferílico producen una fuerte reacción frente al reactivo de floroglucinol (Higuchi y Ito, 1958). En el cuadro (C), podemos observar un espectro tipo de la reacción obtenida con el coniferilaldehído y en el cuadro (D) se representa el resultado obtenido con los productos de deshidrogenación del coniferilaldehído, en este caso sorprendentemente no se produce reacción alguna.

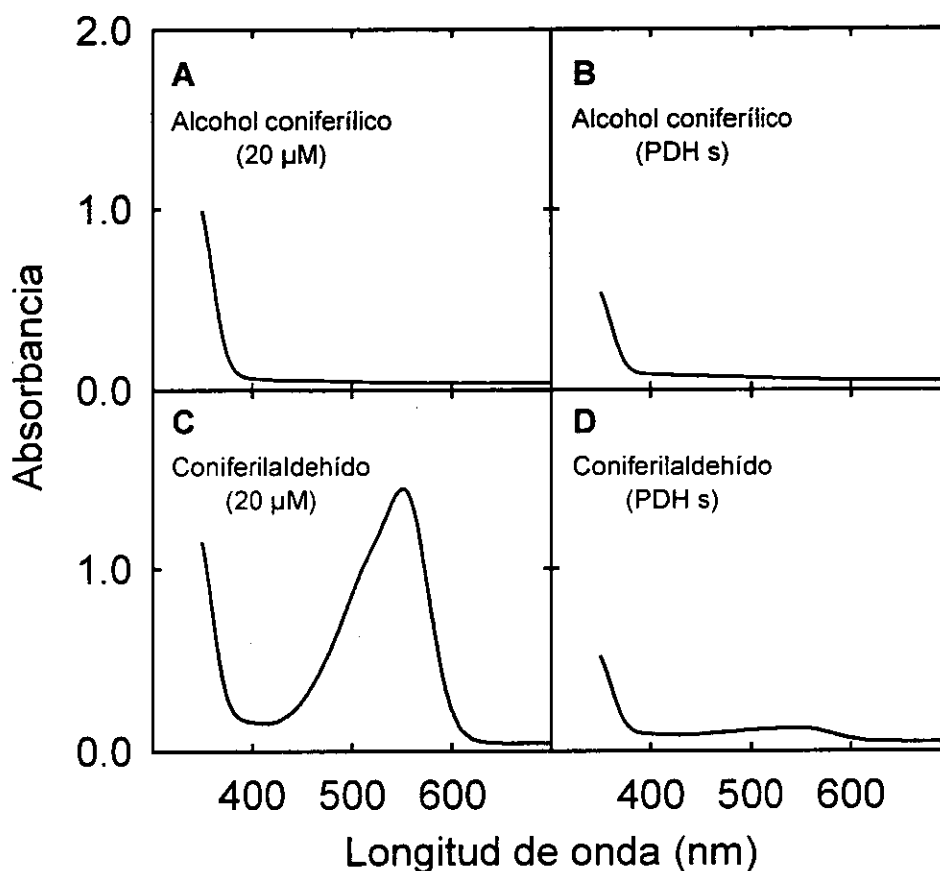


Figura IV.4.- Espectros de la reacción, en medio ácido, del reactivo de floroglucinol con: alcohol coniferílico 20 μM (A), productos de deshidrogenación del alcohol coniferílico (B), coniferilaldehído 20 μM (C), productos de deshidrogenación del coniferilaldehído

Para comprobar esta última observación, realizamos controles en los cuales se incubaba el coniferilaldehído con peroxidasa de *Zinnia elegans* en ausencia de H_2O_2 , y en presencia tan sólo del H_2O_2 . Como se puede observar en la gráfica IV.5. ambos controles dieron como resultado la aparición de una reacción positiva frente al reactivo de floroglucinol, dando lugar a la aparición de un color con un máximo idéntico al obtenido cuando reaccionaba el coniferilaldehído y el reactivo de floroglucinol.

El hecho de que solamente en el caso de incubar el coniferilaldehído conjuntamente con peroxidasa de *Zinnia elegans* y con H_2O_2 desaparezca la reacción con el floroglucinol, nos indica que es debido a la formación de productos de deshidrogenación mediada por la actividad peroxidasa.

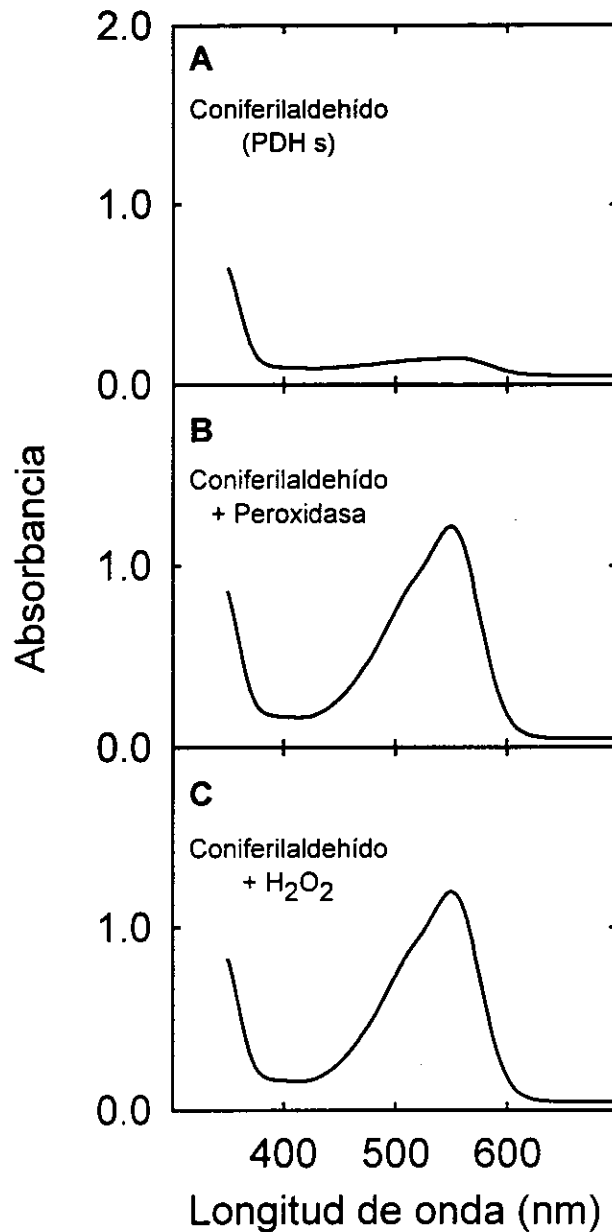


Figura IV.5.- Espectros de la reacción, en medio ácido, del reactivo de floroglucinol con: productos de deshidrogenación del coniferilaldehído (A), control sin peróxido de hidrógeno (B), control sin peroxidasa (C)

En el caso de los grupos siringilo (Fig. IV.6.), observamos igualmente, que tanto el alcohol sinapílico como sus productos de deshidrogenación no producen reacción con el floroglucinol en medio ácido, obteniendo unos espectros que no muestran pico alguno de absorbancia en la región del visible.

Al igual que en el caso del coniferilaldehído, los productos de deshidrogenación del sinapilaldehído no presentan reactividad con el floroglucinol, obteniéndose un espectro en el cual el pico de absorbancia a 561 nm, que se obtenía con el aldehído, desaparece.

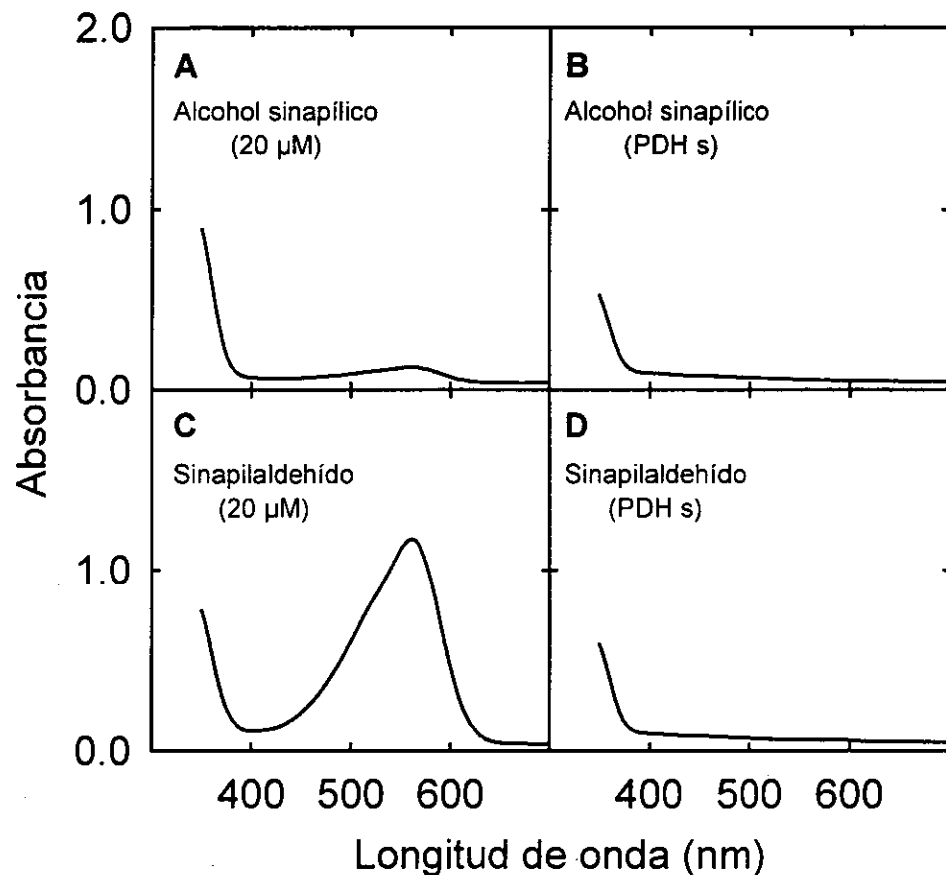


Figura IV.6.- Espectros de la reacción, en medio ácido, del reactivo de floroglucinol con: alcohol sinapílico 20 μM (A), productos de deshidrogenación del alcohol sinapílico (B), sinapilaldehído 20 μM (C), productos de deshidrogenación del sinapilaldehído

De forma idéntica a como se realizó con el coniferilaldehído, realizamos también en este caso controles incubando el sustrato con peroxidasa de *Zinnia elegans* en ausencia de H_2O_2 y en presencia tan sólo del H_2O_2 (Fig. IV.7.). Estos controles nos permitieron comprobar como en ambos controles, la reacción de color se seguía produciendo, presentando un máximo de absorbancia a 561 nm. Esto nos indica que la desaparición del color en los

productos de deshidrogenación del sinapilaldehído es debida a la actividad peroxidasa.

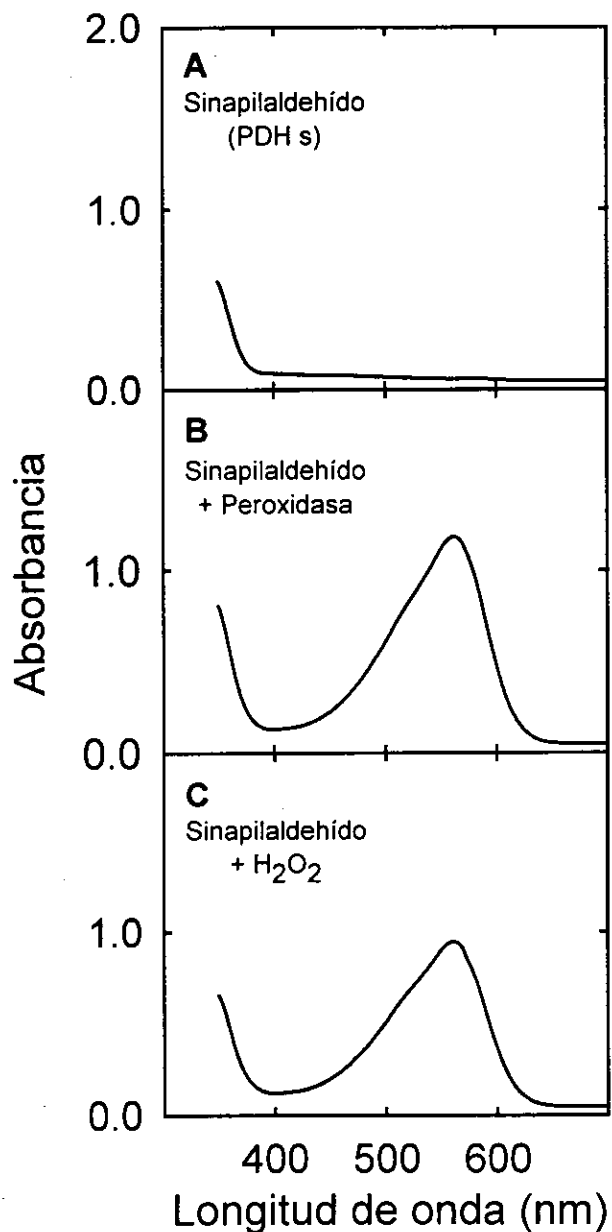


Figura IV.7.- Espectros de la reacción, en medio ácido, del reactivo de floroglucinol con: productos de deshidrogenación del sinapilaldehído (A), control sin peróxido de hidrógeno (B), control sin peroxidasa (C)

El hecho de que los productos de deshidrogenación de los cinamaldehídos no produzcan reacción con el reactivo de floroglucinol, en medio ácido, puede ser debido a que en el proceso de polimerización de los aldehídos, mediado por la peroxidasa de *Zinnia elegans*, el grupo funcional aldehído, el cual es el responsable de la reacción con el floroglucinol, se pierda en reacciones de enlaces laterales que impliquen al carbono β .

A este respecto, Higuchi en 1994 propuso un modelo de dimerización del coniferilaldehído (Fig IV.8.)

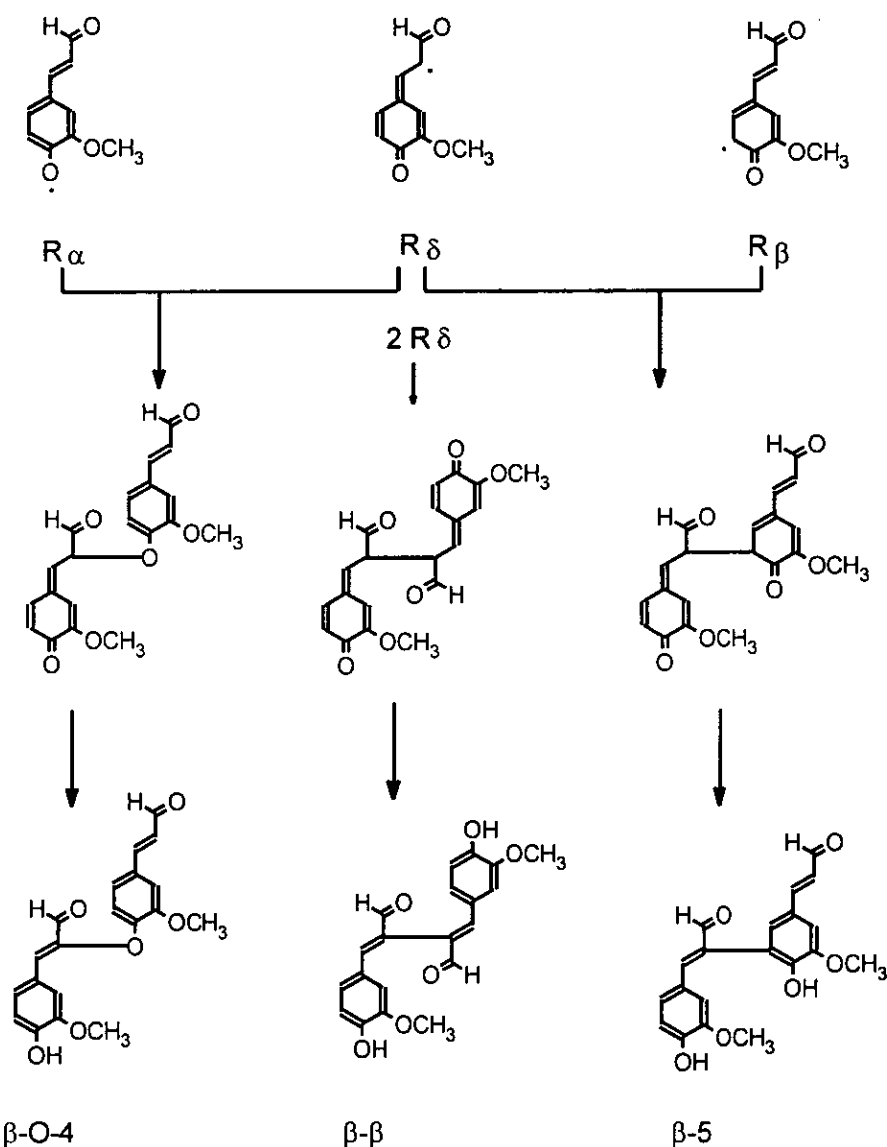


Figura IV.8.- Modelo propuesto para la dimerización del coniferilaldehído (tomado de Higuchi y col., 1994)

En este modelo el coniferilaldehído da lugar, mediante la acción de la peroxidasa, a distintos radicales aroxilos, y a partir de ellos mediante el paso por la formación de quinonas intermedias se llega a la aparición de los distintos dímeros. Estos dímeros pueden estar unidos por medio de enlaces de tipo β -O-4, β - β o bien β -5. Evidentemente estos dímeros seguirían reaccionando con otros elementos hasta dar lugar a la formación de polímeros de coniferilaldehído cuya estructura fue también propuesta por Higuchi (Fig. IV.9).

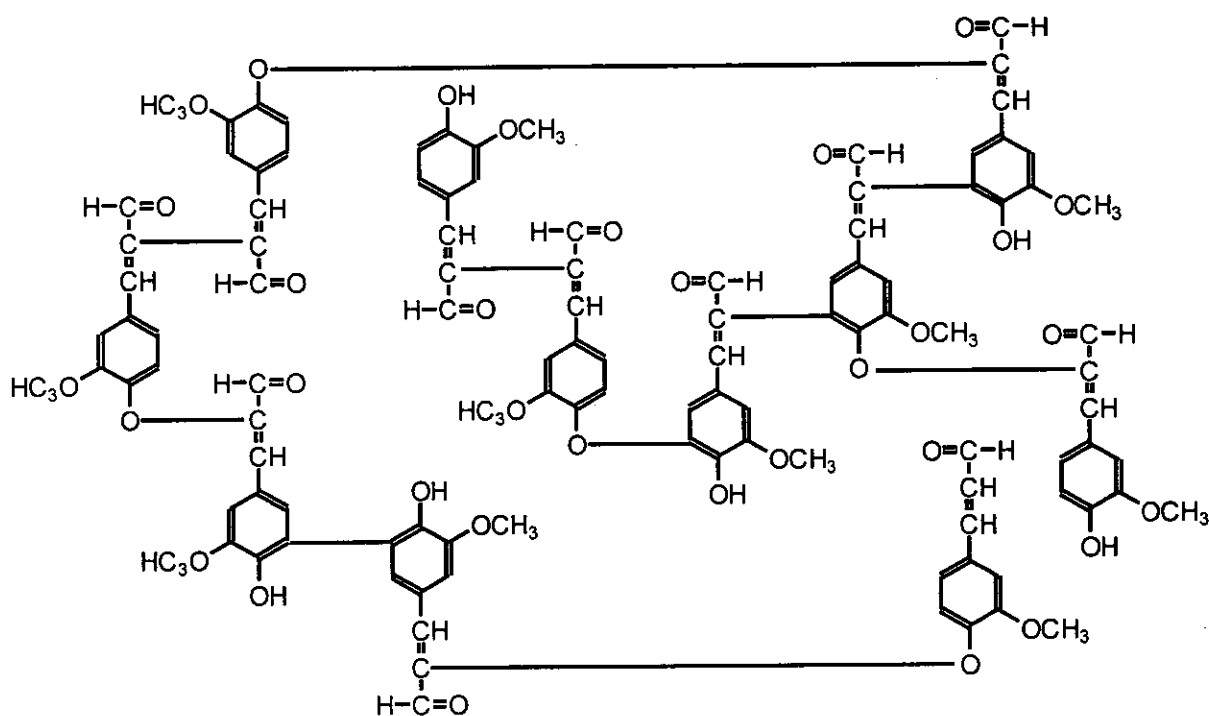


Figura IV.9.- Modelo propuesto para la estructura de los polímeros del coniferilaldehído (tomado de Higuchi y col, 1994)

Este modelo de dimerización-polimerización es igual de válido para el sinapilaldehído, sólo teniendo en cuenta que este compuesto contiene un sustituyente metoxilo en el carbono 5 donde el coniferilaldehído presenta un hidrógeno.

Para poder entender la reacción del floroglucinol con las paredes lignificantes de *Zinnia elegans*, hay que revisar además de los modelos de polimerización de los aldehídos, el mecanismo químico de la reacción que tiene

lugar al aplicar el test de Wiesner. Este mecanismo se basa en la reacción que tiene lugar entre el floroglucinol y los grupos cinamaldehídos para dar lugar a la aparición de un equilibrio tautomérico entre dos formas coloreadas (Figura IV.10 A). Para que esta reacción tenga lugar es necesario que se desarrolle en medio ácido.

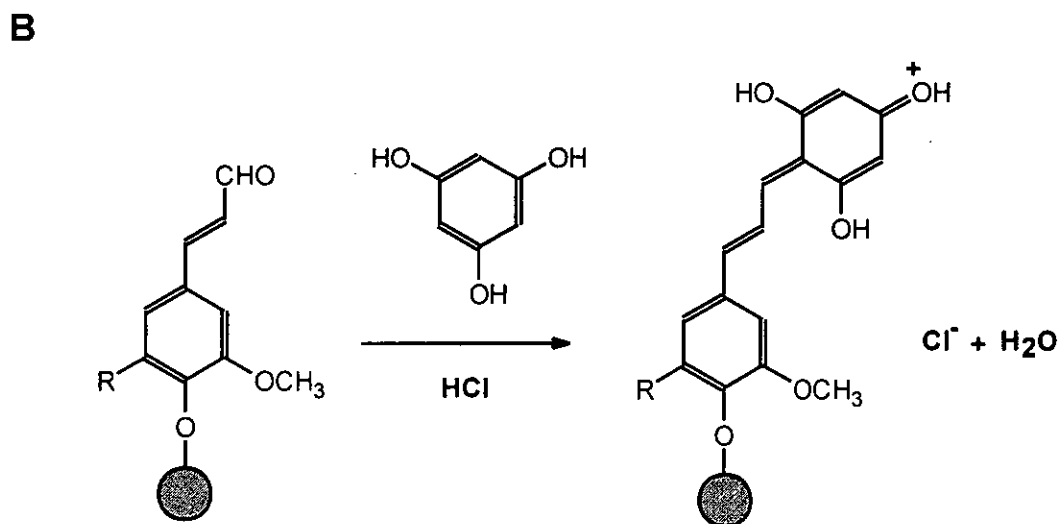
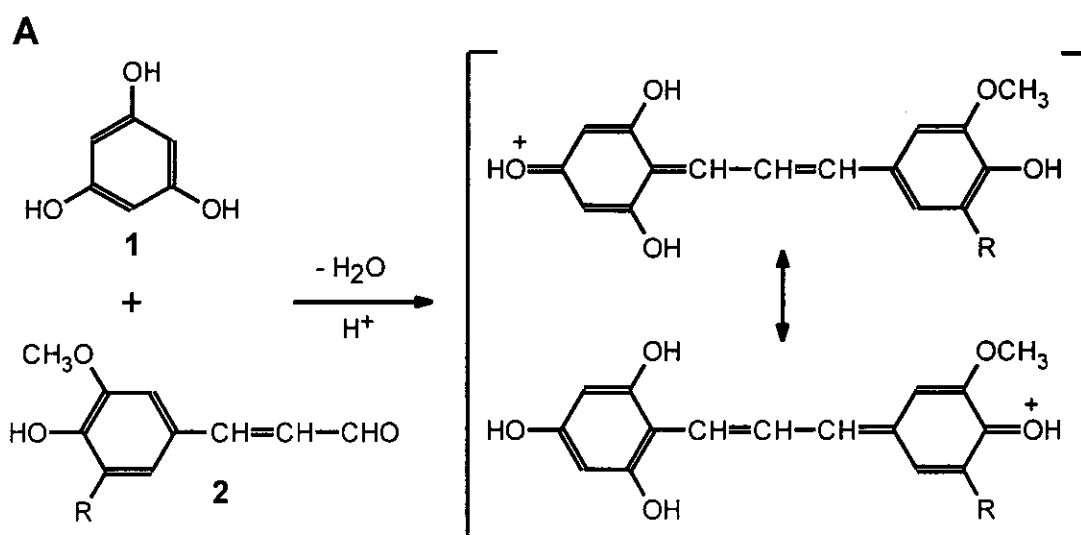


Figura IV.10.- Mecanismo de la tinción de ligninas usando el test de Wiesner. A) Reacción del floroglucinol (1) en medio ácido, con los grupos cinamaldehído (2) para dar un equilibrio tautomérico. B) Reacción del floroglucinol (1) en medio ácido con grupos cinamaldehído terminales

La reacción mostrada en la Figura IV.10 A, es la que tenía lugar al estudiar la capacidad de los cinamaldehídos de reaccionar directamente con el floroglucinol. Por otra parte puede tener lugar la reacción entre el floroglucinol y grupos terminales cinamaldehído en la matriz de ligninas (Figura IV.10 B).

Teniendo en cuenta todos estos resultados, surgen dos posibilidades para explicar la tinción del xilema de *Zinnia elegans* con el reactivo de floroglucinol al aplicar el test de Wiesner. Por una parte, la existencia de grupos cinamaldehídos libres en la matriz de las ligninas (Figura IV.11 A), o bien la existencia de grupos cinamaldehídos terminales unidos a la matriz de la pared por medio de enlaces O-4 (Figura IV.11 B).

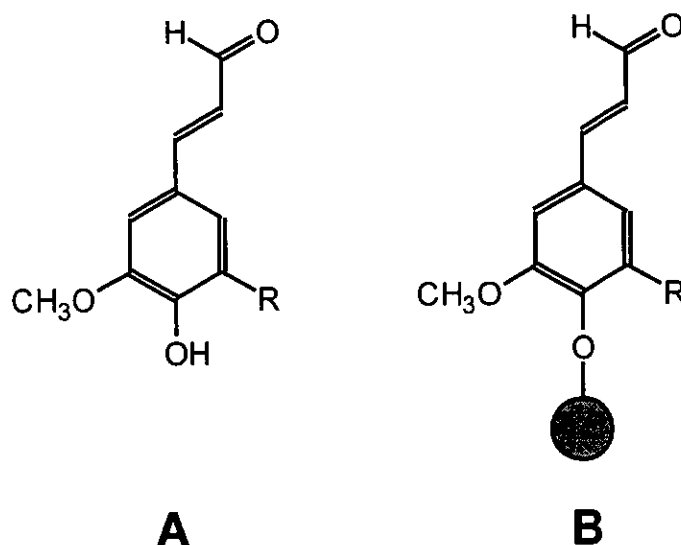


Figura IV.11.- Posibles estructuras presentes en la lignina del xilema de *Zinnia elegans* responsables de la reacción con floroglucinol en medio ácido. A) Grupos cinamaldehídos libres. B) Grupos cinamaldehídos terminales

A la vista de los resultados obtenidos hasta el momento y para poder confirmar las posibilidades apuntadas, se hacía necesario el determinar de forma analítica la presencia de cinamaldehídos o grupos terminales cinamaldehídos en las ligninas de *Zinnia elegans*. Para ello aislamos paredes celulares del hipocotilo de *Z. elegans*, sometiénolas a continuación al proceso de tioacidolisis. La tioacidolisis es una despolimerización ácida, que actúa

mediante la escisión de los enlaces β -O-4. El método combina la acción de un ácido fuerte el BF_3 eterato y un nucleófilo el EtSH. Como la tioacidolisis degrada las ligninas a estructuras que mantienen intactas las cadenas originales, la determinación de los monómeros obtenidos, y sus cantidades, nos permite obtener una gran cantidad de información sobre los grupos funcionales y la estructura de las ligninas.

Una vez realizada la tioacidolisis de las paredes aisladas de *Z. elegans*, los monómeros tioetilados obtenidos por este proceso y derivatizados con el fin de obtener los derivados trimetil-sililo, fueron analizados por medio de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

La Figura IV.12 muestra el cromatograma obtenido de los productos de tioacidolisis de las paredes celulares de *Z. elegans*.

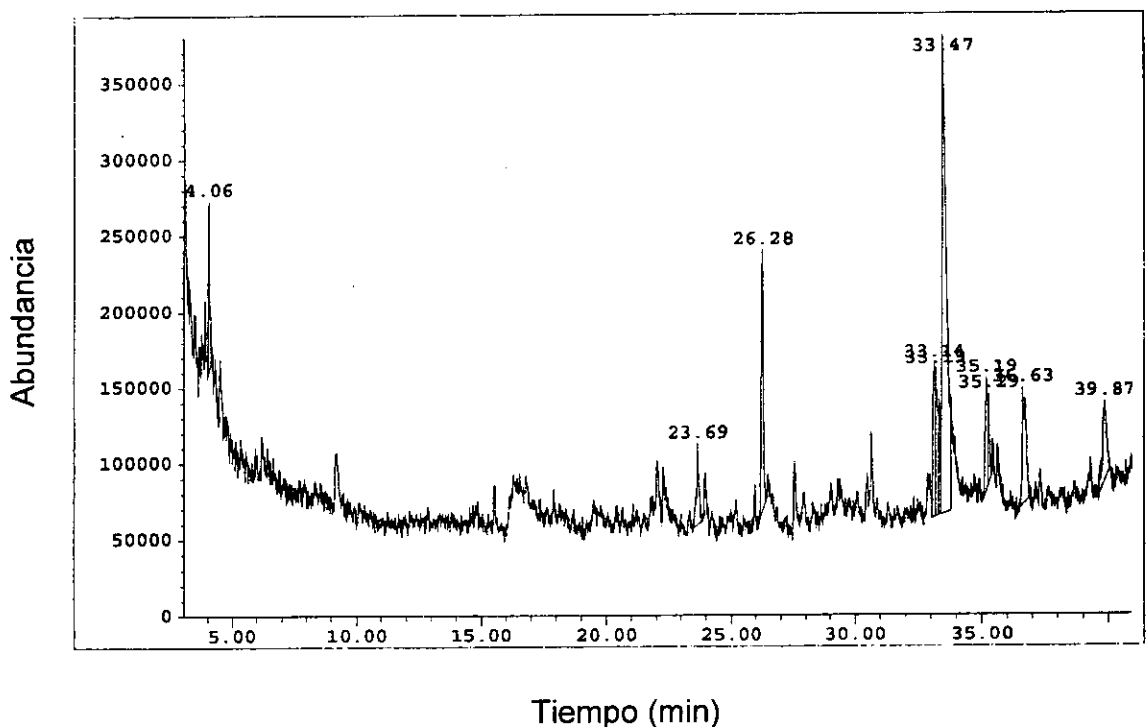


Figura IV.12.- Cromatograma de gases obtenido de los productos de tioacidolisis de las paredes celulares de *Z. elegans*.

La figura IV.13 nos permite observar con mayor detalle los picos obtenidos a partir del minuto 20, señalándose con una flecha aquellos que pudieron ser identificados por medio de la espectrometría de masas.

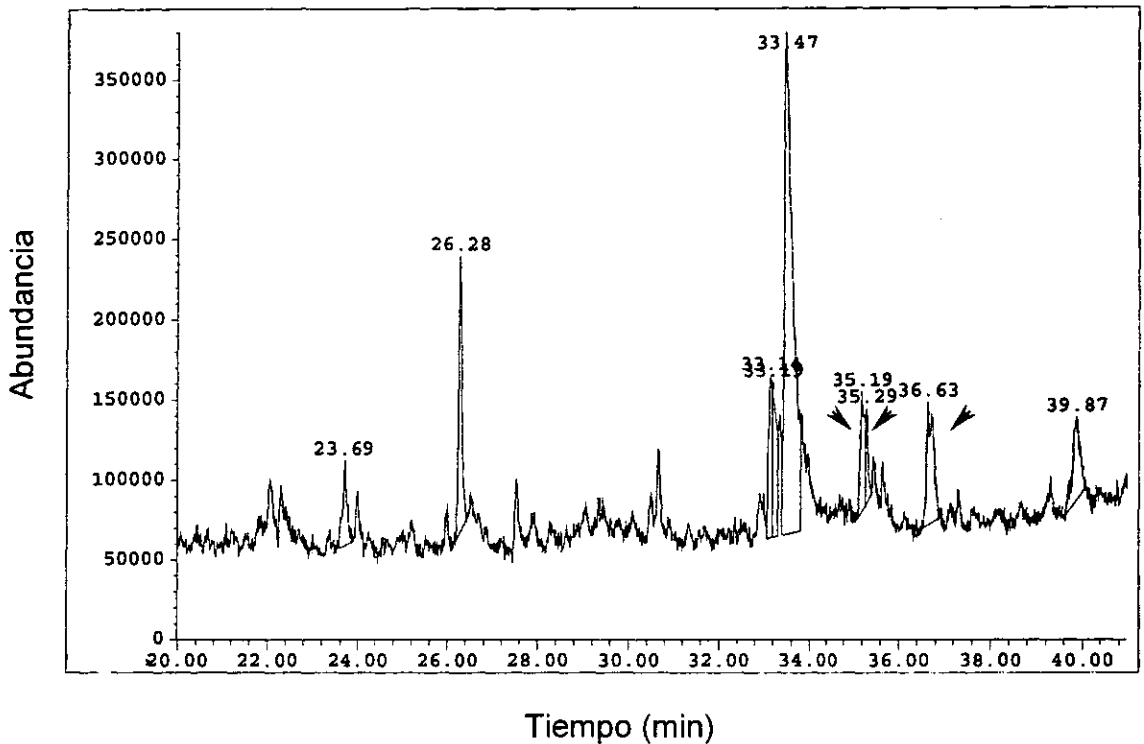


Figura IV.13.- Cromatograma de gases obtenido de los productos de tioacidolisis de las paredes celulares de *Z. elegans* (ampliación a partir del minuto 20). Las flechas indican aquellos picos identificados por espectrometría de masas

En la Figura IV.14, se muestra el espectro de masas del pico correspondiente al tiempo de retención de 35,19 minutos. Este pico presenta como fragmento mayoritario el de $m/z=269$, apareciendo también fragmentos de 73, 295, 209, 135 y otros en menor porcentaje. La presencia de estos fragmentos y su abundancia relativa, cuando se compara con la bibliografía (Higuchi y col., 1994), nos hacen pensar que este pico se debe al monómero tioetilado del coniferilaldehído.

Este monómero se obtendría a partir de un grupo terminal coniferilaldehído en la matriz de la lignina, y su presencia puede considerarse equivalente a la identificación de coniferilaldehído en las paredes celulares de *Z. elegans* (Fig. IV.15).

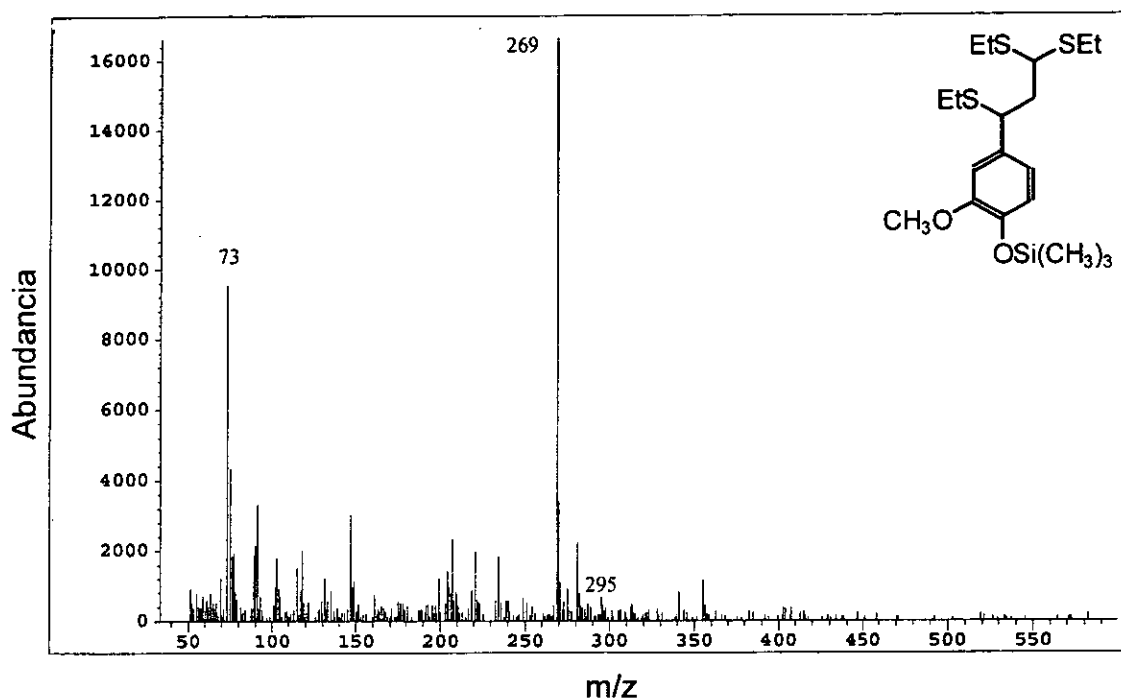


Figura IV.14.- Espectro de masas del el pico con tiempo de retención de 35,19 minutos. En la esquina superior derecha se representa la estructura del monómero tioetilado identificado.

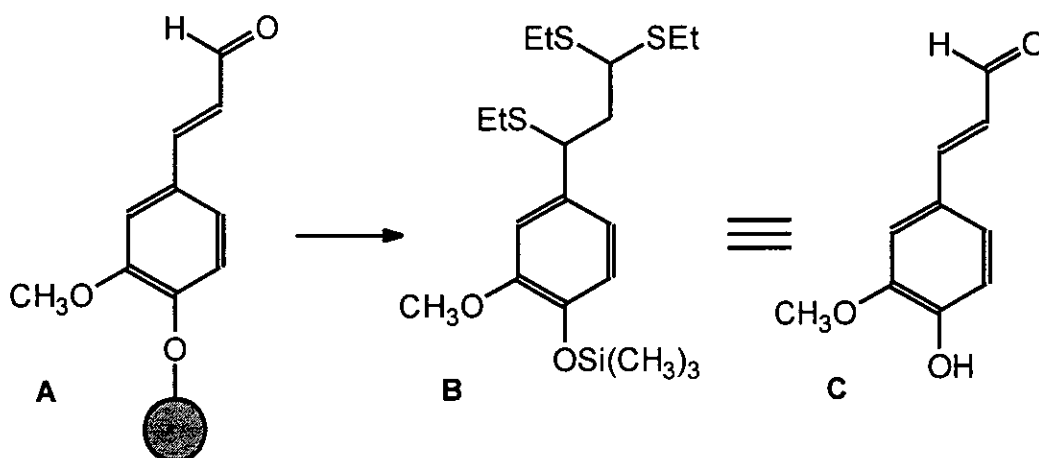


Figura IV.15.- Estructura del monómero recuperado por tioacidolisis (B) y de su estructura original en la lignina (A), que corresponde a las unidades coniferilaldehído terminales unidas por enlaces O-4.

El pico con tiempo de retención de 35,29 minutos, cuyo espectro de masas se presenta en la Figura IV.16, también presenta como fragmento mayoritario el de $m/z=269$, seguido por el fragmento de $m/z=73$, pero este en una menor abundancia relativa. La comparación de los datos espectrales con los dados por la bibliografía (Higuchi y col., 1994), nos indica que se trata del monómero tioetilado del alcohol coniferílico.

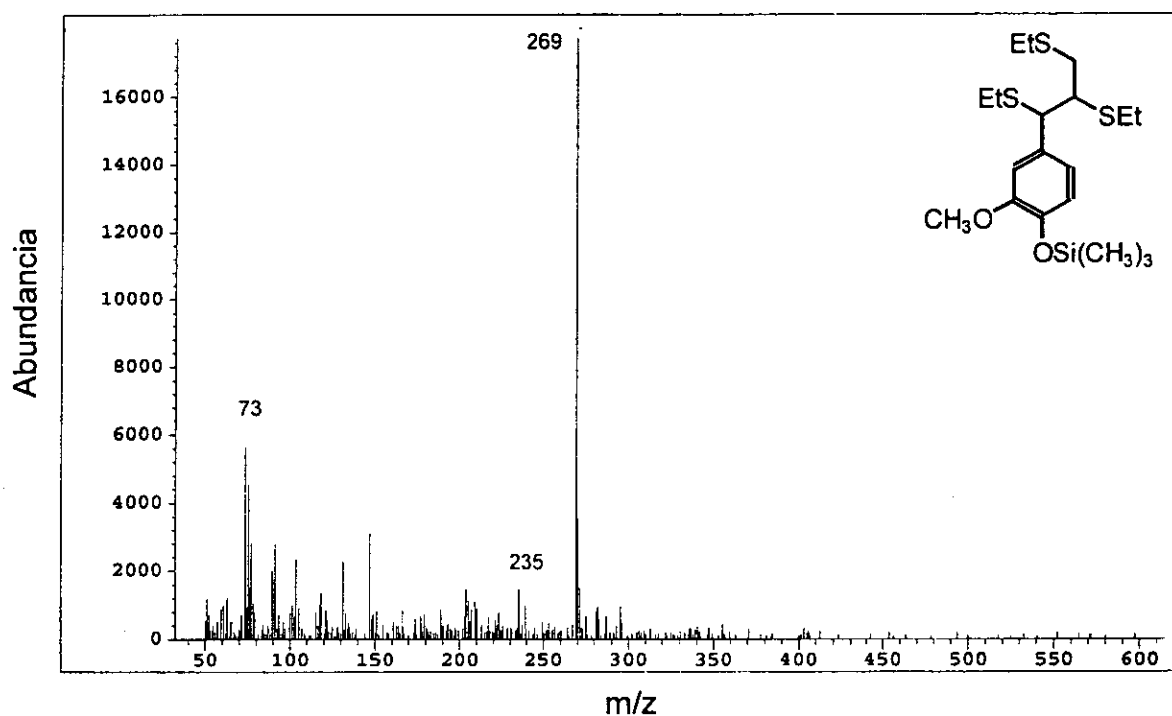


Figura IV.16.- Espectro de masas del pico con tiempo de retención de 35,29 minutos. En la esquina superior derecha se representa la estructura del monómero tioetilado identificado.

Este monómero tioetilado del alcohol coniferílico provendría de una estructura original de tipo C6C3 arilglicerol- β -ariléter en las ligninas nativas (Fig. IV.17).

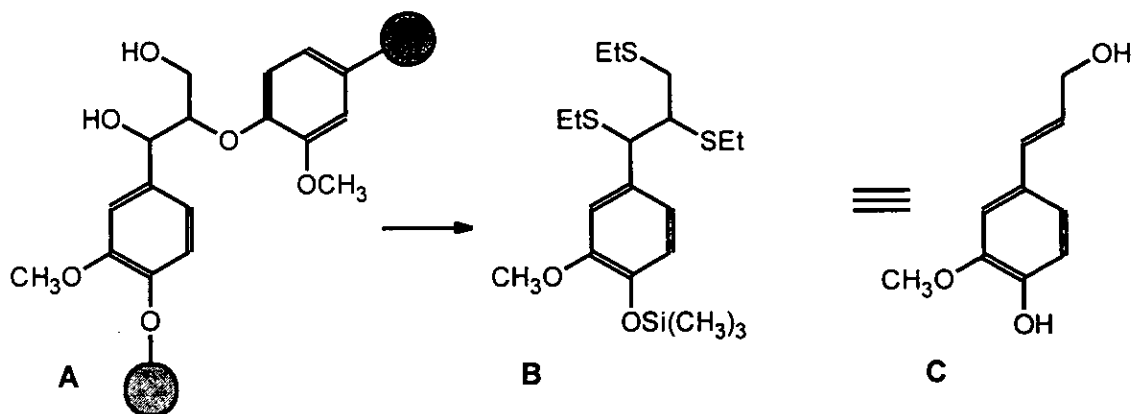


Figura IV.17.- Estructura del monómero recuperado por tioacidólisis (B) y de su estructura original en la lignina (A), que corresponde al alcohol coniferílico (C) presente en las unidades lineales aril-glicerol-β-aril-éter.

Finalmente, también se identificó el pico con tiempo de retención de 36,72 minutos, cuyo espectro de masas se presenta en la Figura IV.18.

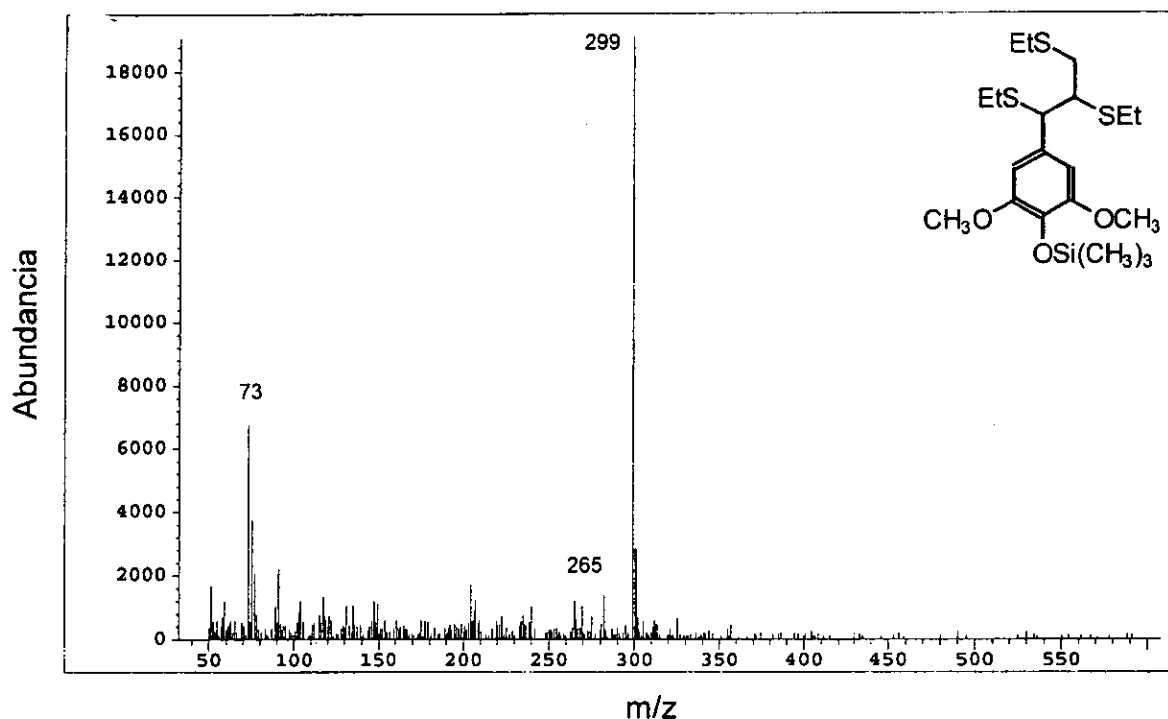


Figura IV.18.- Espectro de masas del pico con tiempo de retención de 36,72 minutos. En la esquina superior derecha se representa la estructura del monómero tioetilado identificado

En este último caso, el fragmento mayoritario fue el de $m/z= 299$ apareciendo también iones a $m/z= 73$ y $m/z= 265$. La comparación de los datos espectrales con los dados por la bibliografía (Higuchi y col., 1994), nos indica que se trata del monómero tioetiolado del alcohol sinapílico Figura III.19.

En este caso el monómero tioetiolado del alcohol sinapílico provendría de una estructura original, de tipo C6C3 arilglicerol- β -ariléter en las ligninas nativas (Fig. IV.19).

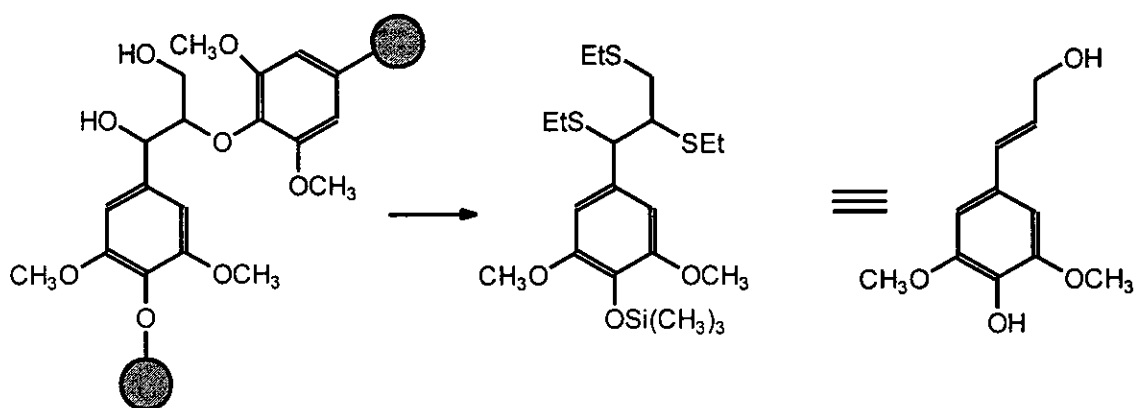


Figura IV.19.- Estructura del monómero recuperado por tioacidolisis (B) y de su estructura original en la lignina (A), que corresponde al alcohol sinapílico presente en las unidades lineales aril-glicerol- β -aril-éter (C).

En resumen, el análisis por medio de la tioacidolisis de las paredes celulares de *Zinnia elegans*, nos ha permitido identificar la presencia de los monómeros derivados de los alcoholes coniferílico y sinapílico, presentes en estructuras aril-glicerol- β -aril-éter, y la presencia de cantidades significativas del monómero derivado de grupos coniferilaldehído terminales unidos por enlaces O-4 (Tabla IV.1.).

Tabla IV.1.- Resultados del análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas de los productos de tioacidolisis de paredes celulares de *Zinnia elegans*

m/z (experimental)	m/z (bibliográfico) (Higuchi y col., 1994)	Monómero	Estructura original en la lignina
269 (100), 73 (57), 209 (5), 135 (6), 295 (4), 239 (4), 192 (3), 418 (1)	269 (100), 73 (50), 209 (5), 135 (60), 295 (9), 239 (5), 192 (5), 418 (8)	G-CHSEt-CH ₂ -CH(SET) ₂	Grupos terminales coniferilaldehído unidos por enlaces O-4
269 (100), 73 (15), 75 (13), 235 (8)	269 (100), 73 (23), 75 (19), 235 (9)	G-CHSEt-CHSEt-CH ₂ SEt	Estructuras C6C3 arilglicerol-β-arileter derivadas del alcohol coniferílico
299 (100), 73 (20), 265 (6)	299 (100), 73 (23), 265 (8)	S-CHSEt-CHSEt-CH ₂ SEt	Estructuras C6C3 arilglicerol-β-arileter derivadas del alcohol sinapílico

La tioacidolisis y posterior cromatografía de gases-espectrometría de masas permite además de la identificación de ciertos componentes, el cálculo de la relación entre grupos guayacilo y siringilo en las ligninas analizadas. En el caso de las paredes de *Zinnia elegans* el resultado que obtuvimos fue el de una relación G/S de 57/43.

El valor de la relación G/S se ha usado en ocasiones como carácter taxonómico; sin embargo estos valores presentan una gran variabilidad (Tabla IV.2), existiendo especies como *Laurelia philippiana* donde los grupos guayacilo son mayoritarios, hasta otras especies como *Noyhofagus dombeyi* donde estos solo suponen el 14% frente al 86% de grupos siringilo. Esta gran variabilidad provoca que el valor de la relación G/S no sea recomendable como carácter taxonómico.

Los resultados anteriores sugieren que la tinción positiva usando el test de Wiesner de los vasos del xilema de *Zinnia elegans* (Fig.IV.2.) indica la presencia de grupos cinamaldehído terminales en la matriz de las ligninas, y que estos grupos cinamaldehído, como es el caso del coniferilaldehído, están unidos por enlaces O-4. A la vista de la complejidad del cromatograma

obtenido, no descartamos la presencia de grupos sinapilaldehído, o incluso de otro tipo de monómeros.

Tabla IV.2.- Valores de la relación de grupos guayacilo y siringilo (G/S), en distintas especies, obtenidos por tioacidolisis (tomado de Lapierre y col., 1995)

ESPECIES	RELACIÓN G/S
ANGIOSPERMAS	
<i>Laurelia phillipiana</i>	66/44
<i>Populus deltoides</i>	44/56
<i>Populus euramericana</i>	37/63
<i>Quercus robur</i>	32/68
<i>Betula verrucosa</i>	22/78
<i>Nothofagus dombeyi</i>	14/86
GIMNOSPERMAS	
<i>Picea abies</i>	98/tr
<i>Pinus pinaster</i>	82/tr

tr: trazas

En numerosos trabajos sobre la incorporación de grupos aldehído a la estructura de las ligninas se han llevado a cabo investigaciones orientadas, en su mayoría, a conocer las propiedades de las ligninas y su posibilidad de degradación en las industrias de la madera y del papel.

Las ligninas constituyen un problema muy importante en la industria papelera, ya que han de ser eliminadas de las fibras de la madera, procesos industriales que precisan del gasto de grandes cantidades de energía, con el coste económico que esto supone, y el uso de numerosos productos químicos, en muchas ocasiones perjudiciales para el medio ambiente.

Por todo ello, se han desarrollado numerosos mutantes, buscando una disminución en la cantidad de lignina presente en los tejidos, o bien una mayor digestibilidad de las mismas. La mayoría de los mutantes desarrollados, tienen alterada la actividad de la cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD), enzima

responsable de la conversión de los cinamaldehídos en los alcoholes cinamílicos.

En ocasiones, estos mutantes presentan un menor porcentaje de lignina que los controles, como es el caso del mutante de *Sorghum bmr6* (Pillonel y col., 1991), o distintos mutantes del maíz (Kuc y Nelson, 1964). Sin embargo, en otros estudios, como los realizados por Baucher y col. (1996) con mutantes de (*Populus tremula x Populus alba*) que tenían reducida su actividad CAD en un 70%, no se observó cambio alguno en la cantidad de lignina presente en las paredes, ni cambios en la relación entre grupos guayacilo y siringilo.

La mayoría de estos mutantes CAD presentan ligninas de color rojizo-marrón, lo que lleva a pensar en una composición de las ligninas distinta a la de los controles. Así, por ejemplo Halpin y col. (1994), trabajando con un mutante de tabaco con la actividad CAD reducida en un 93%, no encontraron diferencias en la cantidad de ligninas presentes en las paredes celulares, pero sí un xilema que mostró una coloración claramente rojiza. Basándose en métodos colorimétricos, y usando el test de Wiesner, estos autores sugirieron un incremento en el contenido de aldehídos en las plantas mutantes. También Baucher y col., (1996), sugirieron cambios en la cantidad de aldehídos en sus mutantes de *Populus*, basándose en la diferente reactividad de las ligninas frente al reactivo de floroglucinol en medio ácido.

De igual manera, Pillonel y col. (1991) trabajando con el ya mencionado mutante de *Sorghum bmr6* encontraron una gran acumulación de grupos coniferilaldehído usando como método analítico la pirolisis acoplada a la espectrometría de masas. Resultados similares han sido obtenidos por Chabbert y col. (1993) al someter estas paredes celulares a tioacidolisis.

IV.1.2.- Oxidación de los alcoholes cinamílicos y de los cinamaldehídos por las paredes celulares aisladas de hipocotilos de *Zinnia elegans*

Una vez que se comprobó la incorporación tanto de los alcoholes cinamílicos (alcohol coniferílico y alcohol sinapílico) como del coniferilaldehído, y posiblemente del sinapilaldehído, a las ligninas de *Zinnia elegans*, como reveló el análisis por tioacidolisis, abordamos el estudio *in situ* de la capacidad de las paredes celulares de *Z. elegans* para oxidar los cinamaldehídos y los alcoholes cinamílicos.

Para ello, se aislaron paredes celulares de los hipocotilos de *Z. elegans*, y se incubaron estas paredes con los distintos sustratos (alcohol coniferílico, alcohol sinapílico, coniferilaldehído y sinapilaldehído) en presencia y en ausencia de peróxido de hidrógeno. Los resultados obtenidos tras estas incubaciones se muestran en la Tabla IV.3.

Tabla IV.3.- Oxidación de los alcoholes cinamílicos y los cinamaldehídos por paredes celulares aisladas de hipocotilos de *Z. elegans*.

	µmoles de sustrato oxidado g⁻¹ P.F.	
	+ H₂O₂	- H₂O₂
Alcohol coniferílico	0,486 ± 0,007 (92%)	0,043 ± 0,052 (8,2%)
Alcohol sinapílico	0,526 ± 0,027 (100%)	0,022 ± 0,030 (4,1%)
Coniferilaldehído	0,526 ± 0,012 (100%)	0,006 ± 0,007 (1,1%)
Sinapilaldehído	0,526 ± 0,019 (100%)	0,010 ± 0,013 (1,9%)

El medio de reacción estaba compuesto por tampón Tris acetato 50 mM pH=5,0, H₂O₂ 0,5mM, 0,05mM de sustrato y paredes celulares equivalentes a 0,2 gramos de tejido en un volumen total de 2 ml. La medida de oxidación se realizó tras dos horas de incubación a 25°C. Los datos son la media ± SE (n=3). Los valores entre paréntesis corresponden al porcentaje de sustrato oxidado.

De los resultados expuestos en la tabla IV.3., puede concluirse que las paredes celulares aisladas del hipocotilo de *Z. elegans* son capaces de oxidar tanto a los alcoholes cinamílicos como a los cinamaldehídos. En el caso de las incubaciones en presencia de peróxido de hidrógeno, las paredes celulares son capaces de oxidar, al cabo de las dos horas de ensayo, el 100% de los aldehídos y del alcohol sinapílico, alcanzando el 92% en el caso del alcohol coniferílico.

Las paredes celulares de *Z. elegans* son también capaces de oxidar los substratos, en los medios de incubación en ausencia de peróxido de hidrógeno, pero en mucha menor cantidad, ya que en el caso más efectivo, el del alcohol coniferílico, se alcanzaron valores inferiores al 10%, siendo incluso menores los grados de oxidación del resto de los substratos. En estas incubaciones en ausencia de peróxido de hidrógeno, las paredes celulares aisladas parecen mostrar una cierta especificidad por los alcoholes cinamílicos frente a los cinamaldehídos.

IV.1.3.- Naturaleza de la actividad peroxidasa de las paredes celulares de *Zinnia elegans*

Estudios previos realizados por el grupo de investigación del Dr. Ros Barceló han permitido caracterizar la actividad peroxidasa presente en las paredes celulares de los hipocotilos de *Zinnia elegans*.

La obtención del fluido intercelular (IWF) y su posterior análisis por isoelectroenfoque analítico, permite detectar la presencia de una proteína en la pared celular de punto isoeléctrico básico, aproximadamente 10,2, que muestra una actividad oxidasa frente al 4-metoxi- α -naftol; esta actividad se ve potenciada por la presencia de peróxido de hidrógeno en el medio de tinción (Fig. IV.20 A).

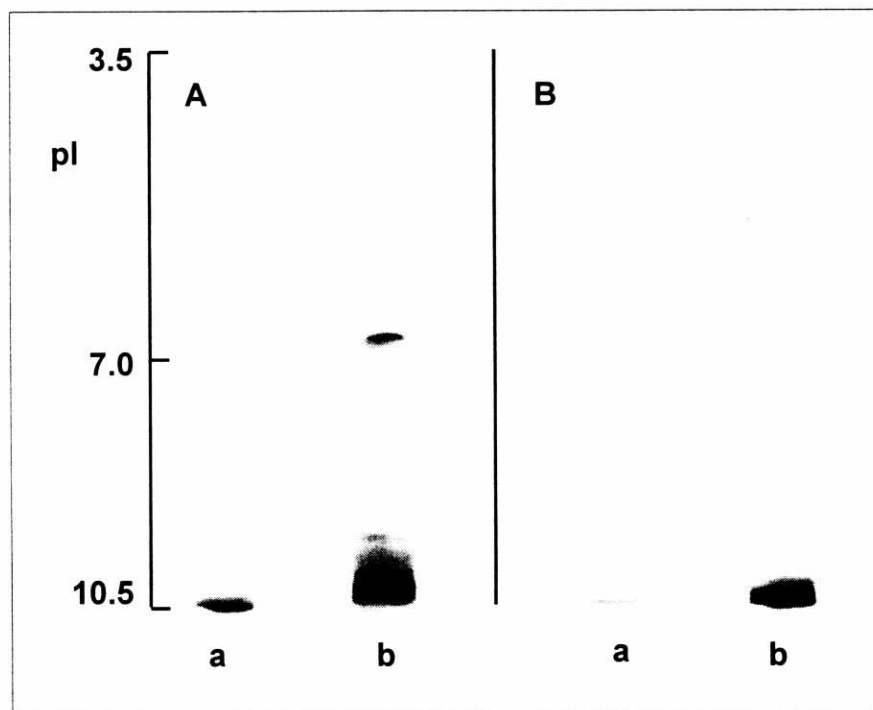


Figura IV.20.- Patrón isoenzimático de peroxidasas obtenido por isoelectroenfoque en un gradiente de pH 3,5-10,5 de A) proteínas presentes en la fracción IWF y B) proteínas presentes en la fracción ICW de hipocotilos de *Zinnia elegans*. El gel fue teñido con 4-metoxi- α -naftol en ausencia (a) y presencia (b) de H_2O_2 (Tomado de Ros Barceló y Aznar-Asensio, 1999)

Esta proteína altamente básica es la única que muestra actividad oxidasa frente al 4-metoxi- α -naftol cuando se analizó la fracción de proteína iónicamente ligada a la pared (ICW) por isoelectroenfoque (Fig IV.20 B).

Asimismo, el análisis por SDS-PAGE de la proteína purificada, mostró una única banda de aproximadamente 43 kDa. Este valor de peso molecular se encuadra perfectamente en el intervalo considerado como general para las peroxididasas vegetales que incluye pesos moleculares entre 40 y 50 kDa (Fig. IV.21), como puede ser el caso de los valores de peso molecular obtenidos para las isoenzimas de cacahuete (42 kDa y 40 kDa, Chibbar y col., 1984), tomate (46 kDa, Jen y col., 1980), o pimiento (50 kDa, Pomar y col., 1997). Sin embargo, en ocasiones se han determinado pesos moleculares que quedan fuera de este intervalo, como es el caso de las peroxididasas del fruto de la fresa (58,1 kDa y 65,5 kDa, Civello y col., 1995), de una isoenzima ácida de aguacate (60 kDa, Sánchez-Romero, 1995), o de una isoenzima ácida de tabaco (36 kDa, Gazaryan y Lagrimini, 1995).

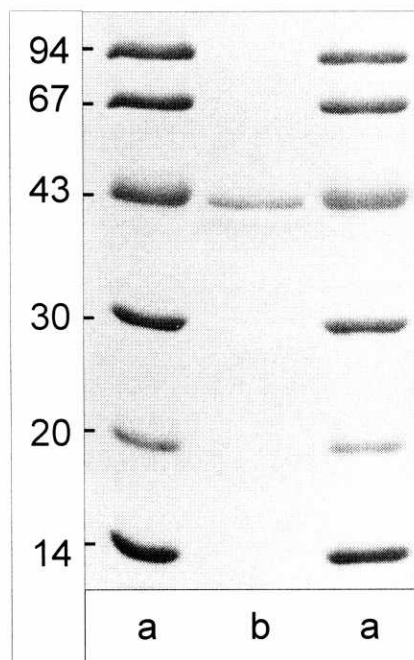


Figura IV.21.- Análisis por SDS-PAGE de la peroxidasa purificada de *Z. elegans*. a) Marcadores de peso molecular (kDa) teñidos con azul de Coomassie. b) Peroxidasa de *Z. elegans* purificada tras una cromatografía de CM-celulosa (Tomado de Ros Barceló y Aznar-Asensio, 1999)

El espectro visible de la proteína purificada mostró máximos de absorción a 403, 496 y 635 nm, derivando estos máximos a 436 y 557 nm cuando la enzima se redujo con ditionito sódico (Fig. IV.22). Estas características espectrales son típicas e inequívocas de peroxidasas de secreción (tipo III) con un grupo hemo conteniendo hierro de alto spin (Yamazaki y Yokota, 1973).

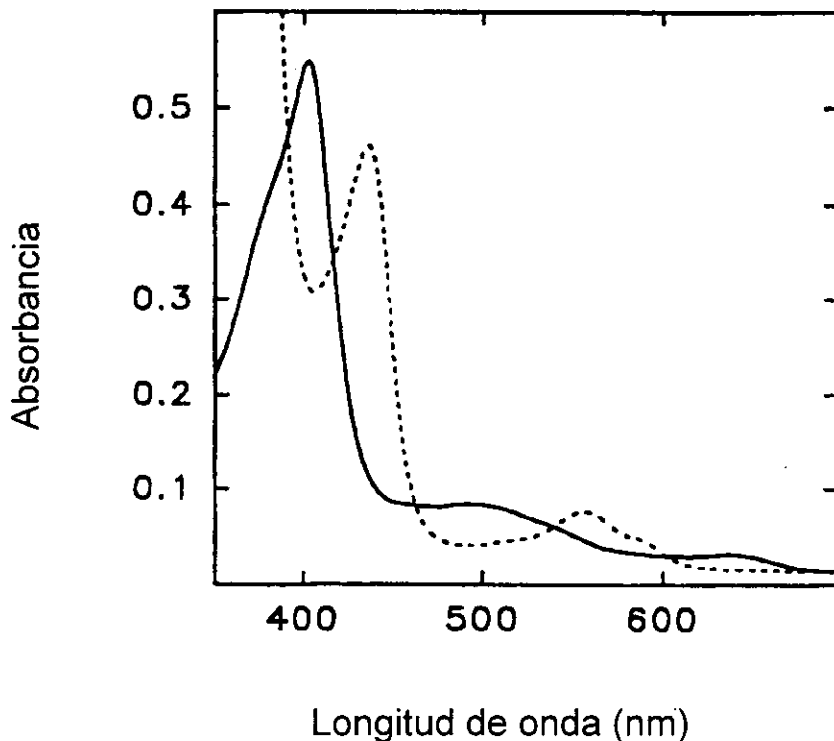


Figura IV.22.- Espectro óptico de la peroxidasa básica purificada de *Z. elegans* en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. La línea discontinua corresponde al espectro obtenido para la enzima reducida tras la adición de 300 μ g de ditionito sódico (Tomado de Ros Barceló y Aznar-Asensio, 1999)

De todos estos resultados puede concluirse que las paredes celulares del hipocotilo de *Zinnia elegans* presentan una proteína con actividad oxidasa; cuya actividad es estimulada por el H_2O_2 . Dicha proteína posee un peso molecular de 43 kDa y un espectro visible característico de peroxidasas de grupo hemo con hierro de alto spin. Todas estas características indican que la

actividad peroxidasa detectada en las paredes celulares de *Z. elegans* se debe a una peroxidasa de secreción de clase III.

IV.1.4.- Oxidación de los alcoholes cinamílicos y de los cinamaldehídos por la peroxidasa de hipocotilos de *Zinnia elegans*

Los datos obtenidos hasta el momento, nos han permitido determinar la incorporación de cinamaldehídos y alcoholes cinamílicos a la matriz de las ligninas de la pared celular de *Z. elegans*, tanto por medio de métodos histoquímicos como analíticos. Asimismo, hemos comprobado la capacidad de las paredes aisladas del hipocotilo de *Z. elegans* de oxidar estos alcoholes cinamílicos y los correspondientes cinamaldehídos. Estos hechos, unidos al conocimiento de la presencia de una peroxidasa en la pared celular de *Z. elegans* hacen que el próximo paso sea el estudio de la capacidad de esta peroxidasa de oxidar tanto los alcoholes cinamílicos como los cinamaldehídos.

Para ello, obtuvimos el fluido intercelular del hipocotilo de *Z. elegans* utilizando la técnica de infiltración al vacío. La proteína obtenida fue desalada por cromatografía a través de una columna PD-10 de Pharmacia con un relleno de Sephadex G-25. Una vez obtenida la proteína el siguiente paso fue el cálculo de los coeficientes de extinción para cada uno de los substratos y para cada una de las reacciones de oxidación.

IV.1.4.1.- Cálculo de los coeficientes de extinción de los alcoholes cinamílicos y los cinamaldehídos y de sus respectivas reacciones de oxidación

Para el cálculo de los coeficientes de extinción de los distintos substratos se procedió a preparar diferentes disoluciones stock de cada uno de ellos, y se midió la absorbancia a λ_{\max} . Los coeficientes de extinción de cada uno de los substratos se calcularon a partir de la ley de Lambert-Beer:

$$\epsilon_{\lambda_{\max}} = A_{\lambda_{\max}}/[S]$$

y los resultados obtenidos se presentan en la tabla IV.4. Para el cálculo del coeficiente de extinción de la reacción de oxidación se procedió a la incubación de cada uno de los sustratos, a la concentración de 0,075 mM, con peroxidasa de *Z. elegans* y un exceso de H₂O₂. El curso de la reacción se siguió a través de espectros consecutivos en la región ultravioleta.

REACCIÓN DE OXIDACIÓN DEL ALCOHOL CONIFERÍLICO

En el caso del alcohol coniferílico, su oxidación por la peroxidasa y el H₂O₂ (Figura IV.23. A) se manifiesta fundamentalmente por un descenso en la absorbancia a 262 nm, valor donde tiene su máximo de absorción.

En la Figura IV.23, también se presentan los resultados obtenidos para los controles realizados en ausencia de peróxido de hidrógeno (B) y en ausencia de peroxidasa (C). En ambos casos se obtiene un espectro similar al anteriormente citado, con un máximo de absorbancia a los 262 nm, pero en esta ocasión no se producen descensos significativos en los valores de la absorbancia en los sucesivos espectros. Los resultados obtenidos con estos controles nos hacen descartar que la oxidación del alcohol coniferílico (Figura IV.23 A) sea debida a reacciones no enzimáticas, y su dependencia del peróxido de hidrógeno nos indica la participación de la peroxidasa de *Z. elegans* en este proceso.

Para calcular el coeficiente de extinción de la reacción de oxidación del alcohol coniferílico se siguió el curso de la misma durante 20 minutos, al cabo del cual ya no se produjo ningún cambio en los valores de absorbancia. El coeficiente de extinción aparente para la reacción se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\epsilon_{262} = \frac{A_{262}^i - A_{262}^f}{[S]}$$

donde A_{262}^i es la absorbancia inicial y A_{262}^f es la absorbancia final de los medios de reacción a 262 nm. El valor obtenido se da en la tabla IV.4.

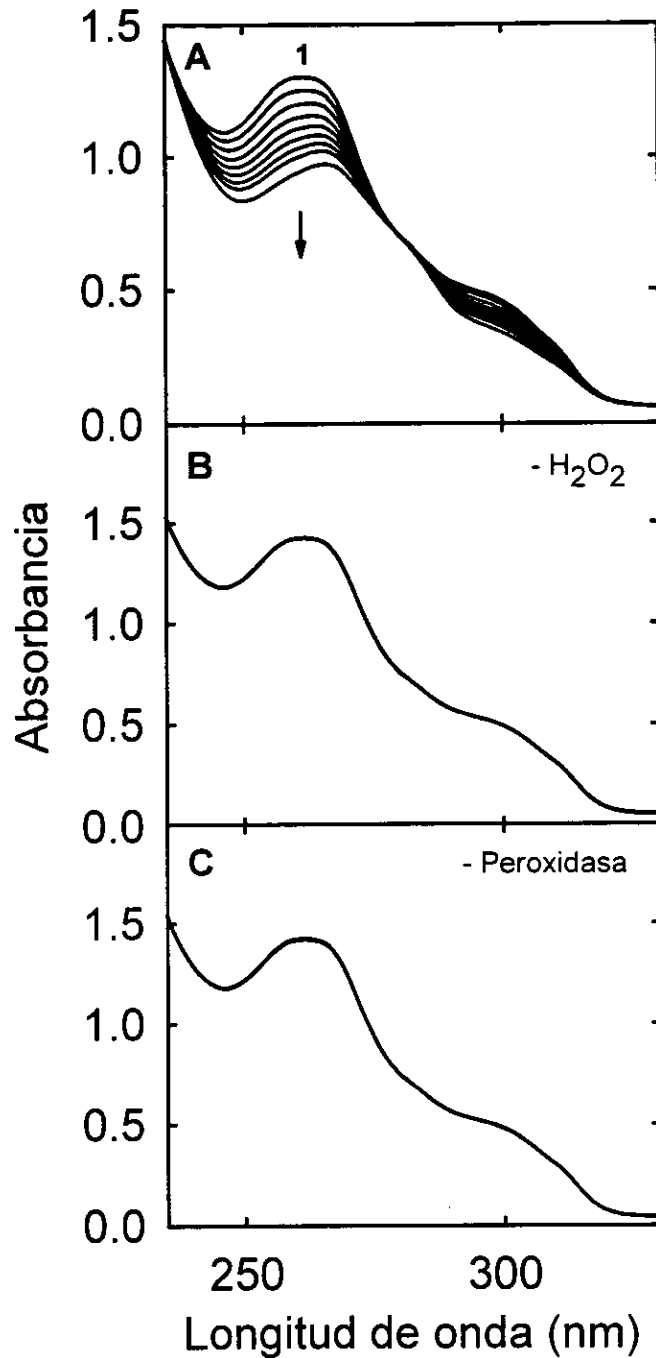


Figura IV. 23.- A) Espectros consecutivos de la oxidación del alcohol coniferílico por la peroxidasa de *Z. elegans*. El medio de reacción estaba compuesto por tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0, alcohol coniferílico 0,075 mM y peroxidasa de *Z. elegans* en presencia de un exceso de H₂O₂. Los registros se realizaron con intervalos de 1 minuto. (1): registro a tiempo cero, la flecha indica la dirección de los cambios espectrales. B) Control en ausencia de H₂O₂. C) Control en ausencia de peroxidasa

REACCIÓN DE OXIDACIÓN DEL ALCOHOL SINAPÍLICO

En el caso del alcohol sinapílico, su oxidación por la peroxidasa y el H_2O_2 (Figura IV.24. A) se manifiesta fundamentalmente por un descenso en la absorbancia a 271 nm, valor donde tiene su máximo de absorción.

En la Figura IV.24., también se presentan los resultados obtenidos para los controles realizados en ausencia de peróxido de hidrógeno (B) y en ausencia de peroxidasa (C). En ambos casos se obtiene un espectro similar al anteriormente citado, con un máximo de absorbancia a los 271 nm, pero en esta ocasión no se producen descensos significativos en los valores de la absorbancia en los sucesivos espectros. Los resultados obtenidos con estos controles nos hacen descartar que la oxidación del alcohol sinapílico (Figura IV.24 A) sea debida a reacciones no enzimáticas, y su dependencia del peróxido de hidrógeno nos indica la participación de la peroxidasa de *Z. elegans* en este proceso.

En el caso del alcohol sinapílico el cálculo del coeficiente de extinción de la reacción de oxidación no es sencillo, ya que no se llega a alcanzar un valor mínimo estable de absorbancia. Esto es debido a que las caídas de absorbancia están posteriormente acompañadas por incrementos de absorbancia debido a la formación de polímeros de deshidrogenación.

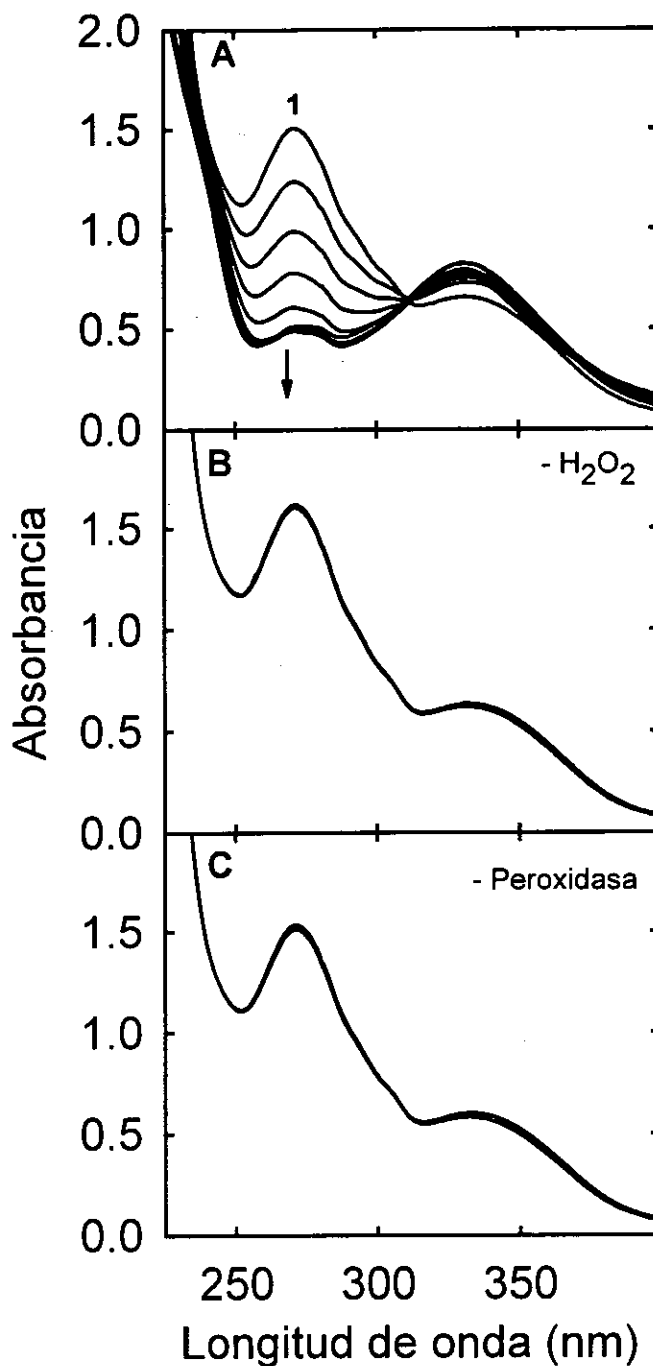


Figura IV.24.- A) Espectros consecutivos de la oxidación del alcohol sinapílico por la peroxidasa de *Z. elegans*. El medio de reacción estaba compuesto por tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0, alcohol sinapílico 0,075 mM y peroxidasa de *Z. elegans* en presencia de un exceso de H₂O₂. Los registros se realizaron con intervalos de 1 minuto. (1): registro a tiempo cero, la flecha indica la dirección de los cambios espectrales. B) Control en ausencia de H₂O₂. C) Control en ausencia de peroxidasa

Así, en la Figura IV.25 se observa el curso temporal de la oxidación del alcohol sinapílico por la peroxidasa de *Z. elegans* a través de los cambios de absorbancia a 271 nm.

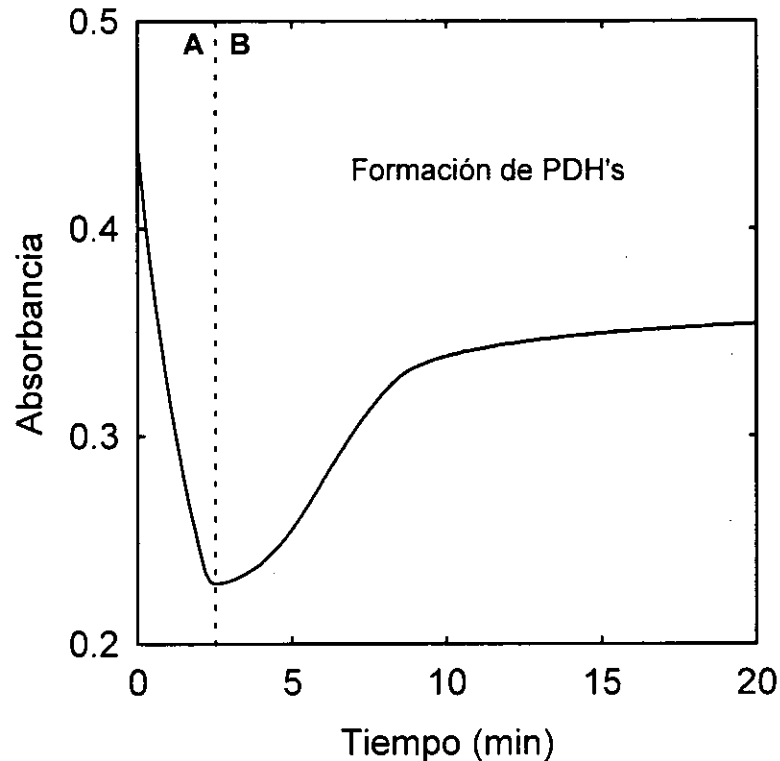


Figura IV.25.- Curso temporal de la oxidación del alcohol sinapílico por la peroxidasa de *Z. elegans* medida a 271 nm. El cuadrante (A) muestra el descenso de absorbancia debido a la desaparición del alcohol sinapílico, mientras que el cuadrante (B) muestra el incremento en los valores de absorbancia debido a la formación de polímeros de deshidrogenación del alcohol sinapílico que aumentan la turbidez del medio.

Como se puede observar en dicha figura, al comienzo de la reacción (cuadrante A) se produce un descenso rápido de la absorbancia debido al consumo del alcohol sinapílico, para a continuación producirse un aumento en la absorbancia (cuadrante B) debido a la formación de polímeros de deshidrogenación. Por este motivo, el coeficiente de extinción aparente para la reacción se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\epsilon_{271} = \frac{A_{271}^i - A_{271}^m}{[S]}$$

donde A_{271}^i es la absorbancia inicial, y la A_{271}^m es la absorbancia mínima de los medios de reacción a 271 nm. El valor obtenido para el coeficiente de extinción de la reacción se da en la tabla IV.4.

Estos polímeros, de naturaleza insoluble, aumentarían la turbidez del medio y por lo tanto, los valores de absorbancia registrados. La formación de estos polímeros de deshidrogenación del alcohol sinapílico es bastante rápida ya que se completa, prácticamente en su totalidad, en los 10 primeros minutos.

REACCIÓN DE OXIDACIÓN DEL CONIFERILALDEHÍDO

En el caso del coniferilaldehído, su oxidación por la peroxidasa y el H_2O_2 (Figura IV.26. A) se manifiesta fundamentalmente por un descenso en la absorbancia a 341 nm, valor donde tiene su máximo de absorción.

En la Figura IV.26., también se presentan los resultados obtenidos para los controles realizados en ausencia de peróxido de hidrógeno (B) y en ausencia de peroxidasa (C). En ambos casos se obtiene un espectro similar al anteriormente citado, con un máximo de absorbancia a los 341 nm, pero en esta ocasión no se producen descensos significativos en los valores de la absorbancia en los sucesivos espectros. Los resultados obtenidos con estos controles nos hacen descartar que la oxidación del coniferilaldehído (Figura IV.26 A) sea debida a reacciones no enzimáticas, y su dependencia del peróxido de hidrógeno nos indica la participación de la peroxidasa de *Z. elegans* en este proceso.

Para calcular el coeficiente de extinción de la reacción de oxidación del coniferilaldehído se siguió el curso de la misma durante 20 minutos, al cabo del cual ya no se produjo ningún cambio en los valores de absorbancia. El coeficiente de extinción aparente para la reacción se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\epsilon_{341} = \frac{A_{341}^i - A_{341}^f}{[S]}$$

donde A_{341}^i es la absorbancia inicial y A_{341}^f es la absorbancia final de los medios de reacción a 341 nm. El valor obtenido se da en la tabla IV.4.

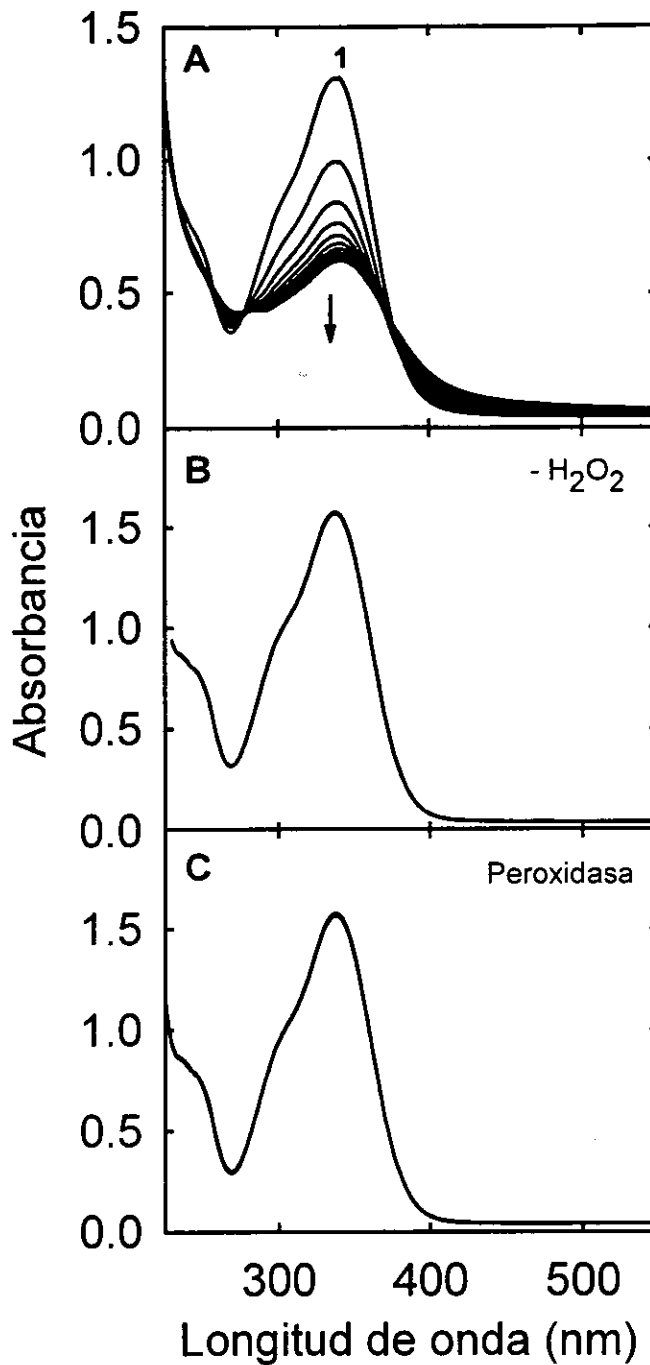


Figura IV.26.- A) Espectros consecutivos de la oxidación del coniferilaldehído por la peroxidasa de *Z. elegans*. El medio de reacción estaba compuesto por tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0, coniferilaldehído 0,075 mM y peroxidasa de *Z. elegans* en presencia de un exceso de H₂O₂. Los registros se realizaron con intervalos de 1 minuto. (1): registro a tiempo cero, la flecha indica la dirección de los cambios espectrales. B) Control en ausencia de H₂O₂. C) Control en ausencia de peroxidasa

REACCIÓN DE OXIDACIÓN DEL SINAPILALDEHÍDO

En el caso del sinapilaldehído, su oxidación por la peroxidasa y el H_2O_2 (Figura IV.27. A) se manifiesta fundamentalmente por un descenso en la absorbancia a 340 nm, valor donde tiene su máximo de absorción. En este caso, aparece otra zona de acusada variación, a los 550 nm, siendo este hecho observable a simple vista ya que durante el desarrollo de la reacción aparece en el medio un color rosado.

En la Figura IV.27., también se presentan los resultados obtenidos para los controles realizados en ausencia de peróxido de hidrógeno (B) y en ausencia de peroxidasa (C). En ambos casos se obtiene un espectro similar al anteriormente citado, con un máximo de absorbancia a los 340 nm, pero en esta ocasión no se producen descensos significativos en los valores de la absorbancia en los sucesivos espectros. Los resultados obtenidos con estos controles nos hacen descartar que la oxidación del sinapilaldehído (Figura IV.27 A) sea debida a reacciones no enzimáticas, y su dependencia del peróxido de hidrógeno nos indica la participación de la peroxidasa de *Z. elegans* en este proceso.

Para calcular el coeficiente de extinción de la reacción de oxidación del sinapilaldehído se siguió el curso de la misma durante 20 minutos, al cabo del cual ya no se produjo ningún cambio en los valores de absorbancia. El coeficiente de extinción aparente para la reacción se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\epsilon_{340} = \frac{A_{340}^i - A_{340}^f}{[S]}$$

donde A_{340}^i es la absorbancia inicial y A_{340}^f es la absorbancia final de los medios de reacción a 340 nm. El valor obtenido se da en la tabla IV.4.

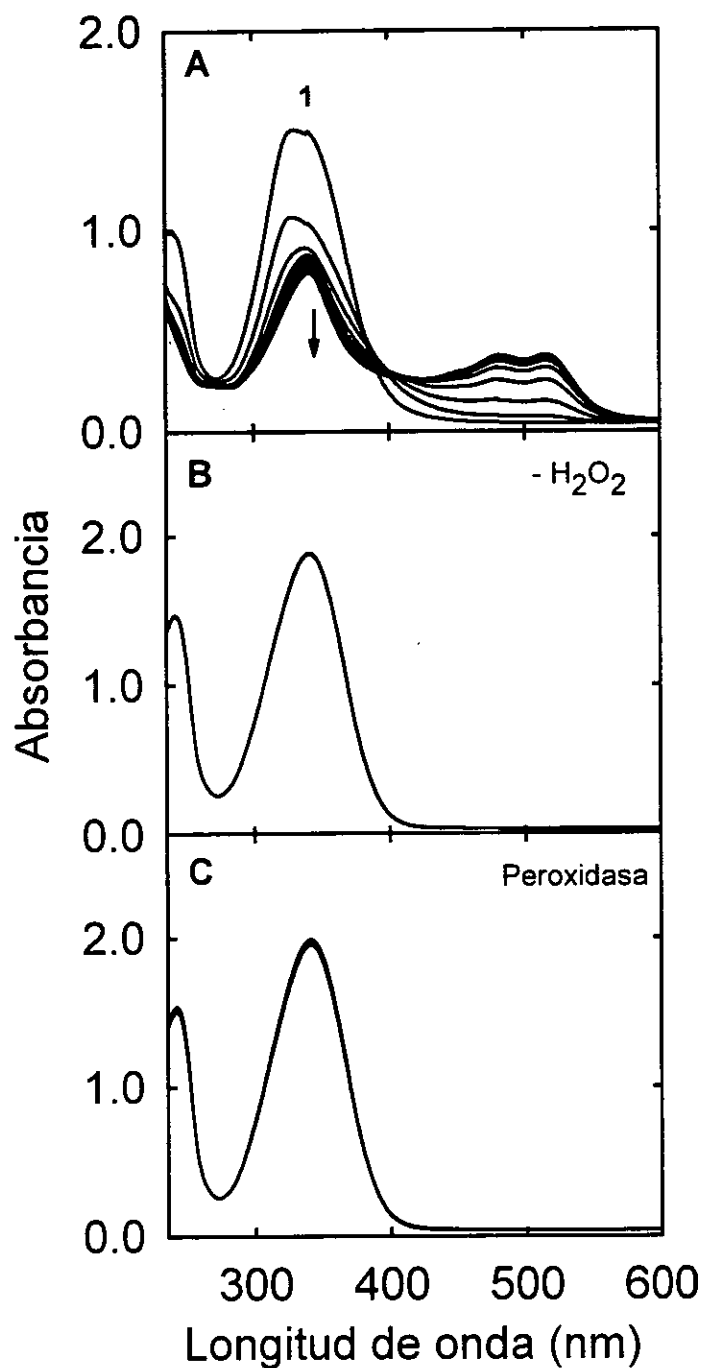


Figura IV.27.- A) Espectros consecutivos de la oxidación del sinapilaldehído por la peroxidasa de *Z. elegans*. El medio de reacción estaba compuesto por tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0, sinapilaldehído 0,075 mM y peroxidasa de *Z. elegans* en presencia de un exceso de H₂O₂. Los registros se realizaron con intervalos de 1 minuto. (1): registro a tiempo cero, la flecha indica la dirección de los cambios espectrales. B) Control en ausencia de H₂O₂. C) Control en ausencia de peroxidasa

Los valores obtenidos para los coeficientes de extinción de los dos alcoholes cinamílicos, y de los dos cinamaldehydos, así como los coeficientes de extinción para cada una de las reacciones de oxidación se dan en la Tabla IV.4.

Tabla IV.4.- Coeficientes de extinción calculados para los alcoholes cinamílicos y los cinamaldehydos, y para sus correspondientes reacciones de oxidación, catalizadas por la peroxidasa

Coeficientes de extinción ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) (λ)		
	Substratos	Reacción
Alcohol coniferílico	17,7 \pm 1,5 (262 nm)	9,75 \pm 0,5 (262 nm)
Alcohol sinapílico	8,12 \pm 0,5 (271 nm)	4,14 \pm 0,0 (271 nm)
Coniferilaldehído	20,6 \pm 0,6 (341 nm)	13,4 \pm 0,5 (341 nm)
Sinapilaldehído	18,6 \pm 0,0 (340 nm)	11,9 \pm 0,2 (340 nm)

Los coeficientes de extinción de las reacciones de oxidación se calcularon a través de la oxidación de los respectivos substratos por la peroxidasa de *Z. elegans* en presencia de un exceso de H_2O_2 y con una concentración inicial para todos los substratos de 0,075 mM.

Estos coeficientes de extinción se usarán a continuación en la determinación de la velocidad de oxidación de cada uno de los substratos por la peroxidasa de *Z. elegans* así como en la caracterización de sus cinéticas.

IV.1.4.2.- Cinéticas de la oxidación de los alcoholes cinamílicos y de los cinamaldehydos por la peroxidasa de hipocotilos de *Zinnia elegans*

Una vez calculados los coeficientes de extinción para las reacciones de oxidación de los distintos substratos, se estudió la capacidad de la peroxidasa de *Z. elegans* de oxidar los alcoholes cinamílicos y los cinamaldehydos. Los resultados se dan en la tabla IV.5.

Tabla IV.5.- Velocidades de oxidación de los alcoholes cinamílicos y los cinamaldehídos por la peroxidasa de *Z. elegans*.

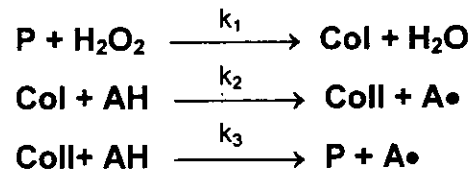
	nmoles de sustrato oxidado g ⁻¹ P.F.	
	+ H ₂ O ₂	- H ₂ O ₂
Alcohol coniferílico	143,4 ± 6,32	3,83 ± 3,10
Alcohol sinapílico	467,2 ± 7,80	12,0 ± 8,10
Coniferilaldehído	352,2 ± 11,0	1,20 ± 0,65
Sinapilaldehído	409,4 ± 11,3	3,20 ± 1,43

El medio de reacción estaba compuesto por tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0, H₂O₂ 0,1 mM, 0,1 mM de sustrato y peroxidasa de *Z. elegans*. Los datos son la media ± SE (n=3).

Como se puede ver en dicha tabla, la peroxidasa de *Z. elegans* es capaz de oxidar los cuatro sustratos, tanto en presencia como en ausencia de peróxido de hidrógeno. Este último dato nos indica la presencia de una cierta actividad oxidasa, que en ningún caso llega a suponer más del 3% de la actividad peroxidasa.

El análisis de los datos reflejados en la tabla IV.5. , nos permiten concluir que la peroxidasa de *Z. elegans* muestra, en presencia de H₂O₂, una actividad catalítica diferencial frente a cada sustrato, oxidándolos en el siguiente orden: alcohol sinapílico > sinapilaldehído > coniferilaldehído > alcohol coniferílico; lo que nos indica claramente que la peroxidasa de *Z. elegans* oxida mejor las unidades siringilo que a las unidades guayacilo. Este orden de preferencia en los sustratos está de acuerdo con los datos aportados recientemente para otras peroxidases vegetales por Wallace y Fry (1999). En el caso de la oxidación en ausencia de H₂O₂, la peroxidasa también muestra una mayor actividad catalítica frente a los grupos siringilo.

El paso siguiente fue estudiar las cinéticas que rigen estas oxidaciones. Para ello, se utilizó el mecanismo de ping-pong irreversible propuesto para las reacciones catalizadas por la peroxidasa por Rasmussen y col., (1995) y validado por Ros Barceló y col. (1998). Este modelo se caracteriza por un paso irreversible de oxidación de dos electrones seguido por 2 pasos de reducción de 1 electrón.



Donde **P** representa la peroxidasa en su forma férrica nativa, **Col** y **Coll** a los compuestos I y II de la peroxidasa, y **AH** al sustrato que es oxidado por la peroxidasa.

En condiciones de estado estacionario, se pueden formular las siguientes ecuaciones:

$$\frac{d[\text{P}]}{dt} = k_3[\text{Coll}][\text{AH}] - k_1[\text{P}][\text{H}_2\text{O}_2] = 0 \quad (1)$$

$$\frac{d[\text{Col}]}{dt} = k_1[\text{P}][\text{H}_2\text{O}_2] - k_2[\text{Col}][\text{AH}] = 0 \quad (2)$$

$$\frac{d[\text{Coll}]}{dt} = k_2[\text{Col}][\text{AH}] - k_3[\text{Coll}][\text{AH}] = 0 \quad (3)$$

Realizando un balance de masas para la enzima:

$$[\text{E}] = [\text{P}] + [\text{Col}] + [\text{Coll}] \quad (4)$$

De (1) deducimos:

$$[\text{P}] = \frac{k_3[\text{Coll}][\text{AH}]}{[\text{H}_2\text{O}_2]k_1} = \frac{k_3[\text{AH}]}{k_1[\text{H}_2\text{O}_2]}[\text{Coll}] \quad (5)$$

De (3) deducimos:

$$[\text{Col}] = \frac{k_3[\text{Coll}][\text{AH}]}{[\text{AH}]k_2} = \frac{k_3}{k_2}[\text{Coll}] \quad (6)$$

Sustituyendo (5) y (6) en (4):

$$[E] = \left\{ \left(\frac{k_3[AH]}{k_1[H_2O_2]} \right) + \left(\frac{k_3}{k_2} + 1 \right) \right\} [CoII] \quad (7)$$

Por otra parte:

$$-\frac{d[AH]}{dt} = k_2[CoI][AH] + k_3[CoII][AH] \quad (8)$$

De (3) deducimos:

$$k_2[CoI][AH] = k_3[CoII][AH]$$

Sustituyendo en (8):

$$\frac{-d[AH]}{dt} = 2(k_3[CoII][AH]) \quad (9)$$

De (7) deducimos:

$$[CoII] = \frac{[E]}{\left\{ \left(\frac{k_3[AH]}{k_1[H_2O_2]} \right) + \left(\frac{k_3}{k_2} + 1 \right) \right\}}$$

Sustituyendo en (9):

$$\frac{-d[AH]}{dt} = \frac{2k_3[E][AH]}{\left(\frac{k_3[AH]}{k_1[H_2O_2]} \right) + \left(\frac{k_3}{k_2} + 1 \right)} \quad (10)$$

Asumiendo que $k_2 \gg k_3$, como ocurre para la mayoría de las peroxidasas (Bakovic & Dunford, 1993), la ecuación de la velocidad de oxidación de los substratos se puede expresar de la siguiente manera:

$$\frac{-d[AH]}{dt} = \frac{2[E]k_3[AH][H_2O_2]}{(k_3/k_1)[AH] + [H_2O_2]}$$

o lo que es lo mismo:

$$V = \frac{2[E]k_3[AH][H_2O_2]}{(k_3/k_1)[AH] + [H_2O_2]}$$

Si esta misma fórmula la expresamos en función del H_2O_2 :

$$V = \frac{A[H_2O_2]}{B + [H_2O_2]}$$

Donde A es la V_{max} y B la k_M aparente para el H_2O_2 , o lo que es lo mismo:

$$V_{max} = 2[E]k_3[AH]$$

$$k_M = (k_3/k_1)[AH]$$

Igualmente al representar la ecuación de la velocidad en función de la concentración del substrato fenólico se obtiene

$$V = \frac{A[AH]}{B + [AH]}$$

Donde A es la V_{max} y B es la k_M aparentes para el substrato fenólico, o lo que es lo mismo:

$$V_{max} = 2[E]k_1[H_2O_2]$$

$$k_M = (k_1/k_3)[H_2O_2]$$

En este último caso la relación entre V_{max} y k_M es lineal, y además equivalente al valor de la constante cinética k_3 , ya que:

$$A/B = 2[E]k_3$$

A la vista de este mecanismo ping-pong, y del desarrollo matemático expuesto, una cinética de oxidación que siga este modelo ha de cumplir una serie de requisitos:

- a) Por una parte se ha de dar una dependencia lineal entre los valores de la k_M aparente y V_{max} aparente para el sustrato para diferentes concentraciones de H_2O_2 :

$$\frac{V_{max}^{RH}}{K_M^{RH}} = 2[E]k_3$$

- b) Por otra parte se ha de dar una dependencia lineal entre los valores de la k_M aparente y V_{max} aparente para el H_2O_2 para diferentes concentraciones de sustrato:

$$\frac{V_{max}^{H_2O_2}}{K_M^{H_2O_2}} = 2[E]k_1$$

IV.1.4.2.1.-Cinética de la oxidación del alcohol coniferílico

Para el análisis de las características cinéticas de la reacción de oxidación del alcohol coniferílico por la peroxidasa, se efectuaron curvas de saturación midiendo la dependencia de la velocidad de oxidación de la concentración de H_2O_2 y de la concentración de alcohol coniferílico.

Como se puede ver en la Figura IV.28 A., la oxidación del alcohol coniferílico por la peroxidasa de *Z. elegans* mostró una cinética de tipo hiperbólico frente a la concentración del alcohol, que puede ser ajustada a una ecuación de Michaelis-Menten a bajas concentraciones de sustrato, presentando inhibición a altas concentraciones del alcohol coniferílico.

De igual forma, la velocidad de oxidación del alcohol coniferílico frente a la concentración de peróxido de hidrógeno también presenta una cinética de tipo hiperbólico ajustable a una ecuación de Michaelis-Menten a bajas concentraciones de sustrato, e igualmente aparece inhibición a altas concentraciones de H_2O_2 (Fig. IV.28 B).

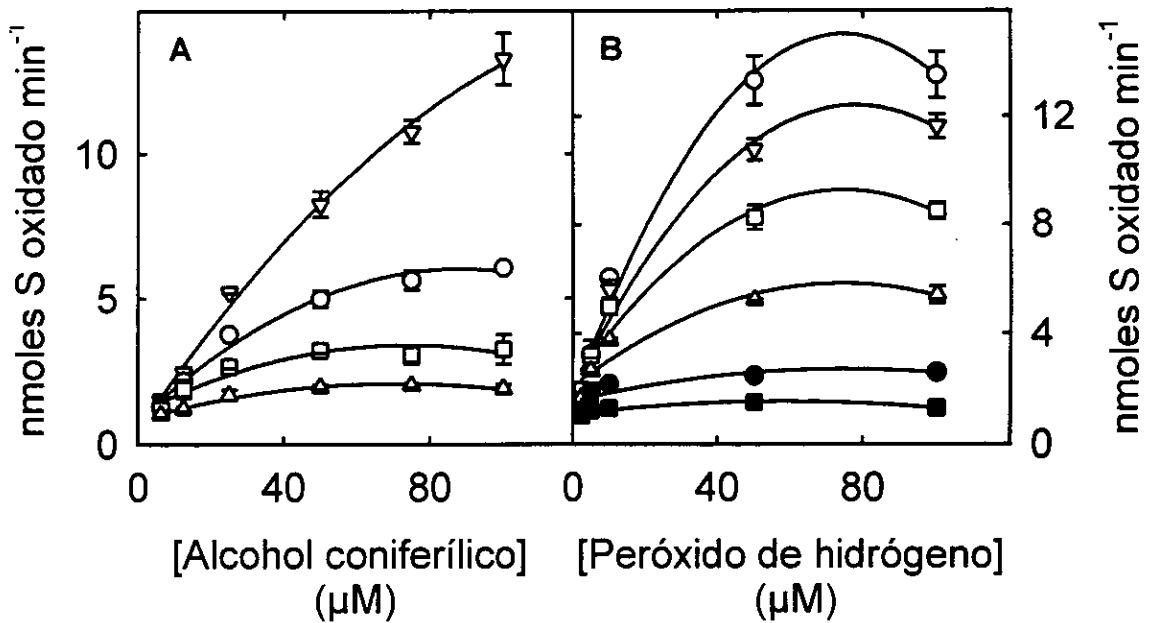


Figura IV.28.- A) Dependencia de la velocidad de oxidación del alcohol coniferílico de la concentración de sustrato por la peroxidasa de *Z. elegans*. Los medios de reacción estaban compuestos por diferentes concentraciones de alcohol coniferílico, peroxidasa de *Z. elegans* y H₂O₂ (∇) 50 μM, (O) 10 μM, (□) 5 μM, (Δ) 2,5 μM, en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0.

B) Dependencia de la de la velocidad de oxidación del alcohol coniferílico concentración de peróxido de hidrógeno por la peroxidasa de *Z. elegans*. Los medios de reacción estaban compuestos por diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno, peroxidasa de *Z. elegans* y alcohol coniferílico (O) 100 μM, (∇) 75 μM, (□) 50 μM, (Δ) 25 μM, (●) 12,5 μM y (■) 6,25 μM, en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0

La representación de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk ($1/v$ frente a $1/[\text{alcohol coniferílico}]$) nos permitió calcular los valores de V_{\max} y k_M para cada una de las concentraciones de H₂O₂ ensayadas. De igual manera, las representaciones de $1/v$ frente a $1/[\text{H}_2\text{O}_2]$, nos permitieron calcular los valores de V_{\max} y k_M para cada una de las concentraciones de alcohol coniferílico.

En la Figura III.29 se muestra la dependencia de los valores obtenidos de la V_{\max} y la k_M de la concentración del peróxido de hidrógeno y del alcohol coniferílico. Como se puede ver en las gráficas, estas muestran una dependencia lineal lo que está de acuerdo con el modelo cinético antes propuesto.

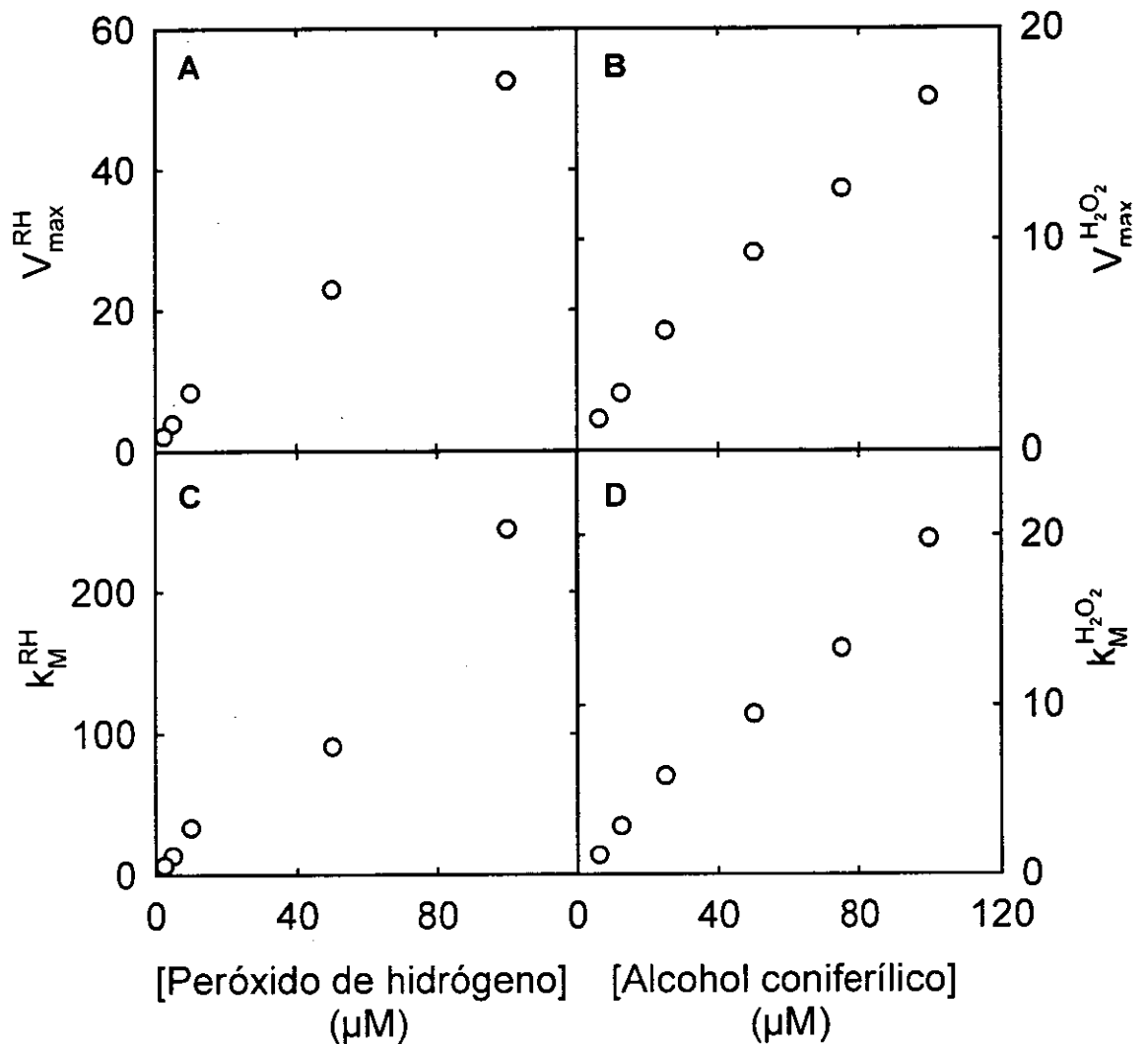


Figura IV.29.- A) Dependencia del valor de V_{max} para el alcohol coniferílico de la concentración de peróxido de hidrógeno. B) Dependencia del valor de V_{max} para el peróxido de hidrógeno de la concentración de alcohol coniferílico. C) Dependencia del valor de k_M para el alcohol coniferílico de la concentración de peróxido de hidrógeno. D) Dependencia del valor de k_M para el peróxido de hidrógeno de la concentración de alcohol coniferílico

Asimismo, en la Figura IV.30. se representan los valores de V_{max} frente a los de k_M para el alcohol coniferílico (A) a distintas concentraciones de H_2O_2 y para el peróxido de hidrógeno (B) a distintas concentraciones de alcohol coniferílico. Como se puede observar, ambas relaciones son de tipo lineal, hecho que confirma el modelo ping-pong antes propuesto.

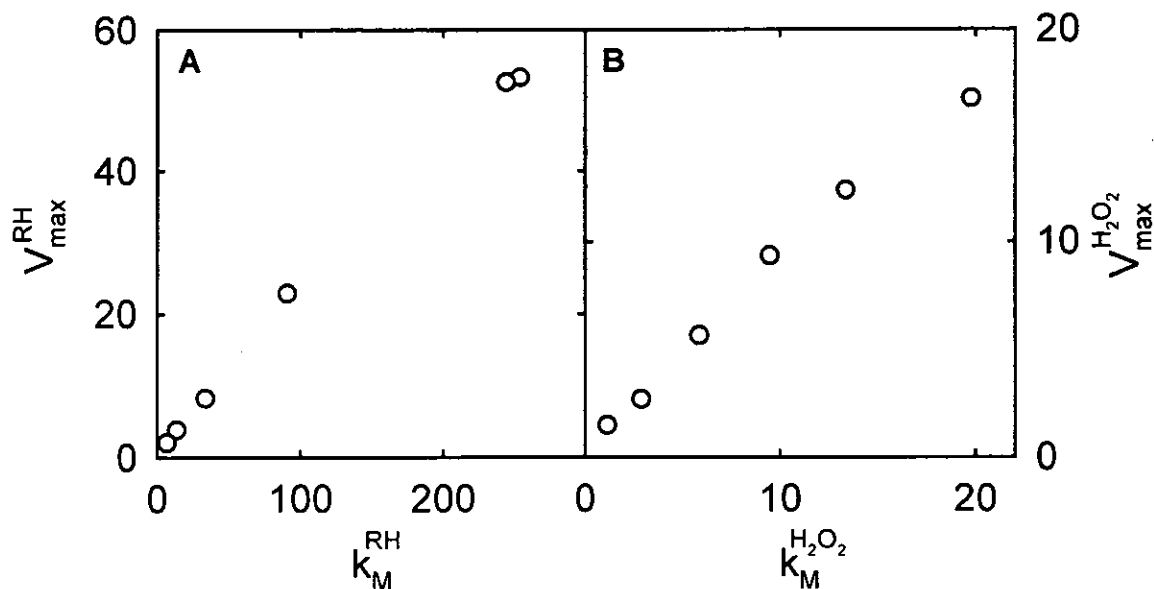


Figura IV.30.- A) Dependencia de los valores de V_{max} y k_M para el alcohol coniferílico a diferentes concentraciones de H_2O_2 . B) Dependencia de los valores de V_{max} y k_M para el peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones de alcohol coniferílico

IV.1.4.2.2.-Cinética de la oxidación del alcohol sinapílico

Para el análisis de las características cinéticas de la reacción de oxidación del alcohol sinapílico por la peroxidasa, se efectuaron curvas de saturación midiendo la dependencia de la velocidad de oxidación de la concentración de H_2O_2 y de la concentración de alcohol sinapílico.

Como se puede ver en la Figura IV.31 A., la oxidación del alcohol sinapílico por la peroxidasa de *Z. elegans* mostró una cinética de tipo hiperbólico frente a la concentración del alcohol, que puede ser ajustada a una ecuación de Michaelis-Menten a bajas concentraciones de sustrato, presentando inhibición a altas concentraciones del alcohol sinapílico.

De igual forma, la velocidad de oxidación del alcohol sinapílico frente a la concentración de peróxido de hidrógeno también presenta una cinética de tipo hiperbólico ajustable a una ecuación de Michaelis-Menten a bajas

concentraciones de sustrato, e igualmente aparece inhibición a altas concentraciones de H_2O_2 (Fig. IV.31 B).

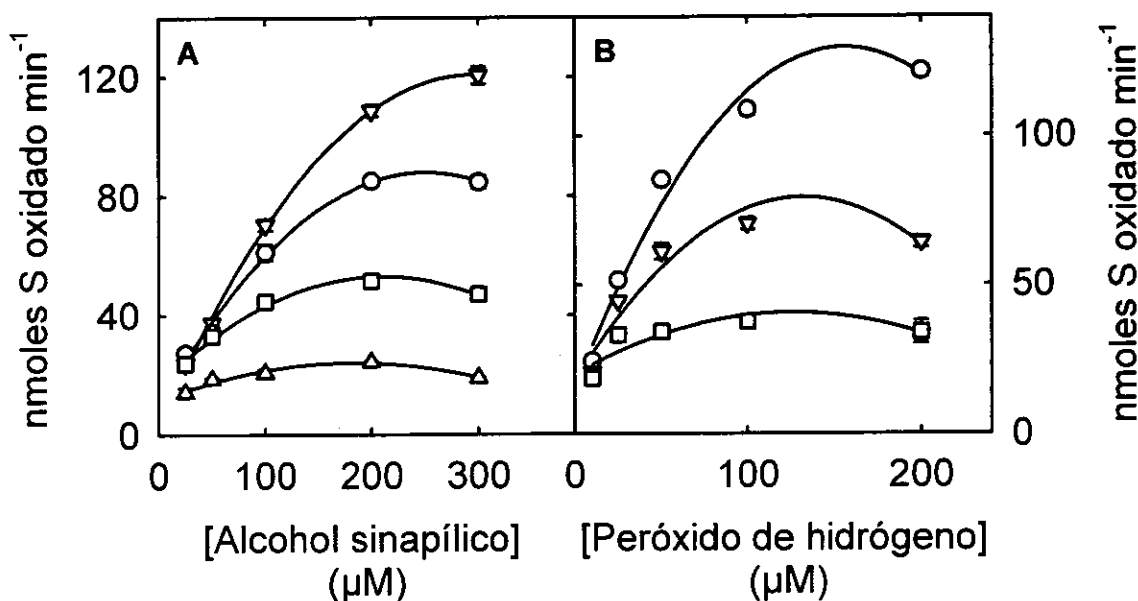


Figura IV.31.- A) Dependencia de la velocidad de oxidación del alcohol sinapílico de la concentración de sustrato por peroxidasa de *Z. elegans*. Los medios de reacción estaban compuestos por diferentes concentraciones de alcohol sinapílico, peroxidasa de *Z. elegans* y H_2O_2 (∇) 100 μM, (O) 50 μM, (□) 25 μM, (Δ) 10 μM, en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0.

B) Dependencia de la velocidad de oxidación del alcohol sinapílico de la concentración de peróxido de hidrógeno por peroxidasa de *Z. elegans*. Los medios de reacción estaban compuestos por diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno, peroxidasa de *Z. elegans* y alcohol sinapílico (O) 200 μM, (∇) 100 μM y (□) 50 μM, en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0

La representación de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk ($1/v$ frente a $1/[\text{alcohol sinapílico}]$) nos permitió calcular los valores de V_{max} y k_M para cada una de las concentraciones de H_2O_2 ensayadas. De igual manera, las representaciones de $1/v$ frente a $1/[\text{H}_2\text{O}_2]$, calculamos los valores de V_{max} y k_M para cada una de las concentraciones de alcohol sinapílico.

En la Figura IV.32 se muestra la dependencia de los valores obtenidos de la V_{max} y la k_M de la concentración del peróxido de hidrógeno y del alcohol sinapílico. Como se puede ver en las gráficas, estas muestran una dependencia lineal lo que está de acuerdo con el modelo cinético antes propuesto.

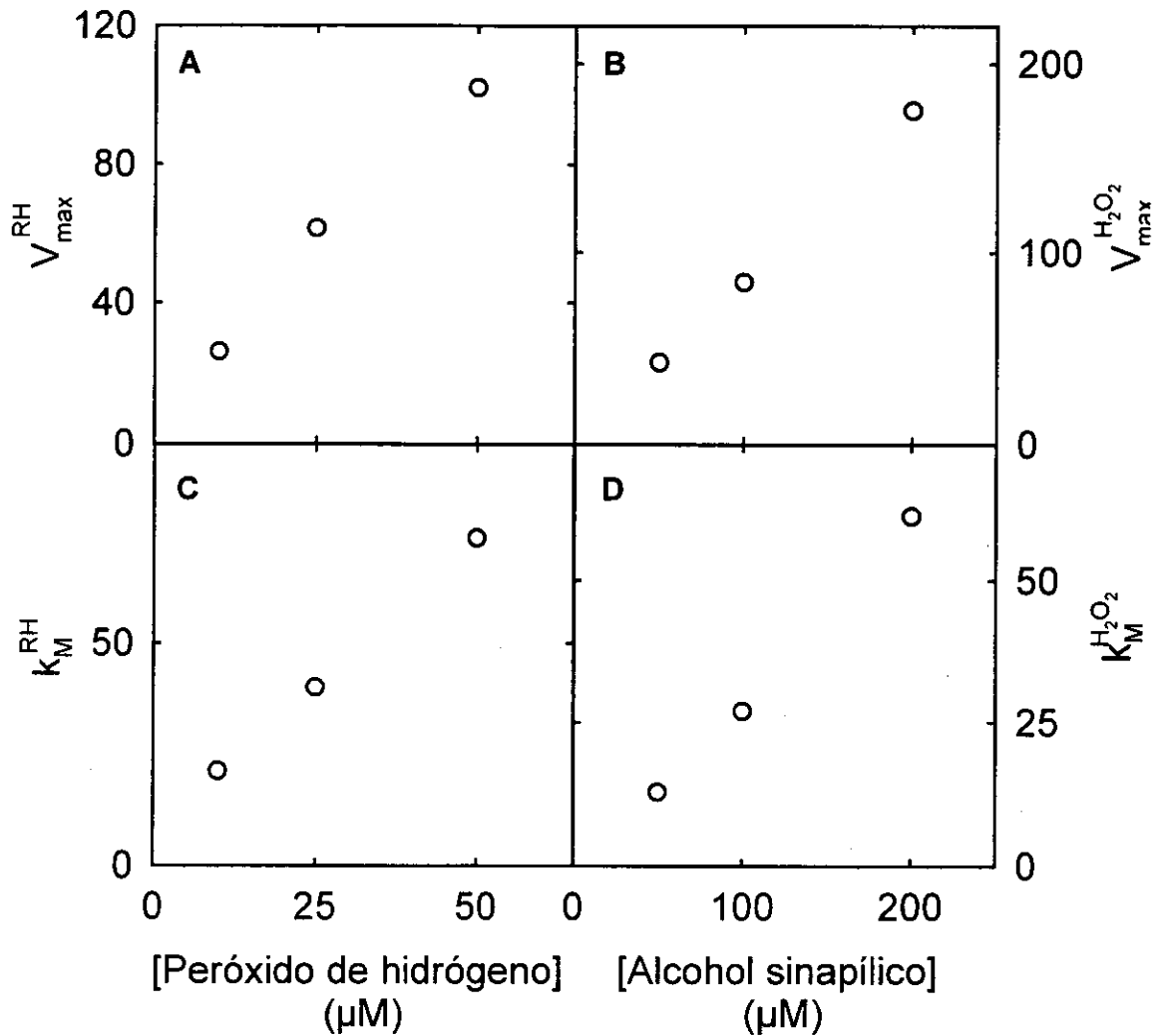


Figura IV.32.- A) Dependencia del valor de V_{\max} para el alcohol sinapílico de la concentración de peróxido de hidrógeno. B) Dependencia del valor de V_{\max} para el peróxido de hidrógeno de la concentración de alcohol sinapílico. C) Dependencia del valor de k_M para el alcohol sinapílico de la concentración de peróxido de hidrógeno. D) Dependencia del valor de k_M para el peróxido de hidrógeno de la concentración de alcohol sinapílico

Asimismo, en la Figura IV.33. se representan los valores de V_{\max} frente a los de k_M para el alcohol sinapílico (A) a distintas concentraciones de H_2O_2 y para el peróxido de hidrógeno (B) a distintas concentraciones de alcohol sinapílico. Como se puede observar, ambas relaciones son de tipo lineal, hecho que confirma el modelo ping-pong antes propuesto.

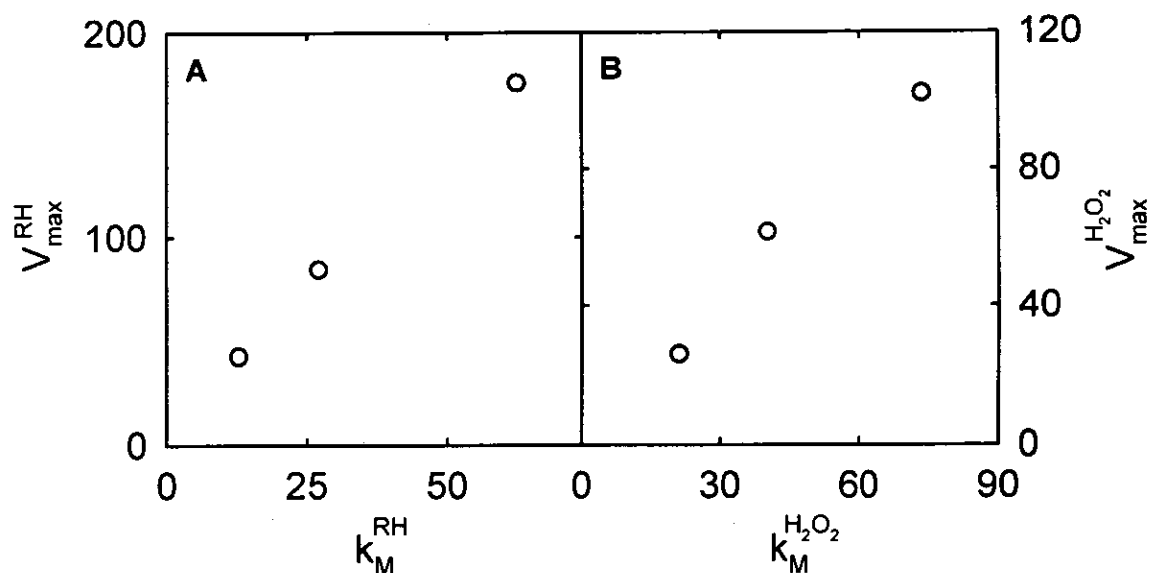


Figura IV.33.- A) Dependencia de los valores de V_{max} y K_M para el alcohol sinapílico a diferentes concentraciones de H_2O_2 . B) Dependencia de los valores de V_{max} y K_M para el peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones de alcohol sinapílico

IV.1.4.2.3.-Cinética de la oxidación del coniferilaldehído

Para el análisis de las características cinéticas de la reacción de oxidación del coniferilaldehído por la peroxidasa, se efectuaron curvas de saturación, midiendo la dependencia de la velocidad de oxidación de la concentración de H_2O_2 y de la concentración de coniferilaldehído.

Como se puede ver en la Figura IV.34 A., la oxidación del coniferilaldehído por la peroxidasa de *Z. elegans* mostró una cinética de tipo hiperbólico frente a la concentración del aldehído, que puede ser ajustada a una ecuación de Michaelis-Menten a bajas concentraciones de substrato, presentando inhibición a altas concentraciones del coniferilaldehído.

De igual forma, la velocidad de oxidación del coniferilaldehído frente a la concentración de peróxido de hidrógeno también presenta una cinética de tipo hiperbólico ajustable a una ecuación de Michaelis-Menten a bajas concentraciones de substrato, e igualmente aparece inhibición a altas concentraciones de H_2O_2 (Fig. IV.34 B).

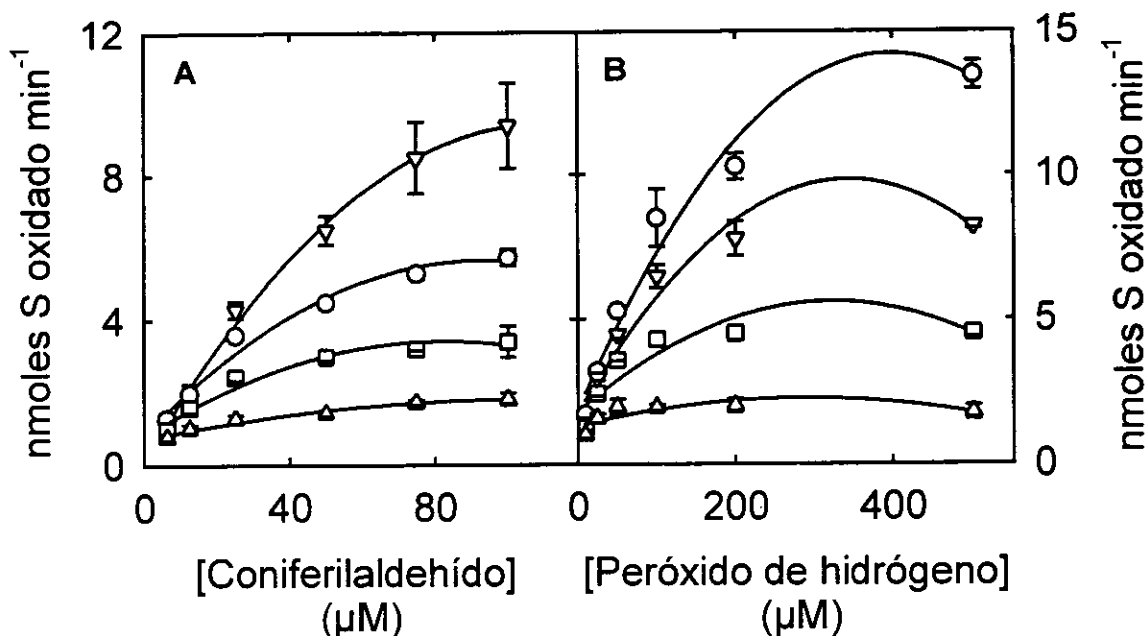


Figura IV. 34.- A) Dependencia de la velocidad de oxidación del coniferilaldehído de la concentración de sustrato por la peroxidasa de *Z. elegans*. Los medios de reacción estaban compuestos por diferentes concentraciones de coniferilaldehído, peroxidasa de *Z. elegans* y H₂O₂ (∇) 100 μM, (O) 50 μM, (□) 25 μM y (Δ) 10 μM, en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0.

B) Dependencia de la velocidad de oxidación del coniferilaldehído de la concentración de peróxido de hidrógeno por la peroxidasa de *Z. elegans*. Los medios de reacción estaban compuestos por diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno, peroxidasa de *Z. elegans* y coniferilaldehído (O) 75 μM, (∇) 50 μM, (□) 25 μM y (Δ) 12,5 μM, en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0

La representación de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk ($1/v$ frente a $1/[\text{coniferilaldehído}]$) nos permitió calcular los valores de V_{max} y k_M para cada una de las concentraciones de H₂O₂ ensayadas. De igual manera, las representaciones de $1/v$ frente a $1/[\text{H}_2\text{O}_2]$, nos permitieron calcular los valores de V_{max} y k_M para cada una de las concentraciones de coniferilaldehído.

En la figura IV.35 se muestra la dependencia de los valores obtenidos de la V_{max} y la k_M de la concentración del peróxido de hidrógeno y del coniferilaldehído. Como se puede ver en las gráficas, estas muestran una dependencia lineal lo que está de acuerdo con el modelo cinético antes propuesto.

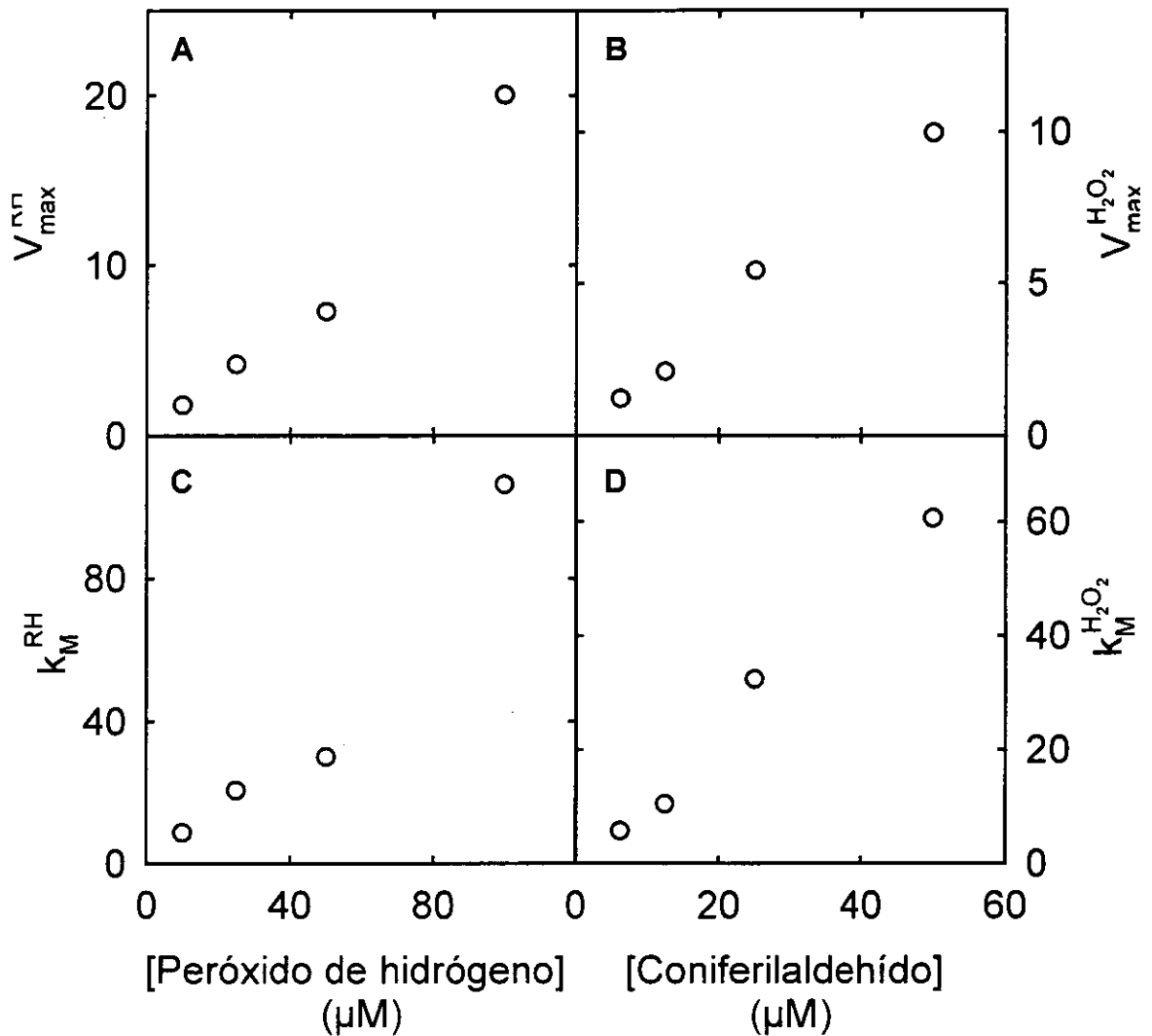


Figura IV.35.- A) Dependencia del valor de V_{max} para el coniferilaldehído de la concentración de peróxido de hidrógeno. B) Dependencia del valor de V_{max} para el peróxido de hidrógeno de la concentración de coniferilaldehído. C) Dependencia del valor de k_M para el coniferilaldehído de la concentración de peróxido de hidrógeno. D) Dependencia del valor de k_M para el peróxido de hidrógeno de la concentración de coniferilaldehído

Asimismo, en la figura III.36. se representan los valores de V_{max} frente a los de k_M para el coniferilaldehído (A) a distintas concentraciones de H_2O_2 y para el peróxido de hidrógeno (B) a distintas concentraciones de coniferilaldehído. Como se puede observar, ambas relaciones son de tipo lineal, hecho que confirma el modelo ping-pong antes propuesto.

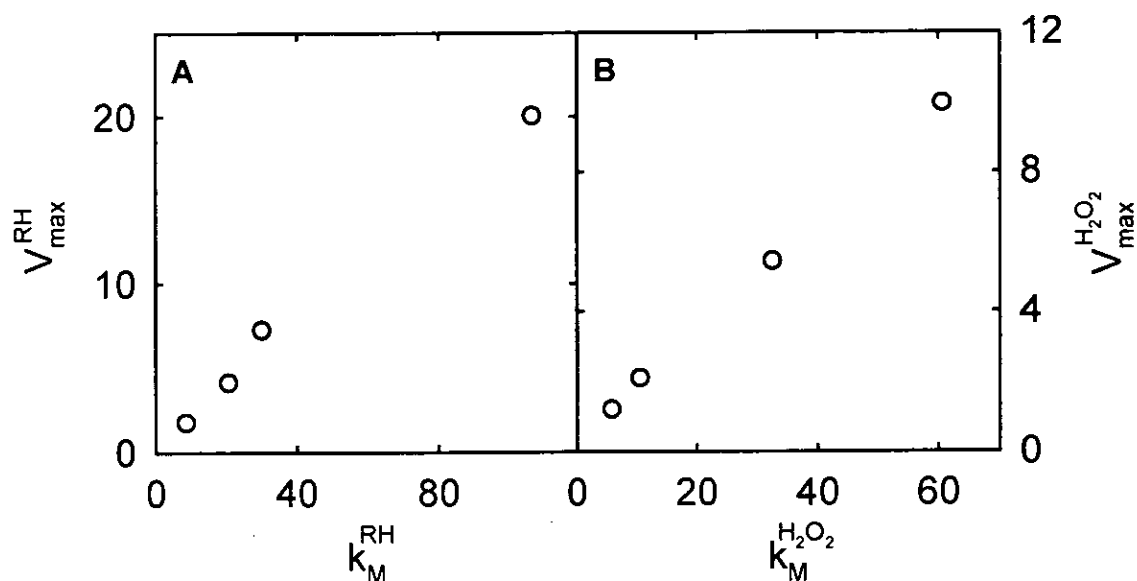


Figura IV.36.- A) Dependencia de los valores de V_{max} y K_M para el coniferilaldehído a diferentes concentraciones de H_2O_2 . B) Dependencia de los valores de V_{max} y K_M para el peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones de coniferilaldehído

IV.1.4.2.4.-Cinética de la oxidación del sinapilaldehído

Para el análisis de las características cinéticas de la reacción de oxidación del sinapilaldehído por la peroxidasa, se efectuaron curvas de saturación, midiendo la dependencia de la velocidad de oxidación de la concentración de H_2O_2 y de la concentración de sinapilaldehído.

Como se puede ver en la Figura IV.37 A., la oxidación del sinapilaldehído por la peroxidasa de *Z. elegans* mostró una cinética de tipo hiperbólico frente a la concentración del aldehído, que puede ser ajustada a una ecuación de Michaelis-Menten a bajas concentraciones de sustrato, presentando inhibición a altas concentraciones del sinapilaldehído.

De igual forma, la velocidad de oxidación del sinapilaldehído frente a la concentración de peróxido de hidrógeno también presenta una cinética de tipo hiperbólico ajustable a una ecuación de Michaelis-Menten a bajas concentraciones de sustrato, e igualmente aparece inhibición a altas concentraciones de H_2O_2 (Fig. IV.37 B).

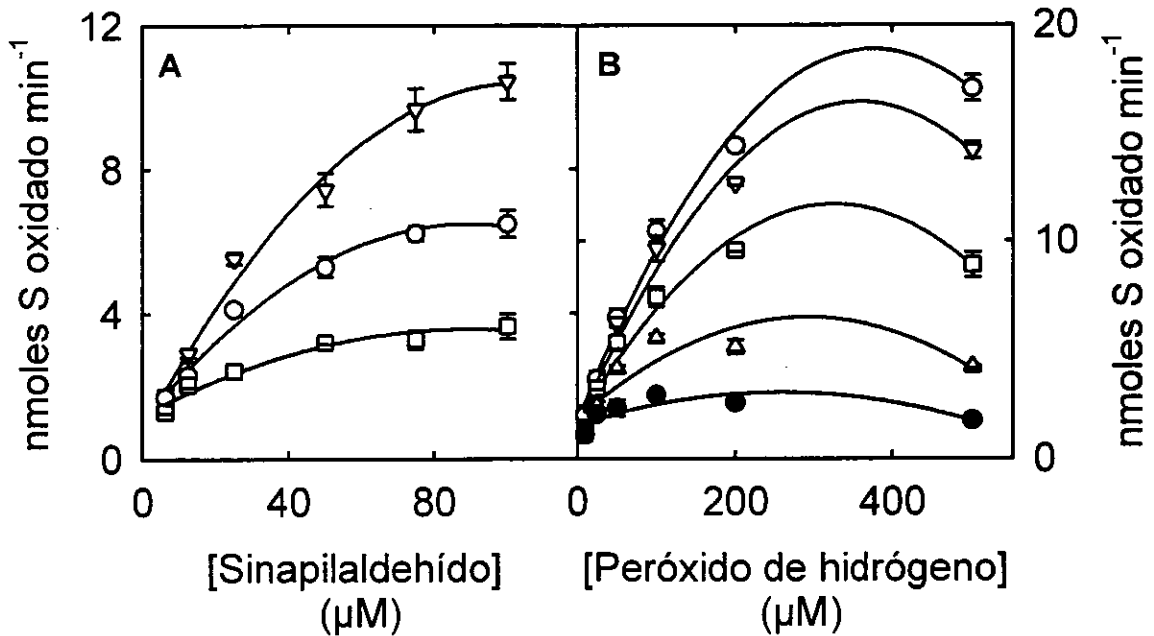


Figura IV. 37.- A) Dependencia de la velocidad de oxidación del sinapilaldehído de la concentración de sustrato por la peroxidasa de *Z. elegans*. Los medios de reacción estaban compuestos por diferentes concentraciones de sinapilaldehído, peroxidasa de *Z. elegans* y H₂O₂ (∇) 100 μM, (O) 50 μM y (□) 25 μM, en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0.

B) Dependencia de la velocidad de oxidación del sinapilaldehído de la concentración de peróxido de hidrógeno por la peroxidasa de *Z. elegans*. Los medios de reacción estaban compuestos por diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno, peroxidasa de *Z. elegans* y sinapilaldehído (O) 100 μM, (∇) 75 μM, (□) 50 μM, (Δ) 25 μM y (●) 12,5 μM en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0

La representación de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk ($1/v$ frente a $1/[\text{sinapilaldehído}]$) nos permitió calcular los valores de V_{max} y k_M para cada una de las concentraciones de H₂O₂ ensayadas. De igual manera, las representaciones de $1/v$ frente a $1/[\text{H}_2\text{O}_2]$, nos permitieron calcular los valores de V_{max} y k_M para cada una de las concentraciones de sinapilaldehído.

En la figura IV.38 se muestra la dependencia de los valores obtenidos de la V_{max} y la k_M de la concentración del peróxido de hidrógeno y del sinapilaldehído. Como se puede ver en las gráficas, estas muestran una

dependencia lineal lo que está de acuerdo con el modelo cinético antes propuesto.

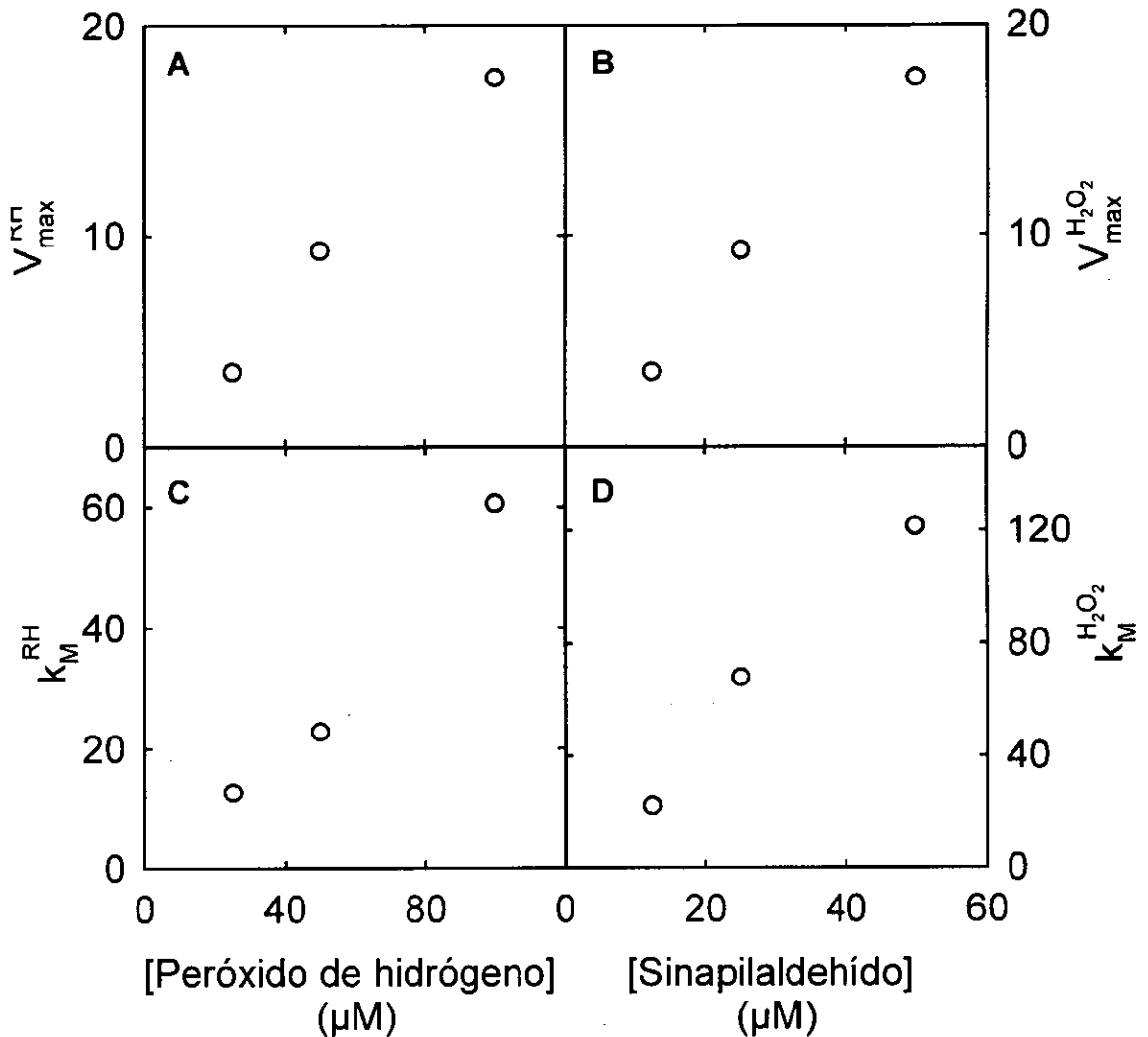


Figura IV.38.- A) Dependencia del valor de V_{max} para el sinapilaldehído de la concentración de peróxido de hidrógeno. B) Dependencia del valor de V_{max} para el peróxido de hidrógeno de la concentración de sinapilaldehído. C) Dependencia del valor de k_M para el sinapilaldehído de la concentración de peróxido de hidrógeno. D) Dependencia del valor de k_M para el peróxido de hidrógeno de la concentración de sinapilaldehído

Asimismo, en la figura IV.39. se representan los valores de V_{max} frente a los de k_M para el sinapilaldehído (A) a diferentes concentraciones de H_2O_2 y para el peróxido de hidrógeno (B) a diferentes concentraciones de sinapilaldehído. Como se puede observar, ambas relaciones son de tipo lineal, hecho que confirma el modelo ping-pong antes propuesto.

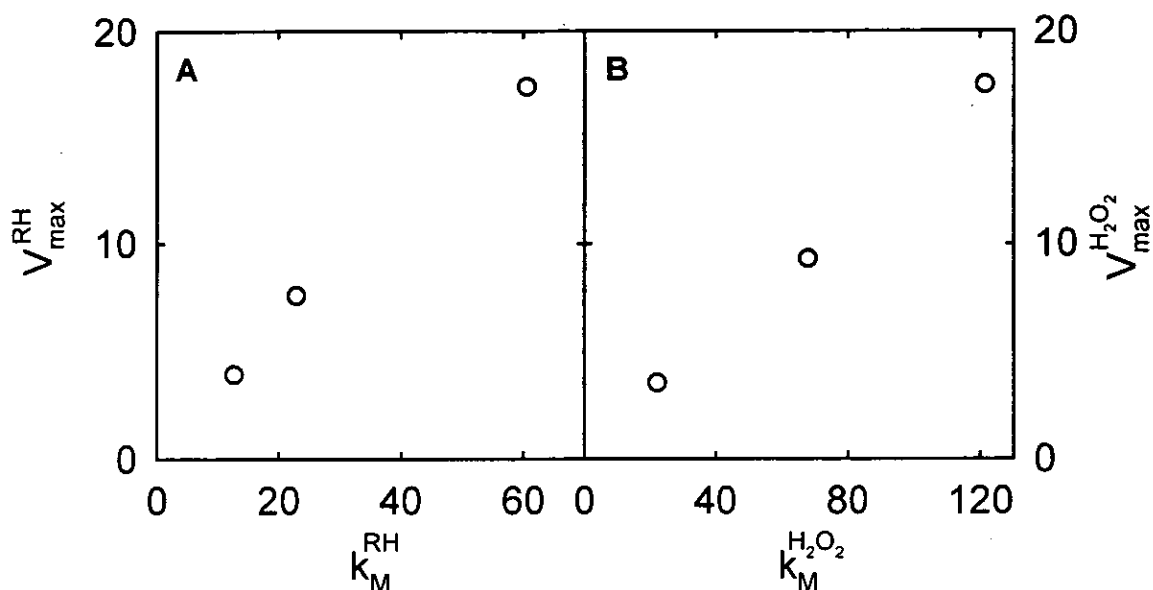


Figura IV.39.- A) Dependencia de los valores de V_{max} y k_M para el sinapilaldehído a diferentes concentraciones de H_2O_2 . B) Dependencia de los valores de V_{max} y k_M para el peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones de sinapilaldehído

IV.1.4.3.- Afinidad de la peroxidasa de *Z.elegans* por los alcoholes cinamílicos y los cinamaldehídos

IV.1.4.3.1.- Valores de k_M para la reacción peroxidativa

Los valores de k_M aparentes calculados para los alcoholes cinamílicos y los cinamaldehídos se muestran en la Tabla IV. 6. Todos estos valores de k_M se encuentran en el rango μM lo que indica una gran afinidad de la peroxidasa de *Z. elegans* por los cuatro substratos ensayados. Comparando los valores de k_M para el alcohol coniferílico con los reflejados en la bibliografía, observamos que en el caso de la peroxidasa de *Z.elegans* se obtienen valores de k_M similares a otras enzimas vegetales, como por ejemplo las peroxidasas ácidas de *Lupinus*, que muestran una k_M de $10 \mu M$ para el alcohol coniferílico a la concentración de H_2O_2 de $0,33 \text{ mM}$ (Pedreño y col., 1989), o las peroxidasas básicas de *Vitis*

con unos valores de k_M de 176 μM para el alcohol coniferílico a la concentración de H_2O_2 de 0,25 mM (Calderón y col., 1992).

Tabla IV.6.- Valores de k_M para los alcoholes cinamílicos y cinamilaldehydos durante su oxidación por la peroxidasa de *Z. elegans* a pH 5,0 a diferentes concentraciones de H_2O_2

Substrato	k_M (μM)					
	[H_2O_2] (μM)					
	5	10	25	50	100	200
Alcohol coniferílico	13,8	33,8	nd	91,0	244,6	nd
Alcohol sinapílico	nd	21,2	40,1	73,7	174,0	201,2
Coniferilaldehído	nd	8,7	20,7	30,0	106,3	319,1
Sinapilaldehído	nd	2,7	12,6	22,9	60,6	115,7

nd, no determinada

Asimismo, el valor de k_M mostrado por la peroxidasa de *Z. elegans* es muy inferior al que muestran otras enzimas propuestas como responsables de la polimerización de los alcoholes cinamílicos, como es el caso de las lacasas que presentan valores de k_M para el alcohol coniferílico y el sinapílico de 10 y 25 mM respectivamente (Bao y col., 1993).

En todo el rango de concentraciones de peróxido de hidrógeno se observa que la afinidad de la peroxidasa de *Z. elegans* por los substratos es mayor para los cinamaldehydos que para los alcoholes cinamílicos. Es destacable el hecho de que las k_M calculadas para la oxidación de los cinamaldehydos son del orden de las mostradas por las enzimas inmediatamente anteriores a la peroxidasa en el proceso de síntesis de ligninas. Así la cinamoil-coenzima A oxidorreductasa de soja, muestra unas k_M que varían entre 73 μM en el caso del feruloil-CoA, hasta 400 μM en el caso del sinapoil-CoA (Grisebach, 1981). De igual manera la cinamoil-CoA de *Forsythia suspensa* presenta un valor de k_M para el feruloil-coA de aproximadamente 5 μM (Gross y Kreiten, 1975). Valores similares de k_M muestra la enzima inmediatamente anterior a la peroxidasa, la alcohol cinamílico deshidrogenasa

(CAD). Estudios realizados con unas isoenzimas CAD de *Forsythia suspensa* (Mansell y col., 1974), arrojaron unos valores de k_M para los cinamaldehídos de 1,7-9,1 μM .

La alta afinidad que presenta la peroxidasa de *Z. elegans* por los cinamaldehídos explica el por qué en mutantes deficientes en CAD, y en consecuencia deficiente en alcoholes cinamílicos, aparecen altas concentraciones de coniferilaldehído y sinapilaldehído en sus ligninas (Higuchi y col., 1994; Hibino y col., 1995). Con la inclusión de los cinamaldehídos en la matriz de las ligninas, en el lugar de sus respectivos alcoholes, los enlaces intramoleculares de las ligninas se ven modificados y sus características químicas cambian; sin embargo el nivel total de ligninas y el consecuente desarrollo de la estructura tridimensional de la planta no se ve modificado.

Esta gran plasticidad metabólica que se manifiesta en el proceso de la síntesis de lignina, da una idea de la gran importancia evolutiva que la lignificación tuvo que representar en el reino vegetal. Las plantas han desarrollado vías alternativas para la formación de las ligninas, que puedan suplir posibles deficiencias, o anomalías, en la ruta habitual, jugando la peroxidasa un papel fundamental debido a su gran plasticidad y capacidad metabólica.

IV.1.4.3.2.- Valores de k_M para la reacción oxidasa

Una característica importante de la peroxidasa de *Z. elegans* es su actividad oxidasa frente a los alcoholes cinamílicos y los cinamaldehídos, como hemos visto en la Tabla IV.5.

Esta actividad probablemente es debida, como ocurre con otros fenoles, a una actividad pseudo-oxidasa que se inicia gracias al peróxido de hidrógeno generado durante una fase lenta de autooxidación de los alcoholes cinamílicos y los cinamaldehídos (Fig. IV. 40.)

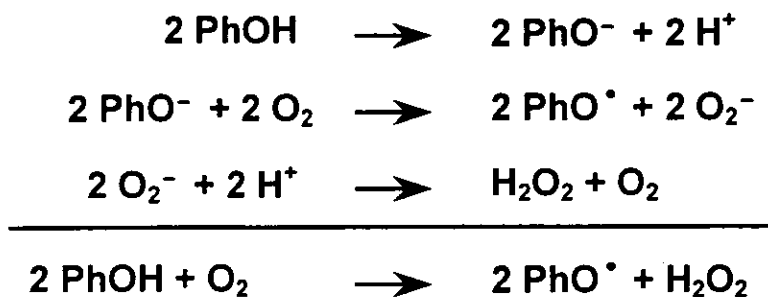


Figura IV. 40.- Modelo para la autooxidación de fenoles con la consiguiente generación de peróxido de hidrógeno

Por este motivo, también se calcularon los valores de k_M para esta actividad oxidasa de la peroxidasa de *Z. elegans* frente a los alcoholes cinamílicos y los cinamaldehídos, y los datos se muestran en la tabla IV.7. En este caso el cálculo se ha realizado teniendo en cuenta la dependencia de los valores de k_M de los alcoholes cinamílicos, y de los cinamaldehídos, de la concentración de H_2O_2 y realizando una extrapolación a concentración cero de H_2O_2 .

Como se puede ver en la tabla IV.7., los valores de k_M de la reacción pseudo-oxidasa son del orden de micromolar, mostrando también una mayor afinidad por los aldehídos frente a los alcoholes.

Tabla IV.7.- Valores de k_M para los alcoholes cinamílicos y los cinamilaldehídos durante su oxidación por peroxidasa de *Z. elegans* a pH 5.0 en ausencia de H_2O_2

Substrato	k_M (μM)
Alcohol coniferílico	7,9
Alcohol sinapílico	7,6
Coniferilaldehído	5,1
Sinapilaldehído	nd
nd, no determinada	

IV.1.4.4.- Reactividad de la peroxidasa de *Z. elegans* frente a los alcoholes cinamílicos y los cinamaldehídos

En la Tabla IV.8 se muestran los valores de la relación V_{\max}/k_M para cada uno de los sustratos. Esta relación nos da una medida de la reactividad de la enzima frente a los distintos sustratos, y mantiene una relación directa con el valor de la k_3 , como ya se había mostrado en el desarrollo del modelo cinético, ya que $V_{\max}/k_M=2[E]k_3$. La constante microscópica k_3 es una medida directa de la reactividad del compuesto II con el sustrato fenólico.

Como se puede ver en dicha tabla, la peroxidasa de *Z. elegans* presenta, en presencia de peróxido de hidrógeno, una mayor reactividad frente a los grupos siringilo que frente a los guayacilo. Dándose también esta relación en el caso de las reacciones en ausencia de peróxido de hidrógeno. Además a la vista de los resultados obtenidos se observa que la reactividad es mayor hacia los alcoholes que hacia los aldehídos en reacciones, tanto en presencia de peróxido de hidrógeno como en su ausencia.

Tabla IV.8.- Valores de la relación V_{\max}/k_M para los alcoholes cinamílicos y los cinamaldehídos, en presencia y en ausencia de H_2O_2 . Los valores en presencia de H_2O_2 son la media de los distintos valores a distintas concentraciones de H_2O_2

Substrato	$V_{\max}/k_M (\propto k_3) \pm SE$	
	+ H_2O_2	- H_2O_2
Alcohol coniferílico	0,25 \pm 0,03	0,16
Alcohol sinapílico	1,55 \pm 0,29	1,31
Coniferilaldehído	0,19 \pm 0,03	0,11
Sinapilaldehído	0,32 \pm 0,11	nd

nd, no determinado

IV.1.5.- Estudio histoquímico de la actividad oxidasa/peroxidasa presente en el hipocotilo de *Z. elegans*

Las ligninas presentan una gran importancia evolutiva ya que su adquisición permitió la colonización del medio terrestre por parte de las plantas (Lewis y Davin, 1999a). Se han propuesto un gran número de enzimas como responsables de la oxidación de los alcoholes cinamílicos a ligninas. Entre estas enzimas se encuentran las polifenoloxidasas de tipo lacasa y catecolasa, así como a las peroxidadas. (Bao y col., 1993; Driouich y col., 1992; O'Malley y col., 1993; Ranocha y col., 1999; Ros Barceló y col., 1998; Udagama-Randeniya y Savidge, 1995).

Tanto las peroxidadas como las lacasas o las catecolasas, son enzimas capaces de oxidar los alcoholes cinamílicos, para dar productos similares a las ligninas con mayor o menor grado de polimerización (Lewis y Davin, 1999a; Sterjiades y col., 1993; Wallace y Fry, 1999). Sin embargo, no existen para todas ellas una evidencia clara que demuestre la localización de éstas en los lugares de lignificación activa. El uso de técnicas inmunohistoquímicas ha demostrado la presencia de estas enzimas en los centros de la pared celular de lignificación activa, pero estas técnicas tienen el problema de no revelar si la enzima se encuentra activa "*in situ*". Otras estrategias histoquímicas presentan el problema de ser incapaces de distinguir entre las polifenoloxidasas y la peroxidasa, ya que usan como criterio la sensibilidad a la catalasa de las tinciones, sin tener en cuenta que las peroxidadas muestran una actividad pseudo-oxidasa, insensible a la catalasa. Es por ello, que en los últimos años se ha hecho necesario el uso de inhibidores selectivos o, en su defecto, de sustratos selectivos, para poder distinguir entre estas enzimas con capacidad fenol-oxidasa (Kahn, 1985; Ros Barceló, 1995).

Una vez que se ha determinado la presencia de alcoholes cinamílicos y cinamaldehídos en las paredes de *Z. elegans*, se ha estudiado la capacidad de las paredes aisladas de *Z. elegans* para oxidar los cuatro sustratos, y se han caracterizado las cinéticas de estas oxidaciones, abordamos el estudio de la

localización de la actividad peroxidasa en los tejidos de *Z. elegans*. Para ello, se han utilizado pruebas histoquímicas que nos han permitido determinar la naturaleza de la enzima responsable de la lignificación, basadas en el uso de inhibidores específicos, que discriminan entre las lacasas, las catecolasas y las peroxidasas.

IV.1.5.1.- Oxidación de la siringaldazina por las paredes del xilema de *Z. elegans*

El hecho de que la peroxidasa de *Z. elegans* sea capaz de oxidar grupos guayacilo, no es un indicio directo de su participación en los procesos de lignificación, ya que este tipo de estructuras está presente en otros compuestos abundantes en plantas como en los ésteres del ácido ferúlico unidos a la pared celular, o en otros compuestos fenólicos no relacionados con las ligninas. Sin embargo, la capacidad que manifiesta la peroxidasa de *Z. elegans* para oxidar los grupos siringilo, incluso con igual o mayor efectividad que los grupos guayacilo, nos permite suponer que esta peroxidasa está estrechamente ligada a los procesos de lignificación, ya que los grupos siringilo, con la excepción de ciertos lignanos (Lewis y Davin, 1999b), solo están presentes en las ligninas.

Por este motivo hemos escogido como sustrato para los estudios histoquímicos a la siringaldazina. La siringaldazina es un sustrato artificial que posee un grupo siringilo y que ha sido usado anteriormente en estudios histoquímicos (Harkin y Obst, 1973).

En la Figura IV.41. podemos observar distintas secciones de hipocotilo de *Z. elegans*. Por medio del test de Wiesner, basado en la reacción de los cinamaldehídos con el reactivo de floroglucinol, se revela la presencia de ligninas localizada a nivel de los vasos del xilema y de los elementos del floema (Figura IV.41.A). La figura B, teñida con reactivo de IK/almidón pone de manifiesto la producción de H_2O_2 por parte del xilema de *Z. elegans*. Esta capacidad del xilema lignificante para producir H_2O_2 se ha demostrado también en otros miembros de la familia Asteraceae (Ros Barceló, 1998). De acuerdo

con Schopfer (1994) el límite de detección del reactivo IK/almidón es del orden de 0,25 mM, por lo que podemos concluir que el xilema de *Z. elegans* es capaz de mantener una concentración de H_2O_2 de al menos 0,25 mM.

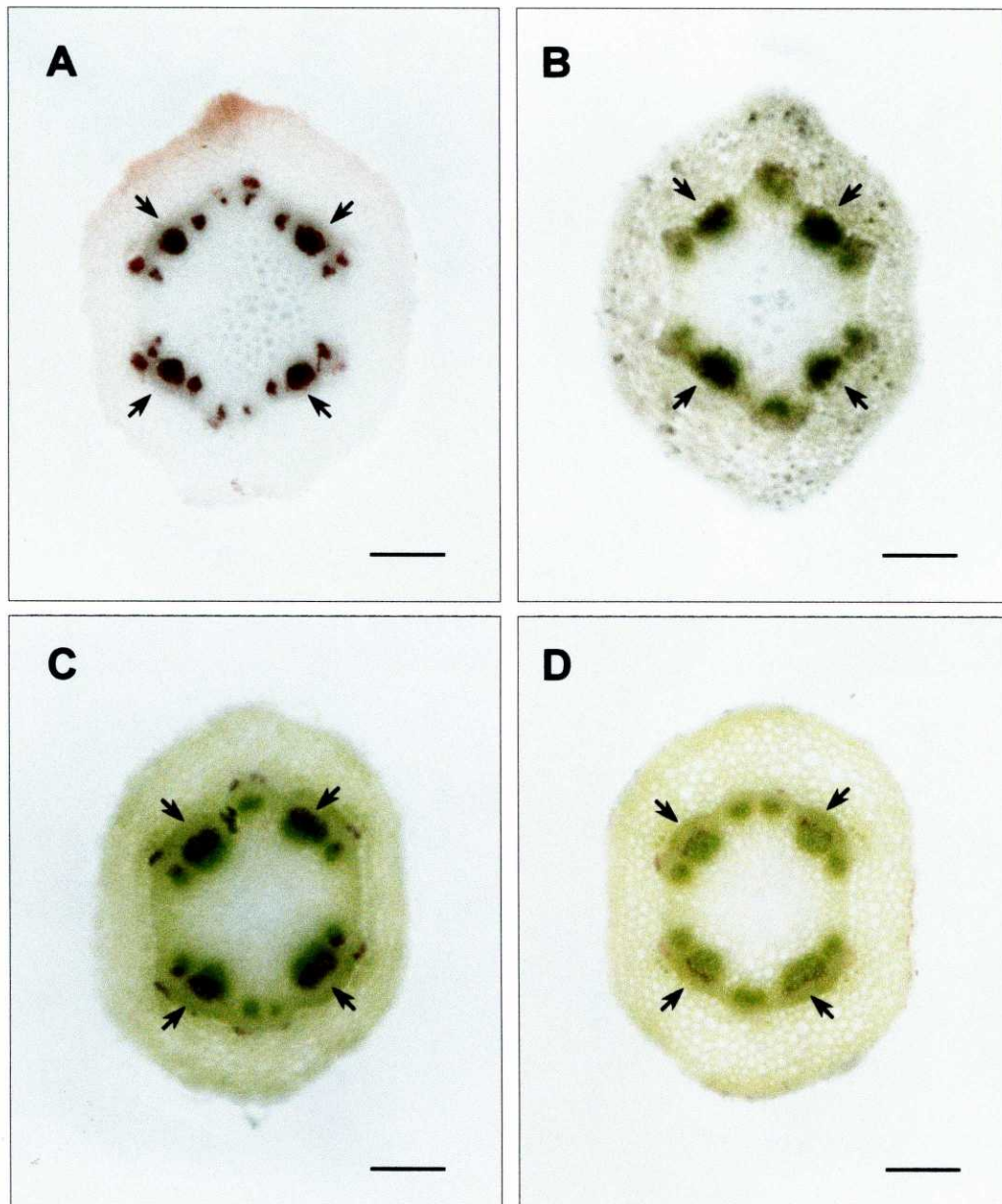


Figura IV.41.- A) Localización histoquímica de ligninas en el hipocotilo de *Z. elegans* usando el reactivo floroglucinol en medio ácido. B) Localización histoquímica de H_2O_2 usando el reactivo de IK/almidón. C) Localización histoquímica de la actividad siringaldazina oxidasa. D) Efecto de la catalasa (200 U ml^{-1}) sobre la actividad siringaldazina oxidasa. Barra= $300\text{ }\mu\text{m}$.

En la figura IV.41.C, observamos la localización de la actividad siringaldazina-oxidasa, que muestra una localización similar a las ligninas y al el H_2O_2 . Esta actividad siringaldazina-oxidasa no es suprimida al incubar los tejidos con catalasa (Fig. IV.41 D), lo que sugiere que las actividades peroxidasa y oxidasa comparten una misma localización en el tejido.

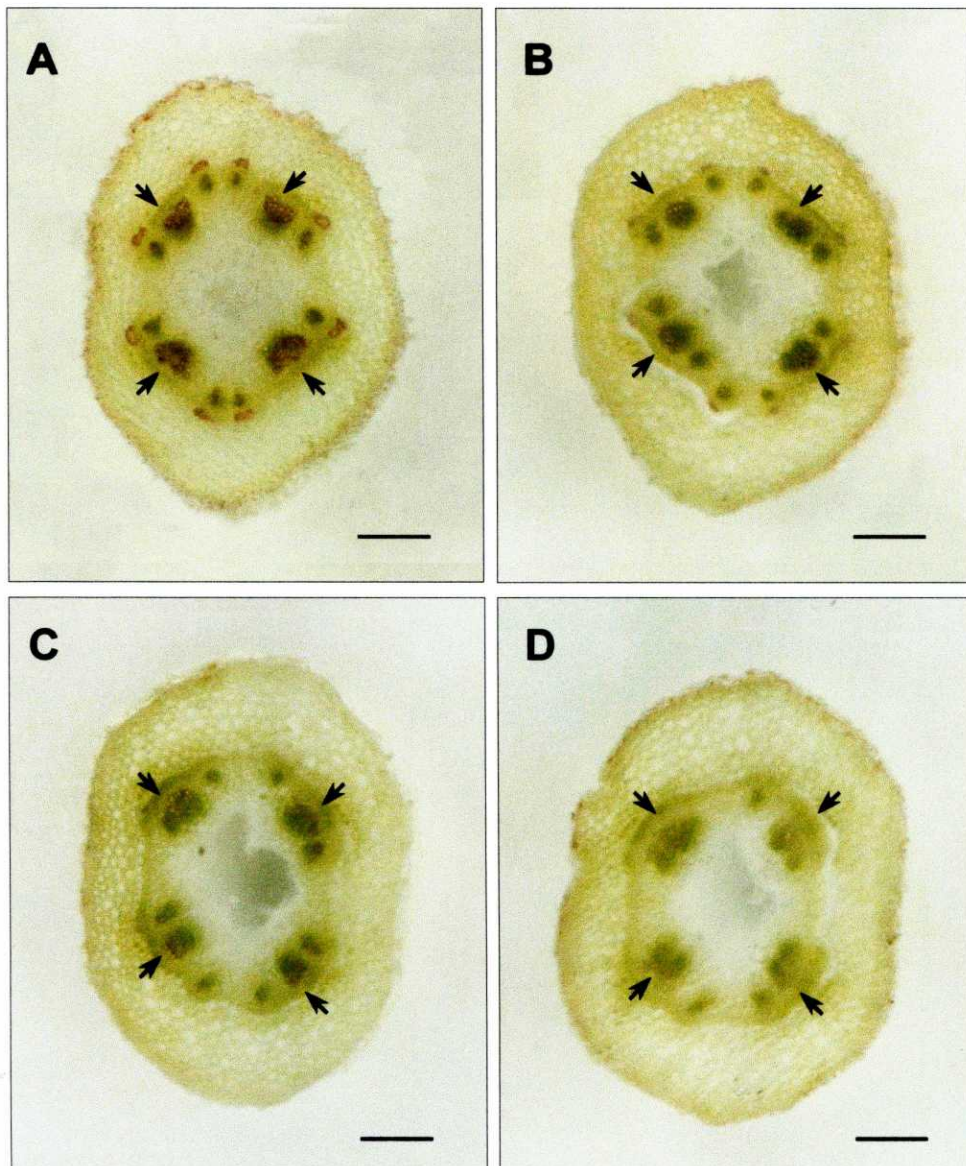


Figura IV.42.- A) Localización histoquímica de la actividad siringaldazina-oxidasa. B) Efecto de la catalasa (200 U ml^{-1}) sobre la actividad siringaldazina-oxidasa. C) Efecto de la tropolona y la catalasa sobre la actividad siringaldazina-oxidasa. D) Efecto del ácido ferúlico y la catalasa sobre la actividad siringaldazina-oxidasa. Barra= $300\text{ }\mu\text{m}$.

En la Figura IV.42 A se presenta de nuevo una sección teñida con siringaldazina en presencia de 200 U/ml de catalasa (Fig IV.42 B). Esta actividad oxidasa subyacente es insensible a la catalasa y no se ve afectada por la tropolona, un inhibidor conocido de la actividad catecolasa de la polifenoloxidasas (Fig. IV.42 C), pero sí es inhibible por el ácido ferúlico, un compuesto inhibidor tanto de la actividad catecolasa como de la peroxidasa (Fig.IV.42. D).

A la vista de este último resultado, nos dispusimos a estudiar cual es la naturaleza de la responsable de la actividad siringaldazina-peroxidasa/oxidasa en el xilema de *Z. elegans*, a través del uso de distintos inhibidores.

En la Figura IV.43 se muestra en detalle el xilema de *Z. elegans* teñido para la actividad siringaldazina-peroxidasa/oxidasa. La tinción da lugar a un producto de color rojo-rosado, que se acumula a nivel del xilema lignificante. El patrón de tinción muestra que la oxidación de la siringaldazina tiene lugar, exclusivamente, a nivel del xilema lignificante, situado sobre las tres o cuatro filas de células externas, y a su vez más próximas al cambium vascular, no habiendo reacción en otros tejidos como el xilema viejo ya lignificado.

La localización de la actividad siringaldazina-peroxidasa/oxidasa en estas filas de células está de acuerdo con lo observado en la Figura IV.2. En aquella figura se mostraba la localización de ligninas con floroglucinol, observándose una menor tinción a nivel de esta filas de células próximas al cambium vascular, lo que nos indicaba una menor concentración de ligninas. Estos dos hechos, parecen indicar que es en estas células jóvenes, próximas al cambium, donde el proceso de lignificación es activo. En este contexto la actividad enzimática que revelamos con la tinción con siringaldazina está aparentemente implicada en la formación de las ligninas.

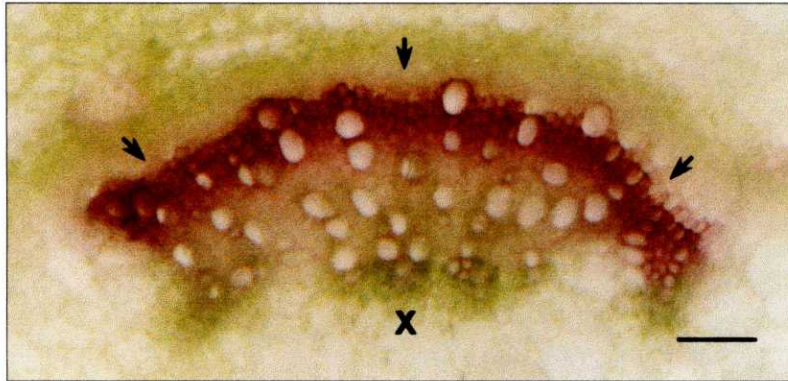


Figura IV.43.- Localización histoquímica de la actividad siringaldazina-peroxidasa/oxidasa en los tejidos vasculares de *Z. elegans*. X: xilema, las flechas indican la zona más próxima al cambium vascular, donde la tinción es más intensa. Barra= 100 μ m

IV.1.5.2.- Efecto del ácido ferúlico sobre la oxidación de la siringaldazina por el xilema lignificante de *Z. elegans*

El estudio del efecto de los distintos inhibidores sobre la actividad siringaldazina-peroxidasa/oxidasa se ha realizado a dos niveles. Por una parte se ha estudiado la influencia de estos inhibidores sobre la oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa de *Z. elegans*. Por otro lado, se ha estudiado el efecto de los distintos inhibidores a nivel histoquímico sobre la actividad siringaldazina peroxidasa.

En la Figura IV.44 se muestra el efecto del ácido ferúlico sobre la velocidad de oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa de *Z. elegans*. Como se puede observar, a concentraciones bajas de ácido ferúlico como 0,1 μ M o 1,0 μ M, se produce una pequeña activación de la actividad, pero a concentraciones de 10 μ M la inhibición comienza a ser apreciable, para hacerse total a concentraciones de 100 μ M de ácido ferúlico o superiores.

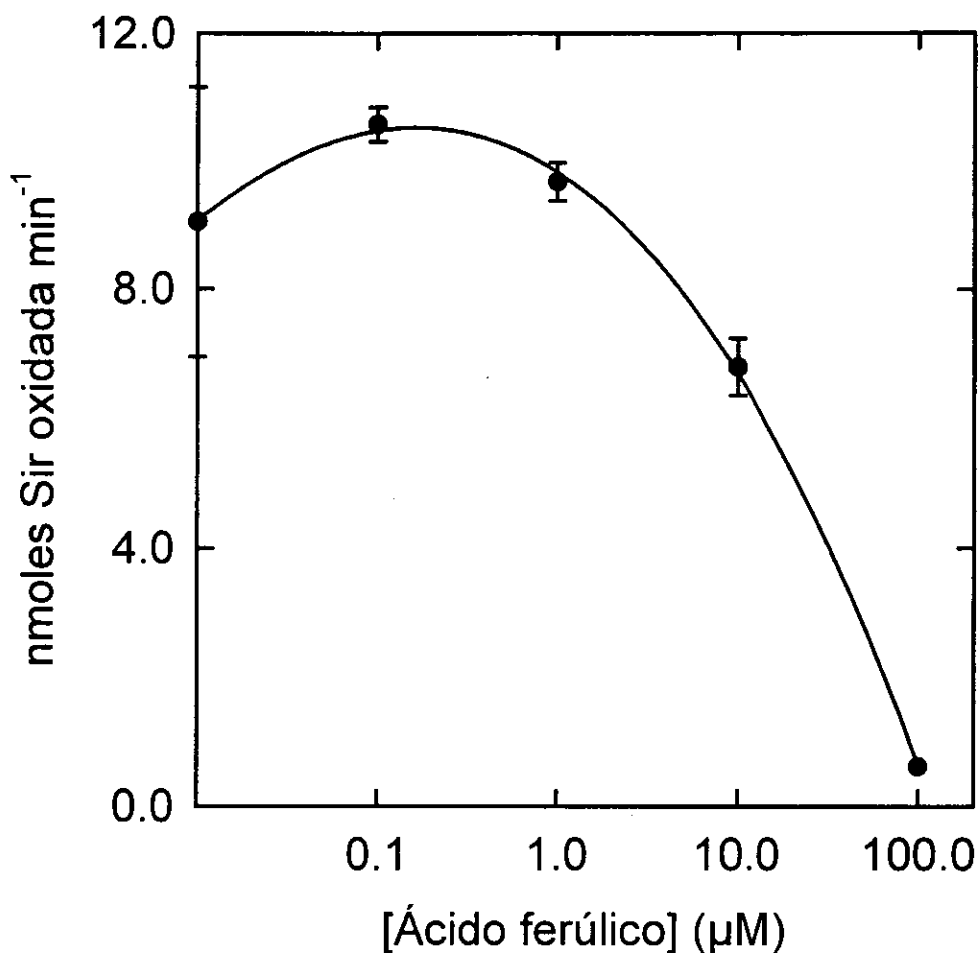


Figura IV.44.- Efecto del ácido ferúlico sobre la velocidad de oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa de *Z. elegans*. El medio de reacción estaba compuesto por H₂O₂ 0,5 mM, siringaldazina 50 µM, peroxidasa de *Z. elegans* y distintas concentraciones de ácido ferúlico, en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. El inhibidor se añadió, 1 minuto antes de iniciar la reacción con la adición de la siringaldazina

Por otra parte, se ensayó el efecto a nivel histoquímico del ácido ferúlico sobre la oxidación de la siringaldazina por el xilema lignificante de *Z. elegans*. Para ello se utilizó una concentración de ácido ferúlico de 1mM, concentración suficiente para provocar una inhibición del 100% en los ensayos espectrofotométricos.

Como se puede ver en la Figura IV.45 B, el ácido ferúlico, a la concentración de 1mM, inhibe completamente la oxidación de la siringaldazina por el xilema lignificante de *Z. elegans* (Fig IV.45 A).

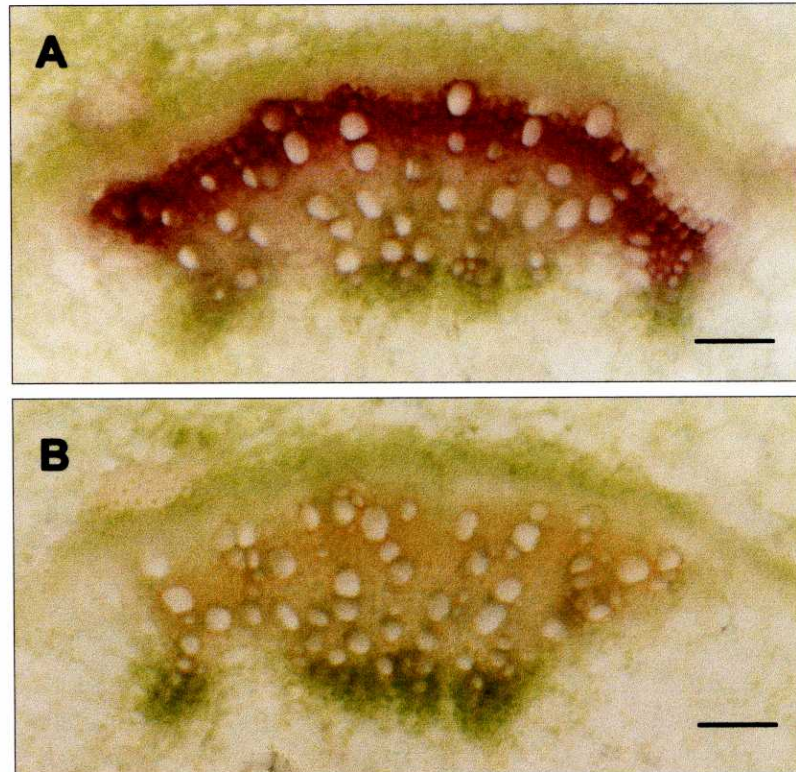


Figura IV.45.- Efecto del ácido ferúlico sobre la actividad siringaldazina-peroxidasa/oxidasa del xilema de *Z. elegans*. A) Sección control teñida con siringaldazina. B) Sección teñida con siringaldazina en presencia de ácido ferúlico 1mM. Barra= 100 μ m

El ácido ferúlico reacciona con el compuesto II de la peroxidasa, a una velocidad que llega a ser 10 veces mayor que la mostrada por otros muchos fenoles, tratándose de uno de los mejores substratos de la peroxidasa. Asimismo, presenta una gran capacidad de acomodarse en el centro activo de la enzima, pudiendo dar lugar hasta tres modelos distintos de interacción con la enzima (Fig. IV. 46) (Henriksen y col, 1999).

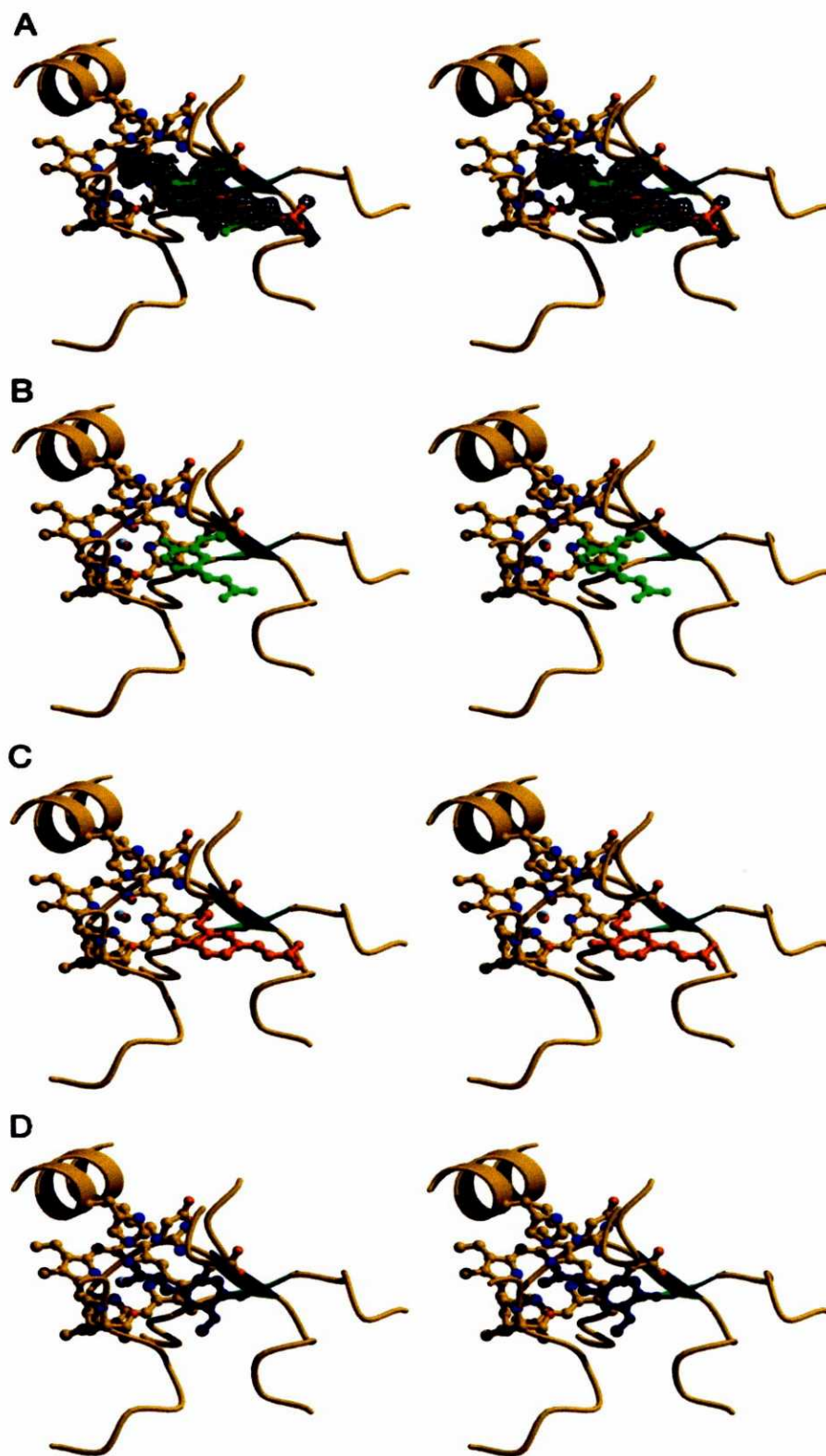


Figura IV.46.- A) Modelos del complejo peroxidasa-ácido ferúlico, mostrando los tres posibles modos de unión. B) Modo de unión FA1. C) Modo de unión FA2. D) Modo de unión FA3. (Imágenes estereoscópicas tomadas de Henriksen, y col., 1999)

Estas características hacen del ácido ferúlico uno de los mejores inhibidores competitivos de la peroxidasa. Por otra parte, el ácido ferúlico a la concentración de 1mM no tiene efecto sobre las polifenoloxidasas de tipo lacasa (Sterjiades y col., 1992; Chabanet y col., 1994; Ranocha y col., 1999). Estos resultados descartan a la actividad lacasa como la enzima responsable de la actividad siringaldazina-oxidasa presente en el xilema lignificante de *Z. elegans*.

Sin embargo, el ácido ferúlico es un importante inhibidor de la actividad enzimática de las polifenoloxidasas de tipo catecolasa (Udagama-Randeniya y Savidge, 1995; Richardson y col., 1997). Por este motivo, el uso del ácido ferúlico no nos permite discernir entre la peroxidasa y las catecolasas, lo que hace necesario el uso de otro inhibidor para distinguir entre estos dos tipos de enzimas.

IV.1.5.3.- Efecto de la tropolona sobre la oxidación de la siringaldazina por el xilema lignificante de *Z. elegans*

Con el fin de poder discriminar entre las polifenoloxidasas de tipo catecolasas y las peroxidasas, utilizamos la tropolona. La tropolona es un inhibidor selectivo de las actividades de tipo catecol-oxidasa (Chabanet, y col., 1994; Udagama-Randeniya, y Savidge, 1995), que no tiene efecto conocido sobre las peroxidasas.

El efecto de la tropolona sobre la oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa de *Z. elegans* se muestra en la tabla IV.9. La tropolona no provoca ningún tipo de inhibición a la concentración de 1 mM, apareciendo incluso un ligero efecto activador.

Tabla IV.9.- Efecto de la tropolona sobre la oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa de *Z. elegans*.

Inhibidor	Actividad peroxidasa (nmoles S oxidado min ⁻¹)
Control	9,05 ± 1,96 (15)
Tropolona (1mM)	10,04 ± 0,56 (6)

El medio de reacción estaba compuesto por H₂O₂ 0,5 mM, siringaldazina 50 µM, en tampón tris acetato 50 mM pH 5,0. El inhibidor se añadió, 1 minuto antes de iniciar la reacción con la adición de la siringaldazina. Los valores son la media ± SE (n).

Paralelamente se estudió el efecto de la tropolona a nivel histoquímico, sobre la actividad siringaldazina oxidasa (Fig IV.47.).

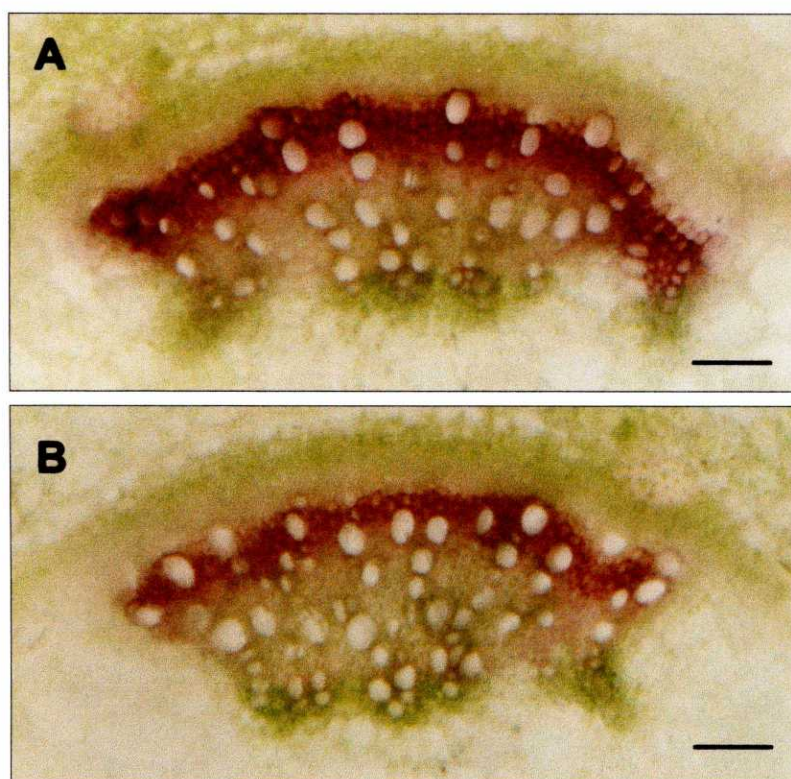


Figura IV.47.- Efecto de la tropolona sobre la actividad siringaldazina-peroxidasa/oxidasa del xilema de *Z. elegans*. A) Sección control teñida con siringaldazina. B) Sección teñida con siringaldazina en presencia de tropolona 1mM. Barra= 100 µm

Como se puede observar en la figura IV.47. la tropolona no tuvo efecto sobre la oxidación de la siringaldazina por el xilema lignificante de *Z. elegans*, tiñéndose las 3-4 primeras filas de células, más próximas al cambium vascular igual que el control.

El hecho de que la actividad siringaldazina-peroxidasa/oxidasa no se vea afectada por la tropolona descarta a las polifenoloxidasas de tipo catecolasa como las responsables de esta actividad y apoya el posible papel de las peroxidases como responsables de esta tinción.

IV.1.5.4.- Efecto del ferrocianuro potásico y del ferricianuro potásico sobre la oxidación de la siringaldazina por el xilema lignificante de *Z. elegans*

Con el fin de confirmar la naturaleza peroxidasa de la enzima responsable de la oxidación de la siringaldazina por el xilema lignificante de *Z. elegans*, se utilizó el ferrocianuro potásico ($K_4Fe(CN)_6$), como un inhibidor competitivo de la enzima.

El ferrocianuro potásico es un buen sustrato de la peroxidasa, sobre todo del compuesto I (Henriksen y col., 1999). Estudios realizados por Yamazaki y Yokota (1973) han demostrado que, dependiendo del pH, el ferrocianuro muestra una reactividad entre 40 y 45 veces mayor con el compuesto I que con el compuesto II de la peroxidasa. Esta diferencia alcanza valores de 10^6 veces mayor cuando se compara su reactividad con el compuesto I frente a otras formas de la enzima, como es el compuesto III (Tamura y Yamazaki, 1972). El hecho de que el ferrocianuro sea buen sustrato de la enzima, y que dé como producto ferricianuro, lo convierte en un buen candidato para ser usado como inhibidor competitivo en pruebas histoquímicas.

En la Figura IV.48 A, se muestra el efecto del ferrocianuro potásico sobre la velocidad de oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa de *Z. elegans*. Como se puede ver en la gráfica, el ferrocianuro potásico a bajas

concentraciones ($10 \mu\text{M}$) no produce efecto sobre la velocidad de oxidación, mientras que a concentraciones más altas, se produce una clara inhibición. Para concentraciones de ferrocianuro de $1,0 \text{ mM}$ o superiores, la inhibición es prácticamente total.

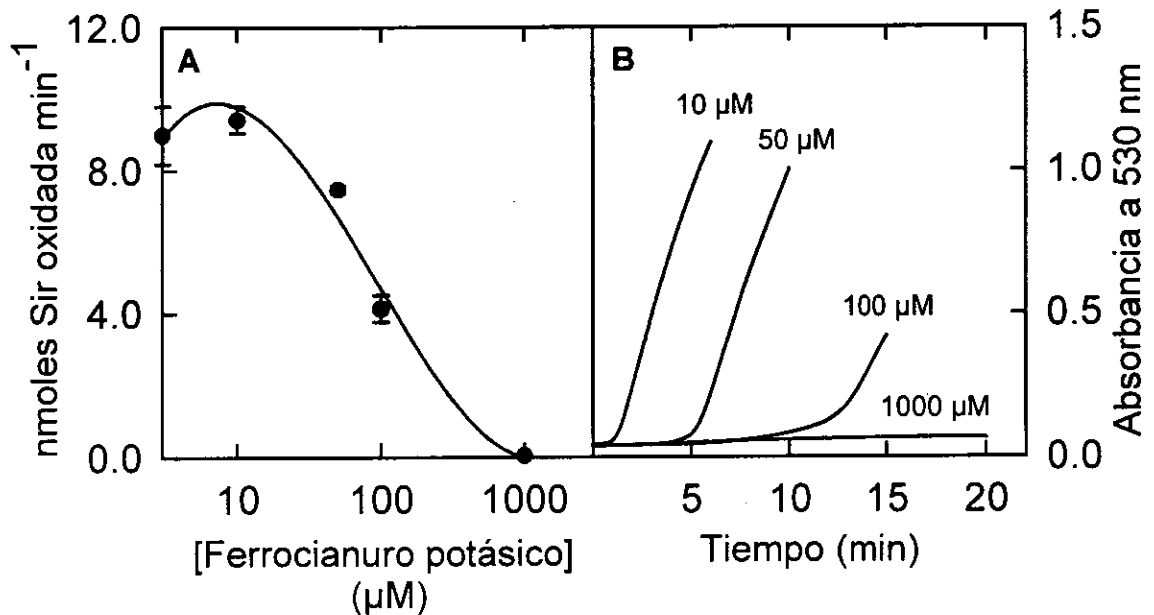


Figura IV.48.- A) Efecto del ferrocianuro potásico sobre la velocidad de oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa de *Z. elegans*. B) Cursos temporales de la oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa de *Z. elegans* en presencia de distintas concentraciones de ferrocianuro potásico. El medio de reacción estaba compuesto por H_2O_2 $0,5 \text{ mM}$, siringaldazina $50 \mu\text{M}$, peroxidasas de *Z. elegans* y distintas concentraciones de ferrocianuro potásico, en tampón Tris acetato 50 mM pH $5,0$. El inhibidor se añadió, 1 minuto antes de iniciar la reacción con la adición de la siringaldazina.

La inhibición producida por el ferrocianuro potásico sobre la enzima es dependiente de su concentración (Fig. IV.48.), provocando un retraso en el curso temporal de la oxidación de la siringaldazina (Fig. IV.48 B). La duración de este retraso crece al aumentar la concentración de ferrocianuro en el medio. Este hecho está de acuerdo con la asunción de que la peroxidasa usa el ferrocianuro como substrato alternativo, oxidándolo en lugar de la siringaldazina. Para concentraciones de ferrocianuro en el medio mayores a la

del peróxido de hidrógeno (0,5 mM), la inhibición de la oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa es total, debido a que todo el peróxido es consumido durante la oxidación del ferrocianuro.

Una de las ventajas del uso del ferrocianuro potásico como inhibidor de la peroxidasa es la posibilidad de contar con un análogo, el ferricianuro potásico ($K_3Fe[CN]_6$), que no es sustrato de la enzima. El uso de este análogo permite determinar si el efecto observado al usar el ferrocianuro potásico es debido a su naturaleza como sustrato de la peroxidasa, o bien debido a efectos colaterales provocados por los complejos de tipo cianuro-hierro sobre las metaloproteínas.

En la tabla IV.10. se muestra el efecto del ferrocianuro potásico y del ferricianuro potásico sobre la oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa de *Z. elegans*.

Tabla IV.10.- Efecto del ferrocianuro potásico ($K_4Fe[CN]_6$) y del ferricianuro potásico ($K_3Fe[CN]_6$) sobre la oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa de *Z. elegans*.

Inhibidor	Actividad peroxidasa (nmoles S oxidado min^{-1})
Control	8,99 ± 0,69 (7)
$K_4Fe[CN]_6$ (1,0 mM)	0,04 ± 0,02 (3)
$K_3Fe[CN]_6$ (1,0 mM)	8,76 ± 0,32 (3)

El medio de reacción estaba compuesto por H_2O_2 0,5 mM, siringaldazina 50 μ M, en tampón tris acetato 50 mM pH 5,0. Los inhibidores se añadieron al medio 1 minuto antes de iniciar la reacción con la adición de la siringaldazina. Los valores son la media ± SE (n).

Como se puede observar en dicha tabla el ferrocianuro potásico a concentraciones de 1,0 mM provoca una inhibición prácticamente total de la actividad enzimática, mientras que el ferricianuro potásico no tiene efecto. Este resultado, junto con los mostrados en la Figura IV.48. nos permite concluir que el efecto del ferrocianuro sobre la oxidación de siringaldazina es debido a una

inhibición de tipo competitiva, actuando el ferrocianuro como sustrato preferente ante la siringaldazina.

A nivel histoquímico, el uso del ferrocianuro potásico provoca una clara inhibición de la actividad siringaldazina oxidasa del xilema lignificante (Fig. IV. 49 B).

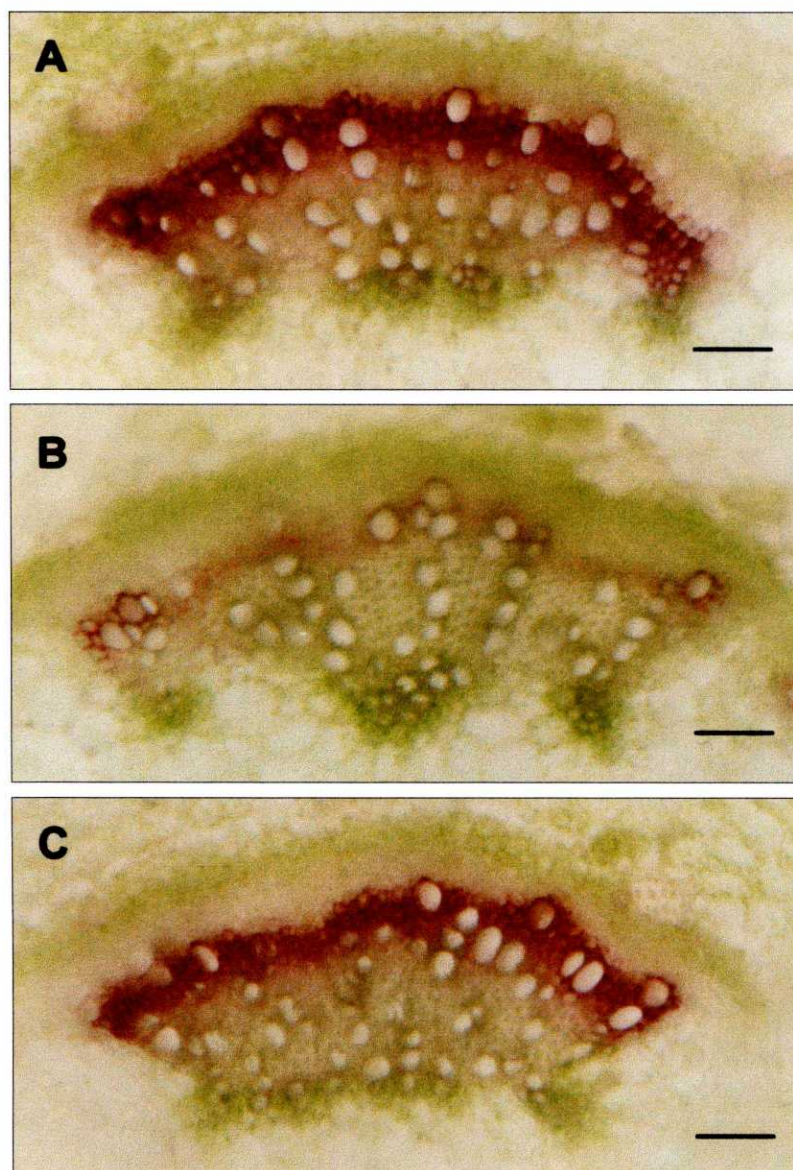


Figura IV.49.- Efecto del ferrocianuro potásico y del ferricianuro potásico sobre la actividad siringaldazina-oxidasa del xilema de *Z. elegans*. A) Sección control teñida con siringaldazina. B) Sección teñida con siringaldazina en presencia de ferrocianuro potásico 1 mM. C) Sección teñida con siringaldazina en presencia de ferricianuro potásico 1 mM. Barra= 100 μ m

Por su parte, el ferricianuro potásico no mostró efecto sobre la oxidación de la siringaldazina por el xilema (Fig. IV. 49 C), dando lugar a un patrón de tinción similar al observado en el control (Fig. IV.49 A).

IV.1.5.5.- Efecto del ácido metacloroperoxibenzoico sobre la oxidación de la siringaldazina por el xilema lignificante de *Z. elegans*

Como hemos visto, el ácido ferúlico y el ferrocianuro potásico son dos buenos inhibidores de la oxidación de la siringaldazina tanto por la peroxidasa de *Z. elegans* como por el xilema lignificante. Ambos compuestos actúan de una forma similar, dando lugar a una inhibición de tipo competitiva, debido a su naturaleza de substratos (donadores de electrones) de la peroxidasa.

Una característica de las peroxidasas es su inhibición por altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (Weinryb, 1966; Ros Barceló y Aznar-Asensio, 1999). Esta inhibición no es ejercida exclusivamente por el peróxido de hidrógeno, ya que otros peróxidos orgánicos como el ácido metacloroperoxibenzoico provocan el mismo efecto inhibitor. Los peróxidos provocan la oxidación de la enzima férrica a compuesto I, y a continuación dan lugar a la producción de formas inactivas conocidas como verdohemoproteínas P670 (Nakajima, y Yamazaki, 1980), que reciben su nombre por presentar un máximo de absorción a 670 nm. En el caso del peróxido de hidrógeno, la peroxidasa es capaz de reaccionar en un ciclo similar al de la catalasa convirtiendo el H_2O_2 en oxígeno molecular, y así amortigua el efecto inhibitor del H_2O_2 (Arnao y col., 1990). Sin embargo, cuando se usa el ácido metacloroperoxibenzoico, la peroxidasa es incapaz de realizar este ciclo de tipo catalasa, consiguiéndose una inhibición 100 veces más efectiva que con el uso del peróxido de hidrógeno (Acosta y col., 1991). Por este motivo, hemos usado el ácido metacloroperoxibenzoico en la caracterización de la actividad siringaldazina oxidasa del xilema lignificante de *Z. elegans*.

Como se muestra en la Figura IV. 50, el ácido metacloroperoxibenzoico es un fuerte inhibidor de la velocidad de oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa de *Z. elegans*, alcanzándose una inhibición del 100% a la concentración de 2,5 mM.

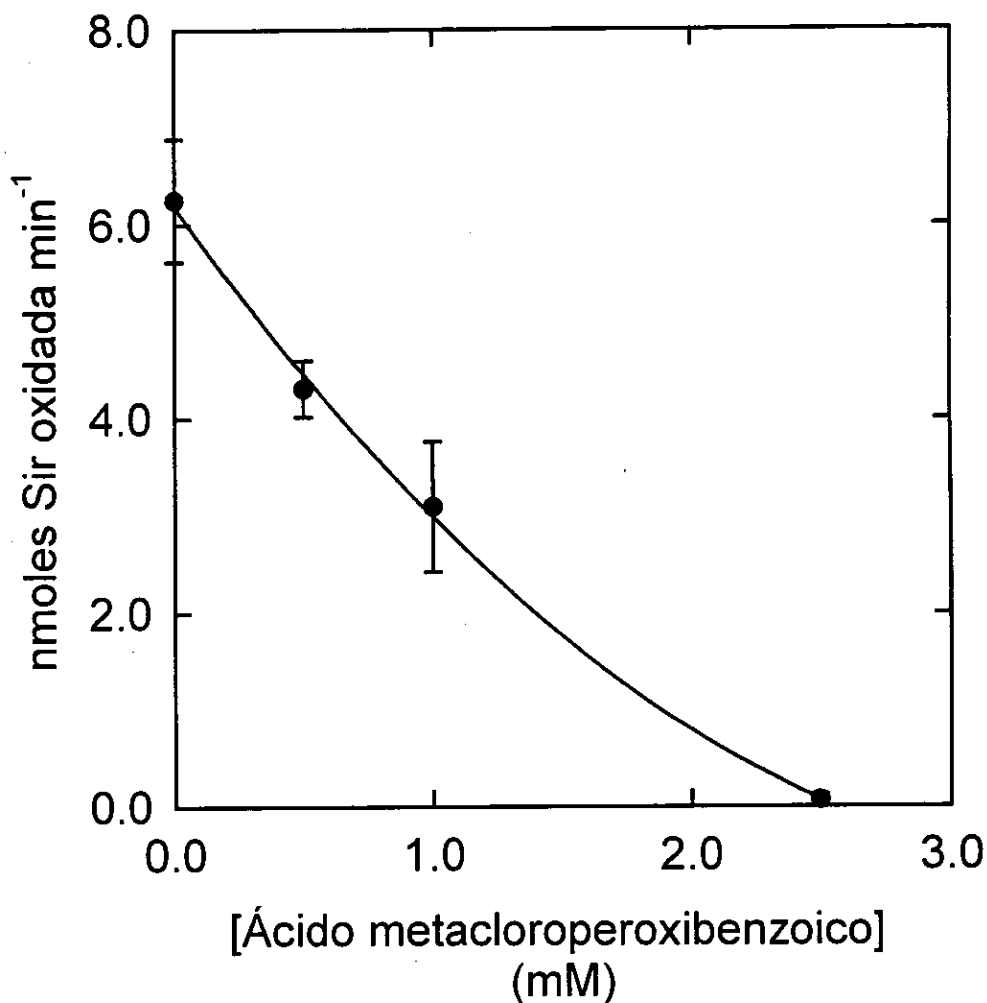


Figura IV. 50.- A) Efecto del ácido metacloroperoxibenzoico sobre la velocidad de oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa de *Z. elegans*. El medio de reacción estaba compuesto por H₂O₂ 0,5 mM, siringaldazina 50 μ M, peroxidasas de *Z. elegans* y distintas concentraciones de ácido metacloroperoxibenzoico, en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. El inhibidor se añadió al medio 1 minuto antes de iniciar la reacción con la adición de la siringaldazina.

Igualmente, se realizaron estudios de inhibición a nivel histoquímico usando para ello una concentración de ácido metacloroperoxibenzoico de 2,5 mM.

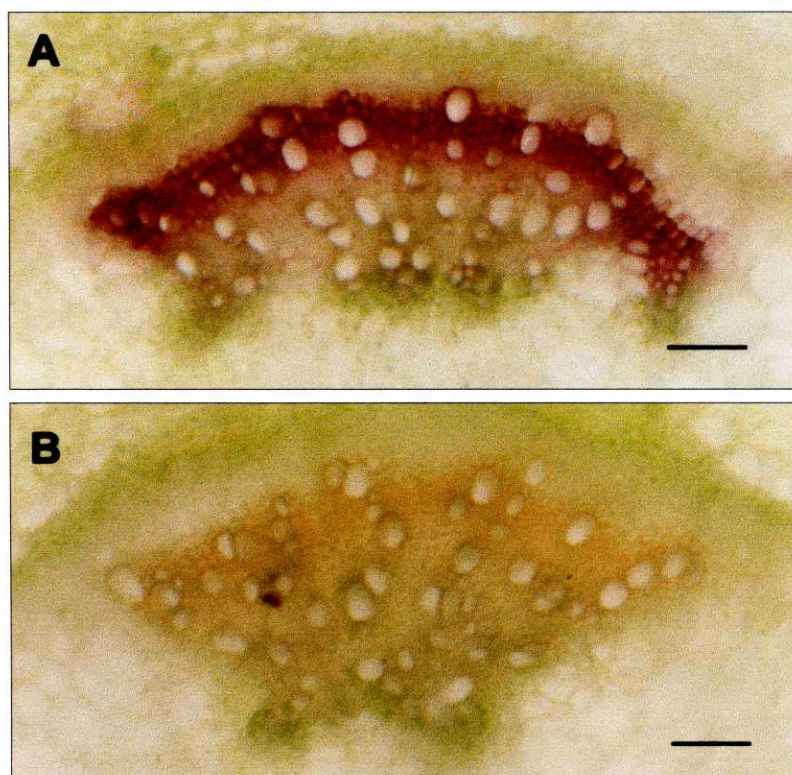


Figura IV.51.- Efecto del ácido metacloroperoxibenzoico sobre la actividad siringaldazina-oxidasa del xilema lignificante de *Z. elegans*. A) Sección control teñida con siringaldazina. B) Sección teñida con siringaldazina en presencia de ácido metacloroperoxibenzoico 2,5 mM. Barra= 100 μ m

Como se puede ver en la Figura IV.51 B, el ácido metacloroperoxibenzoico, a la concentración ensayada, inhibió completamente la oxidación de la siringaldazina por el xilema lignificante de *Z. elegans*.

IV.1.5.6.- Naturaleza de la actividad siringaldazina-oxidasa presente en el xilema lignificante de *Z. elegans*

Como se mencionó con anterioridad, actualmente existe una gran controversia sobre cuál es la enzima responsable de la etapa de polimerización de los alcoholes cinamílicos durante la síntesis de lignina. Para esta reacción, se han propuesto enzimas de naturaleza oxidasas, dependientes de peróxido de hidrógeno (peroxidasas) o independientes de peróxido de hidrógeno. Entre estas últimas se encuentran las lacasas, enzimas pertenecientes al grupo de las oxidasas de cobre azul, y las catecolasas.

El resultado del uso de inhibidores en los estudios histoquímicos, parecen apuntar a las peroxidasas como las enzimas responsables de este proceso (Fig. IV. 52).

Así, la inhibición total de la oxidación de la siringaldazina por el xilema lignificante de *Z. elegans* por el ácido ferúlico, nos permite descartar a las lacasas como las enzimas responsables de dicho proceso (Fig. IV.52 B). Complementariamente, la tropolona no tiene efecto apreciable sobre la tinción (Fig. IV.52 C), apareciendo un patrón prácticamente idéntico al observado en el caso del control (Fig. IV.52 A). Esta observación nos permite descartar a las catecolasas como las enzimas responsables de este proceso. Por lo tanto, el uso complementario del ácido ferúlico y la tropolona nos permite discriminar entre las polifenoloxidasas de tipo lacasa y aquellas de tipo catecolasa frente a las peroxidasas, apuntando a estas últimas como las enzimas responsables de la actividad siringaldazina-oxidasa del xilema lignificante de *Z. elegans*.

La inhibición de la tinción observada con el ferrocianuro potásico (Fig. IV.52 D) y su insensibilidad al ferricianuro potásico (Fig. IV. 52 E), está de acuerdo con la naturaleza peroxidasa de la enzima responsable de la oxidación de la siringaldazina por el xilema lignificante de *Z. elegans*. Esta naturaleza peroxidasa se confirmó a través del efecto inhibitor del ácido metacloroperoxibenzoico (Fig. IV.52 F).

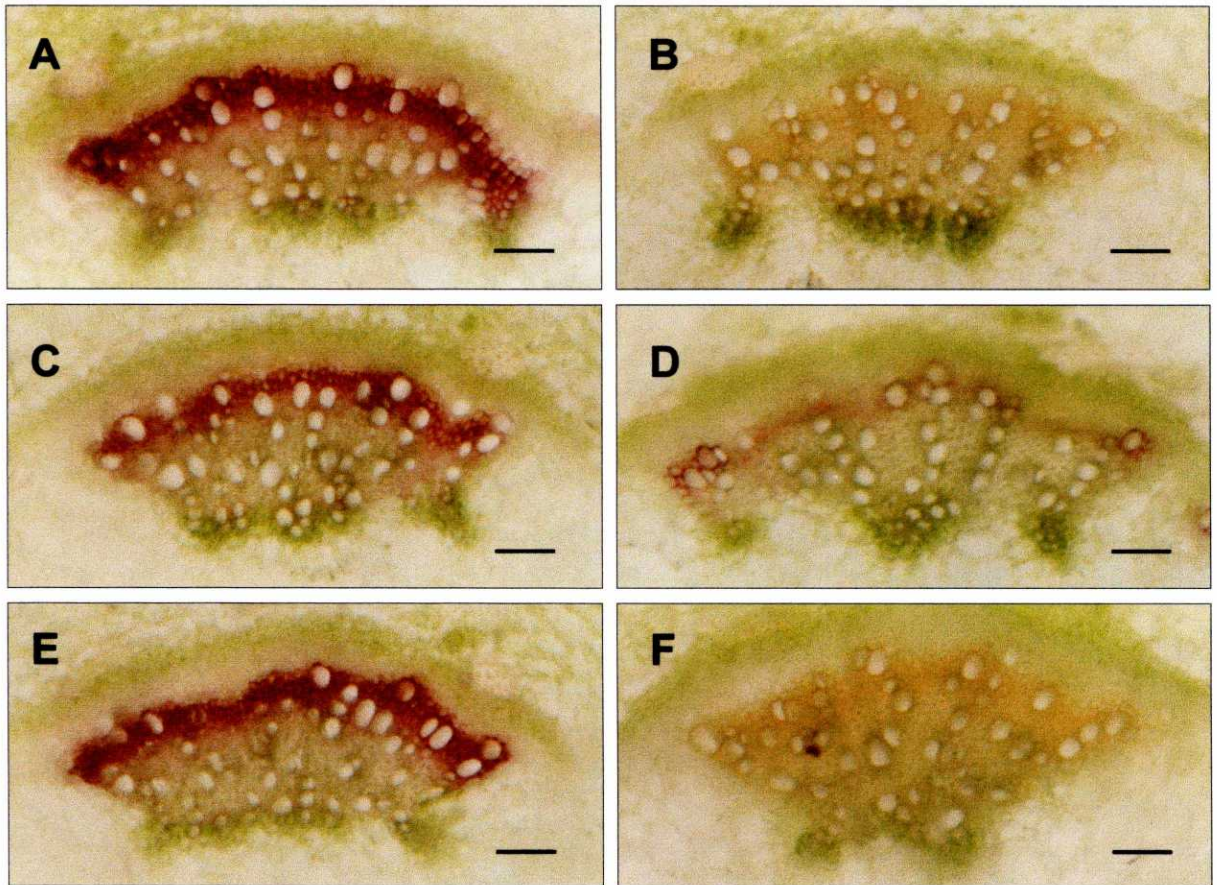


Figura IV. 52.- Efecto de distintos inhibidores sobre la actividad siringaldazina-oxidasa del xilema de *Z. elegans*. A) Sección teñida con siringaldazina. B) Sección teñida con siringaldazina en presencia de ácido ferúlico 1 mM. C) Sección teñida con siringaldazina en presencia de tropolona 1 mM. D) Sección teñida con siringaldazina en presencia de ferrocianuro potásico 1 mM. E) Sección teñida con siringaldazina en presencia de ferricianuro potásico 1 mM. F) Sección teñida con siringaldazina en presencia de ácido metacloroperoxibenzoico 2,5 mM

De todos estos resultados podemos concluir que la actividad siringaldazina-oxidasa del xilema de *Z. elegans*, responde al tratamiento con inhibidores de la misma forma que lo hace la peroxidasa de *Z. elegans*. Asimismo, esta peroxidasa es capaz de oxidar los precursores de la lignina con valores de k_M muy inferiores a los mostrados por algunas lacasas, y además muestra una colocación tanto espacial como temporal con los procesos activos de lignificación. De todos estos estudios podemos concluir que esta peroxidasa de *Z. elegans* parece ser la enzima clave en la oxidación de los alcoholes cinámicos y su posterior polimerización para dar lugar a las ligninas.

IV.2.- INTERACCIÓN *Capsicum annuum* L. var. *annuum*-*Verticillium dahliae* Kleb.

IV.2.1.- Efecto de la inoculación con *Verticillium dahliae* sobre el desarrollo de plantas de *Capsicum annuum*

La inoculación de plantas de pimiento de Padrón con *V. dahliae* provocó un menor crecimiento en las plantas infectadas respecto a las plantas control, sin que se llegase a producir, en ningún caso, la muerte de la planta inoculada durante el tiempo que duró el estudio.

Como se puede ver en la Figura IV.53 A, a tiempos cortos tras la inoculación, no aparecen diferencias externas entre las plantas control y las inoculadas, sin embargo, ya a los 10 días las diferencias de tamaño son claras (Fig. IV.53 B), mostrando las plantas inoculadas una menor longitud total, y un menor desarrollo de las superficies foliares. A tiempos largos tras la infección (Fig. IV.53 C), la diferencia en el desarrollo de las plantas control frente a las inoculadas es manifiesta, presentando las primeras una mayor longitud general y hojas de mayor tamaño y en mayor número. Asimismo, en las plantas inoculadas se observa una ligera marchitez y enrollamiento de las hojas, tornándose los bordes y ápices en un color pardo. Con el paso de los días algunas hojas comenzaron a amarillear y finalmente caían.

Trabajos realizados recientemente (Varela, 1999) muestran como la infección de plantas de pimiento de Padrón con *V. dahliae* provocan una drástica disminución del peso fresco y seco en las plantas inoculadas. Así a los 30 días de la inoculación, el peso fresco de las plantas infectadas suponía solo el 30 % del peso de las control, siendo este porcentaje del 37 % cuando se analizó el peso seco. En conjunto, la sintomatología presentada por las plantas de pimiento de Padrón al haberlas infectado con *V. dahliae* coincide con la descrita por Nuez y col. (1996).

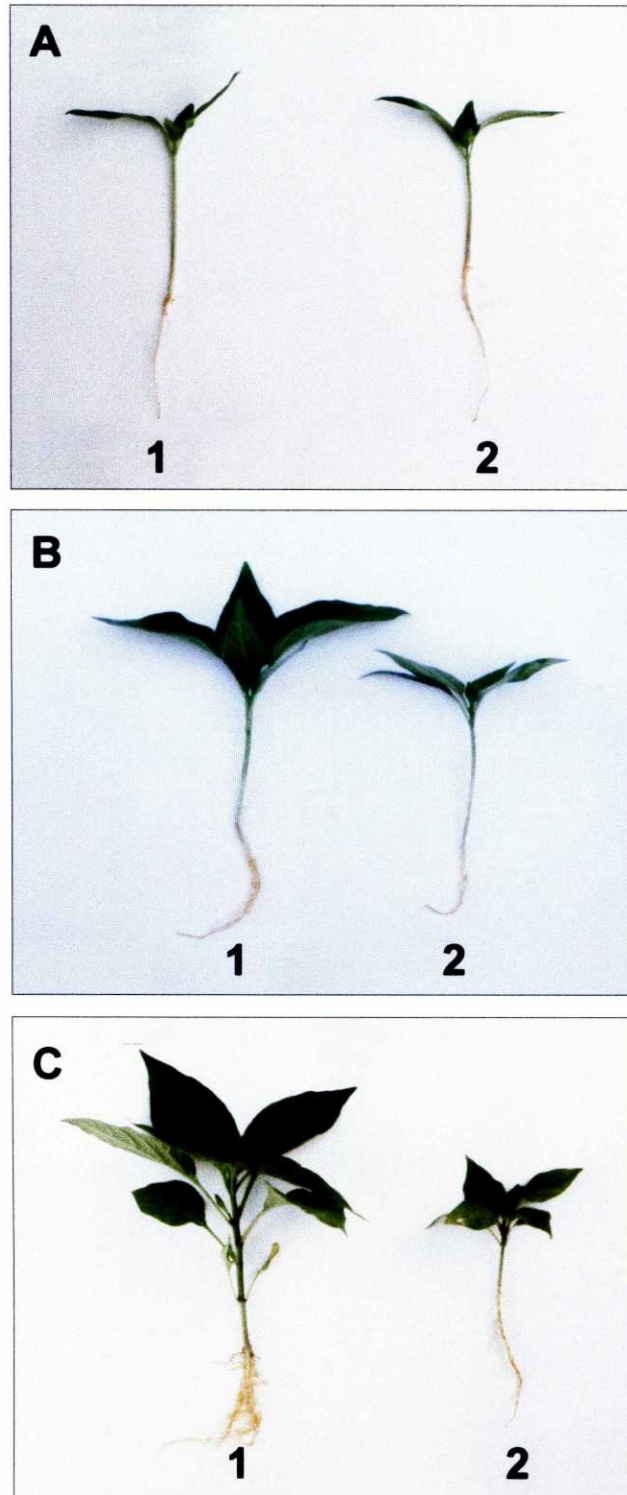


Figura IV.53.- Efecto de la inoculación con *V. dahliae* sobre el desarrollo de plantas de *Capsicum annuum*. A) Plantas control (1) e inoculadas (2) a las 12 horas de la inoculación. B) Plantas control (1) e inoculadas (2) a los 10 días de la inoculación. C) Plantas control (1) e inoculadas (2) a los 24 días de la inoculación

IV.2.2.- Penetración y avance del patógeno a través de la planta

Una vez analizados los síntomas externos era fundamental relacionarlos con la presencia del hongo en los distintos órganos de la planta. Con el fin de confirmar la presencia del hongo en las plantas inoculadas y su ausencia en las control, realizamos una serie de cortes en el tallo de las plantas, y se depositaron los distintos fragmentos en placas petri con medio PDA suplementado para la ocasión con penicilina y estreptomycin. Estos controles nos permitieron comprobar la presencia o ausencia del hongo en las plantas así como su velocidad de ascensión.

Como se puede observar en la Figura IV.54. A, a las 12 horas de haber inoculado las plantas, el hongo solo aparece en el extremo inferior de la raíz. Tan solo 12 horas más tarde, a las 24 de haber sido inoculadas, el hongo llega ya casi a la mitad de la longitud del tallo de la planta (Fig. IV.54. B) apareciendo en el extremo superior del tallo a los 2-3 días tras la inoculación (Fig. IV.54.C). En ningún caso, como era de esperar, aparece el hongo en los fragmentos de las plantas control. La velocidad de ascensión obtenida es similar a la observada por otros autores. Así Heinz y col. (1998), observaron que la colonización de plantas de tomate por el hongo *Verticillium albo-atrum* es rápida, pues a los 2-4 días de la inoculación detectan la presencia del hongo en la parte superior del tallo, incluso en cultivares resistentes.

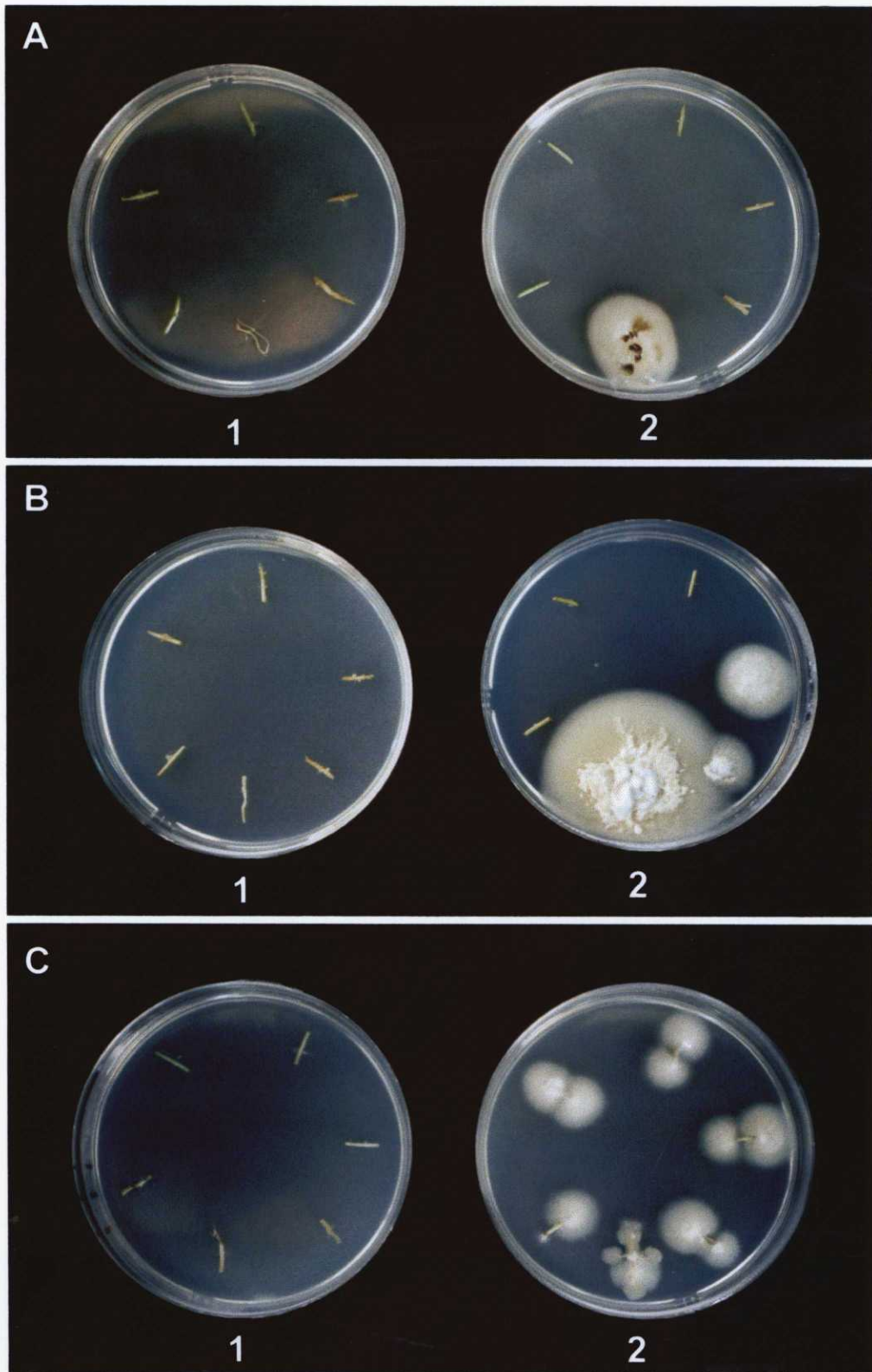


Figura IV. 54.- Reaislamientos de *V. dahliae* a partir de plantas infectadas con el hongo. A) 12 horas tras la inoculación. B) 24 tras horas de la inoculación. C) 48 tras la inoculación

IV.2.3.- Efecto de la inoculación con *V. dahliae* sobre la actividad peroxidasa de *C. annuum*

IV.2.3.1.- Evolución de la actividad peroxidasa a lo largo del proceso de infección

Para el seguimiento de la actividad peroxidasa a lo largo del proceso de infección, obtuvimos un extracto global de los tejidos, separando previamente las muestras por órganos, raíces, tallos y hojas. Las medidas de la actividad se realizaron usando como sustrato el 4-metoxi- α -naftol, el cual es oxidado por la peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno dando lugar a un producto azul insoluble, probablemente el bis[4-metoxi-1-oxo(naftalen-2-ilideno)] (Guilbault y Kramer, 1964). Este producto de oxidación es lo suficientemente soluble para usar el 4-metoxi- α -naftol en ensayos cinéticos y, a la vez, lo suficientemente insoluble como para realizar ensayos zimográficos (Bernal y col., 1993).

Como se puede observar en la Figura IV.55 hasta las 48 horas tras la inoculación, no se observan cambios significativos en la actividad peroxidasa en ninguno de los órganos estudiados. Sin embargo, a tiempos largos, ya se observan diferencias claras en la actividad peroxidasa. En raíces y tallos, aparece un aumento importante a partir de los 14 días tras la inoculación, alcanzándose un máximo a los 28 días, suponiendo en el caso de los tallos un aumento de hasta el 900 %. En las hojas, no es hasta los 21 días cuando detectamos un aumento significativo en la actividad peroxidasa total, apareciendo igualmente el máximo a los 28 días tras la inoculación.

El papel de las peroxidasas en los procesos de interacción planta-patógeno ha sido estudiado en numerosos trabajos. Algunos autores han considerado que las peroxidasas juegan un papel muy importante en los procesos que conducen a la respuesta hipersensible, apareciendo en sistemas incompatibles un fuerte aumento de la actividad (Gaspar y col., 1982). Chakraborty y col. (1993), con el fin de conocer los cambios en los niveles de

peroxidasa en sistemas compatibles e incompatibles, utilizaron dos cepas de diferente grado de virulencia de *Leptosphaeria maculans*, que inocularon en dos cultivares de *Brassica napus* (uno resistente y otro susceptible). Observaron que la actividad peroxidasa estaba correlacionada con la reacción de resistencia pero no con la interacción compatible patógeno-huésped ya que aunque la actividad peroxidasa en este tipo de interacción aumenta, o permanece constante, respecto de las plantas control, tanto con la cepa altamente virulenta como con la moderadamente virulenta, se detectó una mayor actividad cuando el cultivar resistente fue inoculado con la cepa moderadamente virulenta.

Sin embargo, otros autores consideran que los cambios en la actividad peroxidasa no son determinantes en la compatibilidad o incompatibilidad de una interacción, sino que serían más bien una consecuencia de los procesos que se desatan en la respuesta hipersensible (Montalbini y Buonauro, 1989). Su papel estaría encaminado hacia otros procesos como el uso del peróxido de hidrógeno en el endurecimiento de la pared celular (Moerschbacher y col., 1990; Brownleader y col., 1995) a través de la polimerización oxidativa de los fenoles y el entrecruzamiento de proteínas.

Las peroxidases han sido también relacionadas con los procesos de resistencia sistémica inducida basándose en la aparición de importantes incrementos de actividad en aquellas plantas que presentan este tipo de resistencia (Hammerschmidt y col. 1982).

En nuestro caso, la ausencia de cambios en las primeras etapas de la infección, nos hacen pensar que la peroxidasa no se ve implicada en ningún tipo de respuesta hipersensible. Los incrementos observados a partir de los 14 días tras la inoculación podrían ser debidos a la participación de la enzima en otros procesos como pueden ser la síntesis de lignina, la incorporación de proteínas a la matriz de la pared celular, o la oxidación de fenoles para dar productos de naturaleza antifúngica.

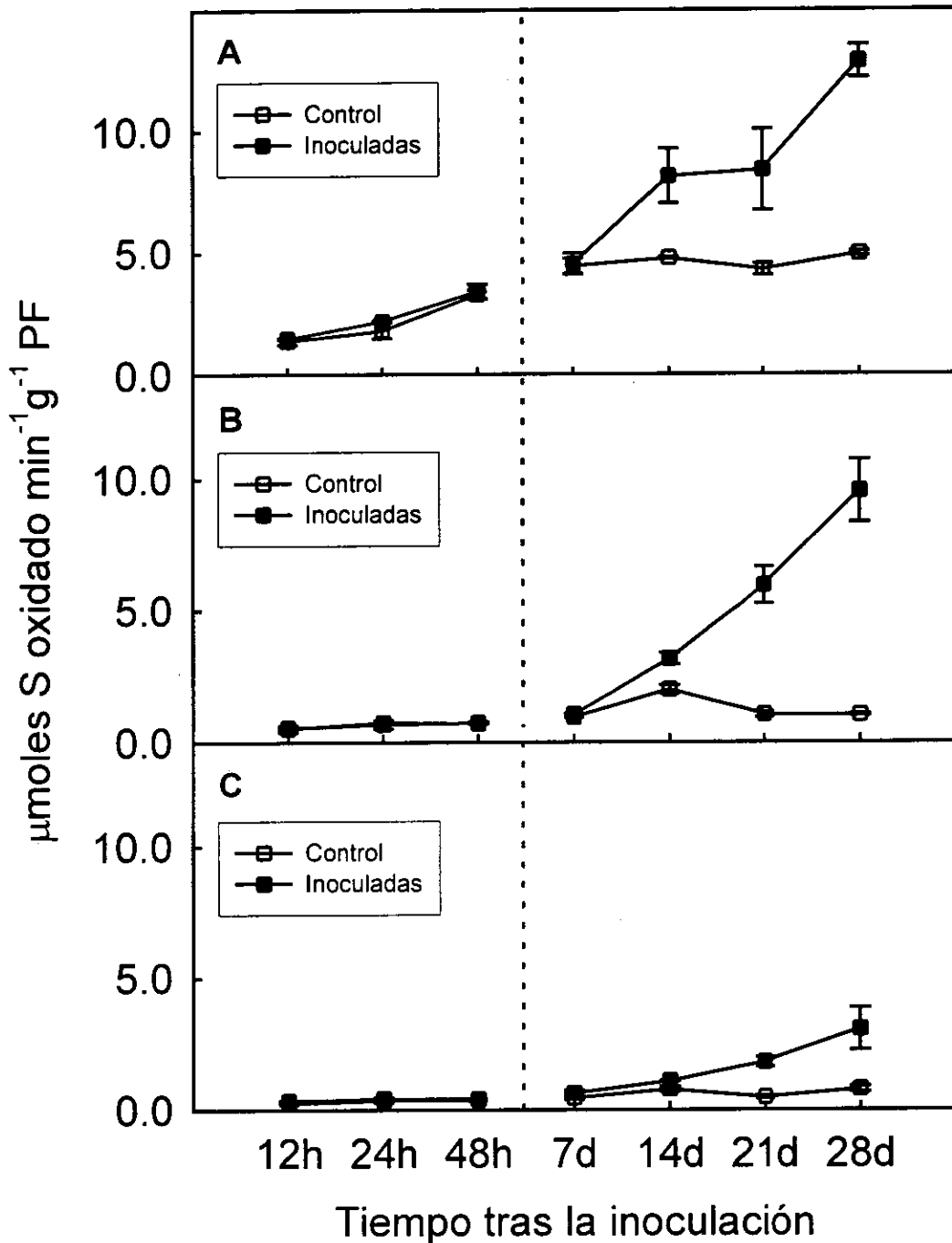


Figura IV.55.- Evolución a lo largo del tiempo de la actividad peroxidasa usando 4MN como sustrato en plantas de *Capsicum annuum* inoculadas con *V. dahliae* y de plantas control. A) Raíces. B) Tallos. C) Hojas. El medio de reacción contenía peroxidasa de *C. annuum*, H_2O_2 0,5 mM, 4MN 1 mM en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. Los datos son la media de tres experimentos independientes

IV.2.3.2.- Isoelectroenfoque analítico

Con el fin de comprobar si los cambios en la enzima peroxidasa eran solo a nivel cuantitativo o implicaban una variación en el patrón isoenzimático, analizamos las muestras por medio de un isoelectroenfoque en un gradiente de pH de 3,5- 9,5 (Fig. IV.56). No hemos detectado cambios significativos en la zona básica, pero sí variaciones en las isoenzimas ácidas, por este motivo solo se muestra esta zona del gel. En ninguno de los órganos estudiados la infección con *V. dahliae* induce la expresión de nuevas isoenzimas.

Como se observa en la Figura IV.56 A, correspondiente a las muestras de raíces, a las doce horas de la inoculación no aparecen diferencias entre los patrones obtenidos para las plantas control y para las inoculadas, manteniéndose esta situación a las 24 y 48 horas (geles no mostrados). Sin embargo, a partir de los 7 días empiezan a aparecer diferencias entre el patrón de raíces de plantas control y el de las inoculadas. Así, aumenta la expresión de una isoenzima de carácter ácido con un punto isoeléctrico aproximado de 3,6, aumento que se hace más patente según avanza la infección como se puede observar a los 28 días de la inoculación.

En el caso del tallo (Figura IV.56. B), el comportamiento es básicamente similar incrementándose esta isoenzima ya a los 7 días, siendo este aumento mucho más manifiesto a los 28 días. Por último, en el caso de las hojas (Figura IV.56. C), no hay un incremento claro en la expresión de la isoenzima a los 7 días desde la inoculación, pero sí que se manifiesta plenamente a los 28 días, en este caso también parece evidenciarse un aumento en otra isoenzima de punto isoeléctrico aproximado de 4,0.

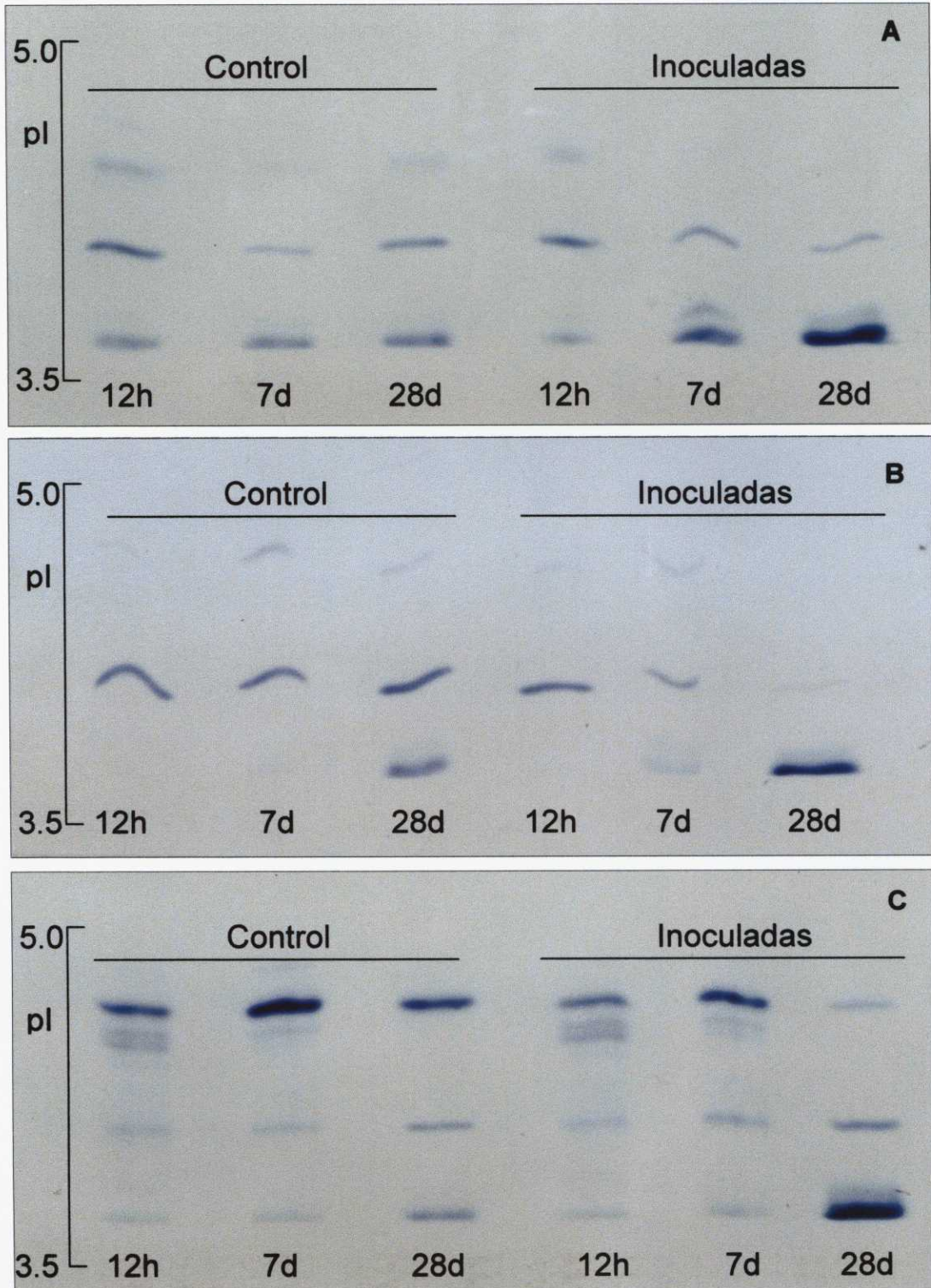


Figura IV. 56.- Evolución a lo largo del tiempo del patrón isoenzimático de la peroxidasa de plantas de *Capsicum annuum* inoculadas con *V. dahliae* y de plantas control. A) Raíces. B) Tallos. C) Hojas. El medio de tinción contenía 4MN 1 mM, H₂O₂ 0,5 mM en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0

La variación en el patrón isoenzimático de la peroxidasa en respuesta a la presencia de algún patógeno ha sido ampliamente ilustrado. Así, Vance y col. (1976), observaron como la inoculación de discos de hojas de *Phalaris arundinacea* L. con *Helminthosporium avenae* E., provocaba no solo la mayor expresión de las isoenzimas básicas, sino incluso la aparición de bandas nuevas. Mellon y Lee (1995), observaron como la elicitación con varios hongos patógenos provocaba en el algodón no sólo un aumento de la actividad peroxidasa total, sino también la aparición de 2 a 5 isoenzimas ácidas que no aparecían en las plantas control, o bien su expresión era mínima. Asimismo, Calderón y col. (1994), han demostrado que la elicitación de *Vitis vinifera* con celulasa Onozuka R-10 provocaba un aumento en los niveles de peroxidasa extracelular y la aparición de una nueva isoenzima básica, relacionada con la oxidación del resveratrol.

La actividad peroxidasa también puede ser estimulada por otros tipos de estrés, como el encharcamiento o las heridas. En relación con esto Díaz y Merino (1998), pudieron comprobar como las heridas realizadas a plantas de pimiento de Padrón provocaban la expresión de una peroxidasa ácida, probablemente la misma peroxidasa de pl 3,6 que se induce con la infección con *V. dahliae*.

IV.2.3.3.- Fraccionamiento subcelular

Una vez comprobado que la infección provoca un aumento en la actividad peroxidasa total, y que este aumento se ve acompañado de cambios en el patrón isoenzimático, intentamos comprobar por medio de la técnica de fraccionamiento subcelular si el aumento detectado se producía en alguna fracción subcelular en concreto. Para ello utilizamos hojas de plantas de 21 días después de la inoculación.

Como se puede ver en la Tabla IV. 11, en todas las fracciones analizadas: soluble, iónica de membrana, iónica de pared y covalente de pared se produce una variación similar en la actividad peroxidasa. Así, en todas ellas

los valores obtenidos para las plantas inoculadas son de tres a cuatro veces superiores a los de las plantas control.

Tabla IV.11.- Fraccionamiento subcelular de hojas, realizado a 21 días de la inoculación. Los datos de actividad peroxidasa se expresan en nmoles de 4MN oxidado $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ P.F.

	Control	Inoculadas
Soluble	754,8 ± 136,4	2944,4 ± 64,7
Iónica de membrana	10,6 ± 1,2	41,7 ± 10,3
Iónica de pared	22,1 ± 5,3	71,3 ± 12,9
Covalente de pared	4,7 ± 1,3	14,3 ± 2,9

Los datos son la media de tres experimentos independientes

Tanto en las plantas control como en las inoculadas la peroxidasa se encuentra fundamentalmente en la fracción soluble, representando más del 95 % del total, y a continuación en la fracción enlazada iónicamente a la pared, seguidas por la fracción enlazadas iónicamente a la membrana, y la fracción covalentemente unida a la de pared celular. Estos valores están de acuerdo con los obtenidos por Bernal y col. (1993), en los cuales la fracción mayoritaria era la soluble con un 93%, o los obtenidos para el fruto del pimiento (Pomar y col., 1997) en los cuales la fracción soluble suponía un 96,8% del total.

IV.2.3.4.- Evolución de la actividad peroxidasa frente a otros substratos artificiales

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos con la oxidación del 4MN, nos propusimos utilizar otros substratos artificiales. Para ello, escogimos la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y la siringaldazina (Sir), debido a su utilidad en estudios histoquímicos, y en el caso de la siringaldazina además por su carácter de análogo de los grupos siringilo de la lignina. En las Figuras IV.57 y IV. 58 se muestran los resultados obtenidos de la evolución de la actividad peroxidasa cuando se usaron como substratos la TMB y la Sir respectivamente.

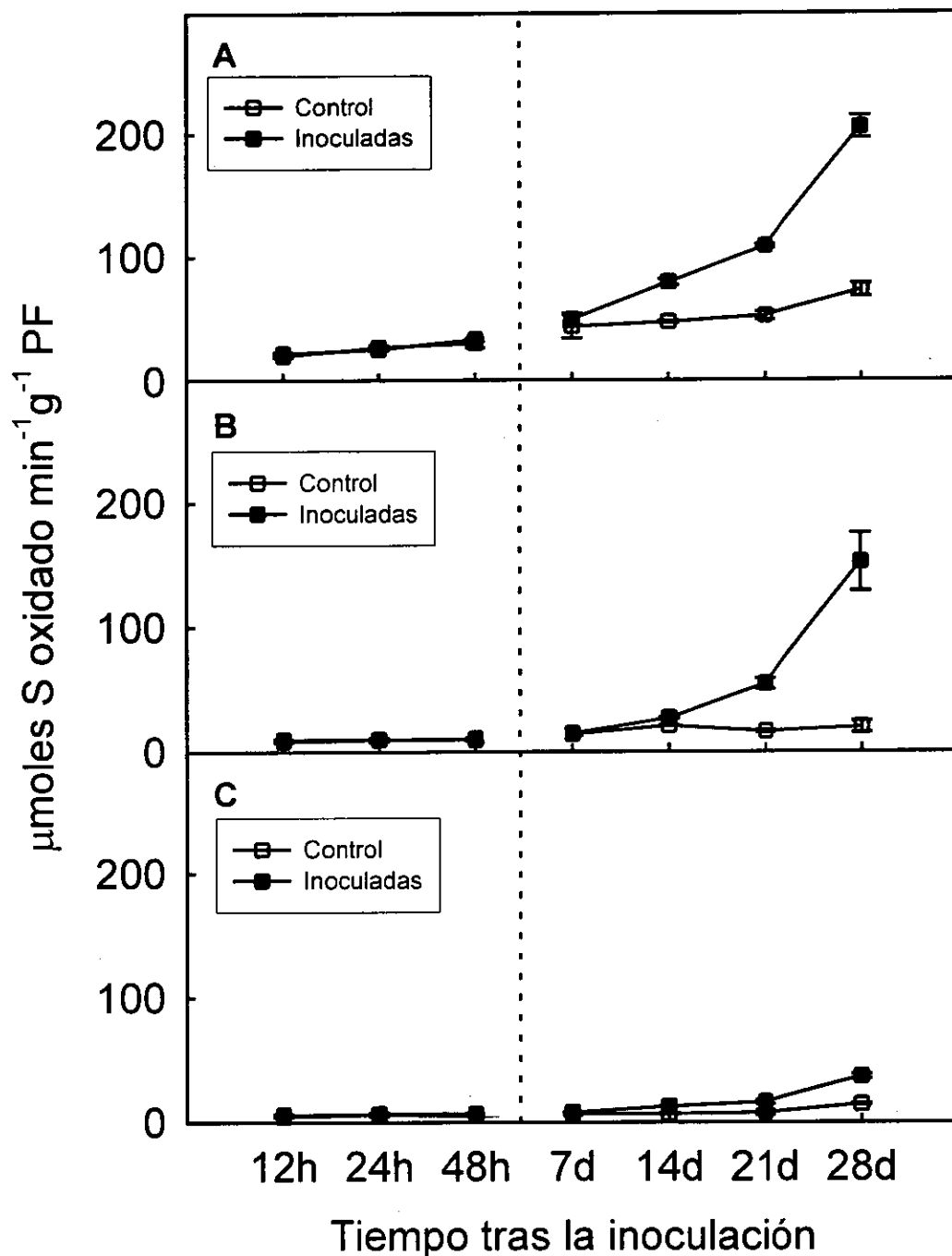


Figura IV.57.- Evolución a lo largo del tiempo de la actividad peroxidasa usando TMB como sustrato en plantas de *Capsicum annuum* inoculadas con *V. dahliae* y de plantas control. A) Raíces. B) Tallos. C) Hojas. El medio de reacción contenía peroxidasa de *C. annuum*, H₂O₂ 0,5 mM, TMB 0,1 mg ml⁻¹ en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. Los datos son la media de tres experimentos independientes

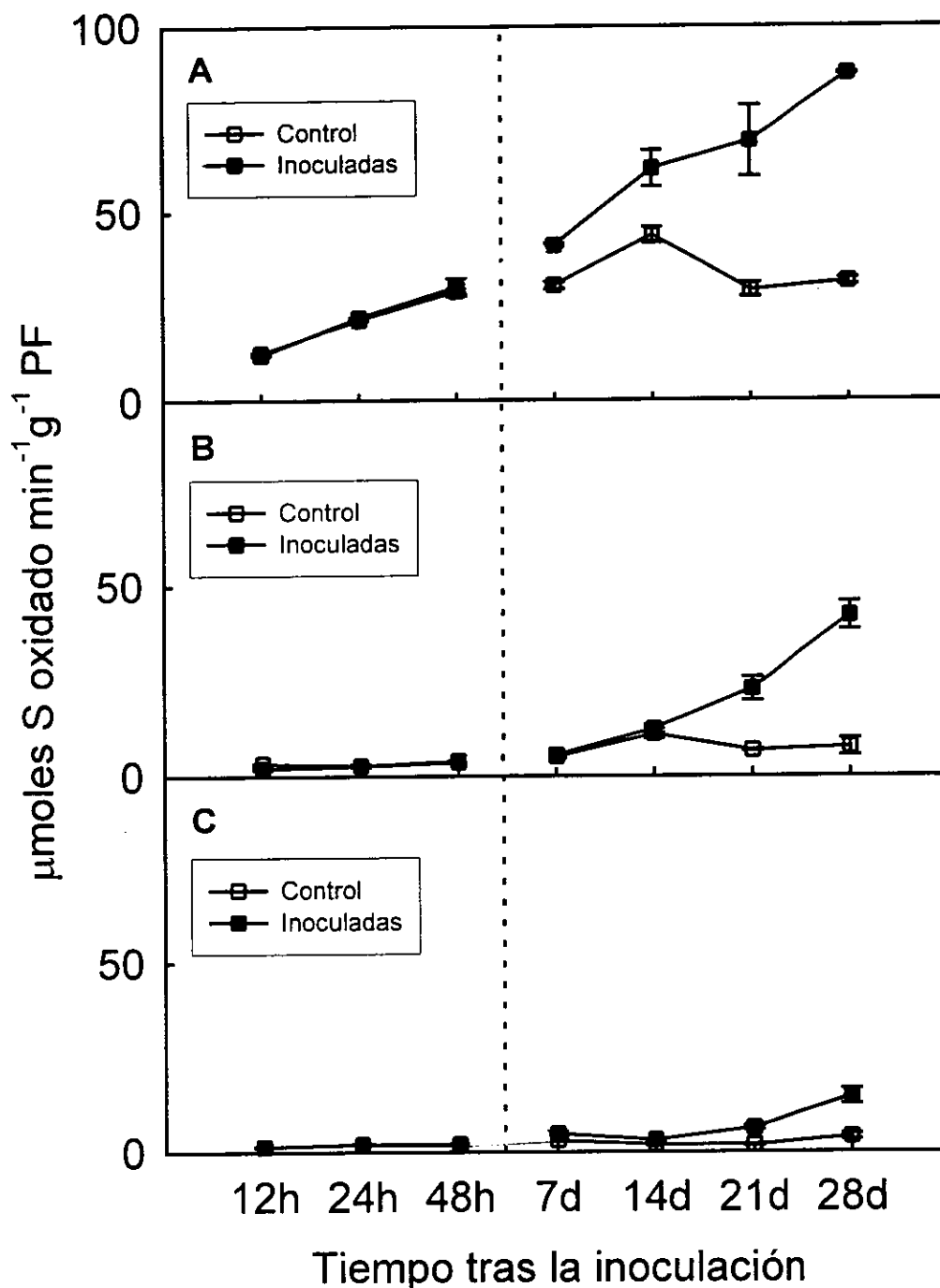


Figura IV.58.- Evolución a lo largo del tiempo de la actividad peroxidasa usando siringaldazina como sustrato en plantas de *Capsicum annuum* inoculadas con *V. dahliae* y de plantas control. A) Raíces. B) Tallos. C) Hojas. El medio de reacción contenía peroxidasa de *C. annuum*, H_2O_2 0,5 mM, siringaldazina 50 μM en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. Los datos son la media de tres experimentos independientes

Al igual que en el caso del 4MN, al seguir la evolución de la actividad peroxidasa usando como sustrato la TMB, no se observó variaciones en ninguno de los órganos estudiados a tiempos cortos tras la inoculación. Sin embargo, tanto en tallos como en hojas a partir de los 21 días de la inoculación, los niveles de actividad peroxidasa en las plantas infectadas fueron muy superiores a los observados en las plantas control, alcanzándose el máximo a los 28 días. En el caso de las raíces el aumento se observa ya a los 14 días de la inoculación, aumentando hasta alcanzar la mayor diferencia a los 28 días.

Cuando utilizamos la siringaldazina como sustrato (Fig. IV.58.), se observa un comportamiento similar en las primeras etapas tras la inoculación, no apareciendo diferencias entre las plantas control y las infectadas. Asimismo, tanto en tallos como en hojas las diferencias se empiezan a observar a partir de los 21 días para volver a presentar un máximo a los 28 días. En el caso de las raíces se detectan cambios ya a partir de los 7 días de la inoculación, donde las plantas inoculadas presentan un incremento en su actividad, que sigue aumentando hasta alcanzar el máximo también a los 28 días.

El hecho de que la peroxidasa de pimiento oxide eficientemente a la siringaldazina, y que a lo largo del proceso de infección aumente la actividad peroxidasa cuando la usamos como sustrato, nos induce a pensar que este aumento de actividad pueda estar relacionado con procesos de lignificación, o bien con procesos de endurecimiento de la pared celular. Debido a esto, decidimos abordar el estudio de las peroxidasas del espacio intercelular y de aquellas asociadas a la pared.

IV.2.3.5.- Infiltración al vacío de tallos y hojas

Con el fin de poder estudiar estas enzimas relacionadas con la pared, aplicamos la técnica de infiltración al vacío a tallos y hojas tanto de plantas control como inoculadas, obteniendo por una parte el fluido intercelular (IWF) y por otra las proteínas unidas iónicamente a la pared celular (ICW).

Como se puede ver en la tabla IV.12. correspondiente a la infiltración de tallos, en ambas fracciones aumentan los valores de la actividad enzimática. La naturaleza de estos aumentos dependen tanto del sustrato que se use como de la fracción de la que se trate.

Tabla IV.12.- Actividad peroxidasa en tallos infiltrados a los 21 días de la inoculación. Los datos se expresan en nmoles de sustrato oxidado $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ P.F

Substrato	IWF		ICW	
	Control	Infectadas	Control	Infectadas
4MN	n.d.	n.d.	53 ± 1	190 ± 9
TMB	573 ± 28	920 ± 5	294 ± 20	1969 ± 111
SIR	217 ± 2	376 ± 8	70 ± 12	963 ± 18

Los datos son la media de tres experimentos independientes, n.d.: no determinada

Así, los mayores incrementos se observan en las enzimas ligadas iónicamente a la pared, donde se obtuvieron aumentos de casi 4 veces la actividad enzimática al usar el 4MN como sustrato, hasta más de 13 veces en el caso de la siringaldazina. En el caso del fluido intercelular, los aumentos observados son mucho menores no llegando en ningún caso a duplicarse la actividad, y siendo muy similares para la TMB y la Sir, ya que en el caso del 4MN no pudimos determinar la actividad.

En el caso de las hojas, cuyos resultados se reflejan en la Tabla IV.13., los mayores incrementos se observan también en la fracción ligada iónicamente a la pared.

Tabla IV.13.- Actividad peroxidasa en hojas infiltradas a los 21 días de la inoculación. Los datos se expresan en nmoles de sustrato oxidado $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ P.F

Substrato	IWF		ICW	
	Control	Infectadas	Control	Infectadas
4MN	39 ± 2	48 ± 1	22 ± 6	30 ± 2
TMB	694 ± 3	840 ± 25	161 ± 75	602 ± 28
SIR	196 ± 4	248 ± 3	97 ± 18	588 ± 16

Los datos son la media de tres experimentos independientes

En esta ocasión los mayores aumentos se detectan también usando la siringaldazina como sustrato, aunque solo se alcanzan valores 6 veces superiores a los de las plantas control. En la fracción correspondiente al fluido intercelular, los incrementos son mucho menores mostrando igualmente la siringaldazina los mayores aumentos.

El análisis por isoelectroenfoque de las muestras obtenidas por infiltración al vacío (Fig. IV.59) nos muestra cómo, tanto en tallos como en hojas, la enzima de pl 3,6 ve claramente aumentada su expresión. Este aumento se observa también en el residuo obtenido tras la infiltración al vacío.

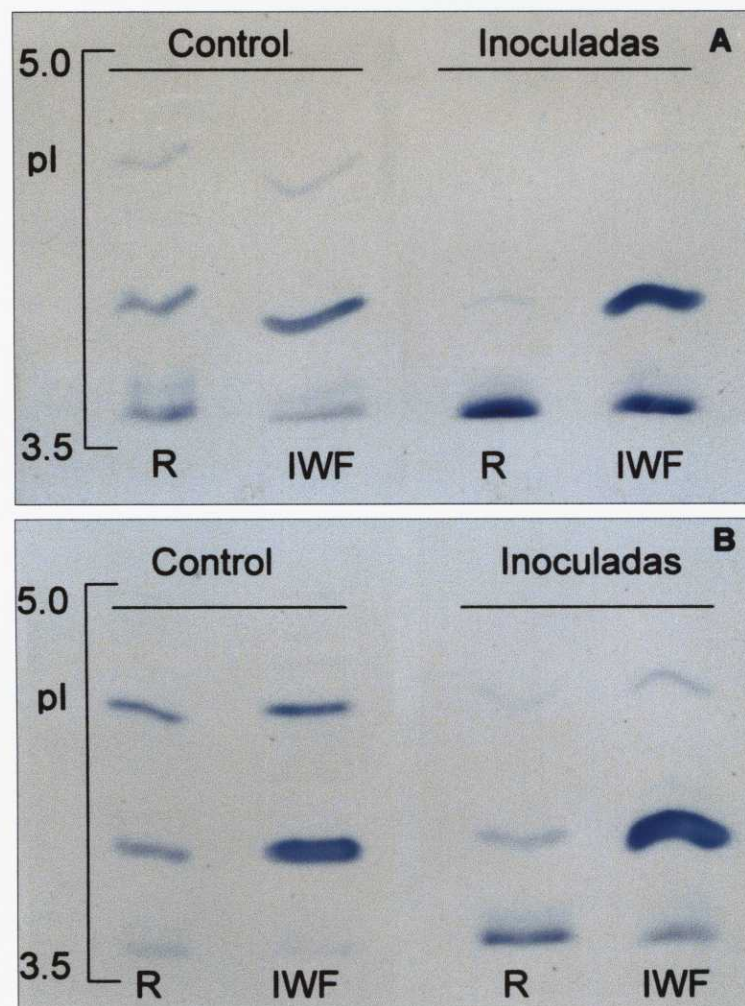


Figura IV.59.- Patrón isoenzimático de la peroxidasa obtenida por infiltración al vacío de plantas de *Capsicum annuum* inoculadas con *V. dahliae* y de plantas control. A) Tallos. B) Hojas. El medio de tinción contenía 4MN 1 mM, H₂O₂ 0,5 mM en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. R=residuo, IWF="fluido de lavado intercelular"

El aumento observado en la enzima de pI 3,6 está de acuerdo con los zimogramas obtenidos anteriormente para la fracción de la peroxidasa total (Fig. IV.56). Sin embargo, esta isoenzima de pI 3,6 no es la que ve incrementada en mayor medida su expresión, sino la de pI 4,0. En este caso se observa un aumento claro de la tinción tanto en tallos como en hojas, pero siempre en la fracción correspondiente al fluido intercelular y no en el residuo.

El hecho de este aumento tan significativo en la isoenzima de pI 4,0 en las muestras obtenidas por infiltración, y el que los mayores aumentos de actividad se observen usando siringaldazina como substrato nos llevó a intentar revelar un gel de isoelectroenfoque con la TMB y la siringaldazina como substratos, aunque la insolubilidad de sus productos de oxidación no los hiciesen adecuados para usarlos en tinciones zimográficas. El resultado de este isoelectroenfoque realizado con IWF tanto de plantas control como inoculadas se muestra en la Figura IV.60.



Figura IV.60.- Patrón isoenzimático de IWF de plantas control e inoculadas. Los medios de reacción contenían H_2O_2 0,5 mM en tampón Tris acetato pH 5,0 y 4MN 1mM, Sir 50 μM , y TMB 0,1 mg ml^{-1} respectivamente. C=control, I=Inoculadas

Como se puede ver en dicha figura, la tinción con 4MN, muestra un aumento en la expresión de las isoenzimas de 3,6 y 4,0 de punto isoeléctrico, como había sucedido en los geles anteriores. Este aumento puede verse también cuando se usa TMB como sustrato, incrementándose el grado de tinción de todas las enzimas, debido a la mayor sensibilidad de este sustrato con respecto al 4MN. Es destacable el hecho de que cuando se usa el 4MN como sustrato, la isoenzima mayoritaria es la de punto isoeléctrico de 3,6, al menos en las plantas infectadas; mientras que cuando revelamos con TMB, la enzima mayoritaria es la de pI de 4,0, hecho que se manifiesta en una sobreoxidación del sustrato dando lugar a la formación de un producto de color amarillo.

En el caso de la tinción del gel con siringaldazina tan solo detectamos una isoenzima, la correspondiente al punto isoeléctrico de 4,0. Lo que viene a confirmar la idea de que esta isoenzima estaría implicada en procesos de lignificación, por lo menos a nivel de la oxidación de grupos siringilo. El hecho de que solo esta enzima sea capaz de oxidar la siringaldazina no descarta al resto en su posible participación en la lignificación, ya que podrían oxidar efectivamente a los grupos guayacilo, e incluso participar en otros procesos de endurecimiento de la pared como son la incorporación de proteínas ricas en hidroxiprolina o la síntesis de suberina.

La capacidad de esta peroxidasa de pimiento de oxidar la siringaldazina, los altos aumentos que detectamos en la actividad de las plantas inoculadas cuando usábamos la siringaldazina como sustrato y el hecho de que este sustrato sea ideal para estudios de tipo histoquímicos, nos llevó a realizar una tinción de secciones de tallos de plantas control e inoculadas. Estas tinciones se realizaron en plantas de 48 horas tras la inoculación, tiempo en el cual la invasión por parte de *V. dahliae* es ya total y tenían como objeto el poder detectar variaciones cualitativas en la localización de la actividad peroxidasa que no pueden ser detectadas en los estudios espectrofotométricos. Asimismo, estas tinciones nos permiten comprobar si los tejidos de pimiento son capaces de oxidar a la siringaldazina "in situ".

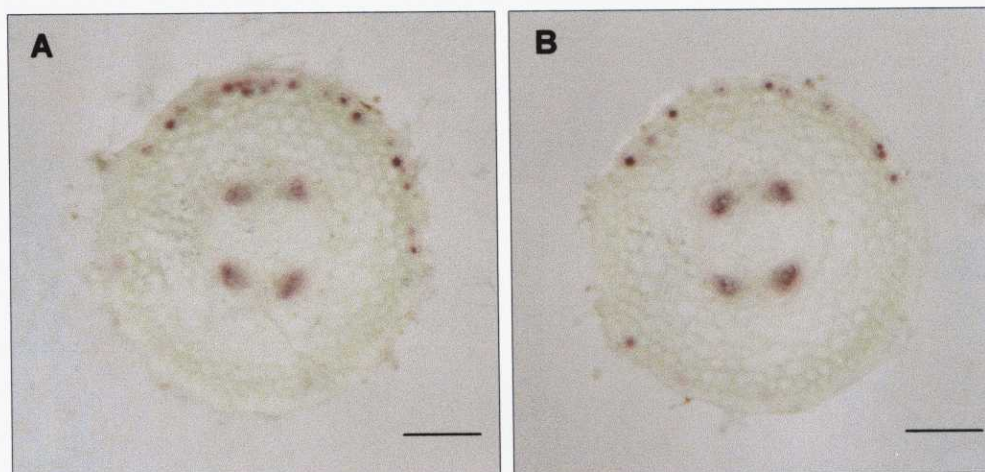


Figura IV. 61.- Localización histoquímica de la actividad peroxidasa en secciones de tallos de *C. annuum* a las 48 horas de la inoculación usando como substrato la siringaldazina. A) Plantas control. B) Plantas inoculadas. Barra= 300 μ m

Como se puede ver en la Figura IV.61, tanto el xilema como los tejidos subepidérmicos de *Capsicum annuum* son capaces de oxidar a la siringaldazina dando como resultado un producto de color rosa-rojizo. Asimismo, no parecen existir diferencias entre las plantas control y las inoculadas, tanto en el grado de tinción como en la localización de la reacción, hecho que confirma que la respuesta de la peroxidasa a la infección con *V. dahliae* es lenta y no aparece hasta que la enfermedad está avanzada.

IV.2.4.- Caracterización de la actividad peroxidasa responsable de la lignificación en *Capsicum annuum*

Para llevar a cabo la caracterización de la actividad peroxidasa responsable de la lignificación se realizaron infiltraciones a vacío de tallos de pimiento de Padrón, en presencia de ClK 1,0 M y CaCl_2 50 mM. Todas las pruebas de inhibición se realizaron con esta fracción de peroxidasa apoplástica.

El primer paso en la caracterización de la actividad peroxidasa fué comprobar el efecto de la azida sódica, inhibidor general de metaloproteínas. En la figura IV.62 se muestra el efecto de la azida sódica sobre la oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa de pimiento.

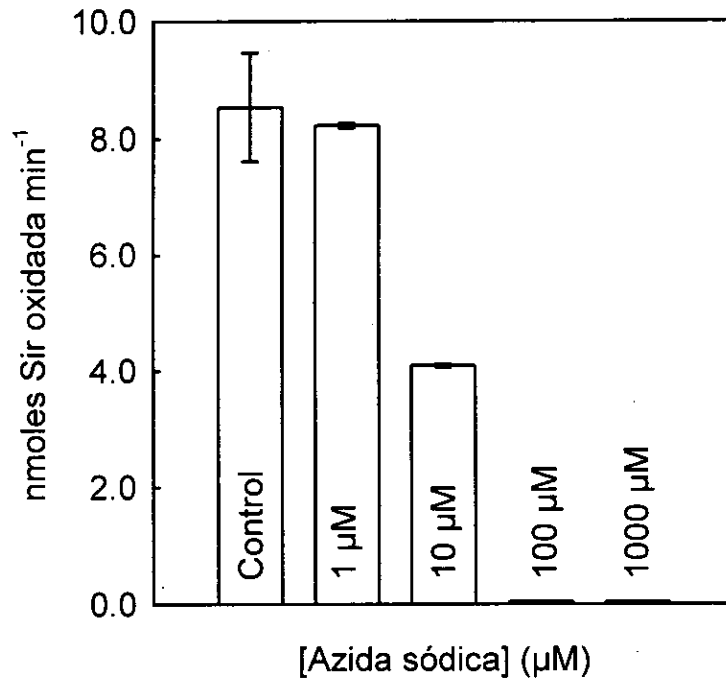


Figura IV.62.- Efecto de la azida sódica sobre la velocidad de oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa de *C. annuum*. El medio de reacción estaba compuesto por H_2O_2 0,5 mM, siringaldazina 50 μM , peroxidasa de *C. annuum* y distintas concentraciones de azida sódica en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. El inhibidor se añadió al medio 1 minuto antes de iniciar la reacción con la adición de la siringaldazina

Como se observa en la gráfica, la azida sódica comienza a tener efecto sobre la actividad siringaldazina-oxidasa a la concentración de 10 μM , concentración a la cual la inhibición es del 50%. A concentraciones de 100 μM y 1000 μM el efecto de la azida es total, y la inhibición es del 100%. El uso de este inhibidor nos permite afirmar que la enzima responsable de la actividad siringaldazina oxidasa es una metaloproteína, característica que poseen las peroxidases. Sin embargo, la azida sódica no es un inhibidor específico de las

peroxidasas, por lo que se hace necesario el uso de otros inhibidores más específicos.

Por este motivo, el siguiente paso en la caracterización de la actividad siringaldazina-oxidasa fue comprobar el efecto de la pareja de inhibidores ácido ferúlico/tropolona, que ya se había usado en el caso de *Z. elegans*.

Recordamos que el ácido ferúlico presenta una alta constante de reacción con el compuesto II de la peroxidasa, siendo uno de los mejores substratos de la peroxidasa. Además, debido a su estructura, presenta una gran capacidad de acomodación en el sitio activo de la enzima (Henriksen y col, 1999). Estas características hacen del ácido ferúlico uno de los mejores inhibidores competitivos de la peroxidasa. La tropolona, por su parte, es un inhibidor selectivo de las actividades de tipo catecol-oxidasa (Chabanet y col, 1994; Udagama-Randeniya y Savidge, 1995), que no tiene efecto sobre las peroxidasas.

En la Figura IV.63 se muestra el efecto del ácido ferúlico sobre la oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa del apoplasto de tallos de pimiento. Como se puede ver en dicha figura, el ácido ferúlico no muestra un efecto significativo sobre la actividad enzimática a concentraciones menores de 100 μM . Sin embargo, a concentraciones de 100 μM la inhibición es patente, siendo del 100% a la concentración de 1000 μM . A esta concentración, el ácido ferúlico no tiene efecto sobre las polifenoloxidasas de tipo lacasa, por lo que podemos descartar que sean estas las responsables de la actividad siringaldazina-oxidasa detectada en el tallo de pimiento.

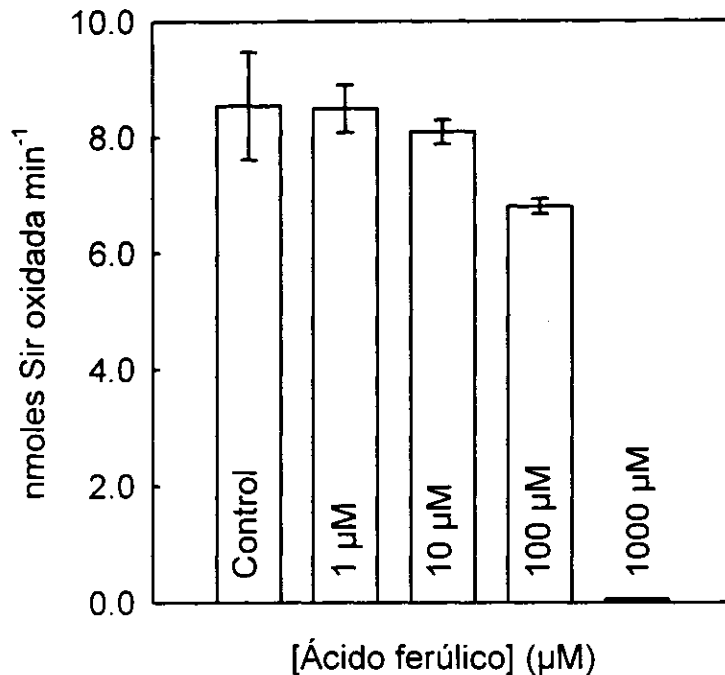


Figura IV.63.- Efecto del ácido ferúlico sobre la velocidad de oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa de *C. annuum*. El medio de reacción estaba compuesto por H₂O₂ 0,5 mM, siringaldazina 50 µM, peroxidasa de *C. annuum* y distintas concentraciones de ácido ferúlico, en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. El inhibidor se añadió al medio 1 minuto antes de iniciar la reacción con la adición de la siringaldazina

En la tabla IV.14. podemos ver el efecto comparado del ácido ferúlico y de la tropolona sobre la oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa del apoplasto del tallo de pimiento

Tabla IV.14.- Efecto del ácido ferúlico y de la tropolona sobre la oxidación de siringaldazina por la peroxidasa del apoplasto de tallos de *C. annuum*.

Inhibidor	Actividad peroxidasa (nmoles S oxidado min ⁻¹)
Control	8,54 ± 0,87 (15)
Ácido ferúlico (1mM)	0,0 ± 0,0 (3)
Tropolona (1mM)	9,5 ± 0,18 (4)

El medio de reacción estaba compuesto por H₂O₂ 0,5 mM, siringaldazina 50 µM, en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. El inhibidor se añadió al medio 1 minuto antes de iniciar la reacción por la adición de la siringaldazina. Los valores son la media ± SE (n)

Como se observa en la tabla IV.14., la tropolona a la concentración de 1 mM no tuvo efecto sobre la actividad siringaldazina-oxidasa, siendo incluso un ligero activador de la actividad enzimática. Este hecho descarta a las catecolasas como las responsables de la actividad siringaldazina oxidasa, en el tallo de pimiento.

Por último, se estudió el efecto del ferrocianuro potásico ($K_4Fe(CN)_6$) sobre la velocidad de oxidación de la siringaldazina por la proteína del apoplasto del tallo de pimiento. Como se ha comentado (IV.1.5.4.), el ferrocianuro potásico es un buen sustrato de la peroxidasa, sobre todo del compuesto I (Henriksen y col., 1999). y puede actuar como un inhibidor competitivo de la enzima. En la Figura IV.64. se muestra el efecto del ferrocianuro potásico sobre la oxidación de la siringaldazina por la proteína del apoplasto del tallo de pimiento.

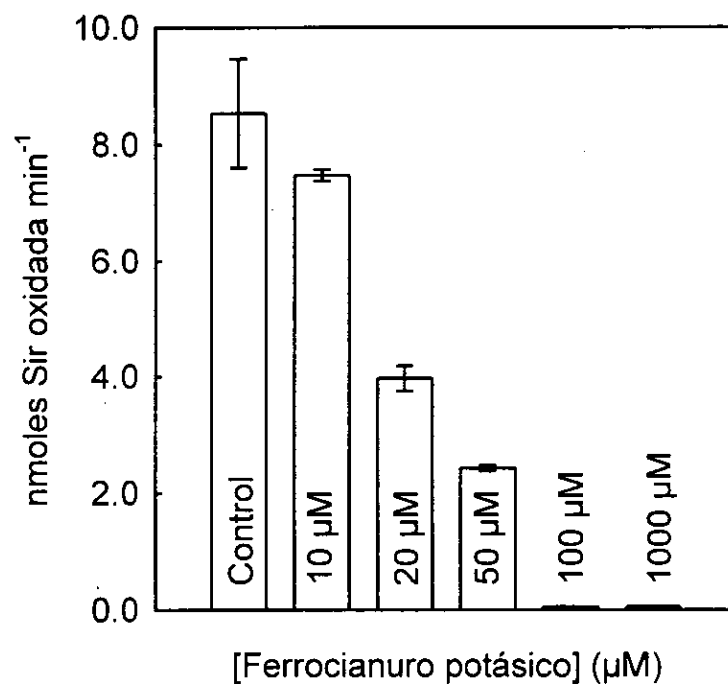


Figura IV.64.- Efecto del ferrocianuro potásico sobre la velocidad de oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa de *C. annuum*. El medio de reacción estaba compuesto por H_2O_2 0,5 mM, siringaldazina 50 μM , peroxidasa de *C. annuum* y distintas concentraciones de ferrocianuro potásico, en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. El inhibidor se añadió al medio 1 minuto antes de iniciar la reacción con la adición de la siringaldazina

Como se puede ver en dicha figura, el ferrocianuro, a la concentración de 10 μM , actúa como inhibidor de la oxidación de la siringaldazina por las proteínas del apoplasto del pimiento, efecto que es del 75% a la concentración de 50 μM . A la concentración de 100 μM el efecto inhibitor es del 100%.

Una vez comprobado el efecto de estos inhibidores sobre la oxidación "*in vitro*" de la siringaldazina, por las proteínas del apoplasto del tallo de pimiento estudiamos su efecto a nivel histoquímico.

En la figura IV.65. se muestra el efecto de los distintos inhibidores sobre la actividad siringaldazina-oxidasa a nivel histoquímico en pimiento. En la Figura IV.65. A se muestra tinción con floroglucinol en medio ácido, que revela la presencia de ligninas a nivel de los tejidos vasculares del xilema. Esta tinción es mucho más intensa en las capas de células más internas (Fig. IV.65 A), donde el proceso de lignificación ya ha tenido lugar y la lignina es más abundante. En las células próximas al cambium vascular la tinción es menos intensa debido a una menor cantidad de ligninas, ya que en esta zona la lignificación esta teniendo aún lugar.

En la Figura IV.65. B una tinción con siringaldazina. El teñido está restringido a las primeras filas de células, las más próximas al cambium vascular (Fig. IV.65 B). Estas filas de células coinciden con las menos teñidas con el reactivo de floroglucinol y son aquellas donde el proceso de lignificación es activo. Esto nos indica que la actividad siringaldazina oxidasa que detectamos presenta una colocalización con el proceso de lignificación, por lo que la enzima responsable de esta actividad enzimática probablemente esté implicada en la formación de las ligninas. El siguiente paso fue determinar la naturaleza de esta actividad enzimática mediante el uso de inhibidores específicos.

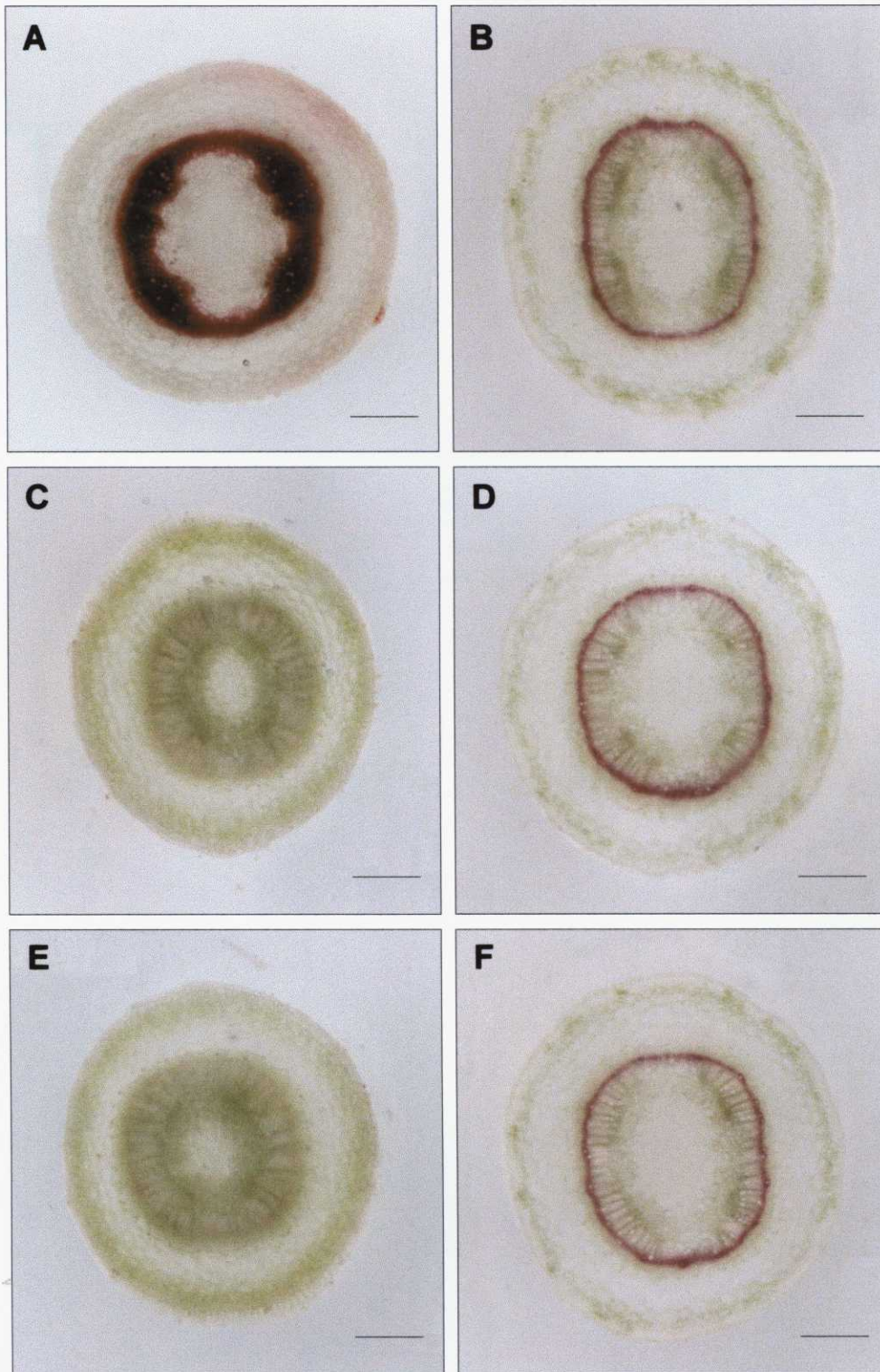


Figura IV. 65.- A) Localización histoquímica de ligninas en tallos de *C. annuum* usando el reactivo floroglucinol en medio ácido. B) Sección teñida con siringaldazina. C) Sección teñida con Sir en presencia de ácido ferúlico 1 mM. D) Sección teñida con Sir en presencia de tropolona 1 mM. E) Sección teñida con Sir en presencia de ferrocianuro potásico 1 mM. F) Sección teñida con Sir en presencia de ferricianuro potásico 1 mM. Barra= 300 μ m

En la figura IV.65. C se observa el efecto del ácido ferúlico sobre la tinción con siringaldazina. Como se ha comentado, el ácido ferúlico es un excelente inhibidor de la peroxidasa y a la concentración usada (1mM) no muestra efecto sobre las polifenoloxidasas de tipo lacasa (Sterjiades y col., 1992; Chabanet y col., 1994; Ranocha, y col., 1999), por lo que del resultado de esta inhibición podemos descartar a estas enzimas como las responsables de la actividad siringaldazina-oxidasa presente en el xilema lignificante de *C. annuum*. El efecto inhibitor del ácido ferúlico se puede observar con mayor detalle en la Figura IV.66.

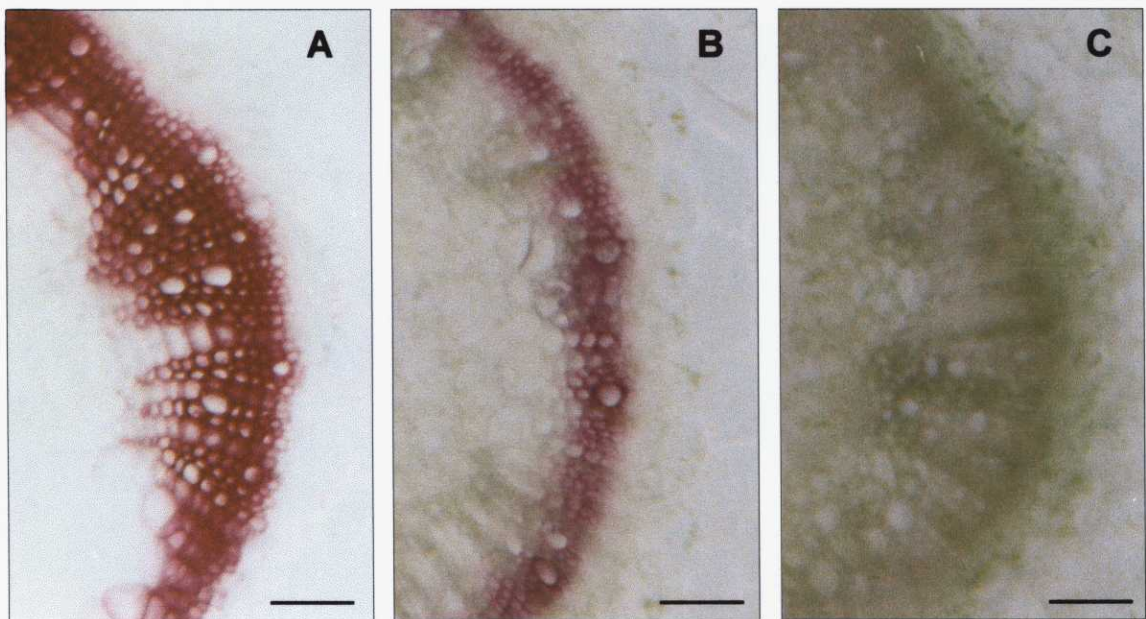


Figura IV. 66.- A) Localización histoquímica de ligninas usando el reactivo de floroglucinol en medio ácido. B) Sección teñida con siringaldazina. C) Sección teñida con siringaldazina en presencia de ácido ferúlico 1 mM.

Sin embargo, el ácido ferúlico se ha descrito también como inhibidor de la actividad catecolasa de las polifenoloxidasas (Udagama-Randeniya y Savidge, 1995; Richardson y col., 1997), por lo que estos resultados no nos permiten discernir entre la peroxidasa y las catecolasas como las responsables de este proceso. Para ello, se utilizó la tropolona. En la Figura IV.65 D se ve el

efecto de la tropolona sobre la tinción con siringaldazina. Como se observa en dicha figura la tropolona a la concentración de 1 mM no tuvo efecto sobre la tinción. Este resultado nos permite descartar a las polifenoloxidasas de tipo catecolasa como las responsables de la oxidación de la siringaldazina, e indica que la enzima responsable es la peroxidasa.

Con el fin de confirmar la naturaleza peroxidasa de la actividad siringaldazina oxidasa detectada histoquímicamente, usamos también el ferrocianuro potásico a la concentración 1 mM. (Figura IV.65 E). El ferrocianuro a esta concentración inhibe completamente la tinción observada. Asimismo, el ferricianuro potásico (Fig. IV.65 F), no tuvo efecto sobre la tinción, lo que confirma que el efecto observado con el ferrocianuro es debido a su papel como substrato alternativo de la peroxidasa.

IV.2.5.- Efecto de la inoculación con *Verticillium dahliae* sobre las ligninas de plantas de *Capsicum annuum*

Todos los resultados obtenidos hasta el momento parecen apuntar hacia una relación entre el incremento en la actividad peroxidasa y cambios en los procesos de lignificación, ya que una de las isoenzimas que aumentan su expresión parece estar implicada en los procesos de lignificación, y los mayores aumentos de actividad enzimática se observan cuando se usa la siringaldazina como substrato, sustancia análoga a los substratos de lignificación con grupos siringilo. Es por todo ello, que se hace necesario estudiar la influencia de la inoculación con *V. dahliae* en la presencia y composición de las ligninas de las plantas de pimiento.

Como se puede observar en la Figura IV.67, correspondiente a la tinción de dos secciones de tallo de pimiento de plantas control de 21 días, con el reactivo MnO_4K (Fig. IV.67 A) y con el reactivo floroglucinol (Fig. IV.67 B), la lignina se acumula a nivel de los vasos del xilema.

Como ya vimos en el apartado IV.1.1., el hecho de que la lignina de pimiento se tiña usando MnO_4K nos revela la presencia en su estructura de

grupos de tipo siringilo, ya que este reactivo es específico para este tipo de grupos. Asimismo, la tinción con floroglucinol, nos indica la presencia en la matriz de la lignina de grupos terminales cinamaldehído, o bien de grupos cinamaldehídos libres.

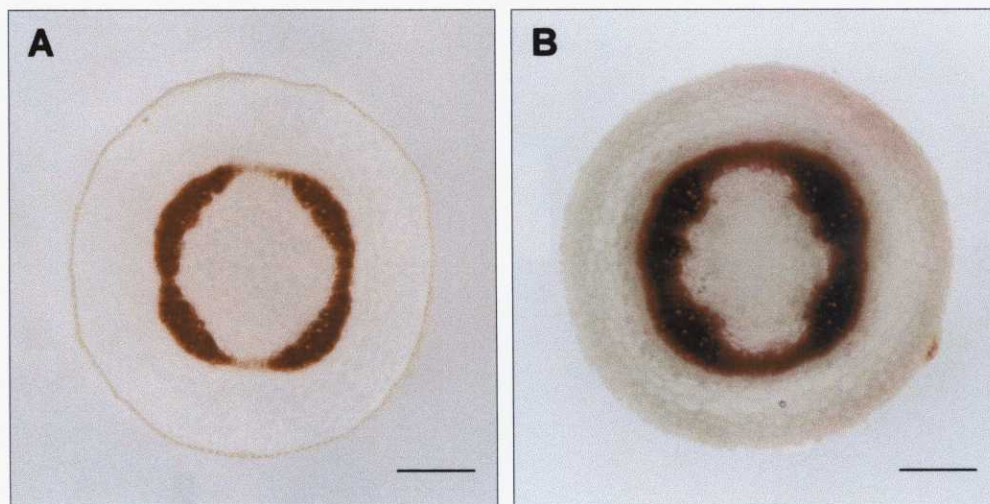


Figura IV.67.- Localización histoquímica de las ligninas en secciones de tallos de *C. annuum* A) Tinción usando el reactivo MnO_4K . B) Tinción usando el reactivo floroglucinol. Barra= 300 μm

IV.2.5.1.- Variación en la cantidad de ligninas

Una vez que hemos comprobado la presencia en los vasos del xilema de una lignina que presenta, como era de esperar, grupos siringilo y grupos aldehído en su estructura, nos dispusimos a estudiar el efecto que tenía la inoculación con *Verticillium dahliae* sobre la cantidad de lignina que se acumula en los distintos órganos del pimiento. Para ello utilizamos el método del bromuro de acetilo.

En la Figura IV.68. se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de las ligninas. En el caso de las raíces (Fig. IV.68 A), a tiempos cortos tras la inoculación no aparecen cambios significativos entre la cantidad de lignina presente en las plantas control y las inoculadas. A partir del día 21 tras la inoculación, parece detectarse un descenso en la cantidad de lignina de las plantas inoculadas, pero en ningún momento las diferencias pueden

considerarse significativas, y nos inclinamos a pensar en que son producto de la variabilidad propia del experimento. En el caso de los tallos (Fig. IV.68 B) el comportamiento es distinto, así a tiempos cortos no se detecta cambio ninguno entre las plantas control y las inoculadas, sin embargo, ya a partir de los 14 días tras la inoculación las plantas inoculadas ven aumentada su cantidad de ligninas. Estos aumentos se mantienen a los 21 días, alcanzando un máximo a los 28 días de la inoculación. Por último, el análisis de las hojas dio como resultado la ausencia de variaciones en las primeras etapas después de la inoculación, apareciendo ya diferencias significativas a los 21 días, diferencias que se hacen mucho mayores a los 28 días.

Los procesos de lignificación, y en general todos aquellos encaminados al reforzamiento de la pared celular, juegan un papel fundamental en la respuesta de las plantas ante la invasión por parte de hongos patógenos (Ride, 1983; Vance y col., 1980). Existen un gran número de trabajos en los cuales se detectan desde la formación de papilas lignificadas en los lugares de penetración del hongo, hasta la lignificación como respuesta hipersensible en células invadidas (Berdmore y col., 1983).

La participación de la lignina y de los polímeros similares a la lignina en las reacciones de resistencia ha sido estudiada usando diversas estrategias experimentales, como la utilización de técnicas histoquímicas (Maüle y Ride, 1982), la determinación del contenido en lignina (Ride, 1975) o la incorporación de precursores de lignina marcados radiactivamente (Berdmore y col., 1983).

Smit y Dubery (1997) trabajando con hipocotilos de algodón, pudieron observar como tras la exposición a un elicitador de *V.dahliae* tenía lugar un incremento en la síntesis y deposición de ligninas y polímeros similares a la lignina. La fase de lignificación activa estaba precedida por un incremento de ciertas actividades como la fenilalanina amonio liasa (PAL), la cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) y las peroxidasas asociadas a la pared celular. Además estudiaron la respuesta de dos cultivares, uno resistente y otro susceptible a *V. dahliae*, observando que el cultivar resistente presentaba una respuesta más rápida e intensa que el susceptible. A partir de estos resultados, estos autores

propusieron la existencia de una correlación directa entre la velocidad e intensidad de la acumulación de polímeros similares a la lignina y la tolerancia o resistencia ante *V. dahliae*.

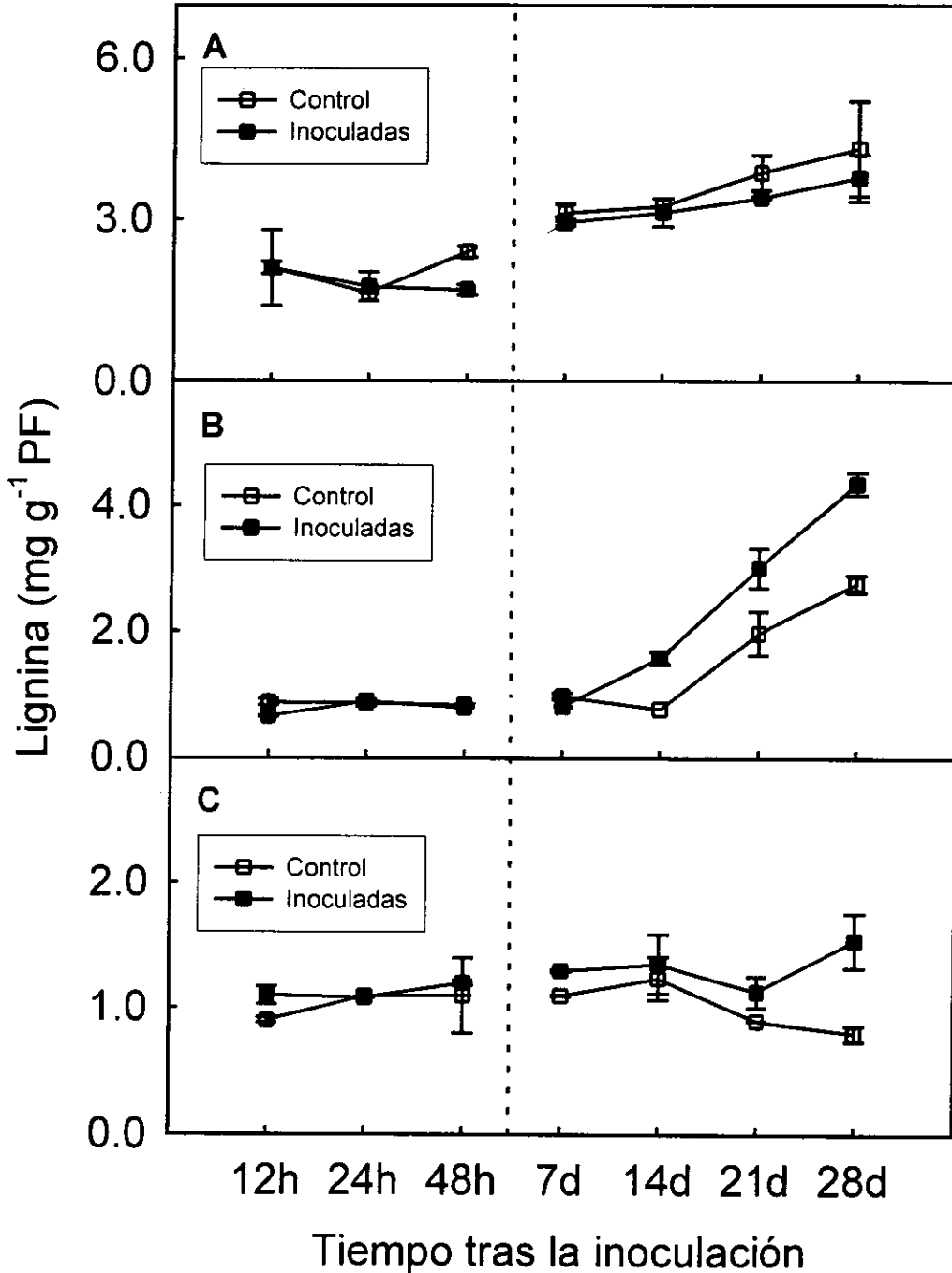


Figura IV.68.- Evolución, con el tiempo del contenido de ligninas en plantas de *Capsicum annuum* tras la inoculación con *V. dahliae*. A) Raíces. B) Tallos. C) Hojas. Los datos son la media de tres experimentos independientes

De la misma forma, Vance y col. (1976) habían observado como plantas de *Phalaris arundinacea* L. inoculadas con *Helminthosporium avenae* Eidam presentaban un incremento en la actividad peroxidasa total, induciéndose la expresión de tres isoenzimas catódicas, todo ello asociado a un rápido aumento en la lignificación. Aplicando cicloheximida, un inhibidor síntesis de proteínas, toda la respuesta se paralizaba y el hongo era capaz de penetrar en la planta aun cuando se usaban cepas no patógenas.

Como se ha descrito en la mayoría de los casos, el incremento en la lignificación y en la actividad de las enzimas implicadas están relacionados con procesos de resistencia, y en muchas ocasiones son respuestas muy rápidas formando parte incluso parte de la respuesta hipersensible. En nuestro caso, los incrementos observados son muy similares a los de otros autores tanto en la lignina como en la actividad peroxidasa, sin embargo no se producen rápidamente, y de hecho en nuestra interacción no aparece un fenómeno de resistencia, ya que aunque la planta no se muere, por lo menos en el periodo estudiado, sí manifiesta todos los síntomas de la enfermedad.

IV.2.5.2.- Tioacidolisis de paredes celulares de plantas control e inoculadas

Muchos estudios sobre la respuesta de las plantas a la infección con hongos patógenos detectan un cambio en la resistencia de las paredes celulares a la maceración enzimática (Berdmore y col., 1983; Bird y Ride, 1981), lo que induce a pensar en un cambio a nivel de la estructura o composición de las ligninas, y no solo en un aumento cuantitativo de las mismas. Por ello, decidimos analizar la composición de las ligninas de tallos de plantas control e inoculadas, después de 21 días de la inoculación, usando la técnica de la tioacidolisis y el posterior análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas.

Como se puede observar en la Figura IV.69, correspondiente al cromatograma obtenido para los productos de tioacidolisis de paredes celulares de plantas control, aparecen gran cantidad de picos, lo que hace pensar que existe un alto número de enlaces susceptibles a este tratamiento.

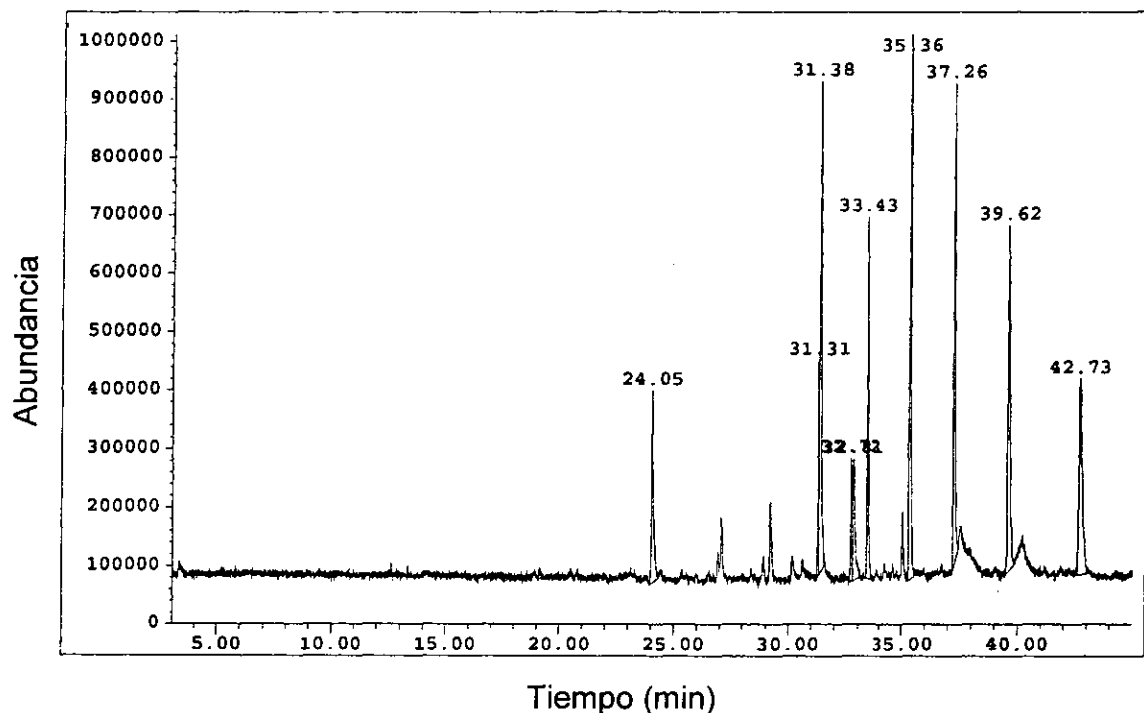


Figura IV. 69.- Cromatograma de gases de los productos de tioacidolisis de paredes celulares de plantas control de *C. annuum*

La figura IV.70 nos permite observar con mayor detalle los picos obtenidos a partir del minuto 20, señalándose con una flecha aquellos que pudieron ser identificados por medio de la espectrometría de masas.

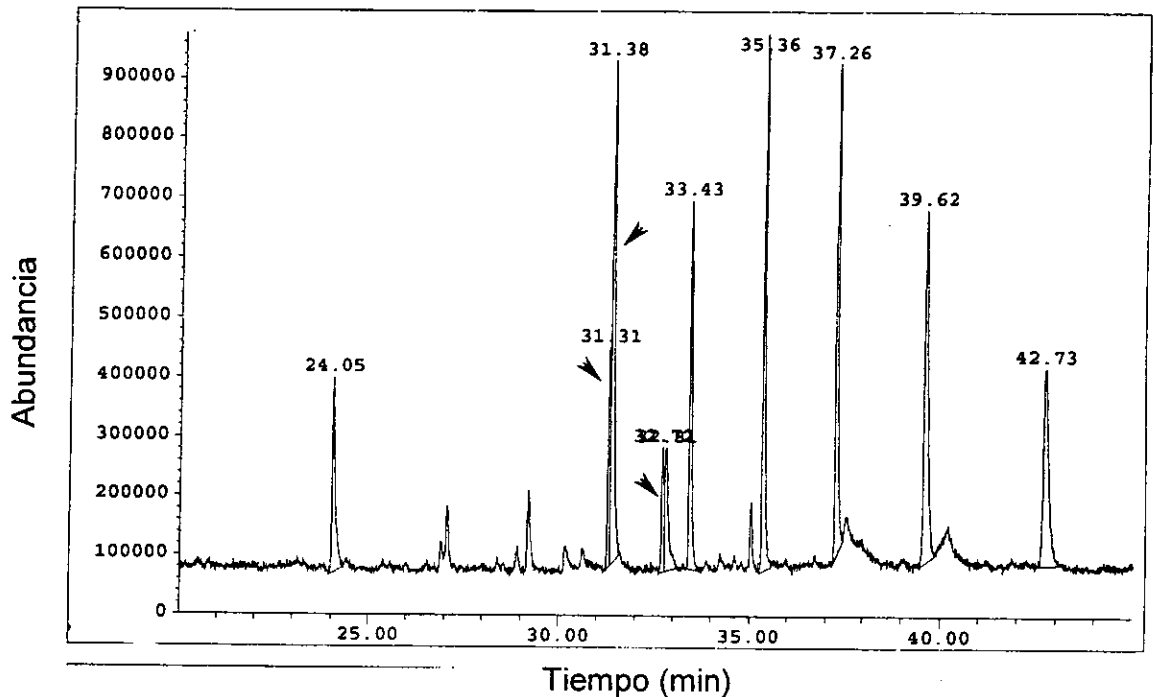


Figura IV.70.- Cromatograma de gases de los productos de tioacidolisis de paredes celulares de plantas control (ampliación a partir del minuto 20). Las flechas indican aquellos picos identificados por espectrometría de masas

En la Figura IV.71, vemos el espectro de masas del pico correspondiente al tiempo de retención de 31,38 minutos. Este pico presenta como fragmento mayoritario el de $m/z=269$, apareciendo también fragmentos de m/z a 73, 295, 209, 135 y otros en menor porcentaje. La presencia de estos fragmentos y su abundancia relativa, cuando se compara con la bibliografía (Higuchi, 1994), nos hacen pensar que este pico corresponde al monómero tioetilado del coniferilaldehído que se presenta en la parte superior derecha de la figura. Este monómero se obtendría a partir de un grupo terminal coniferilaldehído unidos por enlaces O-4.

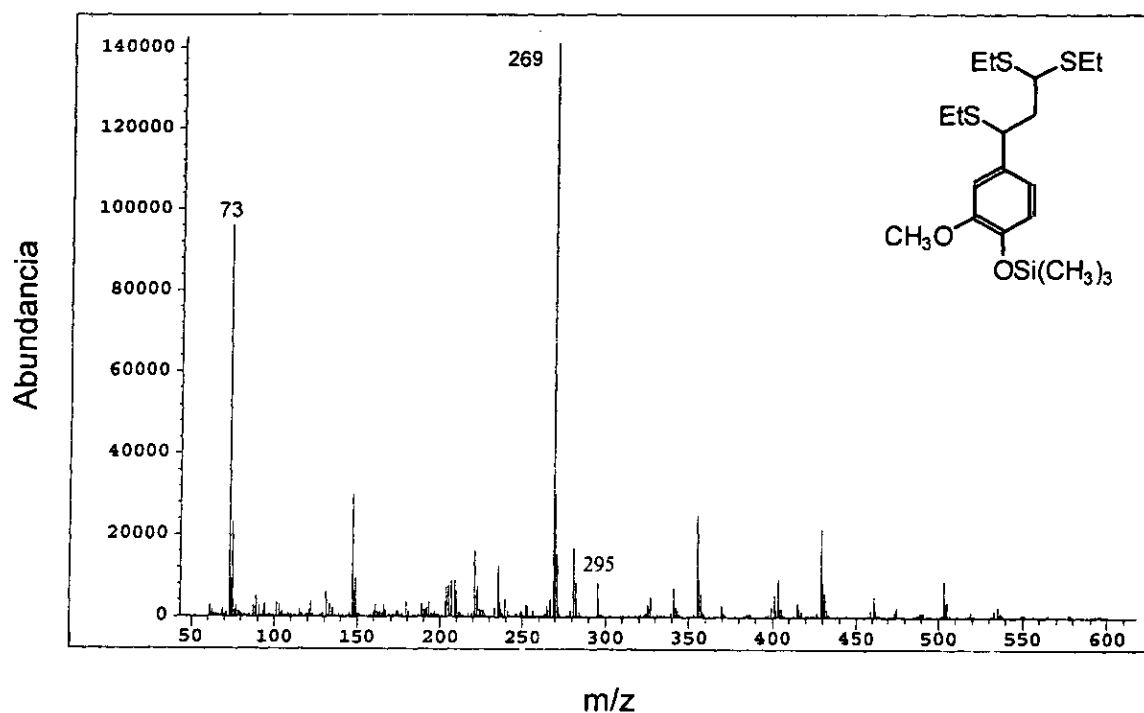


Figura IV.71.- Espectro de masas obtenido del pico con tiempo de retención de 31,38 minutos. En la esquina superior derecha se representa la estructura del monómero identificado.

El pico con tiempo de retención de 31,31 minutos, cuyo espectro de masas se presenta en la Figura IV.72, contiene también como fragmento mayoritario el de $m/z = 269$ y asimismo el de 73 pero éste en una menor abundancia relativa. La comparación de este espectro de masas con los datos por la bibliografía (Higuchi, 1994), nos inclinan a pensar que se trata del monómero tioetiolado del alcohol coniferílico que se presenta en la esquina superior de la figura.

Este monómero tioetiolado del alcohol coniferílico provendría de unidades estructurales del alcohol coniferílico del tipo arilglicerol- β -arileter.

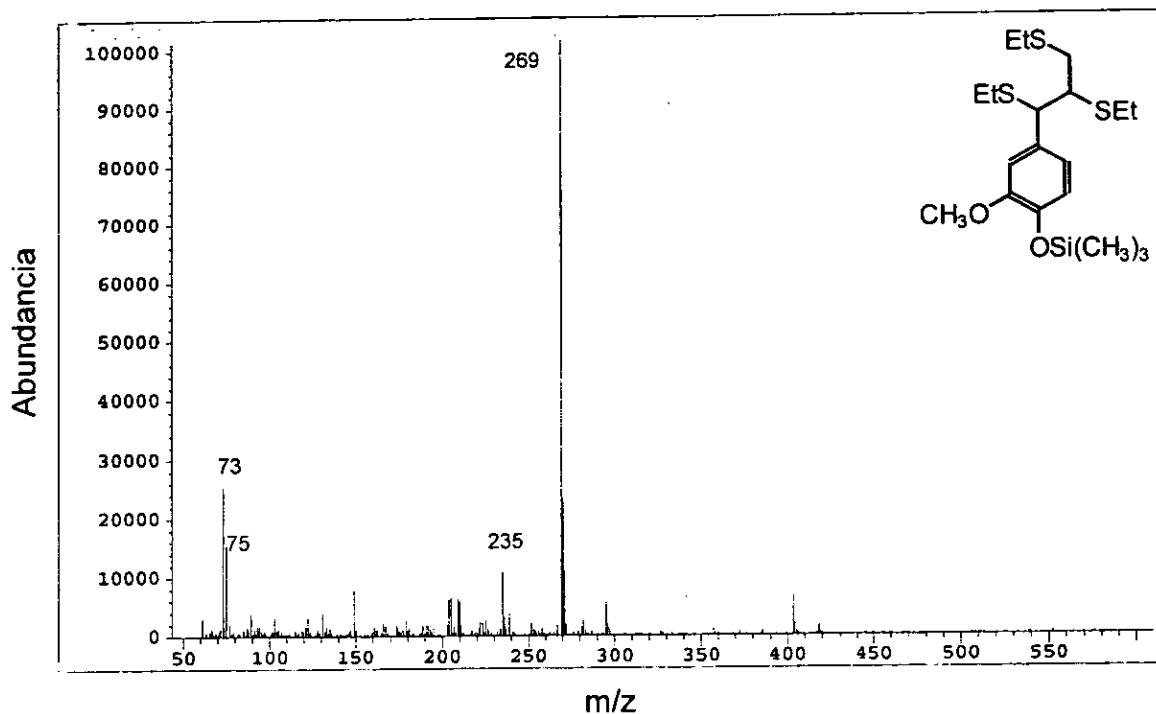


Figura IV.72.- Espectro de masas obtenido del pico con tiempo de retención de 31,31 minutos. En la esquina superior derecha se representa la estructura del monómero identificado

Finalmente, también se identificó el pico con tiempo de retención de 32,72 minutos, cuyo espectro de masas se presenta en la Figura IV.73.

En este último caso, el fragmento mayoritario fue el de $m/z = 299$ apareciendo también los fragmentos a $m/z 73$ y a 265 . Comparando estos resultados con la bibliografía existente (Higuchi, 1994), podemos deducir que este pico corresponde al monómero tioetilado del alcohol sinapílico cuya estructura se representa en la parte superior derecha de la figura.

Este monómero tioetilado del alcohol sinapílico provendría de unidades estructurales del alcohol sinapílico del tipo arilglicerol- β -ariléter.

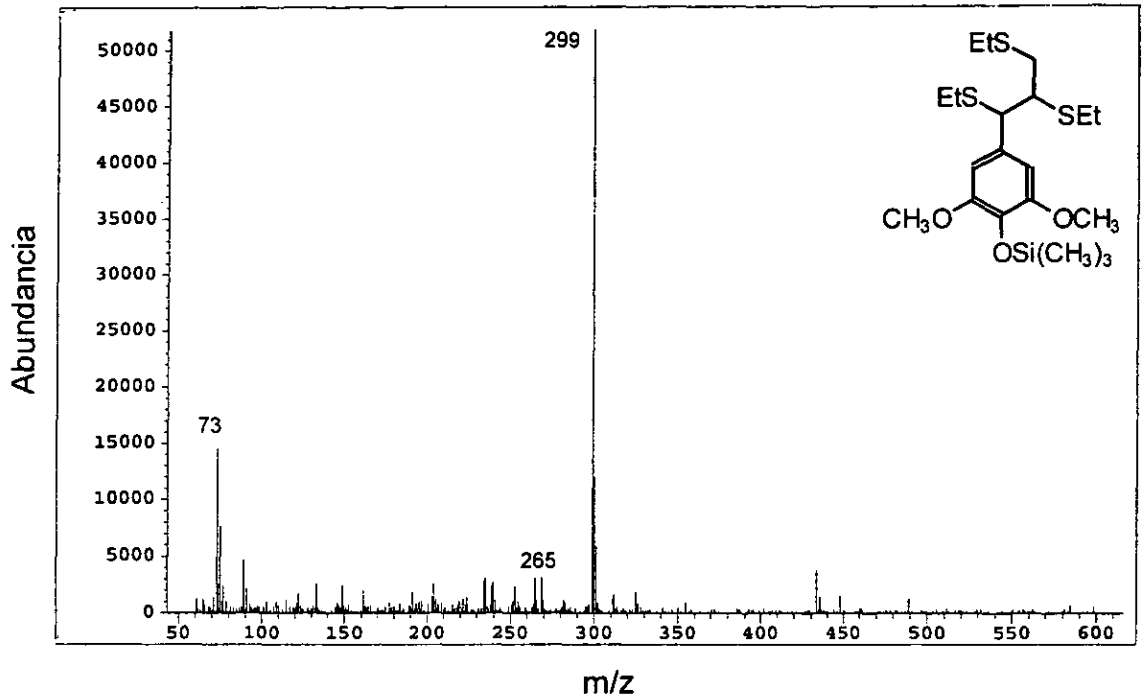


Figura IV.73.- Espectro de masas obtenido del pico con tiempo de retención de 32,72 minutos. En la esquina superior derecha se representa la estructura del monómero identificado

En resumen, el análisis por medio de la tioacidolisis de paredes celulares de plantas control de *Capsicum annuum*, nos ha permitido identificar la presencia de estructuras arilglicerol- β -ariléter derivadas de los alcoholes coniferílico y sinapílico, y la presencia de cantidades significativas de monómeros derivados de grupos terminales del coniferilaldehído (Tabla IV. 15.)

Como ya habíamos visto para *Z. elegans*, la tioacidolisis y posterior cromatografía de gases-espectrometría de masas permite, además de la identificación de ciertos componentes, el cálculo de la relación entre grupos guayacilo y siringilo en la fracción lineal arilglicerol- β -ariléter. En el caso de las paredes celulares de plantas control el resultado que obtuvimos fue el de una relación G/S de 70/30.

Tabla IV.15.- Resultados del análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas de los productos de tioacidolisis de las paredes celulares de plantas de pimiento control

m/z (experimental)	m/z (bibliográfico) (Higuchi y col, 1994)	Monómero	Estructura original en la lignina
269 (100), 73 (63), 295 (6), 209 (4), 239 (3), 135 (1), 192 (1), 418 (1)	269 (100), 73 (50), 295 (9), 209 (5), 239 (5), 135 (60), 192 (5), 418 (8),	G-CHSEt-CH ₂ -CH(SET) ₂	Grupos terminales coniferilaldehído unidos por enlaces O-4
269 (100), 73 (28), 75 (18), 235 (10), 418 (1)	269 (100), 73 (23), 75 (19), 235 (9), 418 (1)	G-CHSEt-CHSEt-CH ₂ SEt	Estructuras C6C3 arilglicerol-β-arileter derivados del alcohol coniferílico
299 (100), 73 (22), 265 (8), 448 (3)	299 (100), 73 (23), 265 (8), 448 (3)	S-CHSEt-CHSEt-CH ₂ SEt	Estructuras C6C3 arilglicerol-β-arileter derivados del alcohol sinápilico

Al igual que para las plantas control, se realizó un análisis de las ligninas presentes en los tallos de plantas inoculadas, a los 21 días de la inoculación, obteniéndose el cromatograma que aparece en la figura IV. 74.

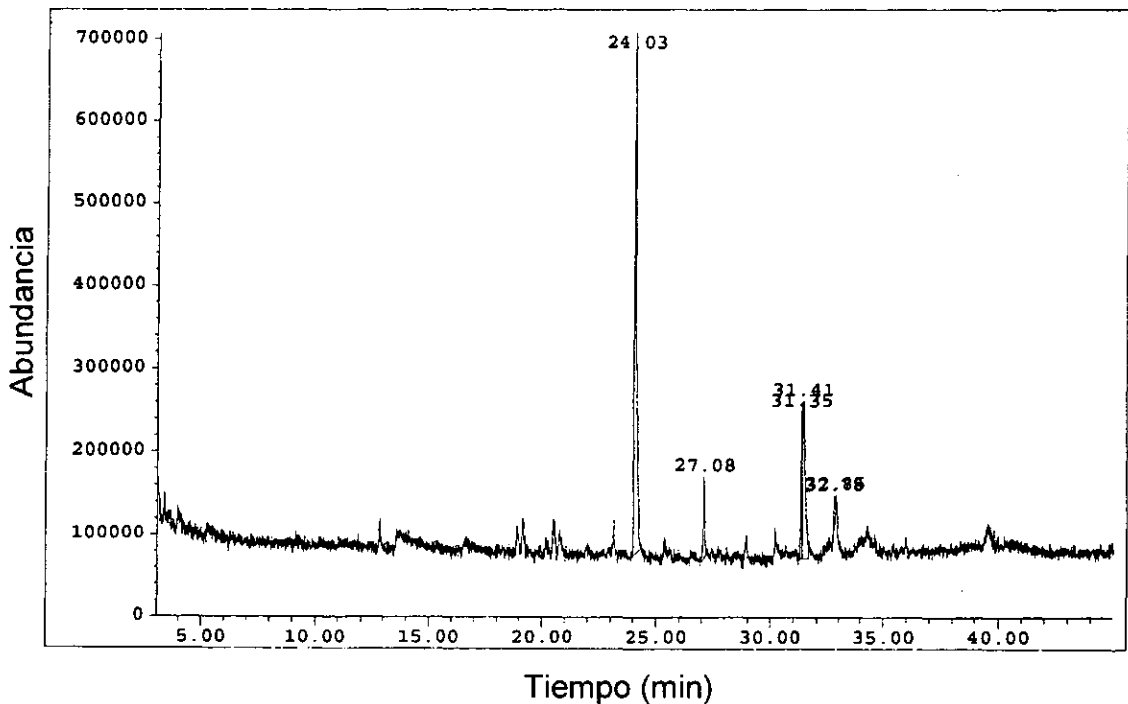


Figura IV. 74.- Cromatograma de gases de los productos de tioacidolisis de paredes celulares de plantas inoculadas, de *C. annuum*

Como se observa en la figura, el número de picos obtenidos es menor que en el caso de las plantas control, lo que indica que la inoculación provoca una disminución en la cantidad de enlaces susceptibles a la tioacidolisis.

La Figura IV.75 nos permite observar con mayor detalle los picos obtenidos a partir del minuto 20, señalándose con una flecha aquellos que pudieron ser identificados por medio de la espectrometría de masas.

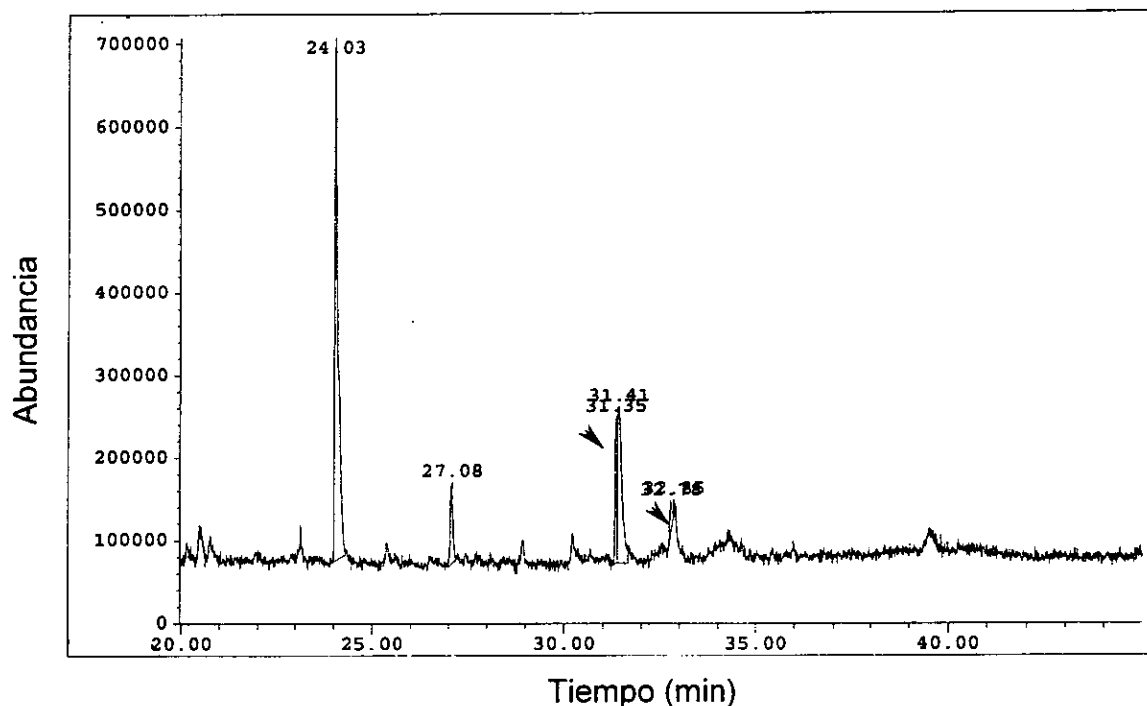


Figura IV. 75.- Cromatograma de gases de los productos de tioacidolisis de paredes celulares de plantas inoculadas (ampliación a partir del minuto 20). Las flechas indican aquellos picos identificados por espectrometría de masas

El pico con tiempo de retención de 31,35 minutos presentó un espectro de masas (Fig. IV. 76), caracterizado por un fragmento mayoritario con un $m/z=269$, apareciendo también fragmentos con $m/z 73$ en una abundancia relativa del 29% y otros fragmentos, en menor proporción como $m/z 75$ y 235. La comparación de este espectro con los observados en la bibliografía existente (Higuchi, 1994) nos hace pensar que se trata del monómero tioetilado del alcohol coniferílico que se presenta en la esquina superior de la figura.

Este monómero tioetilado del alcohol coniferílico provendría de unidades del alcohol coniferílico del tipo arilglicerol- β -ariléter.

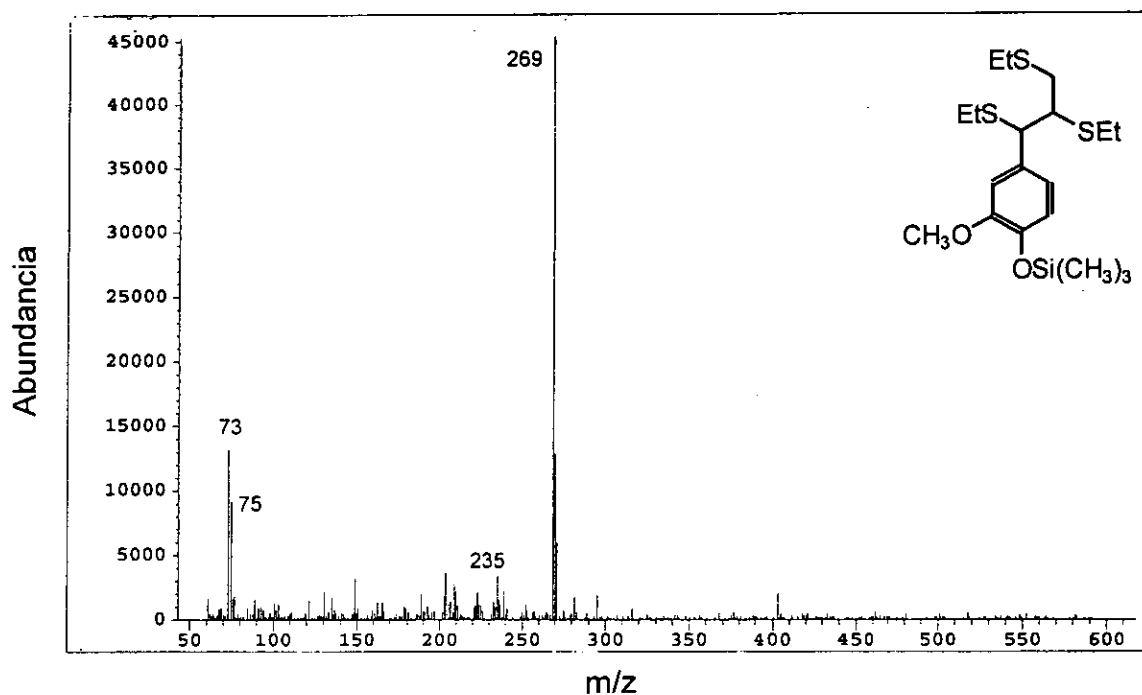


Figura IV. 76.- Espectro de masas obtenido del pico con tiempo de retención de 31,35 minutos. En la esquina superior derecha se representa la estructura del monómero identificado

Asimismo, hemos identificado el pico con un tiempo de retención de 32,75 minutos, cuyo espectro de masas se presenta en la Figura IV.77. En este caso, el fragmento mayoritario fue uno con $m/z= 299$, apareciendo también los fragmentos con m/z a 73 y 265. La comparación de este espectro con los observados en la bibliografía existente (Higuchi, 1994) nos hace pensar que se trata del monómero tioetilado del alcohol sinapílico que se presenta en la esquina superior de la figura.

Este monómero tioetilado del alcohol sinapílico provendría de unidades del alcohol sinapílico del tipo arilglicerol- β -ariléter.

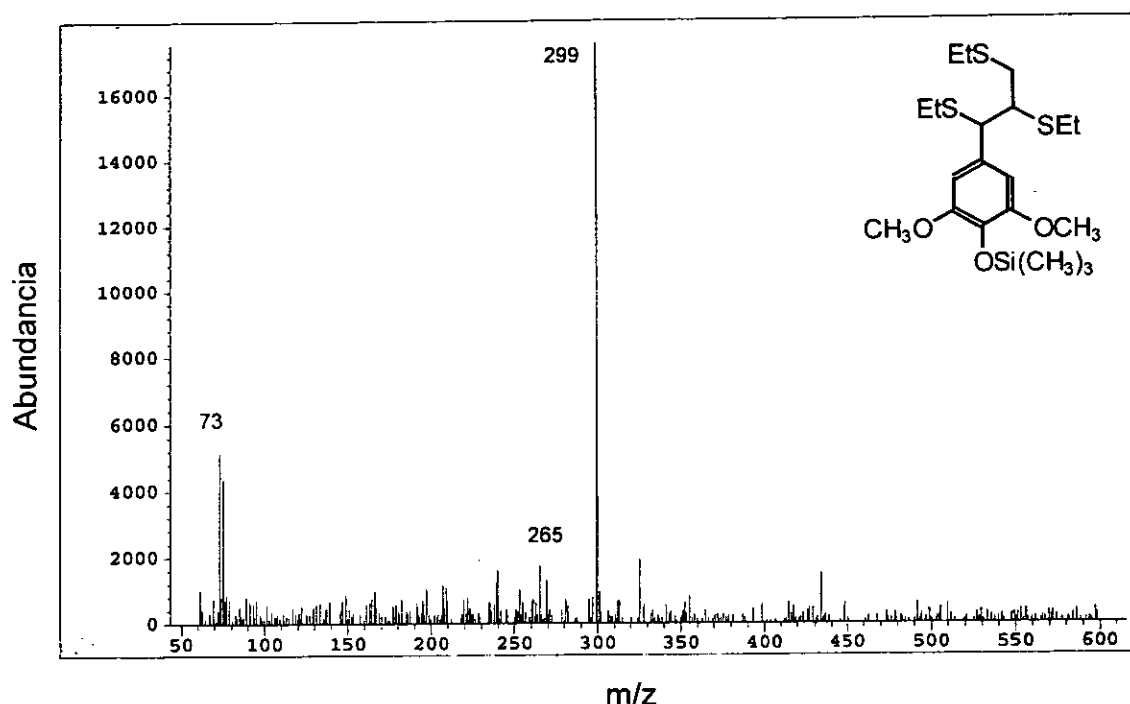


Figura IV. 77.- Espectro de masas obtenido del pico con tiempo de retención de 32,75 minutos. En la esquina superior derecha se representa la estructura del monómero identificado

El análisis por medio de la tioacidólisis de paredes celulares de plantas de *C. annuum* inoculadas con *V. dahliae*, nos ha permitido identificar la presencia de los monómeros derivados de los alcoholes coniferílico y sinapílico presentes en estructuras arilglicerol- β -ariléter. En este caso no hemos podido identificar la presencia de ningún cinamaldehído, aunque no descartamos que estén presentes (Tabla IV. 16)

Tabla IV.16.- Resultados del análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas de los productos de tioacidólisis de paredes celulares de plantas de pimiento inoculadas

m/z (experimental)	m/z bibliográfico (Higuchi y col, 1994)	Monómero	Estructura original en la lignina
269 (100), 73 (29), 75 (20), 235 (7), 418 (1)	269 (100), 73 (23), 75 (19), 235 (9), 418 (1)	G-CHSEt-CHSEt-CH ₂ SEt	Estructuras C6C3 arilglicerol- β -ariléter derivadas del alcohol coniferílico
299 (100), 73 (28), 265 (10), 448 (3)	299 (100), 73 (23), 265 (8), 448 (3)	S-CHSEt-CHSEt-CH ₂ SEt	Estructuras C6C3 arilglicerol- β -ariléter derivadas del alcohol sinapílico

El cálculo de la relación entre grupos guayacilo y siringilo en la fracción lineal arilglicerol- β -ariléter en las ligninas de plantas inoculadas dió como resultado una relación G/S de 80/20. Comparando este valor con el obtenido para las plantas control, observamos que tras la inoculación con *V. dahliae* se produce un incremento en la proporción de los grupos guayacilo. Los grupos siringilo poseen un sustituyente metoxilo en el carbono 5 del anillo aromático que no aparece en el caso de las estructuras de tipo guayacilo. La ausencia de este sustituyente permite a los grupos guayacilo formar parte en enlaces que impliquen al carbono 5 dando lugar a estructuras de lignina más compactas que en el caso de los grupos siringilo. Esta es la razón por la que las ligninas de las maderas con mayor proporción en grupos siringilo son más fácilmente hidrolizadas durante el proceso industrial de la obtención de papel, que las ligninas de las maderas con menor proporción en grupos siringilo (Chiang y Funaoka, 1990).

La mayor presencia de grupos guayacilo en las ligninas de las plantas inoculadas, conjuntamente con una menor proporción de enlaces débiles susceptibles a la tioacidolisis del tipo β -O-4, hecho que se manifiesta en el menor número de picos presentes en el cromatograma, confiere a estas ligninas un carácter más compacto que las de las plantas control. Este hecho podría jugar un importante papel a la hora de impedir o dificultar el avance del hongo fitopatógeno una vez que ha infectado a la planta de pimiento.

IV.2.6.- Evolución de la actividad peroxidasa a lo largo del proceso de infección usando sustratos de lignificación

Tras haber detectado que la infección de plantas de pimiento de Padrón con el hongo *V. dahliae* provocaba un aumento en los niveles de la actividad peroxidasa, y que este aumento se ve acompañado por un incremento también en la cantidad de lignina, decidimos comprobar la capacidad de la peroxidasa de pimiento de oxidar los precursores de la lignina, y seguir su evolución a lo largo del proceso de infección.

Los resultados obtenidos, que se muestran de la Figura IV.78 a la IV.81, son similares para todos los sustratos. Así, en las raíces no se detectan cambios en la actividad en las primeras horas tras la inoculación, sin embargo, a partir del día 14 las plantas inoculadas presentan un mayor nivel de actividad que las plantas control, aumentando esta diferencia según avanzan los días hasta alcanzar un máximo a los 28 días tras la inoculación.

En el caso de los tallos, tampoco a tiempos cortos se detectan cambios de actividad, apareciendo éstos a partir del día 21, alcanzándose la máxima diferencia de actividad entre las plantas control y las inoculadas a los 28 días.

Por último, las hojas presentan los aumentos menos acusados de actividad. A tiempos cortos, igual que en los otros dos órganos no existen cambios significativos, sin embargo a partir de los 21 días las plantas inoculadas presentan mayores niveles de actividad que las plantas control.

Los resultados observados, independientemente del alcohol o aldehídos utilizados como sustratos, además son muy similares a los obtenidos cuando se usaban sustratos artificiales como el 4MN, la TMB o la Sir.

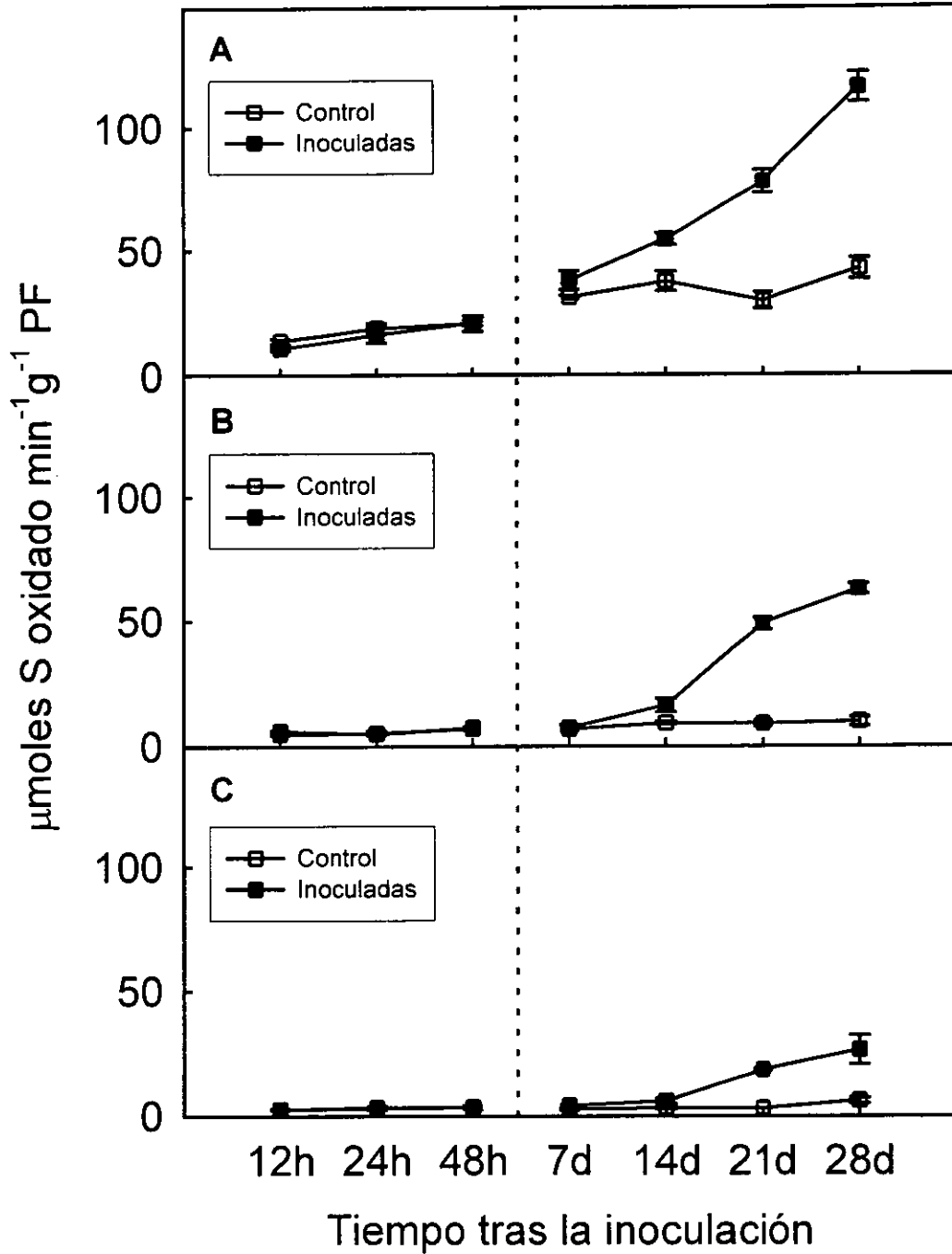


Figura IV.78.- Evolución a lo largo del tiempo de la actividad peroxidasa medida con alcohol coniferílico como sustrato en plantas de *Capsicum annuum* inoculadas con *V. dahliae* y en plantas control. A) Raíces. B) Tallos. C) Hojas. El medio de reacción contenía peroxidasa de *C. annuum*, H_2O_2 0,5 mM, alcohol coniferílico 0,1 mM en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. Los datos son la media de tres experimentos independientes

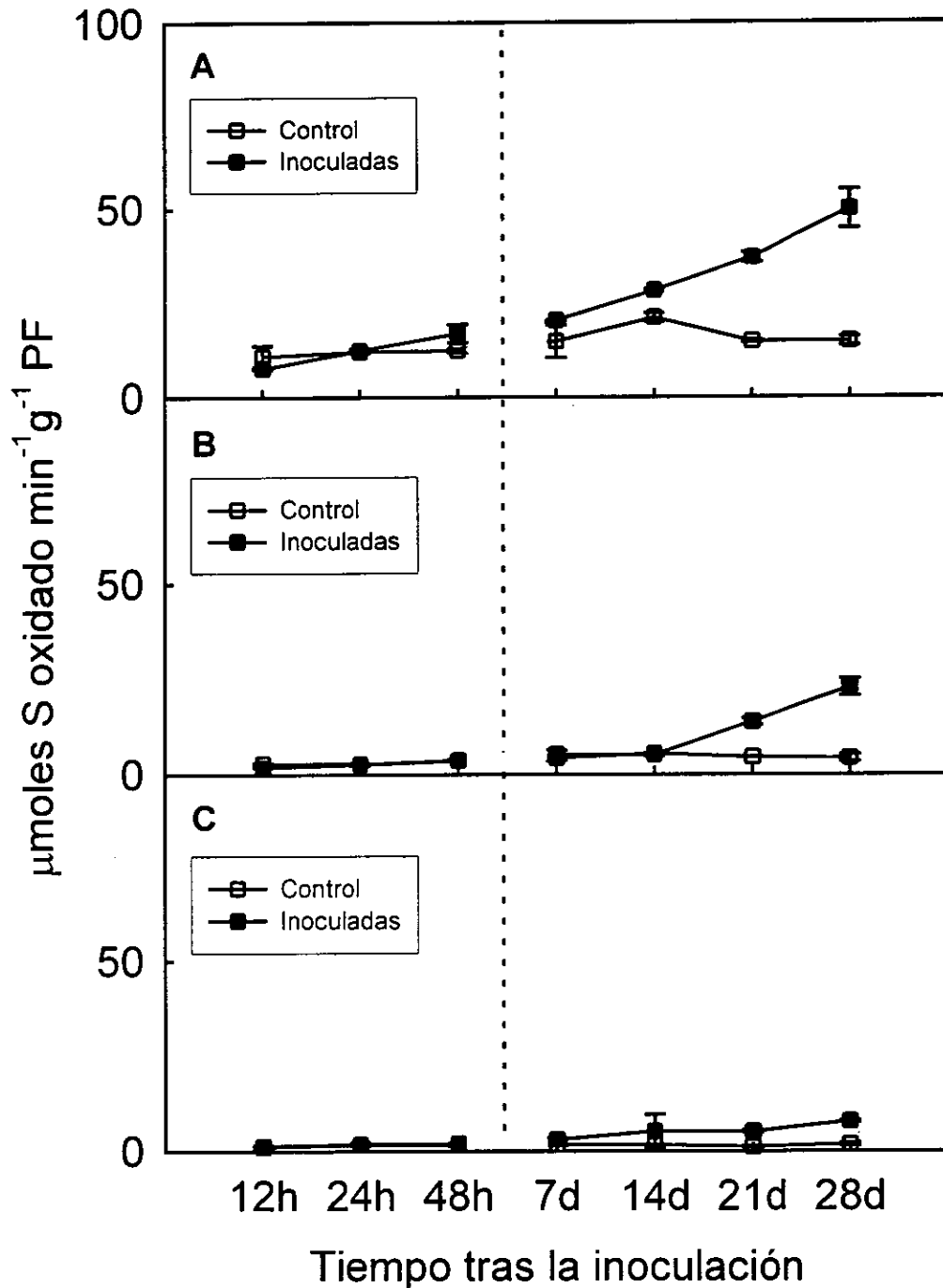


Figura IV. 79.- Evolución a lo largo del tiempo de la actividad peroxidasa medida con alcohol sinapílico como sustrato en plantas de *Capsicum annuum* inoculadas con *V. dahliae* y en plantas control. A) Raíces. B) Tallos. C) Hojas. El medio de reacción contenía peroxidasa de *C. annuum*, H₂O₂ 0,5 mM, alcohol sinapílico 0,1 mM en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. Los datos son la media de tres experimentos independientes

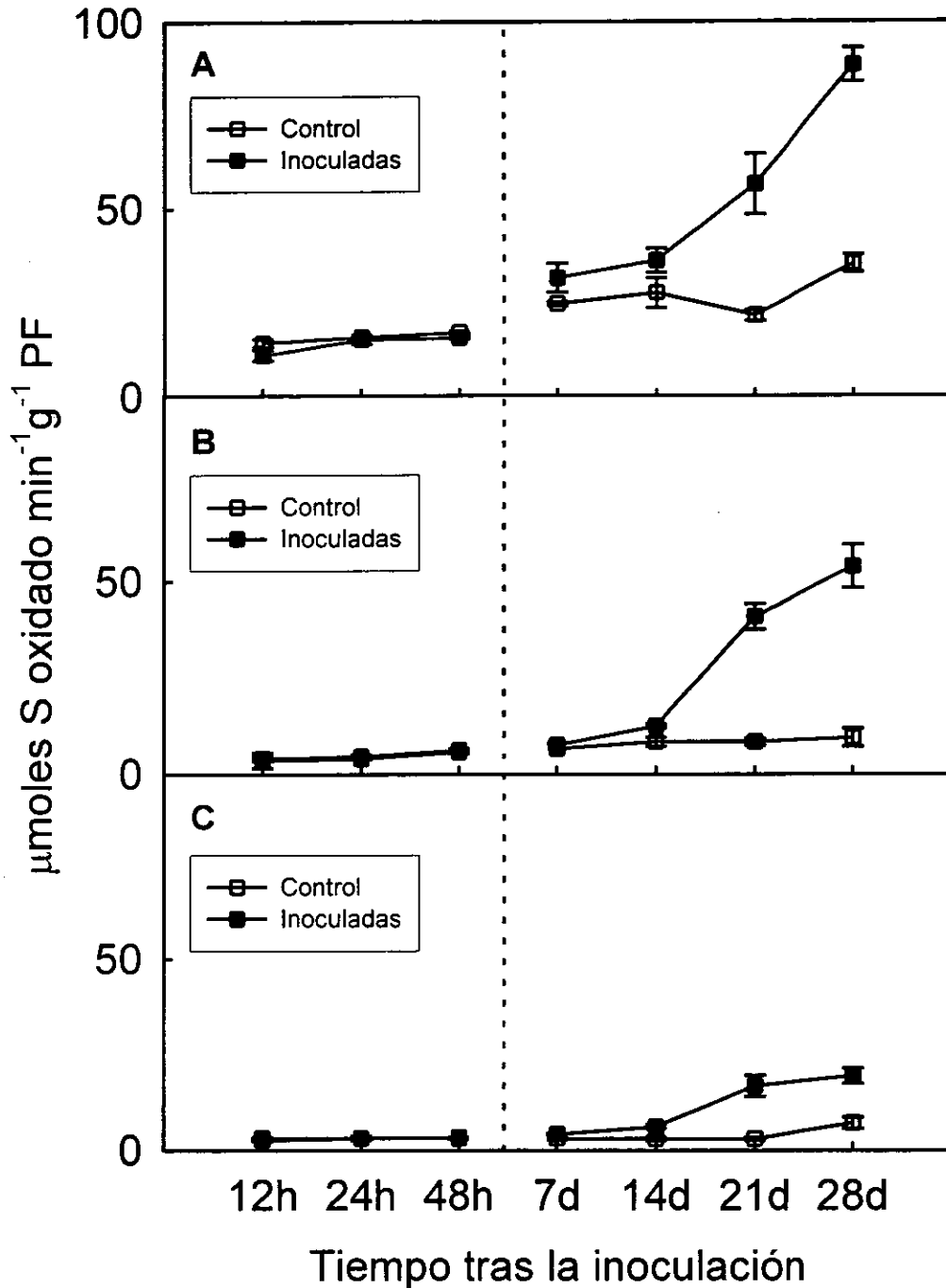


Figura IV. 80.- Evolución a lo largo del tiempo, de la actividad peroxidasa medida con coniferilaldehído como sustrato, en plantas de *Capsicum annuum* inoculadas con *V. dahliae* y en plantas control. A) Raíces. B) Tallos. C) Hojas. El medio de reacción contenía peroxidasa de *C. annuum*, H₂O₂ 0,5 mM, coniferilaldehído 0,1 mM en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. Los datos son la media de tres experimentos independientes

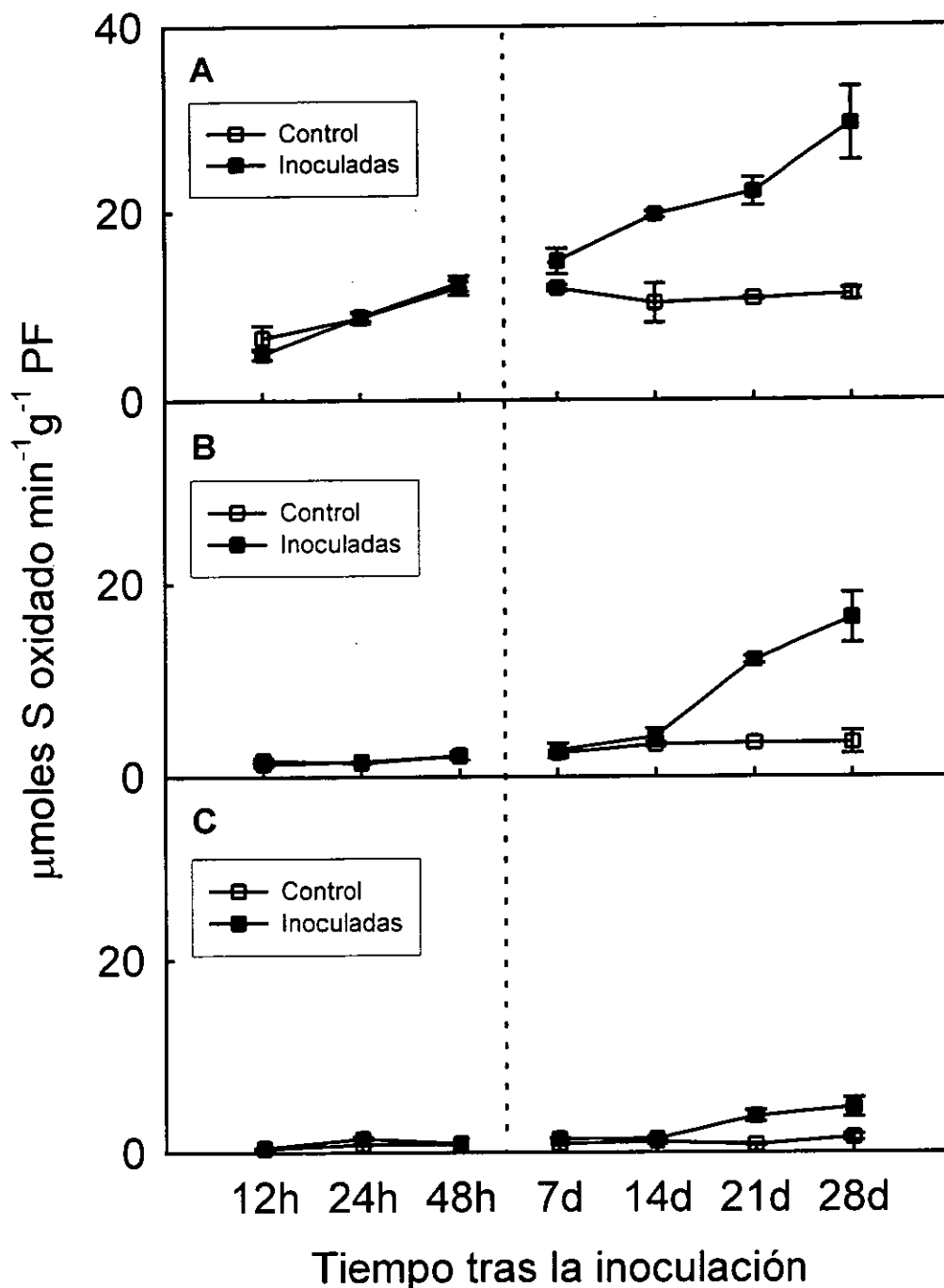


Figura IV.81.- Evolución a lo largo del tiempo, de la actividad peroxidasa medida con sinapilaldehído como sustrato, en plantas de *Capsicum annuum* inoculadas con *V. dahliae* y en plantas control. A) Raíces. B) Tallos. C) Hojas. El medio de reacción contenía peroxidasa de *C. annuum*, H₂O₂ 0,5 mM, sinapilaldehído 0,1 mM en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. Los datos son la media de tres experimentos independientes

Además del seguimiento de la actividad peroxidasa total a lo largo del proceso de infección, se estudió la modificación de los niveles enzimáticos en el apoplasto a través del uso de la técnica de infiltración al vacío. Para ello, utilizamos tallos y hojas de plantas control e inoculadas después de 21 días del proceso de inoculación.

En la tabla IV.17. se muestran los resultados obtenidos para la fracción soluble del apoplasto (IWF) e iónicamente ligada a la pared celular (ICW).

Tabla IV. 17.- Actividad peroxidasa en el apoplasto de tallos a los 21 días de la inoculación. Los datos se expresan en nmoles de sustrato oxidado $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{P.F}$

Substrato	IWF		ICW	
	Control	Infectadas	Control	Infectadas
Alcohol coniferílico	402 ± 4	655 ± 8	99 ± 7	1518 ± 66
Alcohol sinapílico	152 ± 2	291 ± 10	70 ± 1	711 ± 35
Coniferilaldehído	320 ± 8	600 ± 1	123 ± 22	1438 ± 88
Sinapilaldehído	147 ± 1	269 ± 6	50 ± 1	643 ± 33

Los datos son la media de tres experimentos independientes.

Como se observa en la tabla, los mayores aumentos de la actividad enzimática se obtienen en la fracción ligada iónicamente a la pared (ICW), independientemente del sustrato empleado. Las plantas inoculadas presentan por lo menos 10 veces más actividad enzimática que las plantas control, y el máximo incremento se obtiene en el caso del alcohol coniferílico frente al cual las plantas inoculadas muestran 15 veces más actividad enzimática que las plantas control. En el caso del fluido intercelular (IWF) se observan aumentos de actividad enzimática frente a todos los sustratos, pero mucho menores que los obtenidos en la fracción (ICW), ya que en ningún caso las plantas inoculadas presentan el doble de actividad enzimática que las plantas control.

En las tabla IV.18. se muestran los resultados obtenidos para las hojas.

Tabla IV.18.- Actividad peroxidasa en el apoplasto de hojas a los 21 días de la inoculación. Los datos se expresan en nmoles de sustrato oxidado $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{P.F}$

Substrato	IWF		ICW	
	Control	Infectadas	Control	Infectadas
Alcohol coniferílico	204 ± 4	362 ± 12	64 ± 2	880 ± 2
Alcohol sinapílico	138 ± 4	219 ± 4	78 ± 3	373 ± 1
Coniferilaldehído	214 ± 1	345 ± 11	67 ± 17	676 ± 12
Sinapilaldehído	94 ± 3	200 ± 7	25 ± 3	355 ± 4

Los datos son la media de tres experimentos independientes.

Al igual que en el caso de los tallos, las mayores diferencias entre las plantas control e inoculadas aparecen en la fracción enlazada iónicamente a la pared (ICW). En este caso, los incrementos de actividad enzimática son superiores a 10 veces la actividad enzimática de las plantas control. En el caso del alcohol sinapílico, los aumentos de actividad enzimática fueron sólo de 4 veces. En la fracción IWF los incrementos de actividad enzimática son mucho menores, y tan sólo en el caso del sinapilaldehído, las plantas inoculadas muestran el doble de actividad enzimática que las plantas control.

Todos estos resultados nos muestran que la actividad peroxidasa, que aumenta en las plantas de pimiento de Padrón en respuesta a la infección con *Verticillium dahliae*, puede estar implicada en los procesos de lignificación que tienen lugar en la pared celular.

IV.2.7.- Efecto de la inoculación de plantas de pimiento con *V. dahliae* sobre los fenoles presentes en la planta

Durante la obtención de paredes celulares de plantas control e inoculadas pudimos observar como el aspecto de las mismas era muy distinto (Fig. IV. 82)



Figura IV.82.- Paredes celulares aisladas de tallos de *Capsicum annuum*. C) Plantas control. I) Plantas inoculadas

Este hecho, podría ser debido a una mayor presencia de fenoles en las plantas inoculadas, por lo que nos dispusimos a analizar el efecto de la inoculación sobre el contenido de fenoles en las plantas.

Para ello, realizamos dos extracciones distintas, una encaminada a obtener los fenoles libres, y otra con el fin de cuantificar los fenoles ligados. En la Figura IV.83. se presenta el resultado obtenido para los fenoles libres. Como se puede ver en dichas figuras, en las primeras fases después de la inoculación no aparecen cambios en el contenido de fenoles, independientemente del órgano analizado.

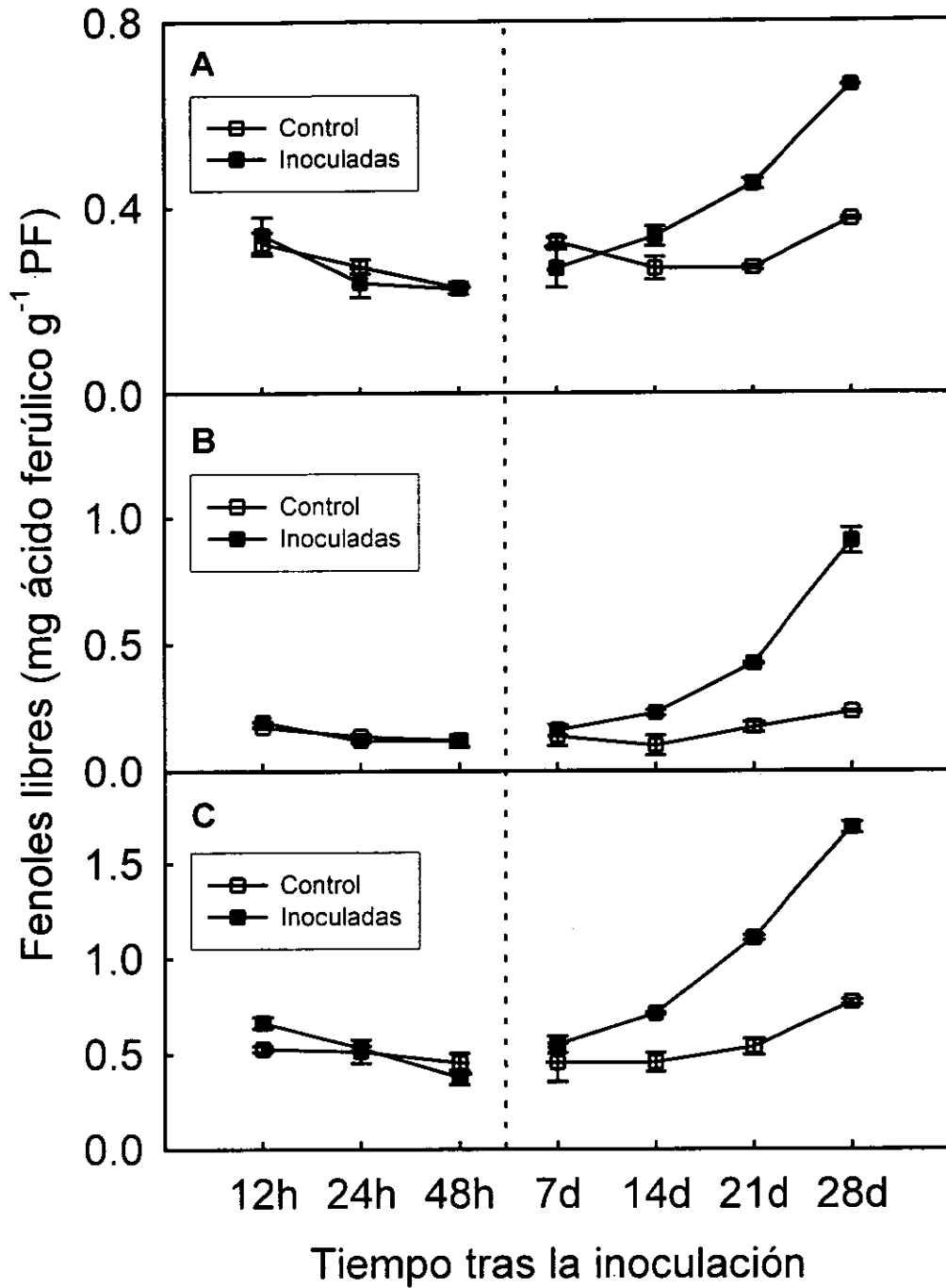


Figura IV.83.- Evolución con el tiempo del contenido en fenoles libres de plantas de *Capsicum annuum* tras la inoculación con *V. dahliae*. A) Raíces. B) Tallos, C) Hojas. Los datos son la media de tres experimentos independientes

Sin embargo, a partir de los 14 días se observa un aumento en el contenido de fenoles en las plantas inoculadas, aumento que se hace mayor según pasa el tiempo, alcanzándose un máximo a los 28 días tras la inoculación.

En la Figura IV. 84. se muestran los resultados obtenidos para los fenoles ligados. En este caso, y a tiempos cortos tras la inoculación, tampoco se detectan cambios significativos con respecto a las plantas control. En las raíces, y a partir de los 21 días, se observan cambios, aumentando la concentración de fenoles en las plantas infectadas, siendo este aumento aún superior a los 28 días. En los tallos, ya a partir del día 14 aumenta el nivel de fenoles en las plantas inoculadas, alcanzándose también un máximo a los 28 días. Las hojas presentan, sin embargo, un comportamiento distinto, ya que no se detectan diferencias hasta el día 28.

La figura IV.85. presenta los resultados para los fenoles totales. En este caso el comportamiento de todos los órganos es similar, no apareciendo cambios en las primeras etapas tras la inoculación. Sin embargo, a partir de los 14 días se produce un aumento en el nivel de fenoles en las plantas inoculadas, incremento que se hace mayor a los 28 días.

Aunque los compuestos fenólicos se han relacionado con la respuesta de las plantas ante el ataque por parte de patógenos no está claro el papel que pueden jugar. En muchos trabajos se relaciona el aumento del contenido fenólico con la resistencia a la enfermedad (interacciones incompatibles) (Nicholson y Hammerschmidt, 1992), detectándose una disminución en interacciones compatibles. Raganathan y Vidhyasekaran (1986), observaron una mayor acumulación de fenoles y enzimas implicadas en la ruta de los fenoles en interacciones compatibles de *Lablab niger* inoculado con *Colletotrichum* spp.

Sin embargo, Pollock y Drysdale (1976), estudiando la participación de los compuestos fenólicos y de enzimas oxidantes en la resistencia de distintos cultivares de tomate a *Verticillium albo-atrum*, observaron que en las plantas de los cultivares de baja resistencia el aumento en compuestos fenólicos y

enzimas oxidantes de éstos (peroxidasa y polifenol oxidasa), era mayor que en variedades resistentes.

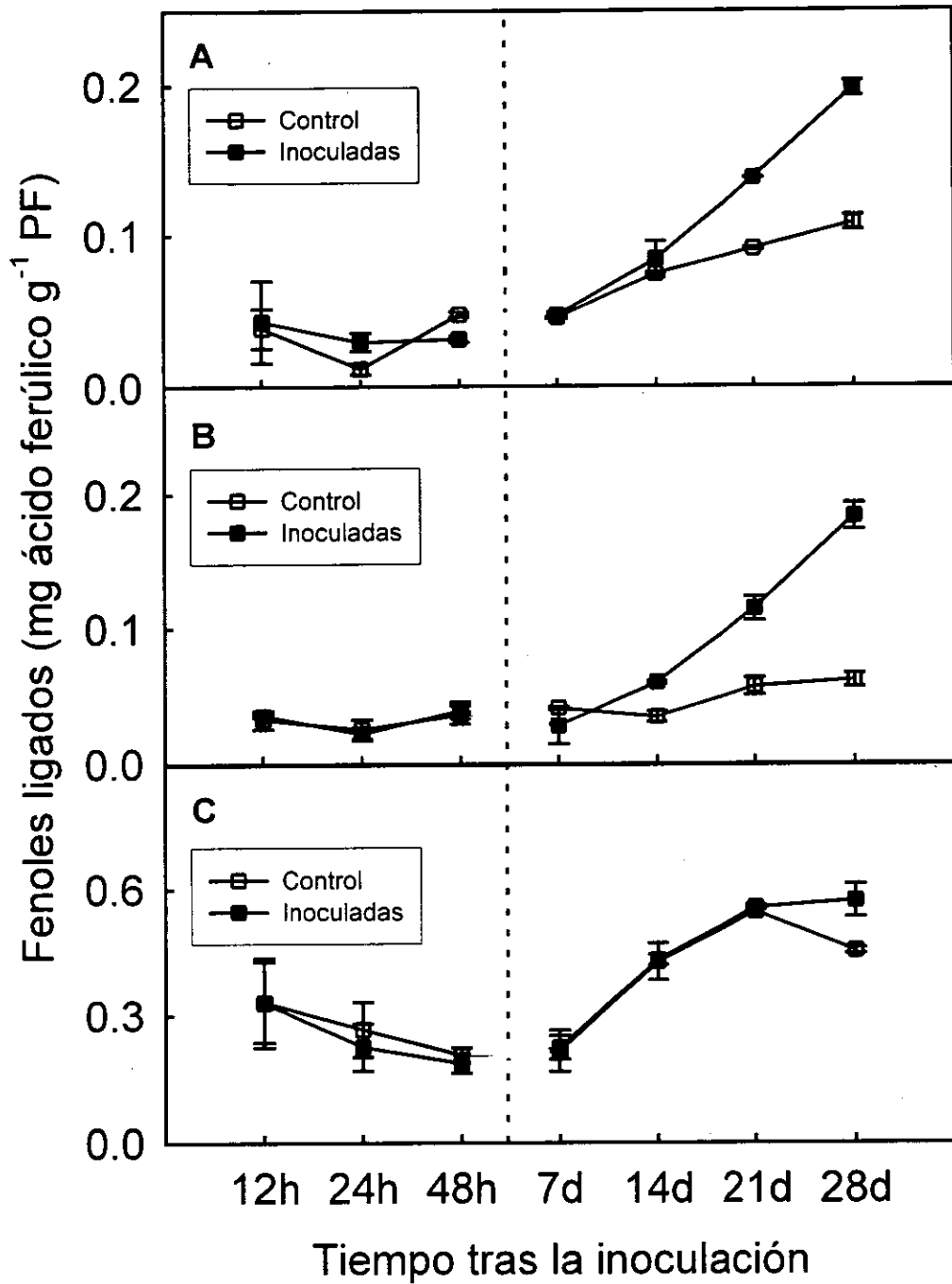


Figura IV.84.- Evolución, con el tiempo del contenido en fenoles ligados de plantas de *Capsicum annuum* tras la inoculación con *V. dahliae*. A) Raíces. B) Tallos. C) Hojas. Los datos son la media de tres experimentos independientes

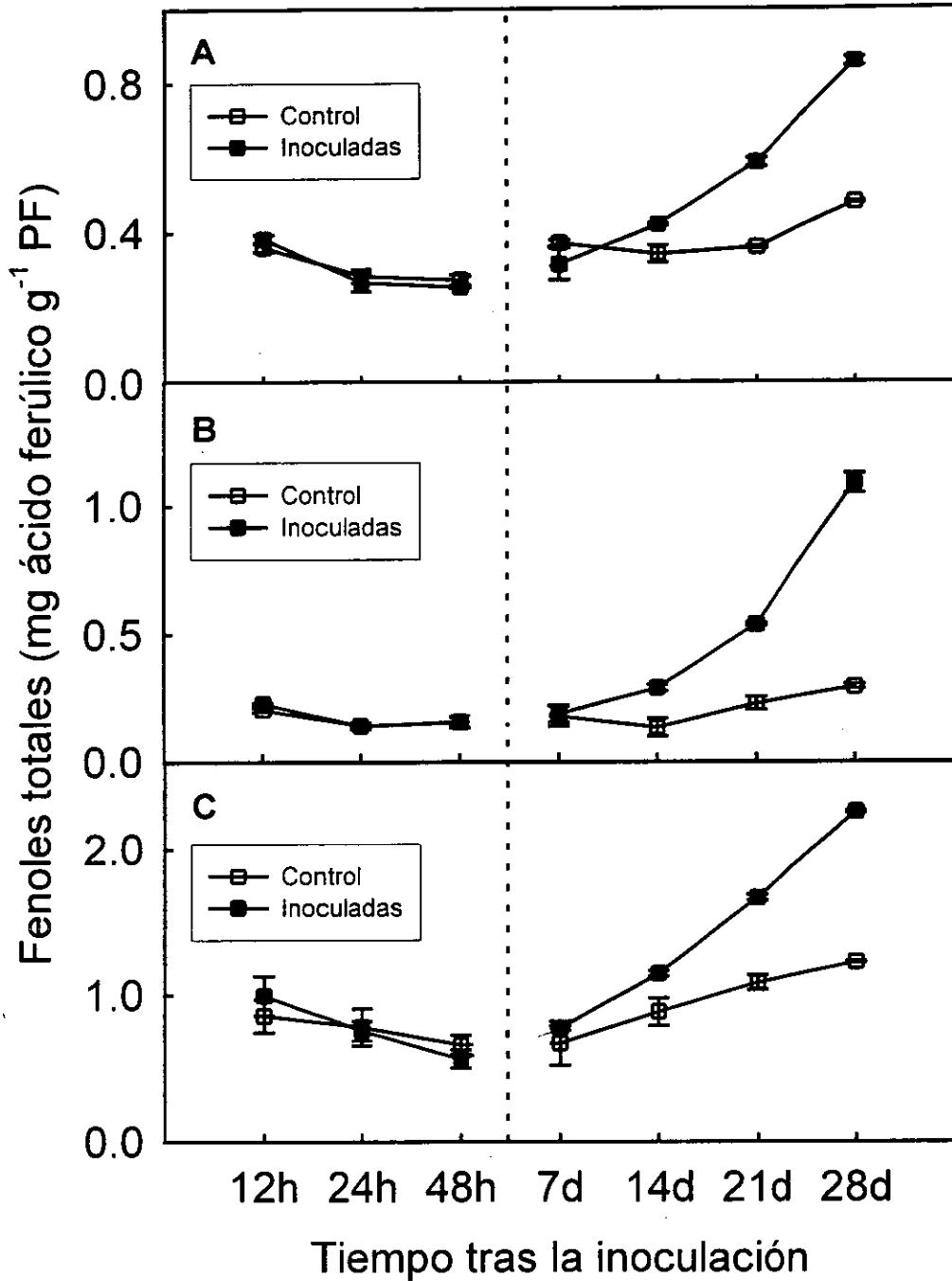


Figura IV.85.- Evolución con el tiempo del contenido en fenoles totales de plantas de *Capsicum annuum* tras la inoculación con *V. dahliae*. A) Raíces. B) Tallos. C) Hojas. Los datos son la media de tres experimentos independientes

Blum y Shafer (1988) estudiaron los efectos de los compuestos fenólicos sobre los microorganismos edáficos observando que, en algún caso, estimulan el crecimiento de ciertas poblaciones microbianas, ya que éstas son capaces de utilizarlos como fuente de carbono.

Souto y col. (1995), observaron que el enriquecimiento del suelo en compuestos fenólicos a bajas concentraciones, estimula el crecimiento de poblaciones de bacterias y hongos, ahora bien a concentraciones mayores, puede incluso hacer que las poblaciones decrezcan. En el caso de los hongos, detectaron que los ácidos p-cumárico, ferúlico, vanílico, p-hidroxibenzoico y gálico y p-vanilina a determinadas concentraciones producían un descenso en las poblaciones al comienzo de la adición, pero al cuarto día de tratamiento las poblaciones de los hongos aumentaban.

Tras haber comprobado el aumento en el contenido de compuestos fenólicos causado por la inoculación con *V. dahliae*, decidimos identificar los fenoles individuales responsables de dicho incremento. Para ello, analizamos en la planta entera las fracciones de fenoles libres y ligados, tanto en plantas control como inoculadas, por medio de cromatografía de fase reversa usando un equipo de HPLC.

Tabla IV.19.- Análisis por HPLC de las fracciones fenólicas de plantas control e inoculadas. Los datos se expresan en $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco

	Solubles		Ligados	
	Control	Infectadas	Control	Infectadas
Protocatéquico	n.d.	n.d.	$0,26 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,04$
Clorogénico	$27,3 \pm 0,22$	$26,0 \pm 0,34$	n.d.	n.d.
Cafeico	n.d.	n.d.	$4,74 \pm 0,79$	$5,20 \pm 0,81$
Vanilina	$0,76 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,06$	$0,18 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,05$
Cumárico	n.d.	n.d.	$0,68 \pm 0,01$	$0,73 \pm 0,02$
Ferúlico	n.d.	n.d.	$0,20 \pm 0,03$	$0,35 \pm 0,02$
Total	$28,06 \pm 0,23$	$26,75 \pm 0,85$	$6,06 \pm 0,85$	$6,80 \pm 0,93$

Los datos son la media de tres experimentos independientes, n.d.: no detectado

Como se puede observar, en la Tabla IV.19. el análisis por HPLC, no nos permitió detectar cambios significativos en los fenoles solubles. Sin embargo, en el caso de los fenoles ligados, se detecta un aumento tanto en la vanillina como en el ácido ferúlico, en las plantas inoculadas con respecto a las plantas control. Este aumento en la cantidad de vanillina y ácido ferúlico ligados, podría estar relacionado con procesos de reforzamiento de la pared celular mediados por la peroxidasa. La peroxidasa catalizaría la oxidación de los fenoles, dando lugar a nuevos entrecruzamientos con los polisacáridos de la pared, como es el caso de las pectinas y los residuos ferulato.

IV.2.8.- Sistemas antioxidantes en la interacción *Capsicum annuum*-*Verticillium dahliae*

Como ya se comentó en la introducción uno de los mecanismos más importantes en la respuesta de las plantas ante los patógenos es la generación y control de especies activas de oxígeno. Probablemente, una de las especies activas de oxígeno más importantes sea el peróxido de hidrógeno, cuyas funciones en la planta son muy numerosas interviniendo en el entrecruzamiento de proteínas de la pared celular (Otte y Barz, 1996), en la regulación de la expresión de genes relacionados con la patogénesis (Chen y col., 1995), en los procesos de muerte celular de la planta (Levine y col., 1994), y en la muerte directa de patógenos invasores (Peng y Kuc, 1992).

En los organismos biológicos existen sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Halliwell y Gutteridge, 1989) que les permiten controlar la producción de especies activas de oxígeno. Estos sistemas tienden a impedir fundamentalmente la formación de los radicales hidroxilo (OH[•]) nocivos mediante la eliminación de sus precursores: los radicales superóxido y el peróxido de hidrógeno. Los sistemas antioxidantes enzimáticos incluyen a las metaloenzimas catalasa (CAT) y la ascorbato peroxidasa (APX).

Por ello estudiamos la evolución de las actividades catalasa y ascorbato peroxidasa en las plantas a lo largo del proceso de infección.

IV.2.8.1.- Actividad catalasa

En la Figura IV.86 se reflejan los resultados obtenidos para la actividad catalasa. Aunque las tendencias no son claras y existe una gran variabilidad experimental en los datos, se puede observar como a tiempos cortos tras la inoculación la actividad catalasa no presenta un comportamiento común en todos los órganos estudiados. Así, en el caso de las raíces parece detectarse un descenso en la actividad catalasa a las 24 y 48 horas de la inoculación; en el caso de los tallos este descenso sólo se observa a las 12 horas no existiendo diferencias en la actividad catalasa a las 24 y 48 horas.

En el caso de las hojas, no se detectaron cambios en las primeras etapas tras la inoculación. A tiempos más largos apareció un descenso en la actividad catalasa de las plantas inoculadas en todos los órganos estudiados. Este descenso apareció a partir de los 21 días tanto en los tallos como en las hojas, pero en las raíces se observó sólo a partir de los 28 días.

La catalasa juega un papel muy importante en el control de los niveles de H_2O_2 presente en la célula, pero además estudios recientes le han asignado la capacidad de actuar como un receptor del ácido salicílico (Chen y Klessig, 1991; Chen y col., 1993; Levine y col., 1994). Chen y col. (1993) mostraron como el ácido salicílico se unía a una catalasa del tabaco, y además era capaz de inhibir la actividad de la enzima en ensayos "in vitro". El tratamiento de las plantas de tabaco con ácido salicílico provocó un aumento en las concentraciones "in vivo" de peróxido de hidrógeno, por lo que estos autores dedujeron que el ácido salicílico actuaría a nivel de la planta inhibiendo la actividad catalasa y favoreciendo así un aumento en la concentración de peróxido de hidrógeno.

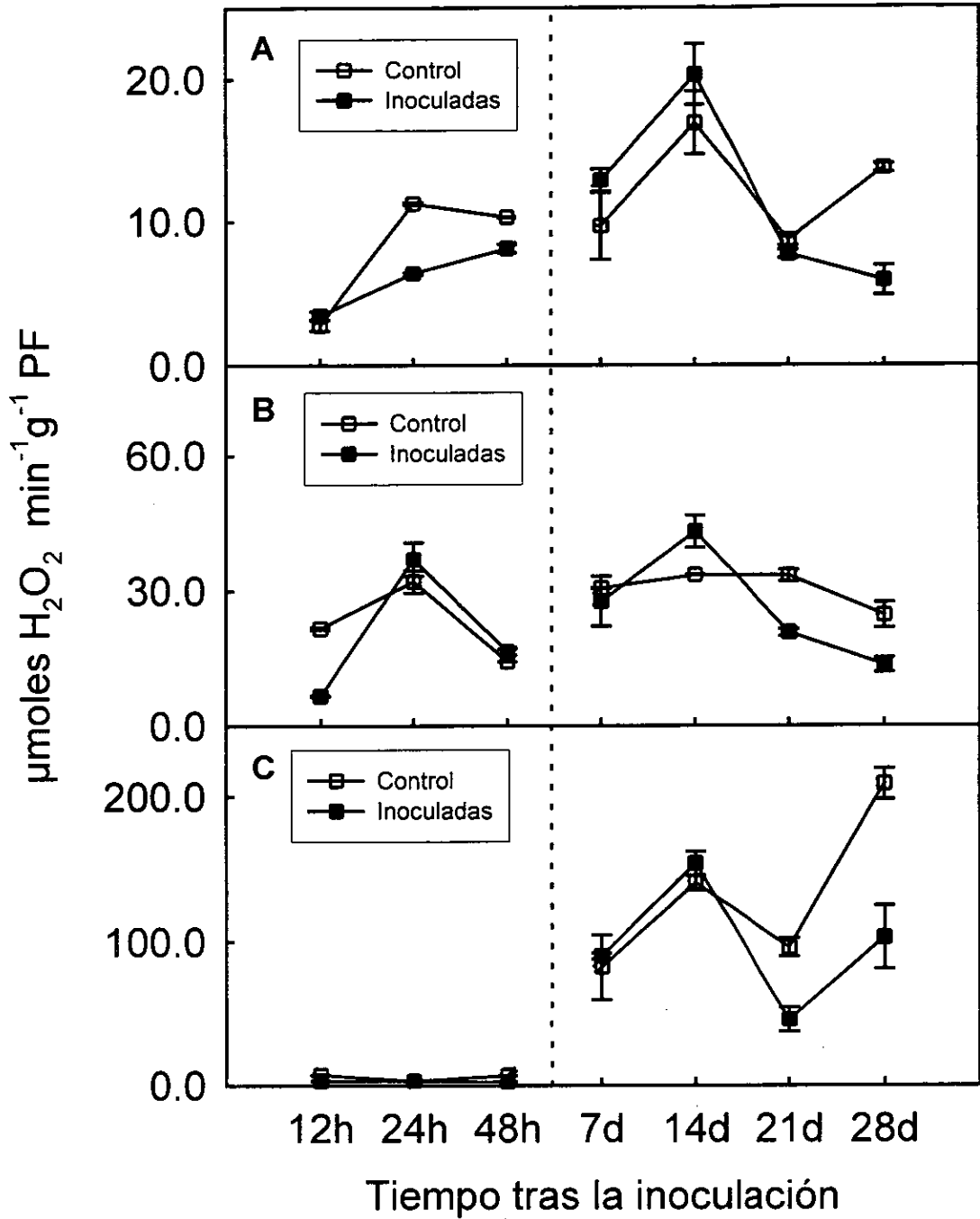


Figura IV.86.- Evolución a lo largo del tiempo, de la actividad catalasa en plantas de *Capsicum annuum* inoculadas con *V. dahliae* y de plantas control. A) Raíces. B) Tallos. C) Hojas. El medio de reacción contenía catalasa de *C. annuum*, H_2O_2 10,6 mM, en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,0. Los datos son la media de tres experimentos independientes

Nuestros resultados con la catalasa, se asemejan mucho a los observados por Milosevic y Slusarenko (1996), trabajando con judía. En su caso la respuesta de la judía frente a la infección por parte de *Pseudomonas syringae* era de tipo hipersensible. Estos autores, detectaron un descenso en la actividad catalasa en las plantas inoculadas, descenso que coincidía temporalmente con un incremento en la actividad peroxidasa y con la aparición de una isoenzima de peroxidasa de punto isoeléctrico ácido. Asimismo, paralelamente al incremento de la actividad peroxidasa se detectaba un aumento en los procesos de lignificación. Todos estos hechos conjuntos llevaron a Milosevic y Slusarenko (1996) a proponer que la planta mantiene concentraciones de peróxido suficientes para que tenga lugar la lignificación mediada por la peroxidasa a través de una disminución en los sistemas de eliminación del peróxido, como la catalasa. En nuestro caso, los procesos que observamos son idénticos, con un incremento de peroxidasa paralelo a la disminución de catalasa, la sobreexpresión de ciertas peroxidases ácidas, y un aumento de los procesos de lignificación. La diferencia fundamental es que en la interacción *C.annuum*- *V.dahliae* estos acontecimientos no tienen lugar a través de una respuesta hipersensible, sino que aparecen a partir de los 14 días después de la infección.

IV.2.8.2.- Actividad ascorbato-peroxidasa

En el caso de la ascorbato peroxidasa (Fig. IV.87), el comportamiento es totalmente distinto al de la catalasa. Así, en raíces no se observa una tendencia clara ya que, aunque a los 14 y 21 días las plantas inoculadas presenten un mayor nivel de actividad, las actividades en las plantas control e inoculadas se vuelven a igualar a los 28 días.

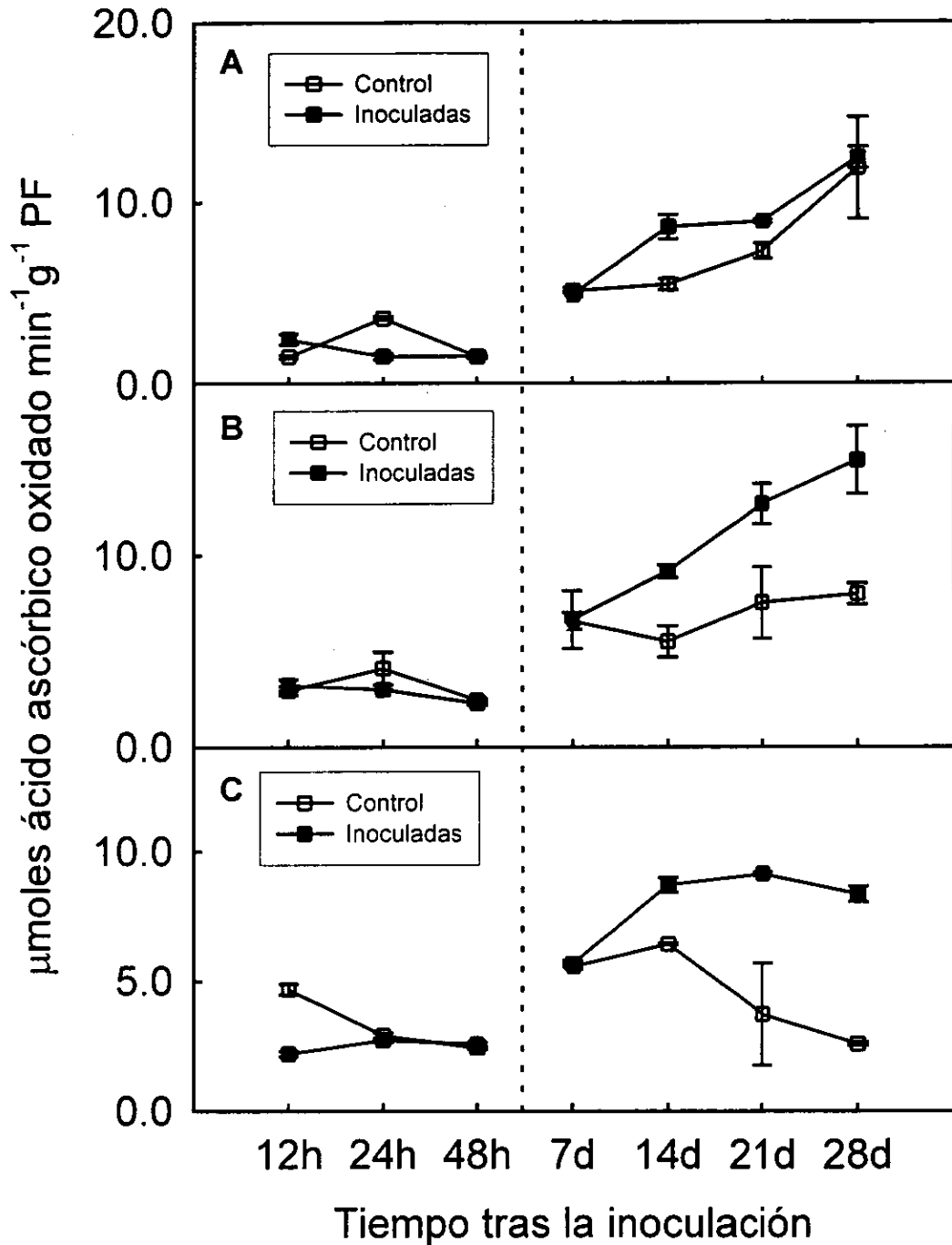


Figura IV.87.- Evolución a lo largo del tiempo de la actividad ascorbato peroxidasa en plantas de *Capsicum annuum* inoculadas con *V. dahliae* y en plantas control. A) Raíces. B) Tallos. C) Hojas. El medio de reacción contenía ascorbato peroxidasa de *C. annuum*, H_2O_2 0,1 mM, ácido ascórbico 0,5 mM, en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,0. Los datos son la media de tres experimentos independientes

En los tallos y en las hojas, a partir de los catorce días se detectan aumentos muy importantes en la actividad ascorbato peroxidasa de las plantas inoculadas con respecto a las plantas control. Este incremento se hace máximo a los 28 días de la inoculación.

Teniendo en cuenta que la ascorbato peroxidasa actúa como un sistema eliminador de peróxido de hidrógeno, un incremento en su actividad es aparentemente contradictorio con el descenso en la actividad catalasa. Sin embargo, la ascorbato peroxidasa está localizada en los cloroplastos, las mitocondrias y el citosol, mientras que la catalasa está localizada en los peroxisomas. Otra explicación de este aumento en la actividad ascorbato peroxidasa, que no se descarta, es que la actividad que estamos detectando sea en parte debida a las peroxidases de tipo III capaces de oxidar al ácido ascórbico, por lo que el aumento a lo largo del proceso de infección sería el resultado más lógico a la vista del aumento ya detectado de la actividad peroxidasa de tipo III.

IV.2.8.3.- Localización del H₂O₂

Además de estudiar las respuestas de estos dos sistemas antioxidantes, realizamos un estudio histoquímico con el fin localizar los tejidos capaces de producir peróxido de hidrógeno durante las primeras etapas de la infección. Estos estudios histoquímicos se realizaron en plantas a las 48 horas de la inoculación, tiempo al cual la invasión por parte de *V. dahliae* es total, utilizando para ello la prueba de la 3,5,3',5'-tetrametilbenzidina. La localización histoquímica del peróxido de hidrógeno por microscopía electrónica en las plantas se realiza usando el CeCl₃ (Bestwick y col., 1997), mientras que a nivel histoquímico se utiliza el reactivo IK/almidón (Schopfer, 1994). El método del IK/almidón está basado en la oxidación del IK por el peróxido de hidrógeno para dar I₂, el cual reacciona con el almidón dando lugar a la formación de un color azul oscuro. Sin embargo el límite de detección de este método se sitúa en una concentración de peróxido 0,25 mM, valor que hace que el método sea

poco sensible. Por este motivo se eligió el método de la TMB para estudiar la localización histoquímica del peróxido. Este método está basado en la oxidación de la TMB en una reacción mediada por la peroxidasa, y estrictamente dependiente de la presencia de peróxido (Ros Barceló, 1998). Este método presenta un límite de detección de la concentración de peróxido de 5-10 μM , y nos indica los tejidos donde está presente tanto el peróxido de hidrógeno como la peroxidasa. En la Figura IV. 88 se muestran los resultados obtenidos cuando esta técnica se aplicó en los tallos de pimiento.

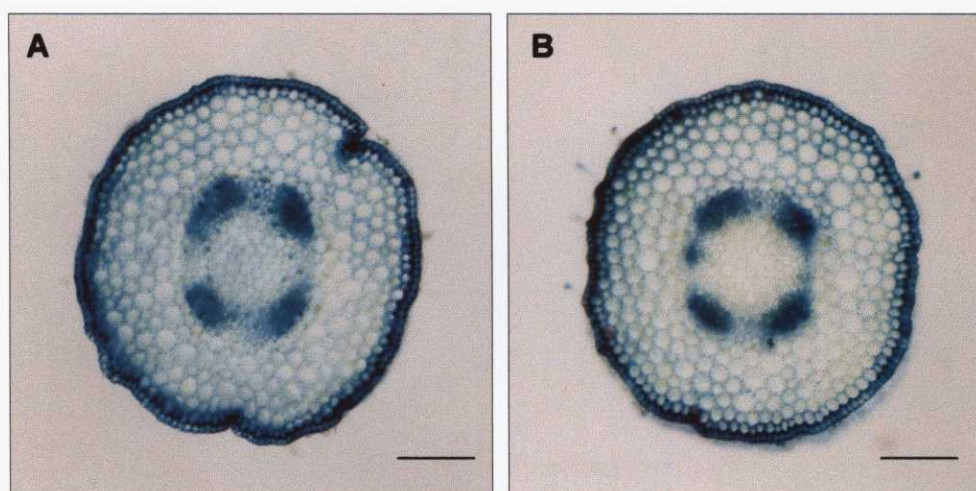


Figura IV.88.- Localización histoquímica del H_2O_2 y la peroxidasa, en tallos de pimiento utilizando la prueba de la TMB. A) Planta control. B) Planta inoculada. Barra= 300 μm .

Como se puede ver en dicha figura, el patrón de tinción no varió en las plantas control y las plantas inoculadas lo que nos indica la ausencia de una explosión oxidativa durante las primeras etapas del desarrollo de la infección. Este hecho, unido a que tanto la ascorbato peroxidasa como la catalasa no muestran cambios de actividad durante estas etapas tempranas, nos permite sugerir que el metabolismo oxidativo tiene una respuesta lenta o nula en este tipo de interacción.

IV.2.9.- Localización de la peroxidasa y el peróxido de hidrógeno en el tallo de *Capsicum annuum*

A la vista de los resultados expuestos en la figura IV.88. abordamos en profundidad la localización del peróxido de hidrógeno y la peroxidasa en los tallos de plantas de pimiento de 28 días.

Como se puede ver en la Figura IV. 89. la incubación de secciones de tallos de pimiento con la TMB provoca la aparición de una tinción localizada a nivel del xilema lignificante y de la subepidermis.

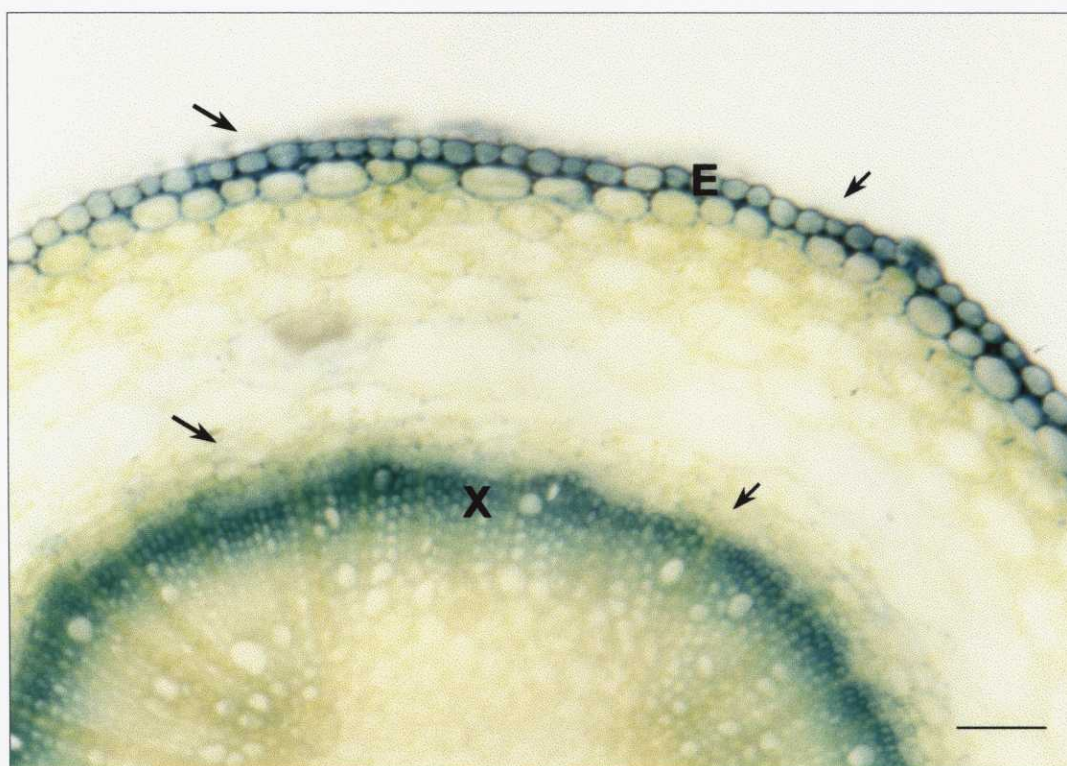


Figura IV.89.- Localización histoquímica del H_2O_2 y la peroxidasa, en tallos de plantas control de 28 días utilizando la prueba de la TMB. X: xilema, E: epidermis, las flechas indican las zonas de tinción. Barra= 100 μ m.

Esta localización del H_2O_2 y la peroxidasa a nivel del xilema lignificante, está de acuerdo con la observada cuando se utilizó la siringaldazina (Fig. IV. 66 B). Esta colocación de la actividad peroxidasa y del peróxido de hidrógeno,

están de acuerdo con la hipótesis de que la peroxidasa es la única responsable de la polimerización de los alcoholes cinamílicos a las ligninas.

Con el fin de confirmar que esta actividad TMB-oxidasa era debida a la peroxidasa, realizamos pruebas con inhibidores utilizando como fracción de proteínas la obtenida por infiltración a vacío en presencia de ClK 1M y Cl_2Ca 50 mM. El efecto de la azida sódica sobre la oxidación de la TMB por esta fracción de proteína se muestra en la Figura IV. 90.

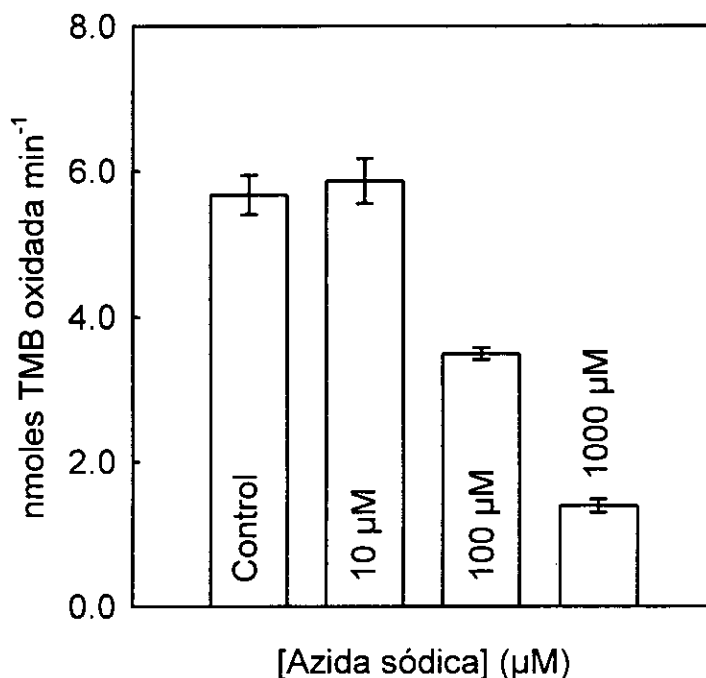


Figura IV.90.- Efecto de la azida sódica sobre la velocidad de oxidación de la TMB por la peroxidasa de *C. annuum*. El medio de reacción estaba compuesto por H_2O_2 0,5 mM, TMB 0,1 mg ml^{-1} , peroxidasa de *C. annuum* y distintas concentraciones de azida sódica, en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. El inhibidor se añadió al medio 1 minuto antes de iniciar la reacción con la adición de la TMB

Como se observa en la figura IV.90. la azida sódica a la concentración de 100 μM , fue capaz de inhibir la oxidación de la TMB en un 30%, mientras que a la concentración de 1000 μM , el efecto inhibitor fué del 70%. A nivel histoquímico una concentración de azida sódica 1 mM, fue capaz de inhibir la tinción con la TMB a nivel del xilema de la planta (Figuras IV.91 y IV.92).

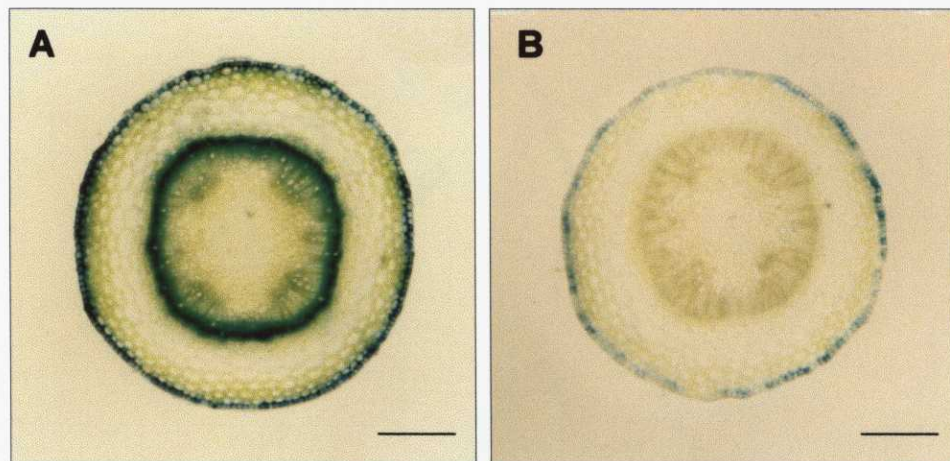


Figura IV.91.- Localización histoquímica de la peroxidasa y el H_2O_2 , en tallos de pimiento. A) Sección control teñida con la TMB. B) Sección teñida con TMB en presencia de 1mM de azida sódica. Barra= 300 μ m

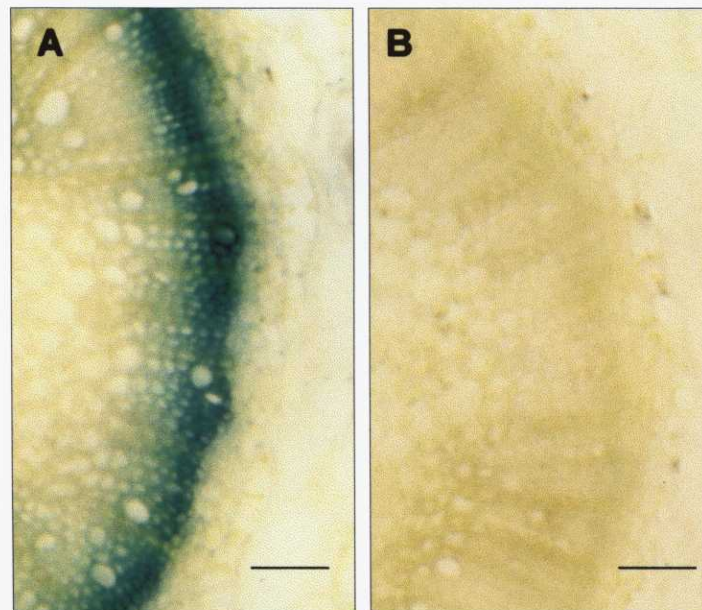


Figura IV.92.- Localización histoquímica de la peroxidasa y el H_2O_2 , en tallos de pimiento. A) Sección control teñida con la TMB. B) Sección teñida con TMB en presencia de 1mM de azida sódica. Barra= 100 μ m

Una vez estudiado el efecto de la azida sódica, el siguiente paso fue estudiar el efecto del ácido ferúlico y la tropolona. En la Figura IV.93 se muestra el efecto del ácido ferúlico sobre la oxidación de la TMB por la proteína de la pared celular de tallos de pimiento. Como se puede ver en dicha figura el ácido ferúlico provoca una inhibición de la oxidación de la TMB del 30% a la

concentración 10 μM , siendo la inhibición del 100% a la concentración de 1000 μM .

En este punto, cabe recordar que el ácido ferúlico es uno de los mejores inhibidores competitivos de la peroxidasa, no mostrando efecto sobre las lacasas, enzimas que quedarían descartadas, en este caso, como responsables de la actividad TMB-oxidasa en pimiento.

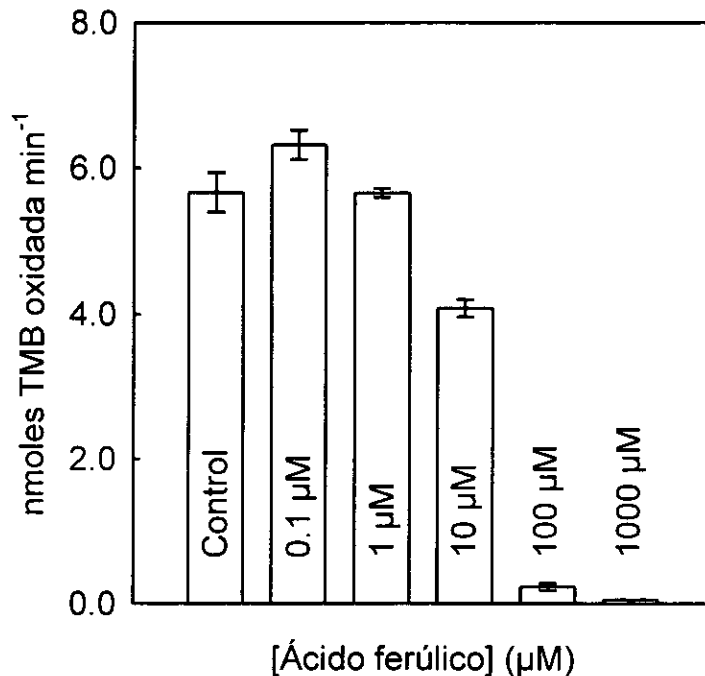


Figura IV.93.- Efecto del ácido ferúlico sobre la velocidad de oxidación de la TMB por la peroxidasa de *C. annuum*. El medio de reacción estaba compuesto por H_2O_2 0,5 mM, TMB 0,1 mg ml^{-1} , peroxidasa de *C. annuum* y distintas concentraciones de ácido ferúlico, en tampón tris acetato 50 mM pH 5,0. El inhibidor se añadió al medio 1 minuto antes de iniciar la reacción con la adición de la TMB

A continuación se utilizó la tropolona como inhibidor para discriminar entre las peroxidasas y las polifenoloxidasas de tipo catecolasa. La tropolona es un inhibidor selectivo de las actividades de tipo catecolasa y no muestra efecto conocido frente a las peroxidasas.

En la tabla IV. 20. se muestra el efecto de la tropolona sobre la actividad TMB-oxidasa del pimiento.

Tabla IV.20.- Efecto del ácido ferúlico y de la tropolona sobre la oxidación de la TMB por la peroxidasa de *C. annuum*.

Inhibidor	Actividad peroxidasa (nmoles S oxidado min ⁻¹)
Control	5,67 ± 0,24 (10)
Ácido ferúlico (1mM)	0,0 ± 0,0 (3)
Tropolona (1mM)	6,15 ± 0,02 (3)

El medio de reacción estaba compuesto por H₂O₂ 0,5 mM, TMB 0,1 mg ml⁻¹, en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. El inhibidor se añadió al medio 1 minuto antes de iniciar la reacción por la adición de la siringaldazina. Los valores son la media ± SE (n)

Como se puede ver en dicha tabla, la tropolona no muestra efecto inhibitorio a la concentración 1 mM, sobre la actividad TMB-peroxidasa, actuando incluso como activador de la enzima. Este resultado nos permite descartar a las catecolasas como las enzimas responsables de la actividad TMB-oxidasa observada en pimiento.

Por último, y para confirmar la naturaleza peroxidasa de la actividad TMB-oxidasa utilizamos como inhibidor el ferrocianuro potásico, cuyo efecto se muestra en la Figura IV.94. Como se observa en dicha gráfica, el ferrocianuro potásico a la concentración 50 µM, produjo una inhibición del 20%, siendo la inhibición del 100% a la concentración 100 µM. Este resultado confirma la naturaleza peroxidasa de la actividad TMB-oxidasa en pimiento, la actividad peroxidasa y la generación de peróxido de hidrógeno, por lo que la peroxidasa parece ser la enzima responsable de la polimerización de los alcoholes cinamílicos a ligninas. Así, el aumento de la actividad peroxidasa detectado en pimiento tras la inoculación con el hongo *V. dahliae* probablemente sea debido a su implicación en los procesos de lignificación que conducen a un aumento en la cantidad total de lignina presente en las plantas.

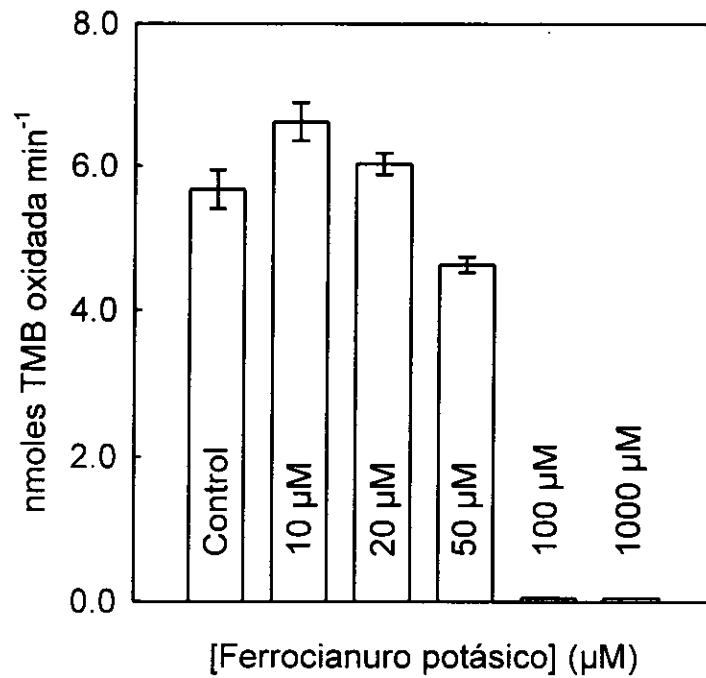


Figura IV.94.- Efecto del ferrocianuro potásico sobre la velocidad de oxidación de la TMB por la peroxidasa de *C. annuum*. El medio de reacción estaba compuesto por H_2O_2 0,5 mM, TMB 0,1 mg ml^{-1} , peroxidasa de *C. annuum* y distintas concentraciones de ferrocianuro potásico, en tampón Tris acetato 50 mM PH 5,0. El inhibidor se añadió al medio 1 minuto antes de iniciar la reacción con la adición de la TMB

IV.2.10.- Efecto del óxido nítrico sobre la peroxidasa

Tanto el H_2O_2 , como otras especies activas de oxígeno, juegan diferentes papeles en la respuesta de las plantas ante el ataque por patógenos. Una de estas funciones sería la de actuar como señales intercelulares o como segundos mensajeros en la activación de genes de defensa. A este respecto, recientemente se ha descrito en animales la existencia del óxido nítrico (NO), una molécula relativamente inestable, que juega un papel muy importante en numerosos procesos fisiológicos. Entre ellos encontramos su efecto sobre la vasodilatación, la neurotransmisión, los procesos de inmunorregulación o la citotoxicidad (Anbar, 1995). En animales, el NO es sintetizado por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), (Knowles, 1997), y su acción reguladora depende de su capacidad para fijarse a las hemoproteínas (Stamler y col., 1992).

Trabajos recientes apoyan la idea de que el NO actúa como mensajero químico en el reino vegetal, promoviendo por ejemplo la acumulación de fitoalexinas en la patata (Noritake y col., 1996), o evitando la pérdida de clorofila en hojas de patata infectadas con *Phytophthora infestans* (Laxalt y col., 1997). El NO también ha sido propuesto como señal en procesos de resistencia a patógenos. Así, Delledone y col. (1998), mostraron que el NO participa en la explosión oxidativa que da lugar a la respuesta hipersensible de la soja al ser infectada con *Pseudomonas syringae*, potenciando la muerte celular. Además, el uso de inhibidores de la síntesis de NO, atenúa la resistencia de *Arabidopsis* a *P. syringae* facilitando el crecimiento bacteriano y el desarrollo de la enfermedad. Por su parte, Durner y col. (1998) demostraron la presencia de la óxido nítrico sintetasa en plantas de tabaco, viendo como en plantas resistentes infectadas con el virus del mosaico aparecía un gran incremento en la actividad de esta enzima, hecho que no se observaba en el caso de plantas susceptibles.

El hecho de que la acción reguladora del NO dependa de su capacidad para interactuar con las hemoproteínas, convierte a las peroxidosas en posibles dianas del mismo. Este hecho, unido a la relación de las peroxidosas con los

procesos de lignificación, llevaron a Ferrer y Ros Barceló (1999), a estudiar el efecto del NO sobre la actividad peroxidasa del xilema lignificante de *Z. elegans*. Con este fin, utilizaron el nitroprusiato sódico (SNP), un compuesto que a la concentración 5 mM es capaz de generar NO a la velocidad de $35 \pm 4 \mu\text{M s}^{-1}$, mostrando que el SNP inhibía a la peroxidasa del xilema de *Z. elegans*.

En la Figura IV.95. podemos ver el efecto inhibitor del SNP 5 mM sobre la tinción con la TMB de una sección de tallo de *Z. elegans*.

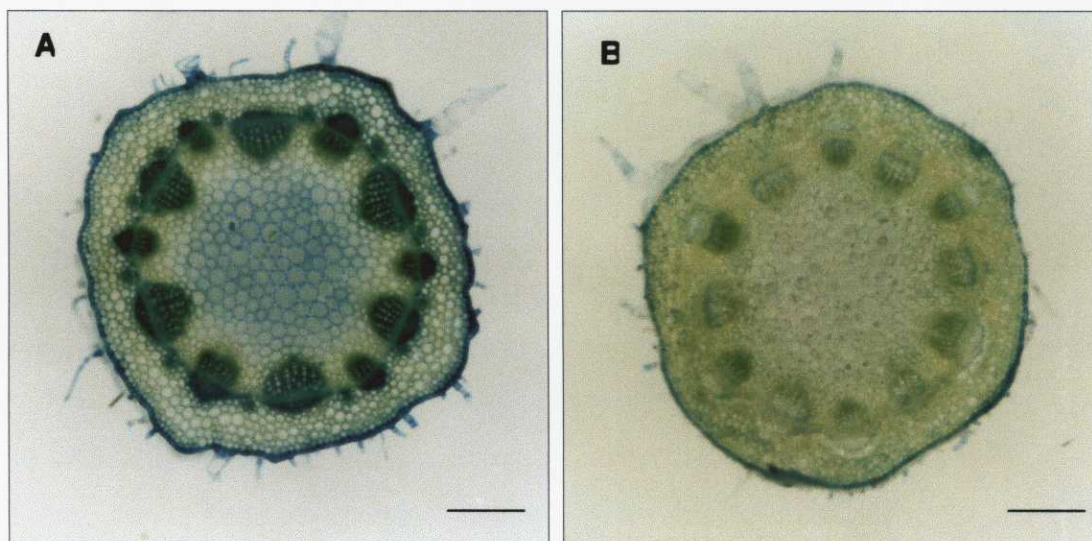


Figura IV. 95.- Localización histoquímica simultánea de la peroxidasa y del H_2O_2 en tallos de *Z. elegans* A) Sección control teñida con TMB. B) Sección teñida con TMB en presencia de 5mM de nitroprusiato sódico. Barra= 300 μm (tomado de Ferrer y Ros Barceló, 1999)

Partiendo de estas observaciones, nuestro siguiente propósito fue demostrar que el efecto del SNP era debido a su capacidad de producir NO. Con este fin se utilizó un compuesto secuestrador del NO, el 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolinona-3-oxido-1-oxil (PTIO) (Durner y col., 1998).

En la Tabla IV. 21. se muestra el efecto del SNP 5 mM sobre la velocidad de oxidación de la TMB por la peroxidasa de *Z. elegans*, y la reversión del efecto del SNP con PTIO. Como se puede observar en dicha tabla, el SNP provoca una inhibición de la velocidad de oxidación de la TMB en un 50%, inhibición que en presencia de PTIO a la concentración de 150 μM , desaparece. Teniendo en cuenta que el PTIO es un secuestrador de NO, de

estos resultados podemos concluir que la inhibición provocada por el SNP es debida a su capacidad de producir NO.

Tabla IV.21.- Efecto del nitroprusiato sódico sobre la oxidación de la TMB por la peroxidasa de *Z.elegans* y su reversión con PTIO.

	Actividad peroxidasa (nmoles S oxidado min⁻¹)
Control	2,54 ± 0,37 (21)
SNP 5 mM	1,33 ± 0,09 (3)
PTIO 150 µM	2,24 ± 0,25 (3)

El medio de reacción estaba compuesto por H₂O₂ 0,5 mM, TMB 0,1 mg ml⁻¹, en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. El inhibidor se añadió al medio 1 minuto antes de iniciar la reacción con la adición de la TMB. El SNP se preincubó 15 minutos antes de su uso. Los valores son la media ± SE (n).

Una vez realizado este estudio a nivel espectrofotométrico, el siguiente objetivo fue estudiar esta reversión a nivel histoquímico. Los resultados se muestran en la Figura IV. 96, donde puede observarse que el SNP a la concentración 5 mM provoca una inhibición de la actividad TMB-oxidasa del xilema (Fig. IV. 96 B), efecto que se revierte en presencia de PTIO (Fig. IV. 96. C). La localización de esta actividad TMB oxidasa a nivel de los sistemas vasculares en *Z. elegans* coincide plenamente con la localización de la producción de peróxido de hidrógeno (Fig. IV. 97), por lo que se podría pensar que el efecto del NO, podría ser debido bien a su interacción con la peroxidasa, o bien a su interacción con el sistema generador de peróxido. Ferrer y Ros Barceló (1999), han demostrado que el efecto del NO es sobre la actividad peroxidasa, y no sobre el sistema generador de peróxido de hidrógeno. Por lo tanto, la peroxidasa parece ser la enzima "diana" sobre la que actúa el NO.

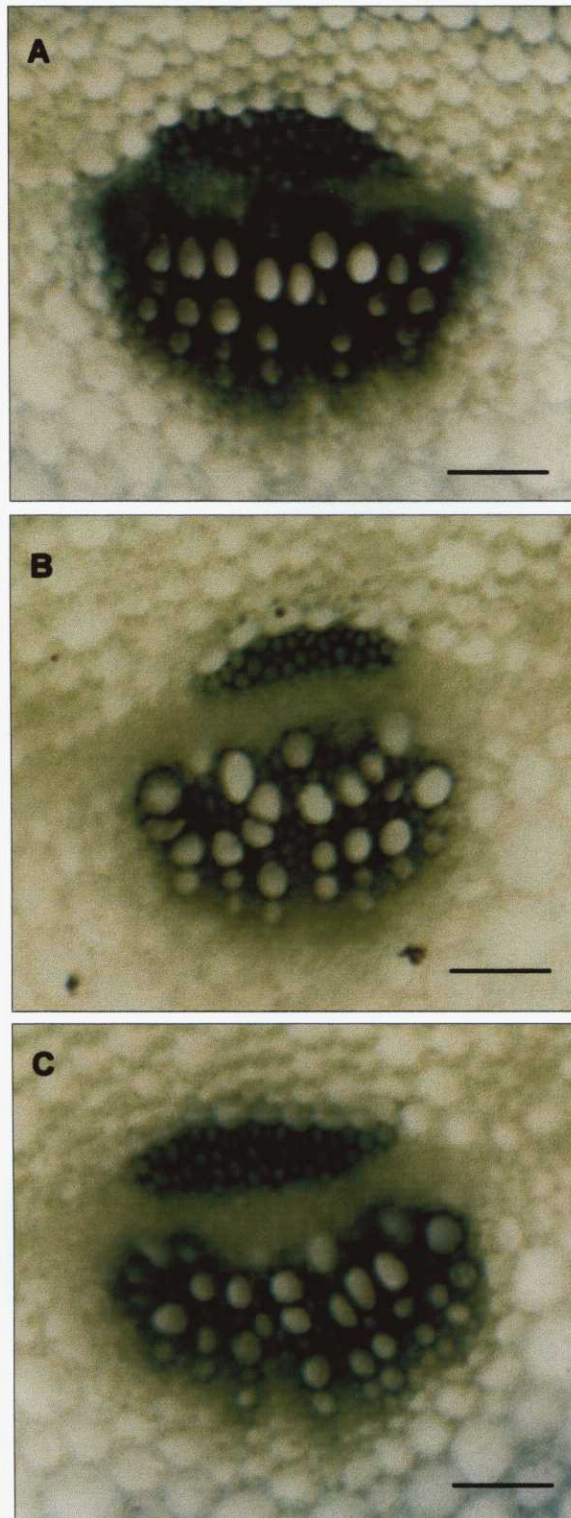


Figura IV. 96.- Localización histoquímica de la peroxidasa y el H_2O_2 en tallos de *Z. elegans* A) Sección teñida con TMB. B) Sección teñida con TMB en presencia de 5mM de nitroprusiato sódico. C) Sección teñida con TMB en presencia de 5mM de nitroprusiato sódico y PTIO 150 μ M. Barra= 100 μ m

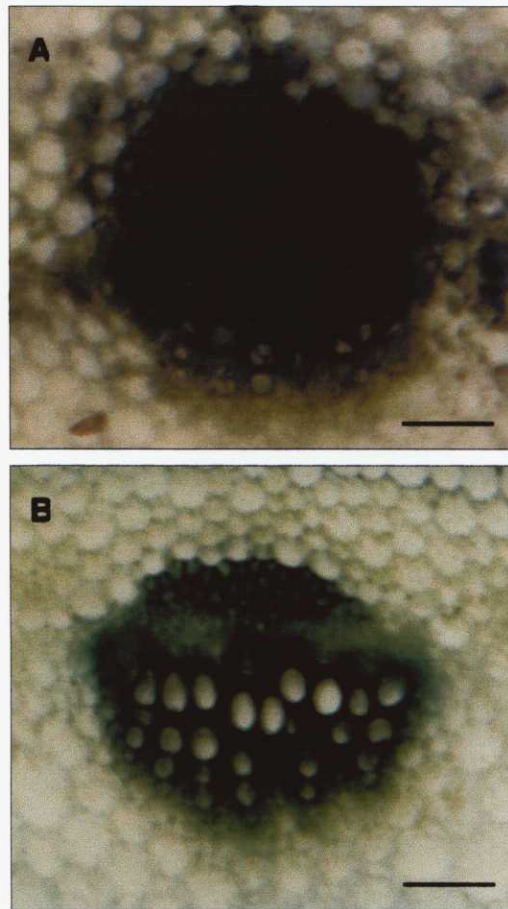


Figura IV. 97.- A) Localización histoquímica del H_2O_2 usando el reactivo de IK/almidón. B) Localización histoquímica de la peroxidasa y el H_2O_2 usando la prueba de la TMB. Barra= 100 μm .

Ferrer y Barceló (1999), sugieren que, en parte, el efecto del NO se deba a la eliminación de formas activas de la enzima, aunque no se descarta la posibilidad de que sea debido a la unión con formas inactivas (Ascenzi y col., 1989), o a la eliminación de radicales durante el ciclo catalítico de la peroxidasa.

Una vez comprobado el efecto del SNP sobre la actividad peroxidasa de *Z. elegans* y que este efecto es debido al NO, se intentó determinar la presencia de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) en *Z. elegans*.

La NOS genera el NO a través de la oxidación de la L-arginina para dar L-citrulina + NO. Esta enzima necesita como cofactor NADPH, y requiere la

presencia de O₂ y la participación de gran cantidad de otros cofactores como: Mg⁺², Ca⁺², calmodulina, tetrahidrobiopterina (H₄B) y FAD.

Los métodos de medida de la actividad NOS se basan normalmente en la desaparición de la L-arginina o en la aparición de L-citrulina (Ninnemann y Maier, 1996), aunque en nuestro caso utilizamos el método propuesto por Murphy y Noack (1994), que usa la hemoglobina. Según este método el NO reacciona con la oxihemoglobina, para dar lugar a la formación de la metahemoglobina. Esta reacción provoca un aumento de la absorbancia a 401 nm, y un descenso de absorbancia a 421 nm, pudiéndose usar estas dos longitudes de onda para el seguimiento de la reacción. Asimismo, durante el transcurso de la conversión de la oxi-Hb a la meta-Hb aparece un punto isosbético a 411 nm, pudiéndose usar también las variaciones observadas en la diferencia de absorbancia entre (401-411), (421-411) o (401-421).

En la tabla IV. 22., se resumen los cambios en la absorbancia a 401 nm, obtenidos al intentar medir la actividad de la NOS en tallos de *Z. elegans*. En la primera fila se muestran los distintos substratos y cofactores usados en los ensayos, indicando su presencia en el medio de reacción con el signo (+++) y su ausencia con (---). Como se puede observar en dicha tabla, no se obtuvo el esperado incremento en los valores de absorbancia a 401 nm, presentando incluso algunos medios de reacción sin L-arginina, un aumento superior a los medios de reacción completos. También se realizaron seguimientos de la reacción a 421 nm y usando las diferencias (401-411), (421-411), y (401-421), no obteniéndose en ninguno de los casos medidas positivas de la presencia de la NOS.

Al no haber podido detectar la presencia de la NOS por el método de la hemoglobina realizamos un control, siguiendo la oxidación de NADPH dependiente de la presencia de L-arginina, no encontrando dependencia alguna entre la oxidación del NADPH y la presencia o no en el medio de L-arginina. Todos estos resultados nos hacen pensar que, o bien la NOS no aparece de forma activa en los tallos de *Z. elegans*, o el método de medida o de extracción no son los adecuados.

Tabla IV. 22.- Ensayo de la actividad NOS en tallos de *Z. elegans* usando el método de la hemoglobina

Ensayo	Hepes 100mM	L-arginina 1 mM	Mg ²⁺ 1mM	Ca ²⁺ 1mM	Calmodulina 50 u	NADPH 0,1 mM	HbO ₂ 8 μM	H4B 10 μM	FAD 4 μM	NOS	Abs 1 min	Abs 10 min	ΔAbs min ⁻¹
1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	+++	---	1,0762	1,0996	+ 0,002
2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	+++	+++	1,0891	1,0805	-0,0080
3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	1,0423	1,0251	-0,0019
4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	***	1,0697	1,0433	-0,0026
5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	+++	4x	1,1294	1,0976	-0,0032
6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	+++	4x	1,2596	1,0600	- 0,0212
7	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	1,0452	1,0806	+0,0052
8	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	4x	1,0743	1,0896	+0,0033
9	+++	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	4x	1,0574	1,0491	-0,0008

+++; indica presencia en el medio de reacción; ---: indica ausencia; *** La muestra es incubada con el H₄B previamente a la reacción
4x La muestra ha sido concentrada 4 veces

Finalmente, tras conocer el efecto inhibitor del NO sobre la peroxidasa, y teniendo en cuenta su importante papel como señal en procesos de resistencia a patógenos, decidimos estudiar su efecto sobre la peroxidasa de pimiento implicada en la lignificación como respuesta a la infección con *V.dahliae*.

Como se observa en la Figura IV.98., el SNP es un inhibidor de la oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa de pimiento. Así, a la concentración 1 mM el efecto inhibitor es del 25%, aumentando la inhibición al aumentar la concentración de SNP.

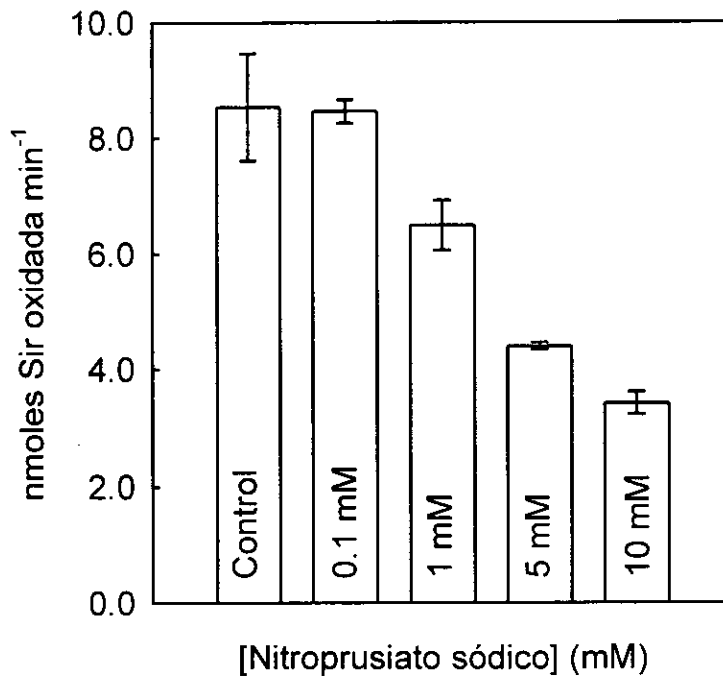


Figura IV. 98.- Efecto del nitroprusiato sódico sobre la velocidad de oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa de *C. annuum*. El medio de reacción estaba compuesto por H_2O_2 0,5 mM, siringaldazina 50 μ M, peroxidasa de *C. annuum* y distintas concentraciones de nitroprusiato sódico, en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. El SNP se añadió al medio 1 minuto antes de iniciar la reacción con la adición de la Sir. El SNP se incubó 15 minutos antes de su uso. Los datos son la media de tres valores.

Resultados similares se observaron durante la oxidación de la TMB por la peroxidasa de pimiento (Fig. IV.99). En este caso el SNP a la concentración de 5 mM, fue capaz de inhibir la actividad enzimática en un 30%, mientras que a la concentración de 10 mM, el efecto inhibitor fue del 50%.

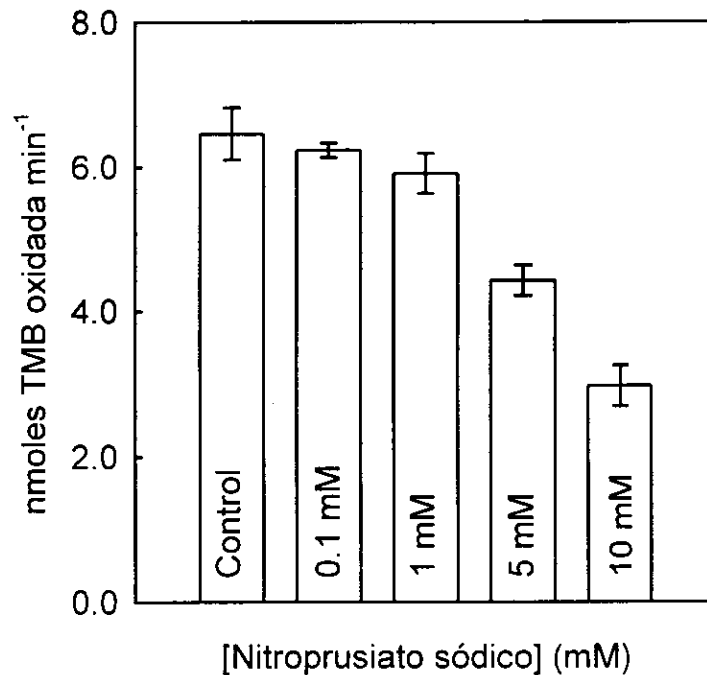


Figura IV. 99.- Efecto del nitroprusiato sódico sobre la velocidad de oxidación de la TMB por la peroxidasa de *C. annuum*. El medio de reacción estaba compuesto por H_2O_2 0,5 mM, TMB 0,1 mg ml⁻¹, peroxidasa de *C. annuum* y distintas concentraciones de nitroprusiato sódico, en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0. El SNP se añadió al medio 1 minuto antes de iniciar la reacción con la adición de la TMB. El SNP se incubó 15 minutos antes de su uso. Los datos son la media de tres valores.

Estos nos indican que el NO tiene un efecto claro sobre la peroxidasa de pimiento. Sin embargo, la participación real del NO en los procesos de lignificación y la respuesta a la infección con *V. dahliae*, es desconocida, abriéndonos un amplio campo de investigación futuro.

V.- CONCLUSIONES

1.- El análisis de las ligninas por el método de la tioacidolisis en el hipocotilo de *Zinnia elegans*, muestra la presencia de grupos coniferilaldehído terminales unidos por enlaces O-4, así como la presencia de alcohol coniferílico y alcohol sinapílico formando parte de las sub-estructuras lineales aril-glicerol- β -ariléter. La relación entre los grupos de guaiacilo y siringilo en esta fracción lineal de ligninas es de 57/43.

2.- La peroxidasa de *Zinnia elegans* es capaz de oxidar el alcohol coniferílico, el alcohol sinapílico, el coniferilaldehído y el sinapilaldehído, tanto en presencia, como en ausencia de H_2O_2 , de acuerdo al modelo cinético propuesto como general para las peroxidasas. Asimismo, esta enzima muestra una afinidad por todos los sustratos del orden de μM , similar a la que presentan las enzimas inmediatamente anteriores en el proceso de síntesis de las ligninas. La peroxidasa de *Z. elegans* presenta una reactividad especial frente al alcohol sinapílico.

3.- Por medio del uso de inhibidores competitivos, se ha podido demostrar a nivel histoquímico, que la peroxidasa de *Z. elegans* se encuentra localizada tanto espacial como temporalmente en los sitios de lignificación activa, lo cual nos permite sugerir que es la enzima clave en la polimerización de las ligninas de tipo siringilo.

4.- La infección de plantas de *Capsicum annuum* con *Verticillium dahliae* provoca un aumento en la actividad peroxidasa de las plantas independientemente del sustrato empleado, proceso que está acompañado por un aumento en la expresión de dos isoenzimas ácidas, de pI 3,6 y 4,0. Esta última isoenzima presenta una reactividad especial con la siringaldazina, lo que confirma su participación en los procesos de lignificación oxidando los grupos siringilo.

5.- La infección de *C. annuum* con *V. dahliae* provoca un aumento en la cantidad de lignina en las plantas infectadas, conjuntamente con un cambio en su composición, que se refleja en una mayor proporción de grupos guaiacilo en las ligninas de las plantas infectadas.

6.- La peroxidasa de *C. annuum* es capaz de oxidar el alcohol coniferílico, el alcohol sinapílico, el coniferilaldehído y el sinapilaldehído. El uso de inhibidores competitivos nos ha permitido demostrar, a nivel histoquímico, que esta peroxidasa se encuentra localizada tanto espacial como temporalmente en los sitios de lignificación activa, lo cual nos permite sugerir que es la enzima clave en la polimerización de las ligninas en el pimiento.

7.- A lo largo del proceso de infección se ha observado un aumento en el contenido de fenoles, tanto libres como ligados, en todos los órganos estudiados, que puede reflejar en alguna medida las profundas alteraciones que sufre el metabolismo secundario de la planta, como consecuencia de la infección.

8.- Como consecuencia de la inoculación de *C. annuum* por *V. dahliae*, se ha observado un aumento en la actividad ascorbato peroxidasa, y una disminución en la actividad catalasa en las últimas etapas estudiadas del proceso de infección. El uso de técnicas histoquímicas ha permitido comprobar que durante las primeras fases de la interacción, no se produce un estrés oxidativo en las plantas inoculadas. Estos resultados nos permiten sugerir que, de haberla, el metabolismo oxidativo tiene una respuesta lenta en este tipo de interacción.

9.- Finalmente, se ha estudiado el efecto del nitroprusiato sódico sobre la actividad de las peroxidasas implicadas en la lignificación. El efecto del SNP se revierte usando PTIO, lo que nos indica un papel regulador del NO en este proceso. Estas observaciones nos abren nuevas perspectivas en el control de la interacción *C. annuum*- *V. dahliae*, que serán objeto de posteriores estudios.

VI.- BIBLIOGRAFÍA

- Abeles, F.B., y Biles, C.L.** (1991). Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. *Plant Physiol.* 95, 269-273.
- Acosta, M., Arnao, M.B., Del Río, J.A. y García-Cánovas, F.** (1991). Inactivation of peroxidases. En: *Biochemical, molecular and physiological aspects of plant peroxidases* (Lobarzewski, J., Geppin, H., Penel, C. y Gaspar, T., eds.) 174-184. University of Geneve. Geneve.
- Adams, J.B., Harvey, A. y Dempsey, C.E.** (1996). Regenerated and denaturated peroxidase as potential lipid oxidation catalysts. *Food Chem.* 57, 505-514.
- Adler, A** (1977). Lignin chemistry past, present and future. *Wood Sci. Technol.* 11, 169-218.
- Alba, C.M., de Forchetti, S.M., y Tigier, H.A.** (1996). Peroxidase and phenoloxidase activities in peach endocarp. En "Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology" (C. Obinger, U. Burner, R. Ebermann, C. Penel, y H. Greppin, eds.), pp. 243-246. University of Geneva, Geneva.
- Anbar, M.** (1995). Nitric oxide: a synchronizing chemical messenger. *Experientia* 51, 545-550.
- Angelini, R., y Federico, R.** (1989). Histochemical evidence of polyamine oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall. *J. Plant Physiol.* 135, 212-217.
- Arnao, M.B., Acosta, M., Del Río, J.A., Varón, R. y García-Cánovas, F.** (1990). A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Acta* 1041, 43-47.
- Ascenzi, P., Brunori, M., Coletta, M. y Desideri, A.** (1989). pH effects on the haem iron co-ordination state in the nitric oxide and deoxy derivatives of ferrous horseradish peroxidase and cytochrome c peroxidase. *Biochem. J.* 258, 473-478.
- Atanassova, R., Favet, N., martz, F., Chabbert, B., Tollier, M.T., Monties, B., Fritig, B. y Legrand, M.** (1995). Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequences in sense and antisense orientation. *Plant J.*, 8, 465-477.

- Auh, C.K., y Murphy, T.M.** (1995). Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O_2^- y H_2O_2 by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells. *Plant Physiol.* 107, 1241-1247
- Baier, M., Goldberg, R., Catesson, A.M., Francesch, C., y Rolando, C.** (1993). Seasonal changes of isoperoxidases from poplar bark tissues. *Phytochemistry* 32, 789-793.
- Bakardjieva, N.T., Christova, N. y Christov, K.** (1996). Effect of calcium and zinc ions on the sensitive of peroxidase from mosses (*Mnium* sp.) and ferns (*Polypodium vulgare*) to high temperature. *Can. J. Bot.* 74, 1665-1670.
- Baker, C.J. y Orlandi, E.W.** (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33, 299-321.
- Bakovic, M. y Dunford, H.B.** (1993). Kinetics of the oxidation of p-coumaric acid by prostaglandin H synthase and hydrogen peroxide. *Biochemistry* 32, 833-840.
- Banci, L.** (1997). Structural properties of peroxidase. *J. Biotechnol.* 53, 253-263.
- Bao, W., O'Maley, D.M., Whetten, R. y Sederoff, R.R.** (1993). A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science* 260, 672-674.
- Barber, K.R., Rodríguez-Marañón, M.J., Shaw, G.S. y Van Huystee, R.B.** (1995). Structural influence of calcium on the heme cavity of cationic peanut peroxidase as determined by 1H -NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* 232, 825-833.
- Baucher, M., Chabbert, B., Pilate, G., Van Doorselaere, J., Tollier, M., Petit-Conil, M., Cornu, D., Monties, B., Van Montagu, M., Inzé, D., Jouanin, L. y Boerjan, W.** (1996). Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinamyl alcohol dehydrogenase in poplar. *Plant Physiol.* 112, 1479-1490.
- Bauer, W., Stadler, R. y Zenk, M.H.** (1992). Peroxidase catalyzed dimerization and demethylation of protoberberine alkaloids. *Bot. Acta* 105, 370-374.

- Berdmore, J., Ride, J.P. y Granger, J.W.** (1983). Cellular lignification as a factor in the hypersensitive resistance of wheat to stem rust. *Physiol. Plant Pathol.* 22, 209-220.
- Bernal, M.A., Pedreño, M.A., Calderón, A.A., Muñoz, R., Ros Barceló, A. y Merino de Cáceres, F.** (1993a). The subcellular localization of isoperoxidases in *Capsicum annuum* leaves and their different expression in vegetative and flowered plants. *Ann. Bot.* 72, 415-421.
- Bernal, M.A., Calderón, A.A., Pedreño, M.A., Muñoz, R., Ros Barceló, A. y Merino de Cáceres, F.** (1993b). Dihydrocapsaicin oxidation by *Capsicum annuum* (var. *annuum*) peroxidase. *J. Food Sci.* 58, 611-613 + 679.
- Bernal, M.A., Calderón, A.A., Pedreño, M.A., Muñoz, R., Ros Barceló, A. y Merino de Cáceres, F.** (1993c). Capsaicin oxidation by peroxidase from *Capsicum annuum* (var. *annuum*) fruits. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1041-1044.
- Bestwick, C.S., Brown, I.R., Bennett, M.H.R., Mansfield, J.W.** (1997). Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell* 9, 209-221.
- Billa, E., Tollier, M.T. y Monties, B.** (1996). Characterization of the monomeric composition of *in situ* wheat straw lignins by alkaline nitrobenzene oxidation: Effect of temperature and reaction time. *J. Sci. Food Agric.* 72, 250-256
- Blum, U., Shater, S.R.** (1988). Microbial populations and phenolic acid in soil. *Soil Biol. Biochem.* 20, 793-800.
- Bohlmann, H., Clausen, S., Behnke, S., Giese, H., Hiller, C., Reihmann-Phillipp, V., Schrader, G., Barkholt, V. y Apel, K.** (1988). Leaf-specific thionins of barley: a novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involved in the defense mechanism of plants. *EMBO J.* 7, 1559-1565.

- Boudet, A.M., y Grima-Pettenati, J. (1995a).** Lignin genetic engineering. *Mol. Breed.* 2, 23-39.
- Boudet, A. M., Lapiere, C. y Grima-Pettenati, J. (1995b).** Biochemistry and molecular biology of lignification. *New Phytol.* 129, 203-236.
- Boudet, A. M., Goffner, D. P., y Grima-Pettenati, J. (1996).** Lignins and lignification: Recent biochemical and biotechnological developments. *C.R. Acad. Sci. Paris (Life Sci.)* 319, 317-331.
- Brady, J.D. y Fry, S.C. (1997).** Formation of di-isodityrosine and loss of isodityrosine in the cell walls of tomato cell-suspension cultures treated with fungal elicitors or H₂O₂. *Plant Physiol.* 115, 87-92.
- Brownleader, M.D., Ahmed, N., Trevan, M., Chaplin, M.F. y Dey, P.M. (1995).** Purification and partial characterization of tomato extensin peroxidase. *Plant Physiol.* 109, 1115-1123.
- Brownleader, M.D., McNally, P.E., Davies, G.E.A., Trevan, M. y Dey, P.M. (1997).** Elicitor-induced extensin insolubilization in suspension-cultured tomato cells. *Phytochemistry.* 46, 1-9.
- Calderón, A.A., Muñoz, R., Morales, M. y Ros Barceló, A. (1992).** A comparative study of two spectrophotometric methods for measuring coniferyl alcohol oxidation catalyzed by peroxidase. *Phytochem. Anal.* 3, 238-240.
- Calderón, A.A., Zapata, J.M., Muñoz, R. y Ros Barceló, A. (1993).** Localization of peroxidase in grapes using nitrocellulose blotting of freezing/thawing fruits. *HortScience.* 28, 38-40.
- Calderón, A.A., Zapata, J.M. y Ros Barceló, A. (1994).** Peroxidase-mediated formation of resveratrol oxidation products during the hypersensitive-like reaction of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 44, 289-299.
- Candela, M.E., Alcázar, M.D., Espín, A., Egea, C. y Almela, L. (1995).** Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathol.* 44, 116-123.

- Carpita, N., McCann, M., y Griffing, L.R.** (1996). The plant extracellular matrix: New from the cell's frontier. *Plant Cell* 8, 1451-1463.
- Cassab, G.I. y Varner, J.E.** (1988). Cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 39, 321-.
- Catesson, A.M., Czaninski, Y, y Monties, B.** (1978). Caractéristiques histochimiques des peroxydases parietales dans les cellules en cours de lignification. *C.R. Acad. Sci. Paris* 286, 1787-1790.
- Chabanet, A., Golberg, R., Catesson, A.M., Szely, M.Q., Delaunay, A.M. y Faye, L.** (1994) Characterization and localization of a phenoloxidase in mung bean hypocotyl cell walls. *Plant Physiol.* 106, 1095-1102.
- Chabbert, B., Tollier, M.T. y Monties, B.** (1993). Expression of brown midrib mutations on grass lignin. En: *Proceedings of the 38th Congress on Lignin.* Japan Wood Research Society, Kagawa, Japan, 33-36.
- Chakraborty, U., Chakraborty, B.N. y Kappor, M.** (1993). Changes in the levels of peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in *Brassica napus* cultivars showing variable resistance to *Leptosphaeria maculans*. *Folia Microbiol.* 38, 491-496.
- Chance, B.** (1952). The kinetics and stoichiometry of the transition from the primary to the secondary peroxidase-peroxide complexes. *Arch. Biochem. Biophys.* 41, 416-424.
- Chapple, C.C.S., Vogt, T., Ellis, B.E., y Somerville, C.R.** (1992). An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* 4, 1413-1424.
- Chen, Z. y Klessig, D.** (1991). Identification of a soluble salicylic acid-binding protein that may function in signal transduction in the plant disease-resistance response. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* 88, 8179-8183.
- Chen, Z., Silva, H. y Klessig, D.** (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262, 1883-1886.

- Chen, Z., Malami, J., Henning, J., Conrarth, V., Sanchez Casas, P., Silva, M., Ricigliano, J. y Klessig, D. F.** (1995). Induction modification of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA.* 92, 4134-4137
- Chiang, V. L. y Funaoka, M.** (1990). The difference between guaiacyl and guaiacyl-syringyl lignins in their responses to kraft delignification. *Holzforschung* 44, 309-313.
- Chibbar, R.N., Cella, R. y Van Huystee, R.B.** (1984). The heme moiety in peanut peroxidase. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62, 1046-1050.
- Civello, P.M., Martinez, G.A., Chaves, A.R. y Añón, M.C.** (1995). Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): partial purification and determination of some properties. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2596-2601.
- Collen, J., Ekdhal, A., Abrahamsson, K. y Pedersen, M.** (1994). The involvement of hydrogen peroxide in the production of volatile halogenated compounds by *Meristiella gelidium*. *Phytochemistry.* 36, 1197-1202.
- Converso, D.A. y Fernández, M.E.** (1996). Ca^{+2} activation of wheat peroxidase: a possible physiological mechanism of control. *Arch. Biochem. Biophys.* 333, 59-65.
- Crevecoeur, M., Pinedo, M., Greppin, H. y Penel, C.** (1997). Peroxidase activity in shoot apical meristem from *Spinacia*. *Acta Histochem.* 99, 177-186.
- Czaninski, Y.** (1978). Localisation ultrastructurale d'activites peroxydasiques dans les parois du xyleme du ble pendant leur differentiation. *C.R. Acad. Sci. Paris* 286, 957-959.
- Czaninski, Y. y Catesson, A.M.** (1969). Localisation ultrastructurale d'activites peroxydasiques dans les tissus conducteurs vegetaux au cours du cycle annuel. *J. Microscopie* 8, 875-888.
- Czaninski, Y., Sachot, R.M., y Catesson, A.M.** (1993). Cytochemical localization of hydrogen peroxide in lignifying cell wall. *Ann. Bot.* 72, 547-550.

- Davin, L.B., Bedgar, D.L., Katayama, T., y Lewis, N.G.** (1992). On the stereoselective synthesis of (+)-pinoresinol in *Forsythia suspensa* from its achiral precursor, coniferyl alcohol. *Phytochemistry* 31, 3869-3874.
- Dean, J.F.D., y Eriksson, K.E.L.** (1992). Biotechnological modification of lignin structure and composition in forest trees. *Holzforschung* 46, 135-147.
- Dean, J.F.D., y Eriksson, K.E.L.** (1994). Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung* 48, 21-33.
- Dean, J.F.D., Sterjiades, R., y Eriksson, K.E.L.** (1994). Purification and characterization of an anionic peroxidase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) cell suspension cultures. *Physiol. Plant.* 92, 233-240.
- DeBary, A.** (1863). Recherches sur le développement de quelques champignons parasites. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* 20, 5-148.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A. y Lamb, C.** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394, 585-588.
- De Pinto, M.C. y Ros Barceló, A.** (1997). Cytochemical localization of phenol-oxidizing enzymes in lignifying *Coleus blumei* stems. *Eur. J. Histochem.* 41, 17-22.
- Desikan, R., Hancock, J.R., Coffey, M.J., y Neill, S.J.** (1996). Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Lett.* 382, 213-217.
- Dharmawardhana, D.P., Ellis, B.E., y Carlson, J.E.** (1995). A β -glucosidase from logdepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. *Plant Physiol.* 107, 331-339.
- Díaz, J. y Merino, F.** (1998). Wound-induced shikimate dehydrogenase and peroxidase related to lignification in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves. *J. Plant Physiol.* 152, 51-57.
- Díaz, J., Bernal, A., Merino, F. y Ros Barceló, A.** (1998). Phenolic metabolism in *Capsicum annuum* L. *Recent Res. Devel. Phytochem.* 2, 155-169.

- Díaz, J., Ros Barceló, A. y Merino de Cáceres, F. (1997).** Changes in shikimate dehydrogenase and the end products of the shikimic pathway, chlorogenic acid and lignins, during the early development of seedlings of *Capsicum annuum*. *New Phytol.* 136, 183-188.
- Dickman, M.B., Podilla, G.K. y Kolattukudy, P.E. (1989).** Insertion of cutinase gene into a wound pathogen enables it to infect intact host. *Nature* 342, 446-448.
- Dixon, R.Y. y Paiva, N. (1995).** Stress-Induces phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085-1097.
- Doke, N., Miura, Y., Sánchez, L.M., Park, H.J., Noritake, T., Yoshioka, H. y Kawakita, K. (1996).** The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence. *Gene*, 179, 45-51.
- Donaldson, L.A. (1985 a).** Critical assessment of interference microscopy as a technique for measuring lignin distribution in cell walls. *N.Z.J. For. Sci.* 15, 349-360.
- Donaldson, L.A. (1985 b).** Within- and between-tree variation in lignin concentration in the tracheid cell wall of *Pinus radiata*. *N.Z.J. For. Sci.* 15, 361-369.
- Driouich, A., Laine, A.C., Vian, B. y Faye, L. (1992).** Characterization and localization of laccase forms in stem and cell cultures of sycamore. *Plant J.* 2, 13-24.
- Durner, J., Wendehenne, D. y Klessig, D.F. (1998).** Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* 95, 10328-10333.
- Ede, R. M., y Brunow, G. (1990).** Two-dimensional ^1H - ^1H chemical shift correlation and J-resolved NMR studies on isolated and synthetic lignins. *Holzforschung* 44, 95-101.
- Edwards, R., Stones, S.M., Gutiérrez-Mellado, M.C. y Jorrin, J. (1997).** Characterization and inducibility of a scopoletin-degrading enzyme from sunflower. *Phytochemistry* 45, 1109-1114.

- Egea, C., Alcázar, M.D. y Candela, M.E. (1996).** Capsidiol: its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiol. Plant.* 98, 737-742.
- Elstner, E.F., y Heupel, A. (1976).** Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.). *Planta* 130, 175-180.
- Ferrer, M.A., Pedreño, M.A., Muñoz, R., y Ros Barceló, A. (1990).** Oxidation of coniferyl alcohol by cell wall peroxidases at the expense of indole-3-acetic acid and O₂. A model for the lignification of plant cell walls in the absence of H₂O₂. *FEBS Lett.* 276, 127-130.
- Ferrer, M.A. y Ros Barceló, A. (1994).** Control of the lignification in *Lupinus* by genistein acting as superoxide scavenger and inhibitor of the peroxidase-catalyzed oxidation of coniferyl alcohol. *J. Plant Physiol.* 144, 64-67.
- Ferrer, M.A. y Ros Barceló, A. (1999).** Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H₂O₂ production by the xylem of *Zinnia elegans*. *Plant, Cell Environ.* 22, 891-897.
- Flor, H.H. (1942).** Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32, 653-669.
- Freudenberg, K., Harkin, J.M., Reichert, M., y Fukuzumi, T. (1958).** Die an der verholzung beteiligten enzyme. Die dehydrierung des sinapinalkohols. *Chem. Ber.* 91,581-590.
- Frías, I., Siverio, J. M., González, C., Trujillo, J.M., y Perez, J. A. (1991).** Purification of a new peroxidase catalysing the formation of lignan-type compounds. *Biochem. J.* 273, 109-113.
- Fridovich, I. (1977).** Oxygen is toxic. *BioScience* 27, 462-466.
- Friend, J. (1981).** Plant Phenolics, lignification and plant disease. *Prog. Phytochemistry* 7, 197-261.
- Fry, S.C. y Miller, J.G. (1987).** H₂O₂-dependent cross-linking of feruloyl-pectins in vivo. *Food Hydrocolloid* 1, 395-397.

- Fujita, I., Hanson, L.K., Walker, F.A. y Fajer, J. (1983).** Models for compound I of peroxidases: axial ligand effects. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 3296-3300.
- García-Florenciano, E., Calderón, A.A., Muñoz, R. y Ros Barceló, A. (1992).** The decarboxylative pathway of indole-3-acetic acid catabolism is not functional in grapevine protoplasts. *J. Exp. Bot.* 43, 715-721.
- Gaspar, TH., Penel, C., Thorpe, T. y Greppin, H. (1982).** Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Universite de Geneve. Switzerland.
- Gazaryan, I.G. y Lagrimini, L.M. (1995).** Purification and unusual kinetic properties of tobacco anionic peroxidase. *Phytochemistry* 41, 1029-1034.
- Geiger, H. y Fuggerer, H. (1979).** On the chemistry of the Wiesner reaction on lignin. *Z. Naturforsch.* 34b, 1471-1472
- Goldberg, R., Le, T., y Catesson, A.M. (1985).** Localization and properties of cell wall enzyme activities related to the final stages of lignin biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 36, 503-510.
- Goldberg, R., Liberman, M., Mathieu, C., Pierron, M. y Catesson, A.M. (1987).** Development of epidermal cell wall peroxidases along the mung bean hypocotyl: possible involvement in cell wall stiffening process. *J. Exp. Bot.* 38, 1378-1390.
- Grabber, J.H., Ralph, J., Hatfield, R.D., Quideau, S., Kuster, T., y Pell, A.N. (1996).** Dehydrogenation polymer-cell wall complexes as a model for lignified grass walls. *J. Agric. Food Chem.* 44, 1453-1459.
- Grand, C., Boudet, A. y Boudet, A.M. (1983).** Isoenzymes of hydroxycinnamate:CoA ligase from poplar stems- Properties and tissue distribution. *Planta* 158, 225-229.
- Gray, J.S.S, Yang, B.Y., Hull, S.R., Venzke, D.P. y Montgomery, R. (1996).** The glycans of soybean peroxidase. *Glycobiology* 6, 23-32.
- Green, B.N. y Oliver, R.W.A. (1991).** The study of intact proteins and glycoproteins by electrospray m.s. *Biochem. Soc. Trans.* 19, 929-935.
- Grisebach, H. (1981).** Lignins. En: *The Biochemistry of plants. A comprehensive treatise.* Conn, E.E. editor, Academic Press.

- Grommeck, R. y Markakis, P.** (1964). The effect of peroxidase on anthocyanin pigments. *J. Food Sci.* 29, 53-57.
- Gross, G. G. y Kreiten, W.** (1975). Reduction of coenzyme A thioesters of cinnamic acids with an enzyme preparation from lignifying tissue of *Forsythia*. *FEBS Letters*, vol. 54, nº 2, 259-262.
- Guibault, G.G. y Kramer, D.N.** (1964). 4-Methoxy- α -naphthol as a spectrophotometric reagent substrate for measuring peroxidatic activity. *Anal. Chem.* 36, 2494-2496
- Hakamatsuka, T., Shinkai, K., Noguchi, H., Ebizuka, Y. y Sankawa, U.** (1992). Isoflavone dimers from yeast extract-treated cell suspension cultures of *Pueraria lobata*. *Z. Naturforsch.* 47c, 117-182.
- Halliwell, B.** (1978). Lignin synthesis: The generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols. *Planta* 140, 81-88.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.** (1989). *Free radicals in biology and medicine*. Editorial Clarendon Press. pp 87-92.
- Halpin, C., Knight, M.E., Foxon, G.A., Campbell, M.M., Boudet, A.M., Boon J.J., Chabbert, B., Tollier, M.T. y Scuch, W.** (1994). Manipulation of lignin quality by downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant J.* 6, 339-350.
- Hammerschmidt, R., Nuckles, E.M. y Kuc, J.A.** (1982). Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Plant Pathol.* 20, 73-82.
- Hapiot, P., Pinson, J., Neta, P., Francesch, C., Mhamdi, F., Rolando, C., y Schneider, S.** (1994). Mechanism of oxidative coupling of coniferyl alcohol. *Phytochemistry* 36, 1013-1020.
- Harkin, J.M. y Obst, J.R.** (1973) Lignification in trees: indication of exclusive peroxidase participation. *Science* 180, 296-298.
- Hatfield, R.D., Grabber, J., Ralph, J. y Brei, K.** (1999). Using the acetyl bromide assay to determine lignin concentrations in herbaceous plants: some cautionary notes. *J. Agric. Food Chem.* 47, 628-632.

- Heinz, R., Lee, S.W., Saprno, A., Nazai, R.N. y Robb, J. (1998).** Cyclical systemic colonization in *Verticillium*-infected tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 52, 385-396.
- Hendriks, T. y Van Loon, L.C. (1990).** Petunia peroxidase a is localized in the epidermis of aerial plant organs. *J. Plant Physiol.* 136, 519-525.
- Henriksen, A., Smith, A.T. y Gajhede, M. (1999).** The structure of the Horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates. *J. Biol. Chem.* 274, 35005-35011
- Hepler, P.K., Rice, R.M., y Terranova, W.A. (1972).** Cytochemical localization of peroxidase in wound vessel members of *Coleus*. *Can. J. Bot.* 50, 977-983.
- Hibino, T., Takabe, K., Kawazu, T., Shibata, D. y Higuchi, T. (1995).** Increase of cinnamaldehyde groups in lignin of transgenic tobacco plants carrying an antisense gene for cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 929-931.
- Higuchi, T. (1959).** Studies on the biosynthesis of lignins. En "Biochemistry of Wood" (K. Kratzl and G. Billek, eds.), pp. 161-168. Pergamon, New York.
- Higuchi, T. (1990).** Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24, 23-63.
- Higuchi, T. y Ito, Y. (1958).** Dehydrogenation products of coniferyl alcohol formed by the action of mushroom phenol oxidase, rhus-laccase and radish peroxidase. *J. Biochem.* 45, 575-579
- Higuchi, T., Ito, T., Umezawa, T., Hibino, T. y Shibata, D. (1994).** Red-brown color of lignified tissues of transgenic plants with antisense CAD gene: Wine-red lignin from coniferyl aldehyde. *J. Biotech.* 37, 151-158.
- Hoyle, M.C. (1977).** High resolution of peroxidase-indolacetic acid oxidase isoenzymes from horseradish by isoelectric focusing. *Plant Physiol.* 60, 787-793.

- Huff, A.** (1982). Peroxidase-catalized oxidation of chlorophyll by hydrogen peroxide. *Phytochemistry* 21, 261-265.
- Huh, G.H., Lee, S.J., Bae, Y.S., Liu, J.R. y Kwak, S.S.** (1997). Molecular cloning and characterization of cDNAs for anionic and neutral peroxidases from suspension cultured-cells of sweet potato and their differential expression in response to stress. *Mol. Gen. Genet.* 255, 382-391.
- Iori, R., Cavalieri, B. y Palmieri, S.** (1995). Cathodic peroxidases of durum wheat flour. *Cereal Chem.* 72, 176-181.
- Jacobs, J.M., Jacobs, N.J., Kuhn, C.B., Gorman, N., Dayan, F.E., Duke, S.O., Sinclair, J.F. y Sinclair, P.R.** (1996). Oxidation of porphyrinogens by horseradish peroxidase and formation of a green pyrrole pigment. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 227, 195-199.
- Jen, J.J., Seo, A. y Flurkey, W.H.** (1980). Tomato peroxidase: purification via hydrophobic chromatography. *J. Food Sci.* 45, 60-63.
- Jennings, A.C. y Street, H.E.** (1974). Changes in peroxidase isoenzymes activities in batch-cultures sycamore cells. Problems of assay by gel electrophoresis. *Plant Sci. Letters* 3, 357-363.
- Johnson, D.B., Moore, W.E. y Zank, L.C.** (1961). The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples. *Tappi* 44, 793-789.
- Kahn, V.** (1985) Tropolone- a compound that can aid in differentiating between tyrosinase and peroxidase. *Phytochemistry* 24, 915-920.
- Kim, S.H., Terry, M.E., Hoops, P., Dauwalder, M., y Roux, S.J.** (1988). Production and characterization of monoclonal antibodies to wall-localized peroxidases from corn seedlings. *Plant Physiol.* 88, 1446-1453.
- Knowles, R.G.** (1997). Nitric oxide biochemistry. *Biochem. Soc. T.* 25, 895-900.
- Kuc, J. y Nelson, O.E.** (1964). The abnormal lignins produced by the brown-midrib mutants of maize. *Arch. Biochem. Biophys.* 105, 103-113.
- LaFayette, P.R., Eriksson, K.E.L., y Dean, J.F.D.** (1995). Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding an acidic laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus* L.). *Plant Physiol.* 107, 667-668.

- Lagrimini, L.M.** (1991). Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant Physiol.* 96, 577-583.
- Lagrimini, L.M., Burkhart, W., Moyer, M., y Rothstein, S.** (1987). Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: Molecular analysis and tissue-specific expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7542-7546.
- Lamb, C. y Dixon, R.A.** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251-275.
- Lapierre, C.** (1993). Applications of new methods for the investigation of lignin structure. En "Forage Cell Wall Structure and Digestibility" (H. G. Jung, D. R. Buxton, R.D. Hatfield, y J. Ralph, eds.), pp. 133-166. American Society of Agronomy, Madison, WI.
- Lapierre, C., Pollet, B., y Rolando, C.** (1995). New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. *Res. Chem. Intermed.* 21, 397-412.
- Laxalt, A.M., Beligni, M.V. y Lamattina, L.** (1997) Nitric oxide preserves the level of chlorophyll in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 643-651.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon R. y Lamb, C.** (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583-593.
- Lewis, N.G. y Yamamoto, E.** (1990). Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 455-496.
- Lewis, N.G., y Davin, L.B.** (1994). Evolution of lignan and neolignan biochemical pathways. En "Evolution of Natural Products" (D. Nes, ed.), ACS Symp. Series, Vol. 562, pp. 202-246. Am Chem. Soc., Washington, D.C.

- Lewis, N.G. y Davin, L.B.** (1999a) The nature and functions of lignins. En: Comprehensive Natural Products Chemistry-Carbohydrates and their Derivatives including Tannins, Cellulose and Related Lignins- Vol.3 (Barton, D.H.R. y Nakanishi, K., eds.). New York Elsevier Science, 617-745.
- Lewis, N.G. y Davin, L.B.** (1999b) Lignans: biosynthesis and function. En: Comprehensive Natural Products Chemistry- Polyketides and other Secondary Metabolites including Fatty acids and their Derivatives- Vol. 1 (Barton, D.H.R. y Nakanishi, K., eds.). New York Elsevier Science, 639-712.
- Lin, L.S., y Varner, J.E.** (1991). Expression of ascorbic acid oxidase in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.). Plant Physiol. 96, 159-165.
- Liu, L., Dean, J.F.D., Friedman, W.E. y Eriksson, K.E.L.** (1994). A laccase-like phenoloxidase is correlated with lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* stem tissues. Plant J. 6, 213-224.
- Liu, L., Eriksson, K.E.L., y Dean, J.F.D.** (1995). Localization of hydrogen peroxide production in *Pisum sativum* L. using epi-polarization microscopy to follow cerium perhydroxide deposition. Plant Physiol. 107, 501-506.
- Lozoya, E., Hoffmann, H., Douglas, C., Schulz, W., Scheel, D. y Hahlbrock, K.** (1988). Primary structures and catalytic properties of isoenzymes encoded by the two 4-coumarate:CoA ligase genes in parsley. Eur. J. Biochem. 176, 661-667.
- Mäder, M., Ungemach, J., y Schlob, P.** (1980). The role of peroxidase isoenzyme groups of *Nicotiana tabacum* in hydrogen peroxide formation. Planta 147, 467-470.
- Mansell, R., Gross, G.G., Stöckigt, J., Franke, H. y Zenk, M.H.** (1974). Purification and properties of cinnamyl alcohol dehydrogenase from higher plants involved in lignin biosynthesis. Phytochemistry 13, 2427-2435.

- Mansfield, J.W.** (1982) The role of phytoalexins in disease resistance, en: "Phytoalexins", J.A. Bailey y J.W. Mansfield eds., 253-288 Blackie, Glasgow and London.
- Marklund, S., Ohlsson, P.I., Opara, A. y Paul, K.G.** (1974). The substrate profiles of the acidic and slightly basic horseradish peroxidases. *Biochem. Biophys. Acta* 350, 304-313.
- Martínez-Parra, J. y Muñoz, R.** (1997). An approach to the characterization of betanine oxidation by horseradish peroxidase. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2984-2988.
- Matile, Ph.** (1980). Catabolism of carotenoids: Involvement of peroxidase?. *Z. Pflanzenphysiol.* 99, 475-478.
- Matile, Ph. y Martinoia, E.** (1982). Catabolism of carotenoids: Involvement of peroxidase?. *Plant Cell Rep.* 1, 244-246.
- Matlok, J., Krzakowa, M. y Rudolph, H.** (1989). Peroxidase patterns in Bryophytes; A critical evaluation. *J. Hattori Bot. Lab.* 67, 407-414.
- Matsui, N., Fukushima, K., Yasuda, S. y Terashima, N.** (1994). On the behavior of monolignol glucosides in lignin biosynthesis. II. Synthesis of monolignol glucosides labeled with ^3H at the hydroxymethyl group of side chain and incorporation of the label into magnolia and ginkgo lignin. *Holzforschung* 48, 375-380.
- Mañle, J. y Ride, J.P.** (1982). Ultrastructure and autoradiography of lignifying cells in wheat leaves wound inoculated with *Botrytis cinerea*. *Physiol. Plant Pathol.* 20, 234-241.
- Mayer, A.M.** (1987). Polyphenol oxidases in plants. Recent progress. *Phytochemistry* 26, 11-20.
- McDougall, G.J.** (1992). Changes in cell wall associated peroxidases during the lignification of flax fibers. *Phytochemistry*, 31, 3385-3389.
- McDougall, G.J., Stewart, D., y Morrison, I.M.** (1994a). Cell wall-bound oxidases from tobacco (*Nicotiana tabacum*) xylem participate in lignin formation. *Planta* 194, 9-14.

- McDougall, G.J., Stewart, D., y Morrison, I.M.** (1994b). Oxidation of coniferyl alcohol to lignin-like products by tobacco xylem cell walls. *Phytochemistry* 37, 683-688.
- McEldoon, J.P. y Dordick, J.S.** (1996). Unusual thermal stability of soybean peroxidase. *Biotechnol. Prog.* 12, 555-558.
- McKeehen, J. y Fulcher, G.** (1997). Wheat phenolic compounds and their potential role in *Fusarium* resistance. *Poliphenols Actualites* 17, 7-10.
- McLean, J.G., LeTourneau, D.J. y Guthrie, J.D.** (1961). Relation of histochemical tests for phenols to *Verticillium* wilt resistance of potatoes. *Phytopathology* 51, 84-89.
- Mehlhorn, H., Lelandais, M., Korth, H.G. y Foyer, C.H.** (1996). Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Lett.* 378, 203-206.
- Mellon, J.E. y Lee, L.S.** (1995). Elicitation of cotton isoperoxidases by *Aspergillus flavus* and other fungi pathogenic to cotton. *Physiol. Plant Pathol.* 27, 281-288.
- Melouk, H.A.** (1992). *Verticillium*. En: "Methods for research on Soilborne phytopathogenic fungi" Singleton, L.L., Mihail, J.D. y Rush, C.M. eds. APS press. The American Phytopathological Society, Minesota.
- Meshitsuka, G. y Nakano, J.** (1978). Studies on the mechanism of lignin color reaction(XII). Maüle color reaction (8). *Mokuzai Gakkaishi* 24, 563-568.
- Meshitsuka, G. y Nakano, J.** (1979). Studies on the mechanism of lignin color reaction(XIII). Maüle color reaction (9). *Mokuzai Gakkaishi* 25, 588-594
- Mikhailov, A. T. y Pásaro, E.** (1995). En: Análisis inmunoquímico. Bases y técnicas. Servicio de Publicaciones, Universidad de La Coruña.
- Milosevic, N. y Slusarenko, A.J.** (1996). Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49,143-158.
- Moerschbacher, B.M., Noll, U., Ocampo, C.A., Flott, B.E., Gotthardt, U., Wüstefeld, A. y Reisener, H.J.** (1990). Hypersensitive lignification response as the mechanism of non-host resistance of wheat against oat crown rust. *Physiol. Plant.* 78, 609-615.

- Mohan, R., Bajar, A.M., y Kolattukudy, P.E.** (1993). Induction of a tomato anionic peroxidase gene (tap 1) by wounding in transgenic tobacco and activation of tap1/GUS and tap2/GUS chimeric gene fusions in transgenic tobacco by wounding and pathogen attack. *Plant Mol. Biol.* 12, 341-354.
- Montalbini, P. y Buonauro, R.** (1989). Effect of rust infection on levels of superoxide dismutases, catalase and peroxidase activities in different fractions of bean leaf homogenate. *Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica.* 24, 245-257.
- Monties, B.** (1985). Recent advances in lignin inhomogeneity. En "The Biochemistry of Plant Phenolics" (C.F. Van Sumere y P.J. Lea, eds.), Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, Vol. 25, pp. 161-181. Clarendon, Oxford.
- Morales, M., Alcántara, J. y Ros Barceló, A.** (1997). Oxidation of trans-resveratrol by a hypodermal peroxidase isoenzyme from Gamay rouge grape (*Vitis vinifera*) berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 33-38.
- Morales, M., Pedreño, M.A., Muñoz, R., Ros Barceló, A., y Calderón, A.A.** (1993). Purification and kinetic characterization of a basic peroxidase isoenzyme responsible for lignification in Gamay rouge grape (*Vitis vinifera*) berries. *Food Chem.* 48, 391-394.
- Morales, M., y Ros Barceló, A.** (1997). A basic peroxidase isoenzyme from vacuoles and cell walls of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry* 45, 229-232.
- Müller, K.O. y Börger, H.** (1940). Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora resistenz der Kartoffel. Zugleich ein Beitrag zum problem der "Erwobenen Resistenz" in Pflanzenreich. *Arb. Biol. Reichs. Land Forst.* 23, 189-231.
- Murphy, M.E. y Noack, E.** (1994). Nitric oxide assay using hemoglobin method. *Methods Enzymol.* 233, 240-250.

- Nakajima, R. y Yamazaki, I.** (1980). The conversion of horseradish peroxidase C to a verdohemoprotein by a hydroperoxide derived enzymatically from indole-3-acetic acid and by m-nitroperoxybenzoic acid. *J. Biol. Chem.* 255, 2067-2072.
- Nakamura, W.** (1967). Studies on the biosynthesis of lignins. I. Disproof against the catalytic activity of laccase in the oxidation of coniferyl alcohol. *J. Biochem.* 62, 54-61.
- Neish, A.C.** (1968). Monomeric intermediates in the biosynthesis of lignin. *En "Constitution and Biosynthesis of Lignin"* (K. Freudenberg y A.C. Neish, eds.), pp. 3-43. Springer-Verlag, New York.
- Nicholson, R.L., y Hammerschmidt, R.** (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30, 369-389.
- Ninnemann, H. y Maier, J.** (1996). Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photocondiation of *Neurospora crassa*. *Photochem. Photobiol.* 64, 393-398.
- Noritake, T., Kawakita, K. y Doke, N.** (1996). Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant Cell Physiol.* 37, 113-116.
- Normanly, J.** (1997). Auxin metabolism. *Physiol. Plant.* 100, 431-442.
- Nose, M., Bernards, M.A., Furlan, M., Zajicek, J., Eberhardt, T.L., y Lewis, N.G.** (1995). Evidence for sequential biosynthetic steps during lignin polymerization. *Phytochemistry* 39, 71-79.
- Nuez, F., Gil, R. y Costa, J.** (1996). Enfermedades no viróticas. En: "El cultivo de pimientos, chiles y ajíes" 193-247. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Ogawa, K., Kanematsu, S. Y Asada, K.** (1997). Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vacular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification. *Plant Cell Physiol.* 38, 1118-1126.
- Oku, H.** (1994). "Plant Pathogenesis and Disease Control". Ed. CRC Press. Florida.

- Okusa, K., Miyakoshi, T., y Chen, C.L.** (1996). Comparative studies on dehydrogenative polymerization of coniferyl alcohol by laccases and peroxidases. Part 1. Preliminary results. *Holzforschung* 50, 15-23.
- Olson, P.D. y Varner, J.E.** (1993). Hydrogen peroxide and lignification. *Plant J.* 4: 887-892.
- O'Malley, D.M., Whetten, R., Bao, W., Chen, C.L. y Sederoff, R.R.** (1993). The role of laccase in lignification. *Plant J.* 4, 751-757.
- Osakabe, K., Koyama, H., Kawai, S., Katayama, Y., y Morohoshi, N.** (1994). Molecular cloning and the nucleotide sequences of two novel cDNAs that encode anionic peroxidases of *Populus kitakammiensis*. *Plant Sci.* 103, 167-175.
- Osbourn, A., Bowyer, P., Lunness, P., Clarke, B. y Daniels, M.** (1995). Fungal pathogens of oat roots and tomato leaves employ closely related enzymes to detoxify different host plant saponins. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8, 971-978.
- Ostergaard, L., Abelskov, A.K., Mattson, O., y Welinder, K.G.** (1996). Structure and organ specificity of an anionic peroxidase from *Arabidopsis thaliana* cell suspension culture. *FEBS Lett.* 398, 243-247.
- Otte, O. y Barz, W.** (1996). The elicitor-induced oxidative burst in cultured chickpea cells drives the rapid insolubilization of two cell wall structural proteins. *Planta* 200, 238-246.
- Otter, T. y Polle, A.** (1997). Characterization of acidic and basic apoplastic peroxidases from needles of norway spruce (*Picea abies* L. Karsten) with respect to lignifying substrates. *Plant Cell Physiol.* 38, 595-602.
- Palazón, C. y Palazón, I.** (1989). Estudios epidemiológicos sobre la "tristeza" del pimiento del Valle Medio del Ebro. *Bol. San. Veg. Plagas* 15, 233-262
- Palazón, C., Gil, R. y Palazón, I.** (1978). La "tristeza" o "seca" del pimiento. Estado actual del problema. *ITEA* 32, 56-62
- Pappa, H.S. y Cass, A.E.G.** (1993). A step towards understanding the folding mechanism of horseradish peroxidase. Tryptophan fluorescence and circular dichroism equilibrium studies. *Eur. J. Biochem.* 212, 227-235.

- Paxton, J. D. (1981). Phytoalexins- a working redefinition. *Phytopathol. Z.* 101, 106-109.
- Pedreño, M.A., Bernal, M.A., Calderón, A.A., Ferrer, M.A., López-Serrano, M., Merino de Cáceres, F., Muñoz, R. y Ros Barceló, A. (1993). A general pattern for peroxidase isoenzyme localization and function in *Vitaceae*, *Solanaceae* and *Leguminosae*. En: *Plant Peroxidases: Biochemistry and physiology*, eds. K.J. Welinder, S.K. Rasmussen, C. Penel y H. Greppin, Universidad de Ginebra, Ginebra, pp. 307-314.
- Pedreño, M.A., Muñoz, R., Ros Barceló, A. y García-Carmona, F. (1989). Método de medida de la oxidación del alcohol 4-hidroxi-3-metoxicinámico catalizada por peroxidasa. cálculo de la constante de Michaelis y velocidad máxima de la reacción. *Afinidad* 422, 329-331.
- Peng, M. y Kuc, J. (1992). Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82, 696-699.
- Pillonel, C., Mulder, M.M., Boon, J.J., Foster, B. y Binder, A. (1991). Involvement of cinnamyl-alcohol dehydrogenase in the control of lignin formation in *Sorghum bicolor* L. Moench. *Planta* 185, 538-544.
- Polle, A., Otter, T., y Seifert, F. (1994). Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol.* 106, 53-60.
- Pollock, C.J. y Drysdale, R.B. (1976). The role of phenolic compounds in the resistance of tomato cultivars to *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathol. Z.* 86, 56-61.
- Pomar, F., Bernal, M.A., Díaz, J. y Merino, F. (1997). Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase. *Phytochemistry* 46, 1313-1317.
- Raganathan, K., Vidhyasekaran, P. (1986). Noninvolvement of phenolics in host-pathogen specificity in *Lablab niger*. En: "Physiology of disease resistance. CRC Press. Boca Ratón, Florida.

- Ralph, J., Hatfield, R.D., Quideae, S., Helm, R.F., Grabber, J.H., y Jung, H.J.G.** (1994 a). Pathway of *p*-coumaric acid incorporation into maize lignin as revealed by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 9448-9456.
- Ralph, J., Quideae, S., Grabber, y Hatfield, R.D.** (1994 b). Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 3485-3498.
- Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderires, G., Stewart, D., Macheteau, M.C., Boudet, A.M. y Goffner, D.** (1999). Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases-a divergent gene family- in poplar. *Eur. J. Biochem.* 259, 485-495.
- Rasmussen, C.B., Dunford, H.B. y Welinder, K.G.** (1995). Rate enhancement of compound I formation of barley peroxidase by ferulic acid, caffeic acid, and coniferyl alcohol. *Biochemistry* 34, 4022-4029.
- Ricard, J., Mazza, G. y Williams, R.J.P.** (1972). Oxidation-reduction potentials and ionized states of two turnip peroxidases. *Eur. J. Biochem.* 28, 566-578.
- Richard, F. y Nicolas, J.** (1989) Purification of apple peel peroxidase. Studies of some properties and specificity in relation to phenolic compounds. *Sci. Alim.* 9, 335-350.
- Richardson, A., Stewart, D. y McDougall, G.J.** (1997). Identification and partial characterization of a coniferyl alcohol oxidase from lignifying xylem of sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Planta* 203, 35-43.
- Ride, J.P.** (1975). Lignification in wounded wheat leaves in response to fungi and its possible role in resistance. *Physiol. Plant Pathol.*, 5, 125-134.
- Ride, J.P.** (1983). Cell walls and other structure barriers in defense. En: *Biochemical Plant Pathology*. Ed. J.A. Callow, 215-236. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Ros Barceló, A.** (1995). Peroxidase and not laccase is the enzyme responsible for cell wall lignification in the secondary thickening of xylem vessels in *Lupinus*. *Protoplasma* 186, 41-44.

- Ros Barceló, A.** (1997). Lignification in plant cell walls. *Int. Rev. Cytol.*, 176, 87-132.
- Ros Barceló, A.** (1998). Hydrogen peroxide production is a general property of the lignifying xylem from vascular plants. *Ann. Bot.* 82, 97-103.
- Ros Barceló, A.** (1999). Some properties of the H_2O_2/O_2^- generating system from the lignifying xylem of *Zinnia elegans*. *Free Rad. Res.* 31, 147-154.
- Ros Barceló, A. y Aznar-Asensio, G.J.** (1999). Coniferyl alcohol oxidase activity of a cell-wall-located class III peroxidase. *Aust. J. Plant Physiol.* 26, 411-419.
- Ros Barceló, A., Morales, M. y Pedreño, M.A.** (1998). Specific compartmentalization of peroxidase isoenzymes in relation to lignin biosynthesis in the plant cell. En: *Lignin and lignan biosynthesis- American Chemical Society Symposium Series- Vol. 697*, pp. 84-95 (Lewis, N.G. y Sarkanen, S., eds.). Washinton, DC: American Chemical Society.
- Ros Barceló, A. y Muñoz, R.** (1989). Epigenetic control of a cell wall scopoletin peroxidase by lupisoflavone in *Lupinus*. *Phytochemistry* 28, 1331-1333.
- Ros Barceló, A., Muñoz, R. y Sabater, F.** (1987). Lupin peroxidases. I. Isolation and characterization of cell wall-bound isoperoxidases activity. *Physiol. Plant.* 71, 448-454.
- Ros Barceló, A., Ferrer, M.A., García-Florenciano, E. y Muñoz, R.** (1991). The tonoplast localization of two basic isoperoxidases of high pl in *Lupinus*. *Bot. Acta* 104, 272-278.
- Ros Barceló, A., Pedreño, M.A., Muñoz, R., y Sabater, F.** (1988). Lupin peroxidases. II. Binding of acidic isoperoxidases to cell walls. *Physiol. Plant.* 73, 238-244.
- Rodríguez-Marañón, M.J., Hoy, A.R. y Van Huystee, R.B.** (1994). Evidence for the presence of Mn(II) in peanut peroxidase. An EPR study. *Cell. Mol. Biol.* 40, 871-879.

- Saake, B., Argyropoulos, D.S., Beinhoff, O., y Faiz, O.** (1996). A comparison of lignin polymer models (DHPs) and lignins by ^{31}P NMR spectroscopy. *Phytochemistry* 43, 449-507.
- Sánchez, M., Peña, M.J., Revilla, G., y Zarra, I.** (1996). Changes in dehydrodiferulic acids and peroxidase activity against ferulic acid associated with cell walls during growth of *Pinus pinaster* hypocotyl. *Plant Physiol.* 111, 941-946
- Sánchez-Romero, C., García-Gómez, M.L., Pliego-Alfaro, F. y Heredia, A.** (1994). Effect of partial deglycosylation on catalytic characteristics and stability of an avocado peroxidase. *Physiol. Plant.* 92, 97-101.
- Sánchez-Romero, C., García-Gómez, M.L., Pliego-Alfaro, F. y Heredia, A.** (1995). One-step purification of an avocado peroxidase. *Plant Physiol. Biochem.* 33, 531-537.
- Sato, Y., Sugiyama, M., Komamine, A., y Fukuda, H.** (1995). Separation and characterization of the isoenzymes of wall-bound peroxidase from cultured *Zinnia* cells during tracheary element differentiation. *Planta* 196, 141-147.
- Saunders, B.C., Holmes-Siedle, A.G. y Stark, B.P.** (1964). Peroxidase. the properties and uses of a versatile enzyme and some related catalysts. Butterworths, London.
- Savidge, R.A., y Udagama-Randeniya, P.** (1992). Cell wall bound coniferyl alcohol oxidase associated with lignification in conifers. *Phytochemistry* 31, 2959-2966.
- Scandalios, J.G.** (1979). Control of gene expression and enzyme differentiation. En: *Physiological genetics* pp:63-107. Academic Press.
- Scandalios, J.G.** (1993). Oxigen estres and superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 101, 7-12.
- Schopfer, P.** (1994). Histochemical demonstration and localization of H_2O_2 in organs of higher plants by tissue printing on nitrocellulose paper. *Plant Physiol.* 104, 1269-1275.

- Sederoff, R., Campbell, M., O'Malley, D., y Whetten, R.** (1994). Genetic regulation of lignin biosynthesis and the potential modification of wood by genetic engineering in loblolly pine. *En "Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism"* (B.E. Ellis, eds.), pp. 313-355. Plenum, New York.
- Shigeoka, S., Nakano, Y. y Kitakoa, S.** (1980). Purification and properties of L-ascorbic acid-specific peroxidase in *Euglena gracilis*. *Z. Arch. Biochem. Biophys.* 201, 121-127.
- Shufflebottom, D., Edwards, K., Schuch, W. y Bevan, M.** (1993). Transcription of two members of a gene family encoding phenylalanine ammonia-lyase leads to remarkably different cell specificities and induction patterns. *Plant J.* 3, 835-845.
- Siegel, B.Z.** (1993). Plant peroxidases- an organismic perspective. *Plant Growth Regul.* 12, 303-312.
- Smit, F. y Dubery, I. A.** (1997) Cell wall reinforcement in cotton hypocotyls in response to a *Verticillium dahliae* elicitor. *Phytochemistry* 44, 811-815.
- Smith, C.G., Rodgers, M.W., Zimmerlin, A., Fernandino, D., y Bolwell, G.P.** (1994). Tissue and subcellular immunolocalisation of enzymes of lignin synthesis in differentiating and wounded hypocotyl tissue of french bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta* 192, 155-164.
- Sottomayor, M., de Pinto, M.C., Salema, R., DiCosmo, F., Pedreño, M.A. y Ros Barceló, A.** (1996). The vacuolar localization of a basic peroxidase isoenzyme responsible for the synthesis of α -3',4'-anhydrovinblastine in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don Leaves. *Plant Cell Environ.* 19, 761-767.
- Sottomayor, M., DiCosmo, F., y Ros Barceló, A.** (1997). On the fate of catharanthine and vindoline during the peroxidase-mediated enzymatic synthesis of α -3',4'-anhydrovinblastine. *Enz. Microb. Technol.* 21, 543-549.

- Sottomayor, M., López-Serrano, M., DiCosmo, F., y Ros Barceló, A. (1998).** Purification and characterization of α -3',4'-anhydrovinblastine synthase (peroxidase-like) from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. FEBS Lett. 428, 299-303.
- Sottomayor, M. y Ros Barceló, A. (1997).** What can we learn from α -3',4'-anhydrovinblastine synthase? Recent Res. Develop. Phytochem Vol. I, S.G. Pandalai, ed., Research Signpost, India, pp. 1, 225-233.
- Souto, X.C., Reigosa, M.J. y González, L. (1995).** Effect of potential phenolic allelochemicals released by *Capsicum annuum* on the growth of some microorganism populations. Proceedings 20th annual meeting. Planta Growth Regulation Society of America. 81-85.
- Stamler, J.S., Singel, D.J. y Loscalzo, J. (1992).** Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. Science 258, 1898-1902.
- Sterjiades, R., Dean, J.F.D. y Eriksson, K.E.L. (1992).** Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols. Plant Physiol. 99, 1162-1168.
- Sterjiades, R., Dean, J.F.D., Gamble, G., Himmelsbach, D.S. y Eriksson, K.E.L. (1993)** Extracellular laccases and peroxidases from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) cell-suspension cultures. Planta, 190, 75-87.
- Strivastava, L.M. (1966).** Histochemical studies on lignin. Tappi 49, 173-183.
- Sutherland, M.W. (1991).** The generation of oxygen radicals during host plant response to infection. Physiol. Mol. Plant Pathol. 39, 79-93.
- Takahama, U. (1988).** Oxidation of flavonols by hydrogen peroxide in epidermal and guard cells of *Vicia faba* L. Plant Cell Physiol. 29, 433-438
- Takahama, U. (1993).** Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolic by ascorbic acid: Different effects of ascorbic acid on the oxidation of coniferyl alcohol by the apoplastic soluble and cell wall-bound peroxidases from epicotyls of *Vigna angularis*. Plant Cell Physiol. 34, 809-817.

- Takahama, U.** (1995). Oxidation of hydroxycinnamic acid and hydroxycinnamyl alcohol derivatives by laccase and peroxidase. Interactions among *p*-hydroxyphenyl, guaiacyl syringyl groups during the oxidation reactions. *Physiol. Plant.* 93, 61-68.
- Takahama, U. y Oniki, T.** (1991). Participation of peroxidase in the metabolism of 3,4-dihydroxyphenylalanine and hydrogen peroxide in vacuoles of *Vicia faba* L. mesophyll cells. *Plant Cell Physiol.* 32, 745-754.
- Tamura, M. y Yamazaki, I.** (1972). Reactions of the oxyform of horseradish peroxidase. *J. Biochem.*, 71, 311-319.
- Teichmann, T., Guan, C., Kristoffersen, P., Muster, G., Tietz, O. y Palme, K.** (1997). Cloning a bichemical characterization of an anionic peroxidase from *Zea mays*. *Eur. J. Biochem.* 247, 826-832.
- Terashima, N.** (1990). A new mechanism for formation of a structurally ordered prolignin macromolecule in the cell wall of tree xylem. *J. Pulp Paper Sci.* 16, 150-155.
- Terashima, N., Atalla, R.H., Ralph, S.A., Landucci, L.L., Lapierre, C., y Monties, B.** (1995). New preparations of lignin polymer model under conditions that approximate cell wall lignification. I. Synthesis of novel lignin polymer models and their structural characterization by ¹³CNMR. *Holzforschung* 49, 521-527.
- Terashima, N., Atalla, R.H., Ralph, S.A., Landucci, L.L. Lapierre, C., y Monties, B.** (1996). New preparations of lignin polymer models under conditions that approximate cell wall lignification. II. Structural characterization of the models by thiacidolysis. *Holzforschung* 50, 9-14.
- Terashima, N., y Fukuyshima, K.** (1989). Biogenesis and structure of macromolecular lignin in cell wall of tree xylem as studied by microautoradiography. *En "Plant Cell Wall Polymers: Biogenesis and Biodegradation"* (N.G. Lewis y m.G. Paice, eds.), ACS Symp. Series, Vol 399, pp 160-168. Am. Chem. Soc., Washington, DC.

- Tollier, M.T., Lapierre, C., Monties, B., Francesch, C., y Rolando, C. (1991).** Structural variations in synthetic lignins (DHPs) according to the conditions of their preparation. En "Proc. Int. Symp. Wood Pulping Chem., Parkville, Victoria", pp. 35-40.
- Udagama-Randeniya, P.V.U. y Savidge, R.A. (1995).** Coniferyl alcohol oxidase- a catechol oxidase? *Trees*, 10, 102-107.
- Vance, C. P., Anderson, J.O. y Sherwood, R.T. (1976).** Soluble and cell wall peroxidases in reed canarygrass in relation to disease resistance and localized lignin formation. *Plant Physiol.* 57, 920-922.
- Vance, C. P. y Sherwood, R.T. (1976).** Regulation of lignin formation in reed canarygrass in relation to disease resistance. *Plant Physiol.* 57, 915-919.
- Vance, C. P., Kirk, T.K. y Sherwood, R.T. (1980).** Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25, 363-379.
- Vanden Driessche, T., Kevers, C., Gaspar, T. y Caubergs, R. (1984).** Peroxidases in *Acetabularia*: their possible role in development. *Differentiation* 27, 175-181.
- Varela, M. M. (1999).** Estudio de los fenómenos de resistencia inducida y ligada a plántula en pimiento frente al hongo patógeno *Verticillium dahliae* Kleb. Tesis de licenciatura.
- Vogeli, V., Meins, F. y Boller, T. (1988).** Co-ordinated regulation of chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. *Planta*, 174,364-.
- Wanner, L.A., Li, G., Ware, D., Somssich, I.E. y Davis, K.R. (1995).** The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 27, 327-338.
- Wallace, G., y Fry, S.C. (1994).** Phenolic components of the plant cell wall. *Int. Rev. Cytol.* 151, 229-267.
- Wallace, G., y Fry, S.C. (1999)** Action of diverse peroxidases and laccases on six cell wall-related phenolic compounds. *Phytochemistry* 52, 769-773.
- Wardrop, A.B. (1971).** Lignins: Occurrence and formation in plants. En "Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions" (K.V. Sarkanen y G.H. Ludwig, eds.), pp. 19-41. Wiley-Interscience, New York.

- Weger, H.G.** (1997). Interactions between Cu(II), Mn(II) and salicylhydroxamic acid in determination of algal peroxidase activity. *Phytochemistry* 46, 195-201.
- Weinryb, I.** (1966). The behavior of horseradish peroxidase at high hydrogen peroxide concentrations. *Biochemistry* 5, 2003-2008.
- Welinder, K.G.** (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 388-393.
- Weymouth, N., Dean, J.F.D., Eriksson, K.E.L.** (1993). Synthesis and spectroscopic characterization of *p*-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl lignin polymer models (DHPs). *Nord. Pulp Paper Res. J.* 8, 344-349.
- Whetten, R., y Sederoff, R.** (1995). Lignin biosynthesis. *Plant Cell* 7, 1787-1799.
- Wong, E. y Wilson, J.M.** (1976). Products of the peroxidase-catalyzed oxidation of 4,2',4'-trihydroxychalcone. *Phytochemistry* 28, 235-238.
- Yamato, S., Ida, T., Katagiri, M. y Ohkawa, H.** (1995). A tobacco soluble protoporphyrinogen-oxidizing enzyme similar to plant peroxidases in their amino acid sequences and immunochemical reactivity. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 558-559.
- Yamazaki, I. y Yokota, K.N.** (1973). Oxidation states of peroxidase. *Mol. Cel. Biochem.* 2, 39-52.
- Yang, B. Y., Gray, J.S.S. y Montgomery, R.** (1996). The glycans of horseradish peroxidase. *Carbohydrate Res.* 287, 203-212.
- Ye, Z.H., Kneusel, R.E., Matern, U. y Varner, J.E.** (1994). An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia*. *Plant Cell* 6, 1427-1439.
- Yoshizawa, N., Ohba, H., Uchiyama, J. y Yokota, S.** (1999). Deposition of lignin in differentiating xylem cell walls of normal and compression wood of *Buxus microphylla* var. *insularis* Nakai. *Holzforschung* 53, 156-160.

- Zapata, J.M., Calderón, A.A., Muñoz, R., y Ros Barceló, A. (1992).** Oxydation of natural hydroxybenzoic acids by grapevine peroxidases: kinetic characteristics and substrate specificity. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 134-138.
- Zhang, A., Collinge, D.B., y Thordal-Christiansen, H. (1995).** Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant J.* 8, 139-145



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA ANIMAL, BIOLOXÍA VEXETAL E ECOLOXÍA

**CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA
IMPLICADA EN LOS PROCESOS DE LIGNIFICACIÓN
Y SU ESTUDIO EN LA INTERACCIÓN**

***Capsicum annuum* L. var. *annuum*-*Verticillium dahliae* Kleb.**

FECHA : 21 DE JUNIO DE 2000

CALIFICACION : SOBRESALIENTE CUM LAUDE
POR UNANIMIDAD

PRESIDENTE

VOCAL 1º

VOCAL 2º

VOCAL 3º

FEDERICO POMAR BARBEITO

2000

SECRETARIO

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Servicio de Bibliotecas



1700759506