

## DISTRIBUCIÓN DE AIA-OXIDASA Y PEROXIDASA EN HIPOCÓTILOS ETIOLADOS DE *LUPINUS ALBUS*, L. RELACIÓN CON EL CRECIMIENTO

J. Sánchez-Bravo\* y C. Núñez\*

Recibido: 3 julio 1990  
Aceptado: 25 noviembre 1990

### SUMMARY

Distribution of IAA-oxidase and peroxidase in etiolated **hypocotyls** of *Lupinus albus*, L. Their relationship with growth.

The enzymatic IAA-oxidase and peroxidase activities in homogenates of zones from different localizations along the etiolated hypocotyls of *Lupinus albus*, L are studied.

In actively growing 9 day old seedlings, both activities expressed on a per fresh weight basis, show a decreasing distribution starting from the cotyledons. The specific activities, however exhibit a bell-shaped distribution that is parallel to that of growth.

At 15 days, the distribution of IAA-oxidase as well as of peroxidase, tends to be more uniform along the whole hypocotyl as a consequence of the decrease in activity in the apical zones and the increase in the basal. The activities per g fresh weight show a distribution very similar to that of growth. On the other hand, the specific activities oscillate along the hypocotyls, the highest values being in the apical (growing) and in the basal zones.

The role of IAA-oxidase in the control of the IAA content during the hypocotyl growth is discussed.

Key words: Growth; Hypocotyl; IAA-oxidase; *Lupinus albus*; Peroxidase.

### RESUMEN

Se ha estudiado la actividad AIA-oxidasa y peroxidasa en extractos correspondientes a zonas con distinta localización en los hipocótilos etiolados de altramuz (*Lupinus albus*, L).

En plantas de 9 días, con crecimiento activo, las actividades enzimáticas por g de peso fresco muestran una distribución decreciente desde el ápice, mientras que las actividades específicas presentan una distribución de campana, paralela a la del crecimiento.

A los 15 días se aprecia una tendencia hacia una distribución uniforme de ambas actividades, como consecuencia de un descenso en las zonas apicales y un aumento en las basales. Las actividades por g de peso fresco se distribuyen de forma paralela al crecimiento, mientras que la distribución de las actividades específicas presenta oscilaciones, localizándose los valores más altos en la zona apical (con crecimiento) y en la basal.

Teniendo en cuenta estudios previos, se discute el papel de AIA-oxidasa en el control de los niveles de AIA durante el crecimiento de los hipocótilos de altramuz.

Palabras clave: AIA-oxidasa; Crecimiento; Hipocótilo; *Lupinus albus*; Peroxidasa.

---

\* Dep. Biología Vegetal. Fac. Biología. Universidad de Murcia. 30100 MURCIA.

## INTRODUCCIÓN

El ac. indolil-3-acético (AIA), desempeña un importante papel en la regulación del crecimiento de las plantas, y en el caso de los hipocótilos etiolados de altramuz, se conocen numerosos datos que apoyan esta idea. Así, se ha comprobado que en este órgano, existe un gradiente longitudinal de crecimiento que cambia con la edad (ORTUÑO *et al.*, 1985 y 1988), y que la variación longitudinal de la concentración de AIA endógeno es paralela a la del crecimiento (SÁNCHEZ-BRAVO *et al.*, 1986).

La acción del AIA en el crecimiento de los órganos, depende de la sensibilidad de los tejidos a la hormona, así como de la concentración de ésta. de forma que cuando se alcanzan concentraciones supraóptimas el crecimiento se inhibe (THIMAN, 1934). De lo anterior se deduce que para que la planta se desarrolle normalmente, debe disponer de un mecanismo que regule de forma eficaz la concentración de la hormona. Uno de los mecanismos de regulación que se han propuesto, consiste en la oxidación descarboxilativa del AIA catalizada por la enzima AIA-oxidasa. Como resultado de la reacción se forman diversos productos que aparentemente carecen de actividad biológica (SABATER *et al.*, 1986).

Las peroxidasas vegetales, principalmente localizadas en la pared y la vacuola de las células, poseen actividad AIA-oxidasa, y en numerosos trabajos se ha estudiado la degradación de AIA catalizada por peroxidasas de diversa naturaleza y origen (Ver la revisión de SCHNEIDER & WHIGHTMANN, 1974). El papel de las peroxidasas en la regulación «in vivo» de la concentración de AIA se ha relacionado generalmente con situaciones anormales en la plantas, como heridas, infecciones, sobredosis de AIA, etc. (REINECKE & BANDURSKI, 1983; WALDRUM & DAVIES, 1981; MACHACKOVA *et al.*, 1988). Sin embargo, algunos estudios recientes muestran que durante el crecimiento normal de los hipocótilos etiolados de altramuz, se produce una destrucción parcial del AIA (SÁNCHEZ-BRAVO *et al.*, 1988 y 1990).

A fin de aportar nuevas evidencias sobre el papel del catabolismo del AIA en la regulación de la concentración de esta hormona, en este trabajo se ha estudiado la distribución longitudinal de las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa en los hipocótilos etiolados de altramuz,

y su relación con el crecimiento del órgano.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### CULTIVO DE LAS PLANTAS

Semillas de altramuz (*Lupinus albus*, L, cv Bary, Italia), se embeben en agua durante 24 h y se siembran en vermiculita húmeda a 24°C y oscuridad. A los 9 días, los hipocótilos se marcan con tinta delimitándose diferentes zonas, cuyo crecimiento se determina por el desplazamiento de las marcas (SÁNCHEZ-BRAVO *et al.*, 1986). El crecimiento se expresa como alargamiento relativo de cada zona a intervalos de 2 días.

### PREPARACIÓN DEL EXTRACTO Y DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

De una misma plantación, se selecciona a los 9 y 15 días una muestra representativa de 10 plantas de tamaño uniforme. Los hipocótilos se dividen, separando las distintas zonas marcadas. Las zonas de igual localización se homogenizan con mortero en cámara fría a 4°C, utilizando tampón fosfato-fosfato potásico (0,1 M, pH 6,3), en la proporción de 2 ml por g de peso fresco. El homogenizado se filtra a través de tela y el filtrado se centrifuga 20 min. a 20.000 × g, en centrífuga refrigerada. El sobrenadante se utiliza para la medida de las actividades enzimáticas.

La actividad AIA-oxidasa, se determina mediante el método espectrofotométrico de RAY (1956) con la modificación de LESCURE (1970) revisado por CUELLO (1972). El medio de reacción contiene tampón fosfato-fosfato 0,06 M, pH 6,3, Cl<sub>2</sub>Mn 10<sup>-4</sup> M, diclorofenol 10 M<sup>-4</sup>, AIA 3.10<sup>-4</sup> M, 0,02 ml de extracto enzimático y agua destilada hasta un volumen final de 6 ml. La referencia no contiene AIA. La actividad se define como aumento de absorbancia a 250 nm después de una hora de reacción a 30°C y oscuridad. En estas condiciones, la relación actividad-concentración de enzima se mantiene lineal para variaciones de absorbancia inferiores a 0,3 (CUELLO, 1972). Cuando un extracto enzimático supera dicho valor, se procede a su dilución y la actividad enzimática obtenida se multiplica por el factor de dilución.

Para la medida de la actividad peroxidasa se sigue el método colorimétrico del guayacol (CHANCE & MACHLEY, 1955), modificado por Lozano (1968) y revisado por CUELLO (1972). El medio de reacción contiene tampón fosfato-fosfato 0,06 M, pH 7, guayacol 5.10<sup>-3</sup> M, 0,02 ml de enzima y agua destilada hasta un volumen final de 8 ml. Ajustado el cero con este medio, se adiciona a la cubeta muestra 0,1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10<sup>-2</sup> M para iniciar la reacción. La actividad se define como el aumento de absorbancia a 480 nm después de 3 min. de reacción a 30°C y oscuridad. La

proporcionalidad se mantiene para aumentos de absorbancia inferiores a 0,35. Para incrementos superiores, se procede a la dilución del extracto y la corrección correspondiente de la actividad medida en el extracto diluido.

El contenido en proteínas de los extractos enzimáticos, se determina espectrofotométricamente por el método de WARBURG & CHRISTIAN (1942), como se describe en un trabajo previo (SABATER *et al.*, 1982).

Las actividades enzimáticas se expresan por g de peso fresco o por mg de proteína (actividad específica).

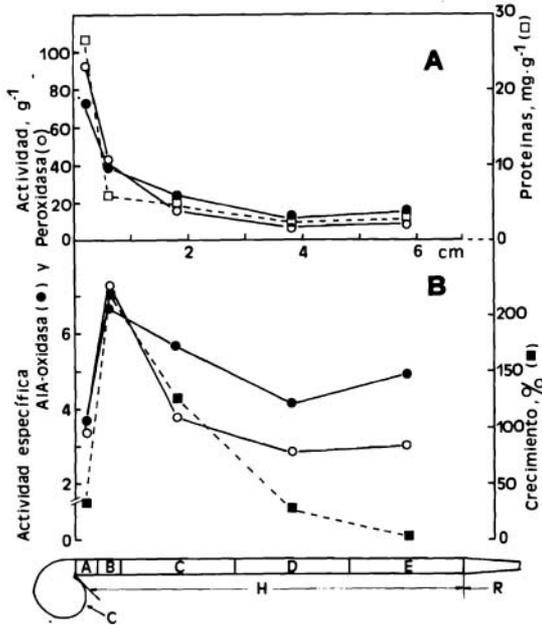


FIGURA 1. Distribución longitudinal del contenido en proteínas, crecimiento y actividades AIA-oxidasa y peroxidasa en hipocótilos etiolados de altramuza, a los 9 días de edad. A: Actividades enzimáticas y proteínas por unidad de peso fresco (PF), medidas en los extractos correspondientes a las distintas zonas del hipocótilo (A, B, C, D y E). B: Actividades específicas y crecimiento relativo (durante el período de 9 a 11 días) de las distintas zonas. La localización de las distintas zonas así como la distancia a los cotiledones (cm), se indica en el esquema.

Longitudinal distribution of protein content, growth and IAA-oxidase and peroxidase activities in 9 day old etiolated lupin hypocotyls. A: Enzymatic activities and proteins on a per fresh weight basis, measured in the extracts from different zones of the hypocotyls (A, B, C, D and E). B: Specific activities and relative growth (from 9<sup>th</sup> to 11<sup>th</sup> day) in the different zones. The localization of the zones and the distance from the cotyledons (cm) are indicated.

Las determinaciones de proteínas y actividades enzimáticas obtenidas por los procedimientos descritos, se ha comprobado que son reproducibles, ya que para un mismo extracto, la desviación típica de 4 repeticiones no supera el 8% del valor medio.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Desde el inicio de la fase exponencial del crecimiento de los hipocótilos etiolados de altramuza (a partir de los 8 días), se ha comprobado que el crecimiento en longitud se debe exclusivamente a la elongación celular (ORTUÑO *et al.* 1988). Durante dicho período, existe un gradiente de crecimiento a lo largo del órgano que varía con la edad (ORTUÑO *et al.* 1985). Los resultados del presente trabajo, indican que tanto el contenido en proteínas como las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa medidas en las distintas zonas del hipocótilo, también varían dependiendo de su localización en el órgano y de la edad de las plantas.

En plantas jóvenes de 9 días con crecimiento rápido, la distribución de proteínas y de ambas actividades, expresadas por g de peso fresco, son decrecientes, siendo la zona apical (A) la que presenta los valores máximos (fig. 1A). Dicha zona contiene el meristemo apical y está constituida por células jóvenes escasamente vacuolizadas (ORTUÑO *et al.*, 1985), lo que justifica su escaso crecimiento a esta edad (fig. 1B). Si se exceptúa esta zona, el crecimiento experimentado durante el período de 9 a 11 días disminuye al aumentar la distancia al ápice (fig. 1B), al igual que sucede con el contenido en proteínas y con ambas actividades expresadas por unidad de peso fresco.

De acuerdo con un estudio previo (ORTUÑO *et al.*, 1988), durante el crecimiento del hipocótilo se produce una dilución de materia seca como consecuencia de la entrada masiva de agua para el alargamiento celular. Así, las células más jóvenes situadas en el ápice (zona A), poseen una mayor densidad citoplásmica y en consecuencia esta zona presenta un alto porcentaje de materia seca (15 %). Por el contrario, las células basales sin crecimiento (zona E), están ampliamente vacuolizadas lo que implica un menor contenido en materia seca (7,5 %). De lo anterior podría deducirse que las distribuciones de proteínas y actividades enzimáticas por unidad de peso fresco que se observan a esta edad

(9 días), podrían ser debidas al efecto de dilución producido por el crecimiento.

Sin embargo, ésta no parece ser la única causa responsable de la disminución de ambas actividades al aumentar la distancia al ápice (fig. 1A), ya que las actividades específicas no muestran una distribución decreciente en el órgano (fig. 1B), sino que presentan forma de campana, con el máximo situado en la zona B, coincidiendo por tanto con la distribución del crecimiento. Esto sugiere que los cambios de actividad AIA-oxidasa y peroxidasa durante el crecimiento del hipocótilo, son al menos parcialmente originados por variaciones específicas en el metabolismo de estas enzimas.

Al aumentar la edad de las plantas de 9 a 15 días, la distribución de proteínas y de las actividades enzimáticas expresadas por g de peso fresco, tiende a hacerse uniforme a lo largo del hipocótilo (fig. 2A). A ello contribuye por una parte, el descenso que se produce en las zonas apicales, y por otra, el incremento en las zonas

basales, mientras que en las zonas intermedias la variación es escasa (compárese las figs. 1A y 2A). Las distribuciones a los 15 días, son paralelas a la del crecimiento. Así, sólo las zonas A y B que muestran algún crecimiento en el período de 15 a 17 días, mantienen niveles altos de proteínas y de actividades enzimáticas. Las restantes zonas, sin crecimiento, presentan valores muy similares. Las actividades específicas sin embargo, no son uniformes a lo largo del órgano, sino que muestran oscilaciones, localizándose los niveles mayores de actividades enzimáticas en la zona apical (con crecimiento) y en la zona basal.

La variación paralela de las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa durante el crecimiento, apoya la idea de que la enzima responsable de la oxidación descarboxilativa del AIA podrían ser algunas isoperoxidasas específicas. Entre las diversas isoenzimas de peroxidasa aisladas de diferentes tejidos, algunas no muestran actividad AIA-oxidasa, pero todas las fracciones con actividad AIA-oxidasa siempre poseen actividad peroxidasa (GASPAR *et al.*, 1974). Solamente SEQUEIRA y MINEO (1966) aislaron en raíces de tabaco una AIA-oxidasa que carecía de actividad peroxidasa. Sin embargo, este resultado no ha podido ser confirmado posteriormente (HOYLE, 1972).

En un trabajo anterior (SABATER *et al.*, 1982), se demostró que las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa presentes en los extractos de altramuz, mantienen un comportamiento análogo frente a las variaciones de pH y temperatura, o la precipitación con sulfato amónico. Además, tras los diferentes procedimientos de separación a los que se sometió el extracto de altramuz (Sephadex G-100, CM-Sephadex C-50, DEAE-Sephadex A50), ambas actividades se localizaban en las mismas fracciones. Los resultados que aquí se presentan, confirman este comportamiento paralelo de ambas actividades.

En los hipocótilos etiolados de altramuz con crecimiento activo (8 días), se ha comprobado que la distribución longitudinal del AIA endógeno se correlaciona positivamente con la del crecimiento (SÁNCHEZ-BRAVO *et al.*, 1986). Al aumentar la edad, se producen oscilaciones de AIA a lo largo del órgano, apareciendo siempre una onda de auxina localizada en la zona de elongación, y una onda secundaria en la zona basal sin crecimiento. El proceso sobre el que se supone influyen ambas ondas, es diferente:

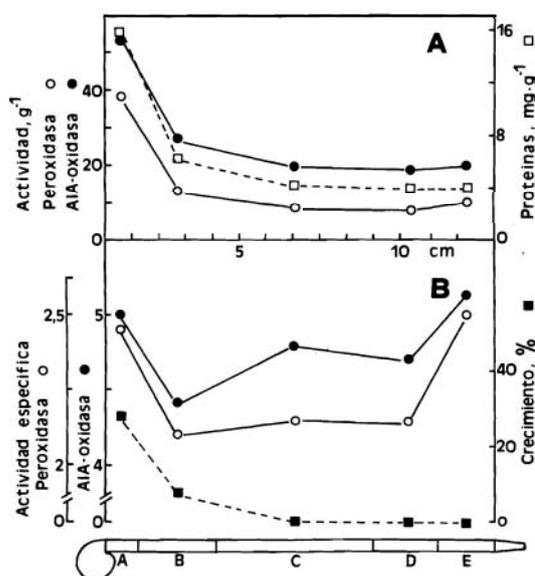


FIGURA 2. Distribución longitudinal del contenido en proteínas, crecimiento y actividades AIA-oxidasa y peroxidasa en hipocótilos etiolados de altramuz a los 15 días de edad. A y B como en la fig. 1. El crecimiento corresponde al período de 15 a 17 días.

Longitudinal distribution of protein content, growth and IAA-oxidase and peroxidase activities in 15 day old lupin hypocotyls. A and B as in fig. 1. Growth from 15<sup>th</sup> to 17<sup>th</sup> day is indicated.

las ondas que aparecen en la zona de crecimiento serían necesarias para el alargamiento celular (SÁNCHEZ-BRAVO *et al.*, 1986), mientras que las ondas situadas en la zona basal estarían relacionadas con procesos de diferenciación y engrosamiento de la pared celular que tienen lugar una vez finalizado el alargamiento de la célula (ORTUÑO *et al.*, 1990).

Los resultados del presente trabajo, indican una variación de la actividad AIA-oxidasa muy similar a la del AIA (figs. 1B y 2B): los valores más altos se detectan siempre en la zona de crecimiento, y con la edad se produce un aumento de la actividad en las zonas basales. Distribuciones paralelas de AIA y AIA-oxidasa han sido igualmente detectadas en coleóptilos de avena (RAJAGOPAL & LARSEN, 1974). Nuestros resultados difieren sin embargo de los descritos por otros autores que sólo detectan una alta actividad AIA-oxidasa en tejidos adultos sin crecimiento, interpretando así que la destrucción del AIA es la responsable del cese del crecimiento (GALSTON & DALBERG, 1954).

Teniendo en cuenta las condiciones de extracción, las actividades enzimáticas que se han determinado en este trabajo, probablemente corresponden a las fracciones solubles (en citoplasma o vacuola) o débilmente ligadas (por ejemplo a la pared celular). En cualquier caso, la actividad AIA-oxidasa medida en estos extractos, puede considerarse como un indicador de la capacidad que poseen los tejidos de este órgano para degradar esta hormona. Su funcionalidad «in vivo» parece confirmarse a la vista de los resultados obtenidos en los experimentos sobre metabolismo «in vivo» de AIA que se han llevado a cabo en este material. Así, las secciones de hipocótilo localizadas en la zona de crecimiento o en la zona basal, son las que producen las mayores tasas de  $^{14}\text{CO}_2$  cuando se incuban en disoluciones de  $[1-^{14}\text{C}]\text{AIA}$  (SÁNCHEZ-BRAVO *et al.*, 1989). De igual forma, tras la aplicación de AIA radiactivo a las plantas decapitadas, los mayores índices de descarboxilación se detectan en la zona de crecimiento y en la zona basal (SÁNCHEZ-BRAVO *et al.*, 1988).

En conclusión, los resultados que se presentan en este trabajo, apoyan la hipótesis propuesta en trabajos previos de que la destrucción del AIA está estrechamente ligada a la acción de esta hormona en el crecimiento de los hipocótilos etiolados de altramu. El hecho de que la actividad AIA-oxidasa varíe durante el creci-

miento de forma paralela al contenido en AIA, sugiere además que la enzima implicada podría ser inducida por el substrato, el AIA. Los experimentos realizados en este sentido, así parecen confirmarlo (SÁNCHEZ-BRAVO & NÚÑEZ, 1990).

## BIBLIOGRAFÍA

- CUELLO, J. 1972. *Estudio del enzima ácido indolacético oxidasa de altramu. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.*
- CHANCE, A. W. & MAEHLEY, A. C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. In: COLOWICK & KAPLAN (Ed.), *Methods in Enzymology* 11, 764. Academic Press.
- GALSTON, A. W & DALBERG, Y. 1954. The adaptive formation and physiological significance of indoleacetic acid oxidase. *Am. Jour. Botany*, 41: 373-380.
- GASPAR, T., DUBUCQ, M. & VAN HOOF, P. 1974. Des isoperoxydases spécifiques de racines. *Biol. Plant.*, 16: 237-240.
- HOYLE, M. C. 1972. Indoleacetic acid oxidase: a dual catalytic enzyme. *Plant Physiol.*, 50: 15-18.
- LESCURE, A. M. 1970. Cinétique enzymatique des 3 indolylacétique oxydases de deux lignées de cellules d'*Acer pseudoplatanus* L. dépendante ou indépendante de l'auxine. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 52: 953-978.
- LOZANO, J. A. 1968. *El complejo fenolasa en algunos frutos. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.*
- MACHACKOVA, I., ULLMANN, J., KREKULE, J. & OPATRNÝ, Z. 1988. Comparison of in vivo IAA decarboxylation rate with in vitro peroxidase/IAA oxidase activities. In: KUTACEK, BANDURSKI & KREKULE (Ed.) *Physiology and Biochemistry of auxins in plants*: 85-86. Academia Praha.
- MORGAN, P. W., TAYLOR, D. M. & JOHAM, H. E. 1976. Manipulation of IAA-oxidase activity and auxin-deficiency symptoms in intact cotton plants with manganese nutrition. *Physiol. Plant.*, 37: 149-156.
- ORTUÑO, A., SÁNCHEZ-BRAVO, J., ACOSTA, M. & SABATER, F. 1985. Estudio del crecimiento de hipocótilos etiolados de altramu: alargamiento del órgano y variación del tamaño celular. *Anales de Biología*, 6 (*Biología Vegetal* 1): 55-60.
- ORTUÑO, A., SÁNCHEZ-BRAVO, J., ACOSTA, M. & SABATER, F. 1988. Growth distribution in etiolated hypocotyls of *Lupinus albus*. *Biol. Plant.*, 30: 268-274.
- ORTUÑO, A., SÁNCHEZ-BRAVO, J., MORAL, J. R., ACOSTA, M. & SABATER, F. 1990. Changes in the concentration of indole-3-acetic acid during the growth of etiolated lupin hypocotyls. *Physiol. Plant.*, 78: 211-217.

- PILET, P.E. & GASPARD, T. 1968. *Le catabolisme auxinique*. Masson et Cie. Paris.
- RAJAGOPAL, R. & LARSEN, P. 1974. Auxin balance in the avena coleoptile. *Physiol. Plant.*, 31: 119-124.
- RAY, P. M. 1956. The destruction of indoleacetic acid. II Spectrophotometric study of the enzymatic reaction. *Arch. Biochem. Biophys.*, 64: 193-216.
- REINECKE, D. M. & BANDURSKI. 1983. Oxindole-3-acetic acid: An indole-3-acetic acid catabolite in *Zea mays*. *Plant. Physiol.*, 71: 211-213.
- SABATER, F., CUELLO, J., SÁNCHEZ-BRAVO, J. & ACOSTA, M. 1976. Absence of biological activity in oxidation products of indoleacetic acid. *Biol. Plant.*, 18: 460-463.
- SABATER, F., ACOSTA, M. & SÁNCHEZ-BRAVO, J. 1982. Catabolismo auxínico: papel de las peroxidases vegetales. In: *Estudios sobre Biología*. Editorial de la Universidad Complutense. Madrid.
- SÁNCHEZ-BRAVO, J., ORTUÑO, A., ACOSTA, M. & SABATER, F. 1986. Distribution of indole-3-acetic acid in relation to the growth of etiolated *Lupinus albus* hypocotyls. *Physiol. Plant.*, 66: 509-514.
- SÁNCHEZ-BRAVO, J., ORTUÑO, A., ACOSTA, M. & SABATER, F. 1988. In vivo metabolism of labelled indole-3-acetic acid during polar transport in etiolated hypocotyls of *Lupinus albus*: Relationship with growth. *Plant Growth Regul.*, 7: 271-288.
- SÁNCHEZ-BRAVO, J., ORTUÑO, A., ACOSTA, M. & SABATER, F. 1989. Evaluation of indole-3-acetic acid decarboxylating activity in hypocotyl sections of etiolated *Lupinus albus* seedlings. *J. Plant Physiol.*, 134: 517-523.
- SÁNCHEZ-BRAVO, J. & NÚÑEZ, C. 1990. Cambios en la actividad AIA-oxidasa y peroxidasa en hipocótilos de *Lupinus albus*, producidos por tratamientos con ac. indolil-3-acético. *Anales de Biología*, 16 (*Biología Vegetal*, 5): 143-151.
- SCHNEIDER, E.A. & WIGHTMANN, F. 1974. Metabolism of auxin in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25: 487-513.
- SEMBDNER, G., GROSS, D., LIEBISCH, H.W. & SCHNEIDER, E. A. 1980. Biosynthesis and Metabolism of Plant Hormones. In: MAC MILLAN, J. (Ed.) *Encyclopedia of Plant Physiology*, 9: 281-444. Springer Verlag. Berlin.
- SEQUEIRA, L. & MINEO, I. 1966. Partial purification and kinetics of indoleacetic acid oxidase from tobacco roots. *Plant Physiol.*, 41: 1200-1208.
- THIMAN, K. W. 1934. Studies on the growth hormone of plants. II The distribution of the growth substances in plant tissues. *J. Gen. Physiol.*, 18: 23-24.
- WALDRUM, J. & DAVIES, E. 1981. Subcellular localization of IAA oxidase in peas. *Plant Physiol.*, 68: 1303-1307.
- WARBURG, O & CHRISTIAN, W. 1942. Isolierung und kristallisation des garmigsfermentes enolase. *Biochem. Z.*, 310: 384-421.