

## CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD IAA-OXIDASA Y PEROXIDASA EN HIPOCÓTILOS DE LUPINUS ALBUS, L, PRODUCIDOS POR TRATAMIENTOS CON AC. INDOLIL-3-ACÉTICO

J. Sánchez-Bravo\* y C. Núñez\*

Recibido: 11 julio 1990  
Aceptado: 11 octubre 1990

### SUMMARY

**Changes in IAA-oxidase and peroxidase activities in hypocotyls of *Lupinus albus*, L, after treatment with indole-3-acetic acid.**

The variation in IAA-oxidase and peroxidase activities in etiolated lupine hypocotyls treated with IAA is studied.

Intact plants sprayed with  $10^{-3}$  M IAA solution, show an increase of IAA-oxidase in the hypocotyls after 6 h of treatment. After 24 h, the activity is the same as that of untreated plants. The effect of IAA varies with the age of the seedlings as well as with the localization along the hypocotyl. Only those zones with low growth or with recently stopped growth, exhibit an increase of IAA-oxidase after treatment with IAA, the increase being suppressed by cicloheximide.

When whole hypocotyls of different ages are incubated in IAA solutions, reproducible results are only obtained if plants are decapitated before the treatments. 24 h after decapitation IAA-oxidase decreases 30 % in relation to non decapitated seedlings. Decapitated seedling hypocotyls incubated with IAA show an increase of specific activity at  $10^{-4}$  M IAA, and a decrease at  $10^{-3}$  M IAA. Cicloheximide reinforces the IAA effect in both cases. Hypocotyl sections from decapitated seedlings show, after incubation with  $10^{-4}$  M IAA, variations in IAA-oxidase that are dependent on the localization of sections along the hypocotyl as well as the age of seedlings. In sections with active growth, the IAA treatment decreases the activity while in slowly growing sections or sections with recent growth, the activity is increased in comparison with the control sections. These results suggest that the effect of IAA on IAA-oxidase, depends of the endogenous IAA level in addition to the exogenous IAA added.

Peroxidase activity does not show a variation similar to that of IAA-oxidase in all the assays, indicating that the different isoperoxidases do not have an identical capacity to destroy IAA.

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

### RESUMEN

Se ha estudiado la variación de las actividades IAA-oxidasa y peroxidasa en hipocótilos etiolados de altramuz tratados con IAA.

Las plantas intactas tratadas por aspersión con disolución  $10^{-3}$  M de IAA, muestran un aumento de actividad IAA-oxidasa en el hipocótilo 6 h después del tratamiento, recuperándose los valores de actividad de

---

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

las plantas no tratadas después de 24 h. El efecto del AIA varía con la edad de las plantas y con la localización a lo largo del hipocótilo. Sólo las zonas con escaso crecimiento o cuyo crecimiento ha cesado recientemente, experimentan un aumento de actividad AIA-oxidasa tras el tratamiento con AIA. Dicho incremento es suprimido por cicloheximida.

Cuando se incuban hipocótilos completos de distinta edad en disoluciones de AIA, sólo se obtienen resultados reproducibles si las plantas se decapitan antes de la incubación. Se ha comprobado que 24 h después de la decapitación la actividad AIA-oxidasa desciende un 30 % respecto a las plantas no decapitadas. Los hipocótilos de plantas decapitadas incubados en AIA, muestran un aumento en la actividad específica a la concentración  $10^{-4}$  M, y un descenso a la  $10^{-3}$  M. La cicloheximida potencia en ambos casos la acción del AIA. Las secciones de hipocótilos de plantas decapitadas incubadas en AIA  $10^{-4}$  M muestran variaciones de la actividad AIA-oxidasa que dependen de la localización de las secciones en el órgano y de la edad de las plantas. En las secciones con mayor crecimiento, el AIA disminuye la actividad, mientras que en las secciones con poco crecimiento o cuyo crecimiento es reciente, el AIA aumenta la actividad en relación con el control. Estos resultados sugieren que el efecto del AIA sobre la actividad AIA-oxidasa depende no sólo de la concentración adicionada, sino también del contenido endógeno de la hormona.

La actividad peroxidasa no muestra una variación paralela a la AIA-oxidasa en todos los ensayos, lo que indica que las diferentes isoperoxidases no poseen la misma capacidad para degradar el AIA.

**Palabras clave:** AIA; Crecimiento del hipocótilo; *Lupinus albus*; Peroxidasa; Tratamientos con AIA.

## INTRODUCCIÓN

La regulación de la actividad AIA-oxidasa, que cataliza la oxidación descarboxilativa del AIA, se supone que juega un importante papel en el control de la concentración del AIA. Por su parte, el control de los niveles de hormona resulta decisivo para su acción, ya que los efectos producidos por el AIA en los procesos de desarrollo (crecimiento, diferenciación, rizogénesis, abscisión, etc.) dependen en gran medida de su concentración.

Los factores que pueden modificar la actividad AIA-oxidasa son muy diversos. Entre otros, se han descrito variaciones producidas por luz (BAKARDJEVA, 1971), iones metálicos como  $\text{Cu}^{+2}$  (COOMBES *et al.*, 1976),  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Co}^{+2}$  (TOMASZEWSKI & THIMANN, 1966), retardadores del crecimiento (GASPAR & LACOPPE, 1968; HALEVY, 1963), y diversas fitohormonas como citoquininas (TANIGUCHI *et al.*, 1973; LEE, 1971a), giberelinas (HALEVEY, 1963) y auxinas, incluido el AIA (MINO, 1968). En muchos casos se han observado variaciones paralelas de peroxidasa (HALEVY, 1963; GASPAR & LACOPPE, 1968). Cabe destacar el amplio estudio realizado sobre la modulación de la actividad AIA-oxidasa y peroxidasa por AIA y otras auxinas sintéticas, como 2,4-D en callos de tabaco (LEE, 1971b y 1972b). Dependiendo de la concentración de auxina, aumenta o disminuye la actividad de diferentes isoenzimas AIA-oxidasa.

La autorregulación de su destrucción por el

propio AIA, puede ser de gran interés fisiológico, ya que representaría un mecanismo de protección frente a las concentraciones altas, y por tanto tóxicas, de esta hormona, circunstancia que puede producirse como consecuencia de infecciones u otras situaciones patológicas que impliquen alteraciones de la biosíntesis o del transporte del AIA.

En un trabajo anterior (SANCHEZ-BRAVO & NÚÑEZ, 1990), se comprobó que la distribución de AIA-oxidasa a lo largo de los hipocótilos etiolados de altramuz, es similar a la de AIA (SÁNCHEZ-BRAVO *et al.*, 1986), lo que sugiere una posible regulación de la actividad degradativa por el sustrato. A fin de evaluar esta hipótesis, en el presente trabajo se ha investigado el efecto que producen las aplicaciones exógenas de AIA en la actividad AIA-oxidasa de hipocótilos etiolados de altramuz. El estudio se ha realizado con plantas intactas tratadas por aspersión con AIA, así como con secciones incubadas en disolución de AIA. Ya que las peroxidases vegetales purificadas son capaces de destruir el AIA produciendo los mismos productos de reacción que los extractos de hipocótilos etiolados de altramuz (SABATER *et al.*, 1976 y 1983), y que las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa presentan distribuciones paralelas en este órgano (SÁNCHEZ-BRAVO & NÚÑEZ, 1990), también se ha estudiado el efecto producido por los tratamientos con AIA en la actividad peroxidasa.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### CULTIVO DE LAS PLANTAS

Semillas de altramus (*Lupinus albus*, L cv Bari, Italia), se embeben en agua durante 24 h y se siembran en vermiculita húmeda a 24°C y oscuridad. Los hipocótilos se marcan con tinta y el crecimiento se determina por el desplazamiento que experimentan las marcas en periodos de 2 días. Los datos de crecimiento se expresan como alargamiento relativo (SÁNCHEZ-BRAVO *et al.*, 1986). En los ensayos con plantas decapitadas, el hipocótilo se corta 8 mm por debajo de los cotiledones.

### APLICACIÓN DE AIA A LAS PLANTAS INTACTAS

Los hipocótilos se tratan por aspersión con disolución acuosa de AIA o con agua (control). Mediante un pulverizador se aplican 0,2 ml de disolución por cada cm de hipocótilo, uniformemente sobre toda la superficie del órgano. Para estudiar la influencia de la cicloheximida, ésta se incorpora a la disolución utilizada para el tratamiento a una concentración final de 0,1 g/l.

### TRATAMIENTO CON AIA MEDIANTE INCUBACIÓN

Los hipocótilos enteros o las diferentes zonas del hipocótilo, se incuban en disoluciones que contienen tampón fosfato potásico 0,1 M pH 6,3 y concentraciones variables de AIA. En los ensayos control, la incubación se hace en tampón. La cicloheximida se incorpora al medio de incubación a una concentración final de 0,1 g/l. Para la incubación se utilizan 2 ml por g de peso fresco de hipocótilo. La incubación se lleva a cabo en oscuridad a 20°C.

### PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO Y DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES AIA-OXIDASA Y PEROXIDASA

Para cada tratamiento se utiliza una muestra uniforme de 7-10 plantas. Los hipocótilos (o en su caso las secciones) se homogenizan con mortero en cámara fría a 4°C, utilizando tampón fosfato potásico frío 0,1 M, pH 6,3 en la proporción de 2 ml por g de peso fresco. Las plantas o secciones tratadas (por aspersión o incubación), se lavan 3 veces con agua destilada antes de ser utilizadas, a fin de eliminar los restos de AIA. El homogenizado se filtra a través de tela y el filtrado se centrifuga 20 min. a 20.000 × g en centrífuga refrigerada. En el sobrenadante se determina el contenido en proteínas (mg/g de peso fresco)

y las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa, utilizando los procedimientos descritos en un trabajo anterior (SÁNCHEZ-BRAVO & NÚÑEZ, 1990). Las actividades se expresan por g de peso fresco o por mg de proteína (actividad específica).

## RESULTADOS

### 1. INFLUENCIA DEL AIA SOBRE LA ACTIVIDAD AIA-OXIDASA Y PEROXIDASA EN PLANTAS INTACTAS

En los extractos obtenidos a diferentes tiempos después de aplicar por aspersión una disolución 10<sup>-3</sup> M de AIA, se aprecia un aumento de la actividad AIA-oxidasa 6 h después del tratamiento (tabla 1). Después de 24 h, la actividad disminuye hasta alcanzar valores similares a los de las plantas control. La actividad peroxidasa oscila entre valores próximos a los de las plantas control. La cicloheximida, inhibidor de la síntesis proteica, anula el efecto producido por el AIA a las 6 h, pero no modifica de forma apreciable las actividades medidas a las 2 y 24 h de tratamiento. Experimentos realizados a intervalos de tiempo diferentes a los de la tabla 1, confirman que el efecto del AIA es pasajero, por lo que en los ensayos sucesivos, se adoptó como tiempo de tratamiento un período de 6 h.

Tabla 1. Influencia del AIA sobre la actividad AIA-oxidasa y peroxidasa en plantas intactas. Plantas de 17 días de edad se tratan con disolución 10<sup>-3</sup> M de AIA con (+C) o sin cicloheximida. A diferentes tiempos de tratamiento, los hipocótilos completos se homogenizan determinándose las actividades en el extracto. Los datos indican la actividad por g de peso fresco.

Influence of IAA on the IAA-oxidase and peroxidase activities in intact seedlings. 17 old seedlings are treated with 10<sup>-3</sup> M IAA solutions with (+C) or without cicloheximide. At different times after treatment, the whole hypocotyls are homogenized and both activities are measured in the extrat. Data indicate activity per g fresh weight.

Tiempo (h)	AIA-oxidasa	Peroxidasa
0	14,5*	26,0*
2	13,0	24,5
2 + C	13,5	27,0
6	18,5	27,0
6 + C	7,0	18,5
24	11,5 ; 12,5*	19,5 ; 23,0*
24 + C	14,0	23,0

\* Datos correspondientes a plantas no tratadas.

TABLA 2. Influencia del AIA sobre la actividad AIA-oxidasa y peroxidasa en zonas con distinta localización en el hipocótilo. Plantas intactas de 8 ó 18 días de edad se tratan por aspersión con AIA  $10^{-3}$  M con (+C) o sin cicloheximida. 6 h después del tratamiento los hipocótilos se dividen en tres zonas de igual longitud (Apical, A; Media, M; y Basal, B). Las plantas control se tratan con tampón. Se indica el crecimiento relativo (%) experimentado por cada zona en las plantas control durante los dos días posteriores. Las actividades se expresan por g de peso fresco.

Influence of IAA on IAA-oxidase and peroxidase activities in zones with variable localization along the hypocotyls. 8 or 18 day old intact seedlings are sprayed with  $10^{-3}$  M IAA solution with (+C) or without cicloheximide. After 6 h, the hypocotyls are divided into three equal zones (Apical, A; Middle, M; and Basal, B). Control plants are treated with buffer. The relative growth (%) exhibited by each zone in untreated plants during the posterior two day period is indicated.

TRATAMIENTO								
Zona	Control			AIA		AIA + C		Edad
	Crecim.	AIA-oxi.	Perox.	AIA-oxi.	Perox.	AIA-oxi.	Perox.	
A	50	40	32	42	34,5	48	35	8 días
M	25	10	18	10	19	6	18,5	
B	0	9	26	14	21	9	25,5	
A	7	25	23,5	33	24	24	20	18 días
M	0	18	21	29	19,5	19	18	
B	0	30	31	24	27,5	23	14,5	

TABLA 3. Influencia del AIA sobre la actividad AIA-oxidasa y peroxidasa en hipocótilos incubados. A cada edad, los hipocótilos completos de las plantas decapitadas (24 h antes de su utilización, D) o no decapitadas (No D), se incuban en tampón (control) o en disoluciones de AIA  $10^{-4}$  o  $10^{-3}$  M. Después de 6 h de tratamiento, los hipocótilos se homogenizan y se determinan las actividades en el extracto. Los datos corresponden a la variación de actividad respecto del control, expresada como porcentaje de aumento (+) o disminución (-) sobre la actividad medida en el control.

Influence of IAA on IAA-oxidase and peroxidase in incubated hypocotyls. At each age, whole hypocotyls from decapitated (24 h before use, D) or from non decapitated (No D) plants, are incubated in buffer (control) or in  $10^{-4}$  and  $10^{-3}$  M IAA solutions. After 6 h, hypocotyls are homogenized, and the activities are measured in the extracts. Data correspond to the variation of activity relative to the control, and are expressed as percentage of increase (+) or decrease (-) on the activity measured in the control.

Edad (d)	AIA-oxidasa		Peroxidasa		
	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$	
10	—	16,7	—	-10,0	No D
15	-8,7	+47,8	-14,1	+29,6	
20	-6,5	-25,0	-6,7	-17,8	
10	—	+11,1	—	+17,5	D
15	+9,5	+14,3	+9,5	+9,5	
20	+11,9	+22,6	+14,6	+17,1	

La tabla 2, muestra que el efecto del AIA depende de la localización en el órgano y de la edad de las plantas. En las plantas jóvenes de 8 días con crecimiento activo, sólo en la zona basal sin crecimiento, se aprecia un aumento importante de la actividad AIA-oxidasa, mientras que en las zonas que crecen (apical y media), las actividades no se modifican apreciablemente respecto a las plantas control. A los 18 días, el hipocótilo ha alcanzado prácticamente su tamaño definitivo, siendo ahora las zonas apical y media las que experimentan un aumento de la actividad AIA-oxidasa en las plantas tratadas mientras que en la zona basal se produce un ligero descenso. La actividad peroxidasa no experimenta variaciones apreciables respecto del control.

La presencia de cicloheximida suprime el aumento de AIA-oxidasa observado en las plantas tratadas, alcanzándose valores similares a los de las plantas control.

## 2. VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD AIA-OXIDASA Y PEROXIDASA EN SECCIONES INCUBADAS EN AIA

Los primeros ensayos se realizaron con

plantas no decapitadas, obteniéndose resultados variables sin tendencias definidas. Sólo cuando las plantas se decapitaban 24 h antes del tratamiento, se encontraron resultados reproducibles. En la tabla 3 se indican los resultados obtenidos en los extractos correspondientes a los hipocótilos completos procedentes de plantas decapitadas y no decapitadas de distinta edad, incubados en tampón o AIA. En las plantas no decapitadas, sólo se observa un aumento apreciable

de actividad en los hipocótilos de 15 días, incubados en AIA  $10^{-3}$  M. En los restantes ensayos, el tratamiento con AIA produce valores similares (con  $10^{-4}$  M) o inferiores (con  $10^{-3}$  M) a los de las plantas control. En las plantas decapitadas, siempre se aprecia un aumento de actividad AIA-oxidasa tras el tratamiento con AIA. Tanto en las plantas decapitadas como en las no decapitadas, las variaciones de peroxidasa son similares a las de AIA-oxidasa.

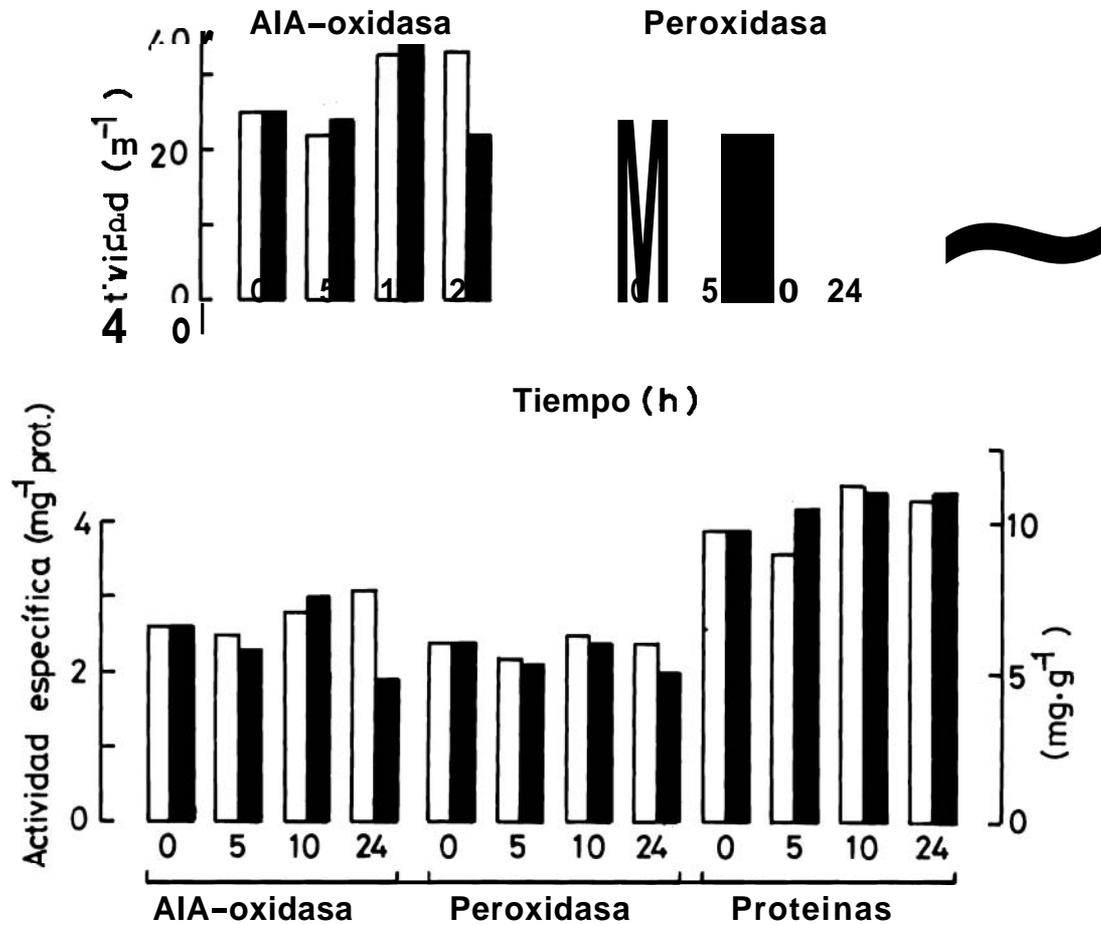


FIGURA 1. Influencia de la decapitación sobre el contenido en proteínas y las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa. En los extractos correspondientes a los hipocótilos de plantas decapitadas (■) o no decapitadas (□) de 8 días de edad, se determina, a diferentes tiempos (t) después de la decapitación, el contenido en proteínas (mg / g peso fresco), las actividades (por g de peso fresco) y las actividades específicas (por mg de proteína).

Effect of decapitation on the protein content and on the IAA-oxidase and peroxidase activities. In the hypocotyl extracts obtained from decapitated (■) or non decapitated (□) 8 day old seedlings, the protein content (mg / g fresh weight), the activities (per g fresh weight) and the specific activities (per mg protein) are measured at different times (t) after decapitation.

La fig. 1 muestra el efecto producido por la decapitación sobre las actividades enzimáticas y el contenido en proteínas. En las plantas no decapitadas de 8 días, después de 24 h se produce un ligero aumento de AIA-oxidasa y proteínas, mientras que la peroxidasa no varía apreciablemente. En las plantas decapitadas, los valores hasta las 10 h después de la decapitación se mantienen similares a los de las no decapitadas, pero después de 24 h, aunque se mantiene el contenido en proteínas, descienden las actividades por g de peso fresco y más aún las actividades específicas.

La presencia de cicloheximida modifica el efecto del AIA, dependiendo de la concentración de éste (tabla 4). Con 10% de AIA se produce un aumento mayor del contenido en proteínas que de las actividades enzimáticas, lo que supone un descenso de las actividades específicas respecto del control. A esta concentración de AIA, la cicloheximida disminuye la actividad por debajo de las plantas control. Con  $10^{-4}$  M de AIA, el contenido en proteínas no se modifica respecto del control, pero el aumento de actividades es similar al producido por  $10^{-3}$  M, lo que supone un aumento de las actividades específicas. En este caso, la cicloheximida incrementa la actividad, y más aún la actividad específica. Si se considera la variación de la actividad específica respecto del control, puede concluirse que la cicloheximida potencia la acción de la hormona, es decir aumenta el descenso

producido por  $10^{-3}$  M e incrementa el aumento producido por  $10^{-4}$  M de AIA.

Teniendo en cuenta que en secciones incubadas en AIA, la concentración  $10^{-4}$  M estimula el crecimiento mucho más que la  $10^{-3}$  M (datos no mostrados), de los resultados de las tablas 3 y 4 parece deducirse que la concentración de AIA  $10^{-3}$  M puede resultar tóxica para las secciones incubadas. Por esta razón, se utilizó la concentración  $10^{-4}$  M de AIA en los posteriores ensayos de incubación.

Cuando se incuban en AIA secciones de hipocótilo con distinta localización en el órgano, se producen cambios de actividad AIA-oxidasa, que dependen de la edad de las plantas utilizadas (fig. 2). A cada edad, los mayores aumentos de actividad se observan en las zonas con poco crecimiento y en sus adyacentes inferiores cuyo crecimiento ha cesado recientemente (en los 2 días anteriores). Así ocurre en las zonas D y E a los 9 días, las C, y D a los 11 días y la C, a los 16 días. Por el contrario, las zonas con mayor velocidad de crecimiento a cada edad, muestran una clara disminución o un ligero aumento de la actividad. Tal es el caso de las zonas C, y C, a los 9 días, la C, a los 11 días y la B a los 16 días. A medida que aumenta el tiempo transcurrido desde la finalización del crecimiento, las zonas se hacen más insensibles a la acción del AIA, como ocurre con la zona E a partir de los 11 días, y la C, y D a los 16 días. A los 20 días, el hipocótilo ha alcanzado su tamaño final, y la

TABLA 4. Influencia del AIA sobre el contenido en proteínas y las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa en hipocótilos incubados. Los hipocótilos completos de plantas decapitadas de 17 días, se incuban en tampón (control) o en disoluciones  $10^{-3}$  o  $10^{-4}$  M de AIA, con (+ C) o sin cicloheximida. Después de 6 h de tratamiento se obtienen los extractos en los que se determina el contenido en proteínas (mg/g de peso fresco), las actividades (por g de peso fresco) y las actividades específicas (por mg de proteína).

Influence of IAA on the protein content and on IAA-oxidase and peroxidase activities in incubated hypocotyls. Hypocotyls from 17 day old decapitated seedlings are incubated in buffer (control) or in  $10^{-3}$  or  $10^{-4}$  M IAA solutions with (+ C) or without cicloheximide. After 6 h the extracts are obtained and the protein content (mg / g fresh weight), the activities (per g fresh weight) and the specific activities (per mg protein) are measured.

Tratamiento	Proteínas	Actividad		Actividad específica	
		AIA-oxi.	Peroxi.	AIA-oxi.	Peroxi.
Control	2,52	27,5	16,0	10,9	6,3
AIA $10^{-3}$	3,25	30,5	17,5	9,4	5,4
Idem+ C	3,16	21,5	13,5	6,8	4,3
AIA $10^{-4}$	2,51	30,0	19,0	11,9	7,5
Idem + C	2,23	37,0	18,0	16,6	8,1

TABLA 5. Influencia del AIA en la actividad peroxidasa en secciones incubadas. Los datos corresponden al experimento de la fig. 2. Se indica el porcentaje de variación de la actividad respecto a los ensayos control.

Influence of IAA on peroxidase activity in incubated hypocotyl sections. Data correspond to the experiment in Fig. 2. The percentage of the variation of activity in relation to the control is indicated.

Zona	Edad (d)			
	9	11	16	20
B	—	—	+7	-30
C <sub>1</sub>	-6	+46	+4	-13
C <sub>2</sub>	0	0	-7	0
D	+14	+8	+10	+13
E	+32	0	+10	+5,5

distribución de la variación de AIA-oxidasa oscila a lo largo del órgano.

El efecto del AIA sobre la actividad peroxidasa es menos sistemático (tabla 5). A los 9 y 20 días, las variaciones son similares a las de AIA-oxidasa, pero la disparidad entre ambas actividades es mayor a los 11 y 16 días.

**DISCUSIÓN**

Los resultados obtenidos indican que el AIA puede modular las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa en los hipocótilos etiolados de altramuz, y que su efecto depende de factores como la edad de la planta, la localización en el hipocótilo de los tejidos y la concentración de AIA.

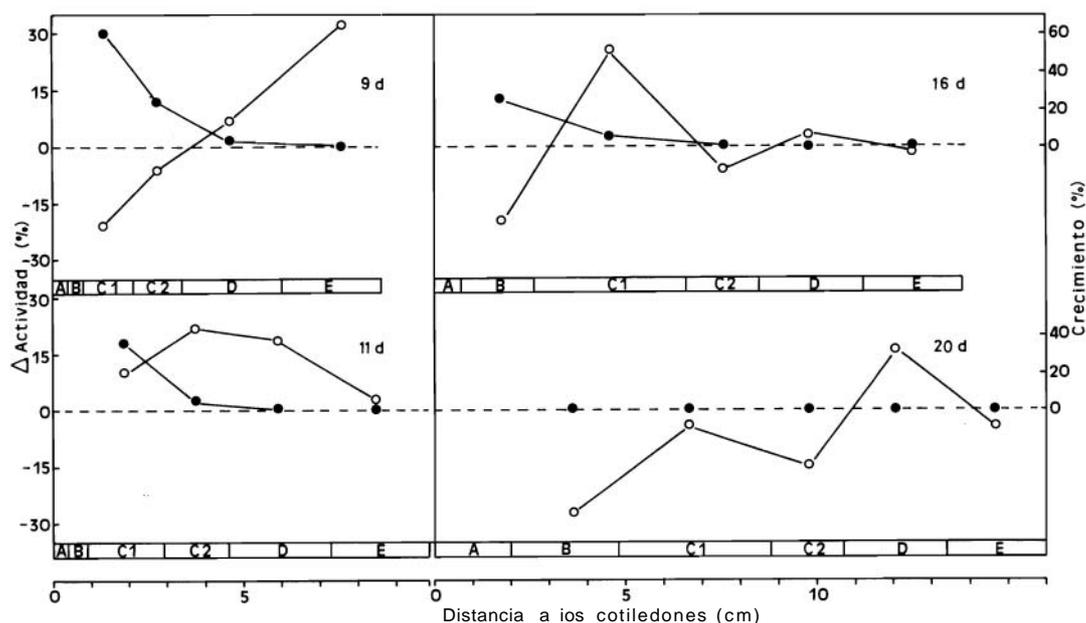


FIGURA 2. Influencia del AIA sobre la actividad AIA-oxidasa en secciones incubadas. A los 9 días se marcan con tinta los hipocótilos, delimitando 6 zonas (A, B, C., C<sub>2</sub>, D y E). A cada edad se decapitan 8 plantas. Después de 24 h se cortan las distintas zonas y se incuban en tampón (control) o en disolución 10<sup>-4</sup> M de AIA. A las 6 h se obtienen los extractos en los que se determinan las actividades AIA-oxidasa (en la figura) y peroxidasa (en la tabla 5). Para cada zona se representa la variación de actividad respecto del control, expresada como % de aumento (+) o disminución (-), sobre la actividad medida en el control (o—o, actividad). Se indica el crecimiento relativo experimentado por cada zona en las plantas intactas (•—•), en los dos días posteriores a cada edad.

Influence of IAA on IAA-oxidase activity in incubated sections. At day 9, hypocotyls are marked with ink to delimit six zones (A, B, C., C<sub>2</sub>, D and E). At each age, 8 plants are decapitated. 24 h after decapitation, the zones are cut and then incubated in buffer (control) or in 10<sup>-4</sup> M IAA solution. The difference between the activity of the treated zones and that of the control is expressed as % of increase (+) or decrease (-) of the activity measured in the control (o — o, activity). The relative growth exhibited by the different zones in intact plants during the posterior two day period at each age is indicated (•—•).

Es de destacar que el crecimiento de éste órgano también varía en función de estos mismos parámetros (ORTUÑO *et al.*, 1988 y 1990; SÁNCHEZ-BRAVO *et al.*, 1986).

El efecto transitorio producido por el tratamiento por aspersión con AIA  $10^{-3}$  M en las plantas intactas (tabla 1), podría ser interpretado como una respuesta defensiva de la planta (aumento de la actividad degradativa) que le permitiría destruir el exceso de hormona en sus tejidos. La recuperación a las 24 h de los niveles de actividad presentes en las plantas control, así parece confirmarlo.

Cuando se compara el efecto que produce la incubación en AIA de los hipocótilos completos correspondientes a las plantas decapitadas y no decapitadas (tabla 3), se comprueba que a los 20 días, al aumentar la concentración de AIA se produce un aumento de actividad en las plantas decapitadas y un descenso en las no decapitadas, mientras que a los 15 días, la actividad aumenta sólo en las decapitadas. De ello se deduce en primer lugar que, dependiendo de su concentración, el AIA puede aumentar o disminuir la actividad degradativa. Resultados semejantes se han obtenido en diferentes materiales, observándose un descenso de la actividad AIA-oxidasa o peroxidasa cuando se utilizan concentraciones altas de AIA (superiores a las fisiológicas), y un aumento de las actividades para concentraciones bajas de AIA (MINO, 1968; LEE, 1971b). En segundo lugar, los datos de la tabla 3 sugieren que el efecto del AIA exógeno puede variar dependiendo del nivel endógeno de auxina, que como se ha comprobado, varía con la edad (SÁNCHEZ-BRAVO *et al.*, 1986; ORTUÑO *et al.*, 1990). Esta última es probablemente la razón por la que en los tratamientos realizados con los hipocótilos completos de plantas decapitadas no se observa descenso de actividad (tabla 3), ya que al decapitar se suprime la fuente endógena de auxina (cotiledones y meristemo apical), con lo que se interrumpe el suministro de hormona al hipocótilo. El hecho de que 24 h después de la decapitación, se produzca un descenso de la actividad AIA-oxidasa (fig. 1), así como una reducción apreciable del crecimiento del órgano (SÁNCHEZ-BRAVO *et al.*, en preparación), podría ser atribuido en ambos casos al descenso en el nivel de AIA endógeno producido por la decapitación.

La interacción entre el AIA exógeno y endógeno, puede ser la causa de la diferente res-

puesta que presentan las distintas zonas del hipocótilo tras el tratamiento con AIA. En las plantas intactas (tabla 2), sólo se observa aumento de actividad en las zonas sin crecimiento. En este caso, la concentración  $10^{-3}$  M no produce efectos tóxicos, probablemente debido a que la barrera epidérmica dificulta la entrada del AIA. Similares resultados se consiguen con secciones incubadas en AIA  $10^{-4}$  M (fig. 2), cuya absorción puede producirse más fácilmente a través de las superficies de corte. Teniendo en cuenta que la concentración de AIA endógeno es mayor en las zonas y edades con crecimiento, el tratamiento con AIA exógeno en estas zonas permitiría alcanzar niveles altos de hormona que provocarían un descenso de actividad (tabla 2 y fig. 2). Por el contrario, las zonas sin crecimiento y por tanto con menor contenido endógeno de AIA, responderían al tratamiento exógeno, produciendo un aumento de actividad.

La capacidad de respuesta al AIA no es permanente ya que al aumentar la edad de las zonas, éstas se hacen insensibles al tratamiento, como es el caso de las zonas basales (fig. 2). La respuesta oscilante observada en hipocótilos de 20 días, es coherente con la distribución ondulatoria de AIA observada a esa edad.

El efecto producido por la cicloheximida en aquellos ensayos en los que anula el efecto producido por el tratamiento con AIA (tablas 1 y 2), sugiere que la hormona podría actuar induciendo la síntesis «de novo» de las enzimas. Por el contrario, algunos resultados muestran un comportamiento paradójico de la cicloheximida, potenciando el efecto producido por el AIA (tabla 4). Recientemente, se ha comprobado que la cicloheximida puede mimetizar el efecto del AIA en las respuestas rápidas del crecimiento (THEOLOGIS, 1986), así como en la estimulación de la síntesis de etileno (PÉREZ-GILABERT *et al.*, en preparación).

El hecho de que la actividad peroxidasa no muestre siempre variaciones paralelas a las de AIA-oxidasa, sugiere que aunque el AIA puede modular la actividad peroxidasa, no todas las isoperoxidasas tienen la misma capacidad para degradar el AIA, como se ha demostrado en diversos materiales (ENDO, 1968; SAHULKA, 1970; GASPAR *et al.*, 1974), y también en hipocótilos etiolados de altramuz (SABATER *et al.*, 1982).

En conclusión, los resultados de este trabajo sugieren que la correlación observada entre la

actividad AIA-oxidasa y el crecimiento en hipocótilos etiolados de altramus (SÁNCHEZ-BRAVO & NÚÑEZ, 1990), puede originarse a través de la acción reguladora del AIA endógeno, cuyos niveles están igualmente correlacionados con el crecimiento de este órgano.

## BIBLIOGRAFÍA

- BAKARDJEVA, N. T. 1971. Competitive oxidation of ascorbic and indoleacetic acids in the presence of enzymes and on copper and iron ions. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences*, 24 (10):1411-1414.
- COOMBES, A. J., LEEP, N. W. & PHIPPS, D. A. 1976. Effects of copper on IAAoxidase activity in root tissue of barley (*Hordeum vulgare* cv Zephyr). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 80 (3):236-242.
- ENDO, T. 1968. Indoleacetate oxidase activity of horseradish and other plant peroxidase isozymes. *Plant Cell Physiol.*, 9:333-341
- GASPAR, T. H. & LACOPPE. 1968. The effect of CCC and Amo on growth, catalase peroxidase and indoleacetic acid oxidase activity of young barley seedlings. *Physiol Plant.* 21:1104-1109.
- GASPAR, T. H., DUBUCQ, M. & VAN HOOF, P. 1974. Des isoperoxydases spécifiques de racines. *Biol. Plant.*, 16:237-240.
- HALEVY, A. H. 1963. Interaction of growth retarding compounds and gibberellin on indoleacetic acid oxidase and peroxidase of cucumber seedlings. *Plant Physiol.*, 38:731-737.
- LEE, T. T. 1971a. Cytokinin-controlled indoleacetic acid oxidase isoenzymes in tobacco callus cultures. *Plant Physiol.*, 47:181-185.
- 1971b. Promotion of indoleacetic acid oxidase isoenzymes in tobacco callus cultures by indoleacetic acid. *Plant Physiol.*, 48:56-59.
- 1972a. Interaction of cytokinin, auxin and gibberellin on peroxidase isoenzymes in tobacco tissues cultured. *Can. Jour. Bot.*, 50:2471-2477.
- 1972b. Changes in indoleacetic acid oxidase isoenzymes in tobacco tissues after treatment with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Physiol.*, 49:957-960.
- MINO, Y. 1968. Studies on the destruction of indole-3-acetic acid by species of *Arthrobacter* I. On the induction of the enzyme responsible for the destruction. *Plant Cell Physiol.*, 9:169-183.
- 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.
- 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.
- SABATER, F., CUELLO, J., SÁNCHEZ-BRAVO, J. & ACOSTA, M. 1976. Absence of biological activity in oxidation products of indoleacetic acid. *Biol. Plant.*, 18 (6):460-463.
- SABATER, F., ACOSTA, M., SÁNCHEZ-BRAVO, J., CUELLO, J. & DEL RÍO, J. A. Indole-3-methanol as an intermediate in the oxidation of indole-3-acetic acid by peroxidase. *Physiol Plant.*, 57:75-78.
- SAHULKA, J. 1970. Electrophoretic study on peroxidase, indoleacetic acid oxidase and o-diphenoloxidase fractions in extracts from different growth zones of *Vicia faba* L. roots. *Biol. Plant.*, 12 (3):191-198.
- SÁNCHEZ-BRAVO, J., 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. & NÚÑEZ, C. 1990. Distribución de AIA-oxidasa y peroxidasa en hipocótilos etiolados de *Lupinus albus*, L. Relación con el crecimiento. *Anales de Biología 16, Biología Vegetal*, 5): 137-142.
- SÁNCHEZ-BRAVO, J., ORTUÑO, A., BOTÍA, J. M., ACOSTA, M. & SABATER, F. 1990. The role of indoleacetic acid polar transport in the growth of etiolated hypocotyls of *Lupinus albus* L. (enviado)
- PÉREZ-GILABERT, M., ORTUÑO, A., ACOSTA, M. & SÁNCHEZ-BRAVO, J. 1990. Variations in ethylene production rate, ethylene forming enzyme activity and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content during the growth of etiolated hypocotyls of *Lupinus albus*. (enviado)
- TANIGUCHI, M., YAMAGUCHI, M. & SATOMURA, Y. 1973. Regulation of IAA metabolizing enzymes in plants by an anti-auxin, 3-(4-Phenylcarbonylsiloxy) acetic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37(4):819-826.
- THEOLOGIS, A. 1986. Rapid gene regulation by auxin. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 37:407-438.
- TOMASZEWSKI, M. & THIMANN, K.V. 1966. Interactions of phenolic acids, metallic ions and chelating agents on auxin-induced growth. *Plant Physiol.*, 41 (9):1443-1454.