

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS

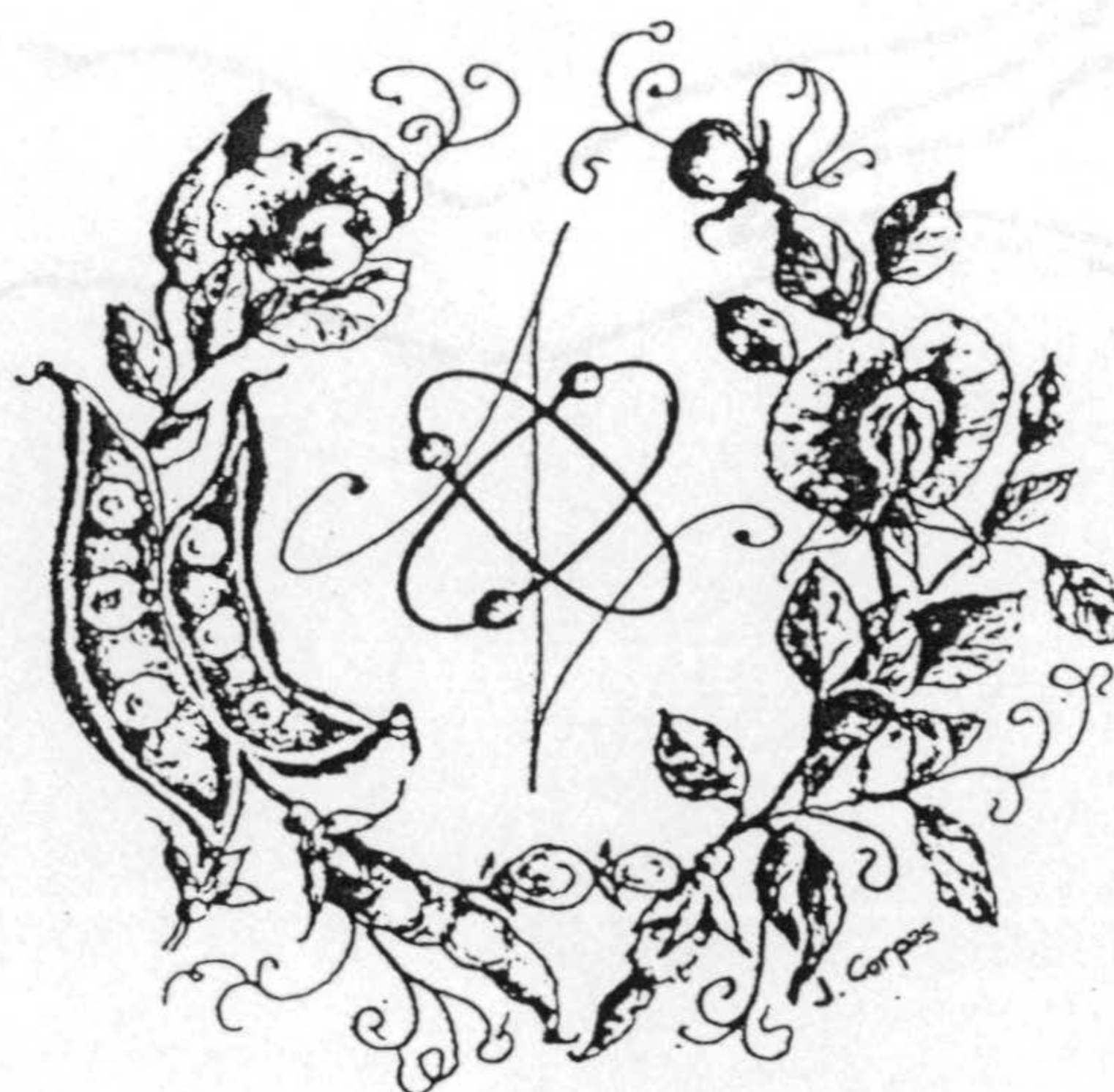
TESIS DOCTORAL

METABOLISMO DEL OXIGENO ACTIVADO Y DE  
LOS UREIDOS EN PEROXISOMAS DE HOJAS  
DE *Pisum sativum* L. EN CONDICIONES  
DE SALINIDAD

*Fco. Javier Corpas Aguirre*  
1992

FACULTAD DE CIENCIAS

METABOLISMO DEL OXÍGENO ACTIVADO Y DE  
LOS UREIDOS EN PEROXISOMAS DE HOJAS  
DE *Pisum sativum* L. EN CONDICIONES  
DE SALINIDAD



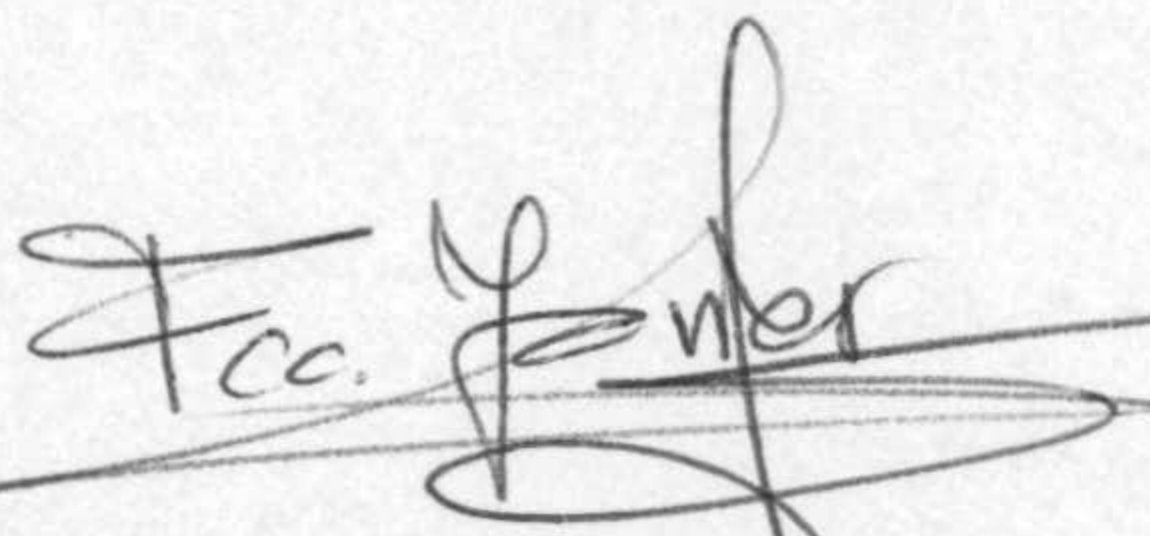
Fco. Javier Corpas Aguirre

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
1992



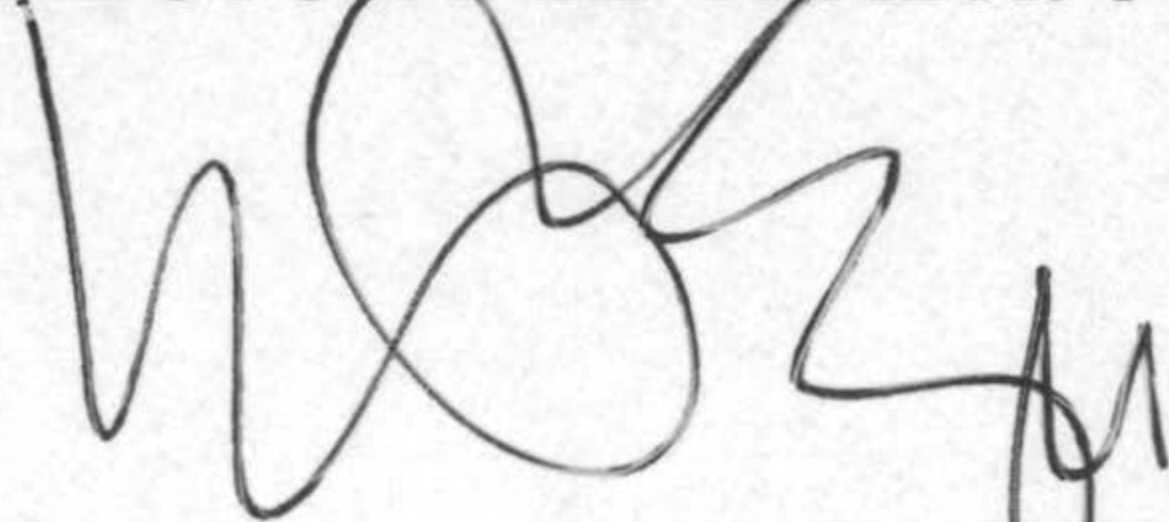
METABOLISMO DEL OXÍGENO ACTIVADO Y DE  
LOS UREIDOS EN PEROXISOMAS DE HOJAS  
DE *Pisum sativum* L. EN CONDICIONES  
DE SALINIDAD

Memoria que presenta el Licenciado  
en Ciencias Biológicas D. Fco. Javier Corpas  
Aguirre para aspirar al grado de Doctor.



Fdo.: Fco. Javier Corpas Aguirre

VºBº  
EL DIRECTOR DEL TRABAJO



Fdo.: Luis Alfonso del Río Legazpi  
Profesor de Investigación del C.S.I.C.



Este trabajo ha sido realizado en la Unidad Estructural de Bioquímica Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín de Granada con ayuda de una beca para la Formación del personal Investigador de la Junta de Andalucía, y ha sido financiado por la DGICYT (PB87-0404-01).

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados a los siguientes congresos y reuniones científicas: I Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal (Barcelona, 1989); XVI Congreso Nacional de Bioquímica (Alicante, 1989); XVII Congreso Nacional de Bioquímica (Oviedo, 1990); IV Portuguese-Spanish Biochemistry Congress (Póvoa de Varzim, Portugal, 1991); y, II Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal (Madrid, 1991).



La realización de esta Tesis Doctoral ha podido ser llevada a cabo gracias a la concurrencia de múltiples y diversos factores. Entre ellos, a la ayuda y al entrañable apoyo de un gran número de personas; introduciéndome unas, en los distintos campos de la investigación científica; otras, ofreciéndome su asistencia técnica. En estos momentos quiero expresarles mi obligado agradecimiento con el mismo calor humano con el que todas ellas me acogieron.

En primer lugar a mi director de tesis Dr. Luis Alfonso del Río Legazpi quien me ha guiado en este viaje fantástico de la investigación. Gracias a su alta calidad y rigor científico como a su paciencia, meticulosidad y continuo ánimo ha sido posible llevar esta tesis a buen puerto.

Al grupo de trabajo al cual me incorpore y en el que a lo largo de estos años no sólo he tenido compañeros sino cordiales amigos como son Luisa M<sup>a</sup> Sandalio González, Pepe Palma Martínez y Pablo Bueno Laraño. También, cómo olvidar, a los que llegaron después: José A. Hernández, en sus visitas mensuales, Gabriela Pastori y Eduardo López-Huertas. Entre todos me crearon un clima ideal de trabajo.

Al Dr. Manuel Gómez Ortega, perteneciente al Dpto. de Fisiología Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín, por su apoyo inapreciable en la selección y mantenimiento del material vegetal. Al Dr. Francisco Sánchez Rasero del Dpto. de Química Analítica por su asesoramiento e inestimable ayuda en las determinaciones por HPLC.

Al grupo de Microscopía Electrónica de la Estación Experimental del Zaidín; Dr. Isabel Rodríguez García y Dña. Matilde Garrido Ortiz, por sus enseñanzas a la hora de realizar este trabajo tan meticuloso y, especialmente, a Juan de Dios Alché Ramírez, compañero y amigo en tantas ocasiones, que siempre me brindó su ayuda y su trabajo.

Al Dr. Fernando Pliego Alfaro del C.I.D.A., de Málaga, por sus enseñanzas en el campo de los Cultivos *In vitro*, pues gracias a su asesoramiento y facilidades dadas, nos ha permitido entrar en tan maravilloso mundo.

A mi hermano José Manuel que me ha ofrecido sus conocimientos en informática ahorrándome muchos quebraderos de cabeza en la presentación de este trabajo.

Por último quiero agradecer a toda mi familia y amigos, especialmente a Leonor, por el apoyo humano que me han brindado a lo largo de todo este tiempo.

A todos ellos, mi más sincero agradecimiento





A mis padres

PARAHUMIN

GALGO





## ÍNDICE

### INTRODUCCIÓN

1. OXÍGENO ACTIVADO Y SISTEMAS ANTIOXIDANTES .....	17
1.1. Especies de oxígeno activado .....	17
1.2. Sistemas antioxidantes .....	20
1.3. Superóxido dismutasa: función y localización celular .....	23
2. METABOLISMO DEL OXÍGENO ACTIVADO EN PEROXISOMAS VEGETALES .	26
3. BIOGÉNESIS DE UREIDOS EN PEROXISOMAS VEGETALES .....	33
3.1. Biogénesis de ureidos en nódulos de leguminosas .....	35
3.2. Metabolismo de ureidos en hojas .....	36
4. ESTRÉS SALINO EN PLANTAS Y TOLERANCIA A LA SALINIDAD .....	37
4.1. Efectos a nivel de membrana .....	39
4.2. Efectos sobre el metabolismo .....	40
5. PROTEASAS EN CÉLULAS VEGETALES .....	46
5.1. Aspectos generales .....	46
5.2. Enzimas proteolíticos en la movilización de proteínas de reserva en las semillas .	51
5.3. Enzimas proteolíticos en la senescencia .....	51
5.4. Enzimas proteolíticos en las modificaciones postraduccionales .....	52
<b>OBJETO Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO .....</b>	<b>55</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
1. MATERIAL VEGETAL .....	63
2. CONDICIONES DE CULTIVO .....	63
3. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS DE HOJAS DE GUISANTE.	
3.1. Inicio de callos de hojas de guisante .....	64
3.2. Inicio de suspensiones celulares .....	67
4. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ORGÁNULOS CELULARES.	
4.1. Guisante .....	67
4.2. Caupí, judía y soja .....	69

5. DETERMINACIÓN DE INTEGRIDAD DE ORGÁNULOS CELULARES.	
5.1. Peroxisomas .....	71
5.2. Mitocondrias .....	71
6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y CITOQUÍMICA DE CATALASA .....	72
7. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.	
7.1. Superóxido dismutasa .....	73
7.2. Catalasa .....	75
7.3. Urato oxidasa o uricasa .....	75
7.4. Alantoinasa .....	75
7.5. Xantina oxidoreductasa.	
7.5.1. Xantina oxidasa o forma O .....	76
7.5.2. Xantina deshidrogenasa o forma D .....	76
7.6. Glicolato oxidasa .....	76
7.7. Hidroxipiruvato reductasa .....	77
7.8. Fumarasa .....	77
7.9. Citocromo c oxidasa .....	77
7.10. Actividad proteasa.	
7.10.1. Endopeptidasas .....	78
7.10.2. Exopeptidasas.	
7.10.2.1. Actividad carboxipeptidasa .....	79
7.10.2.2. Aminopeptidasa .....	79
8. ANÁLISIS DE PURINAS Y ALANTOÍNA POR HPLC Y FPLC .....	80
9. DETERMINACIÓN DE RADICALES SUPERÓXIDO .....	82
10. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR .....	83
11. DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO .....	84
12. OTRAS DETERMINACIONES.	
12.1. Peroxidación lipídica .....	84
12.2. Peróxido de hidrógeno .....	85
12.3. Ureidos .....	86
12.4. Proteínas .....	87
12.5. Clorofila .....	87
12.6. Densidad .....	88
12.7. Determinación química de Na, Cl, Fe, Cu, Mn y Zn .....	88

## RESULTADOS

1. DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE SUPERÓXIDO DISMUTASA EN HOJAS DE LEGUMINOSAS PRODUCTORAS DE UREIDOS .....	93
2. EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CLORURO SÓDICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE GUISANTE .....	98

2.1. Efecto del NaCl sobre el contenido de Na, Cl, Fe, Cu, Mn y Zn en hojas de plantas de guisante .....	100
3. EFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE EL METABOLISMO DEL OXÍGENO ACTIVADO EN PEROXISOMAS .....	102
4. EFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE EL METABOLISMO DE LOS UREIDOS EN PEROXISOMAS.....	107
5. EFECTO DEL CLORURO SÓDICO SOBRE LA ULTRAESTRUCTURA CELULAR DE HOJAS DE GUIANTE. ....	112
6. ACTIVIDAD SOD EN CULTIVOS CELULARES DE HOJAS DE GUIANTE ...	123
7. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN PEROXISOMAS Y MITOCONDRIAS DE HOJAS DE GUIANTE .....	126
DISCUSIÓN .....	135
CONCLUSIONES .....	153
ABREVIATURAS .....	157
BIBLIOGRAFÍA .....	161





GALGO  
PARCHEMIN

INTRODUCCIÓN





## 1. OXÍGENO ACTIVADO Y SISTEMAS ANTIOXIDANTES.

### 1.1. Especies de oxígeno activado.

El oxígeno fue descubierto como un componente del aire casi simultáneamente por el químico, filósofo y teólogo inglés Joseph Priestley y por el farmacéutico sueco Carl Wilhelm Scheele, a finales del siglo XVIII. Años más tarde, el gran químico francés Antoine Lavoisier amplió estas investigaciones, demostrando que el oxígeno –nombre acuñado por él– era un elemento indispensable para la vida, y estableció las bases de la química del oxígeno.

Todos los organismos aerobios están afectados por la situación paradójica de que el oxígeno, fuente de su existencia, también es una sustancia tóxica en cuya presencia sólo pueden sobrevivir merced a un elaborado sistema de defensa. Nuestra comprensión actual de la toxicidad del oxígeno está basada en las consideraciones teóricas de Michaelis (1946) y en las consideraciones experimentales de Gerschman (1954). Estas observaciones condujeron al concepto de que los radicales libres de oxígeno estaban implicados en la toxicidad producida por este gas. Pero fue con los trabajos llevados a cabo por Irwin Fridovich y colaboradores cuando el producto de la reducción univalente del oxígeno –el radical superóxido– pasó al primer plano de la bioquímica. Estos investigadores descubrieron una clase de metaloenzimas –las superóxido dismutasas– que dismutan o desproporcionan los radicales superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno.

La toxicidad del oxígeno para los organismos aeróbios es debida principalmente a los productos de su reducción, y a su forma excitada, el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), que se indican en la Fig. 1A (Elstner, 1982, 1987, 1990; Fridovich, 1983, 1986a; Cadenas, 1989; Halliwell & Gutteridge, 1989).

De las especies de oxígeno activado, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es el más estable y el único que se podría acumular apreciablemente en medios acuosos neutros (Elstner, 1987). El radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , por el contrario, es inestable en soluciones acuosas, con una vida del orden de milisegundos, que es aún todavía mucho más corta en el caso del radical  $\cdot\text{OH}$  (Czapki, 1971; Halliwell & Gutteridge, 1989), que es el que posee mayor reactividad. En solución, el radical superóxido se encuentra en equilibrio con su forma protonada, el radical perhidroxilo ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ) que es más reactivo que el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Behar *et al.*, 1970; Halliwell & Gutteridge, 1989).

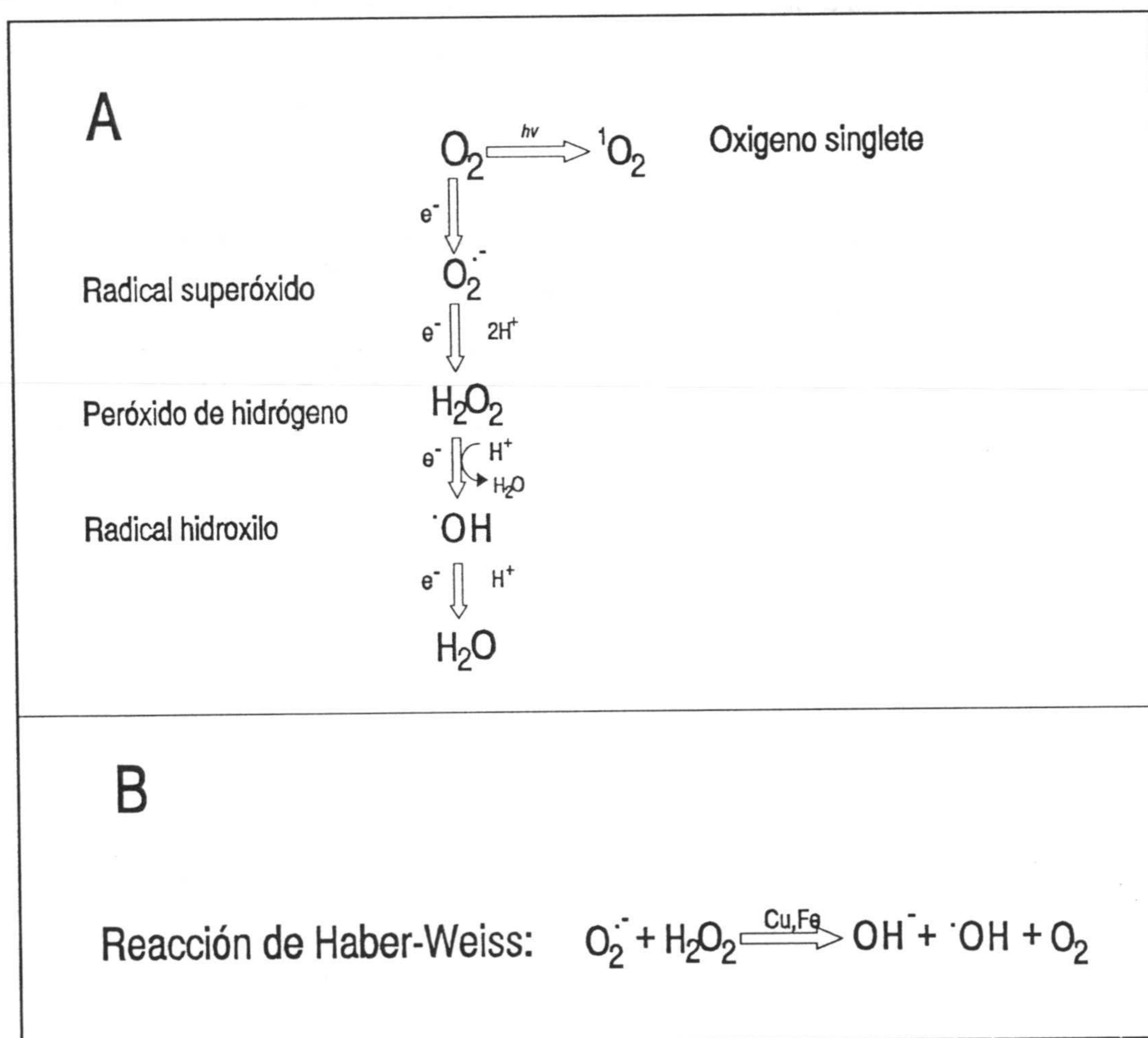


Fig. 1. A, Especies de oxígeno activado. B, Reacción de Haber-Weiss catalizada por trazas de metales.

Aunque los radicales  $O_2^{\cdot-}$  pueden originar daños directos en sistemas biológicos (Fridovich 1986a) su peligrosidad es principalmente indirecta, y radica en el producto de su reacción con el peróxido de hidrógeno, mediante la reacción de Haber–Weiss catalizada por trazas de metales (Czapski *et al.*, 1983). En esta reacción, como se indica en la Fig. 1B, se origina el radical libre hidroxilo ( $\cdot OH$ ), que es uno de los oxidantes más poderosos conocidos, capaz de producir daños importantes en las membranas celulares y de reaccionar con la mayoría de los compuestos presentes en los sistemas biológicos, incluido el ADN (Halliwell & Gutteridge, 1989; Packer & Glazer, 1990).

Las plantas por su metabolismo oxidativo durante la fotosíntesis, respiración y fotorrespiración están expuestas de manera especial a daños oxidativos por diferentes especies de oxígeno activado. En la Tabla 1 se presentan distintos componentes celulares vegetales donde se ha detectado la producción de radicales libres de oxígeno.

**Tabla 1.** Sistemas biológicos productores de radicales libres de oxígeno en plantas.

Sistema biológico	Referencia
Cloroplastos	Mehler (1981); Epel & Neuman (1973); Asada (1984); Halliwell (1987); Asada & Takahashi (1987); Takahashi & Asada (1988); Hodgson & Raison (1991)
Mitocondrias	Rich & Bonner (1978); Boveris <i>et al</i> (1978); Boveris & Cadenas (1982)
Membrana plasmática	Doke (1985); Pupilo <i>et al</i> (1986); Luster & Buckhout (1988); Vianello (1991)
Microsomas	Mayak <i>et al</i> (1983)
Glioxisomas	Sandalio <i>et al</i> (1988)
Peroxisomas de hoja	del Río <i>et al</i> (1989)

La toxicidad de las especies del oxígeno activado en sistemas biológicos se debe principalmente a: 1) La inactivación de enzimas por oxidación de grupos -SH en los centros activos o por cambios en el estado redox de metales en el centro activo; 2) A la hidroxilación de compuestos aromáticos, principalmente bases de ADN, lo que puede provocar la rotura de las cadenas de ADN y originar mutaciones; y 3) A la peroxidación de lípidos de membranas alterando la funcionalidad de las mismas (Frank, 1985; Oberley, 1985; Ames, 1989; Halliwell & Gutteridge, 1989).

## 1.2. Sistemas antioxidantes.

Los organismos aeróbios presentan mecanismos de control de la producción de especies de oxígeno activado, pudiendo distinguirse dos grupos que, aunque independientes, actúan con un mismo fin protector:

**A) Enzimáticos.** Su función es prevenir la iniciación de las oxidaciones en cadena, al eliminar a las especies de oxígeno parcialmente reducidas ( $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$ ) (Winston, 1990). Incluye a superóxido dismutasas (SODs), catalasa y peroxidasa, particularmente la glutatión peroxidasa y la ascorbato peroxidasa.

La catalasa, una enzima que está principalmente confinada en los peroxisomas (Huang *et al.*, 1983), se encarga de descomponer el  $H_2O_2$  por dos mecanismos, catalítica o peroxidativamente, como se indica en la Fig. 2 (Aebi, 1984) donde  $AH_2$  generalmente suele ser un ácido orgánico o un alcohol. La reacción catalítica se encuentra favorecida a concentraciones altas de  $H_2O_2$  (Chance *et al.*, 1979) lo que pone de relieve la importancia que presenta en los sistemas biológicos de protección la coordinación de las actividades SOD y catalasa.

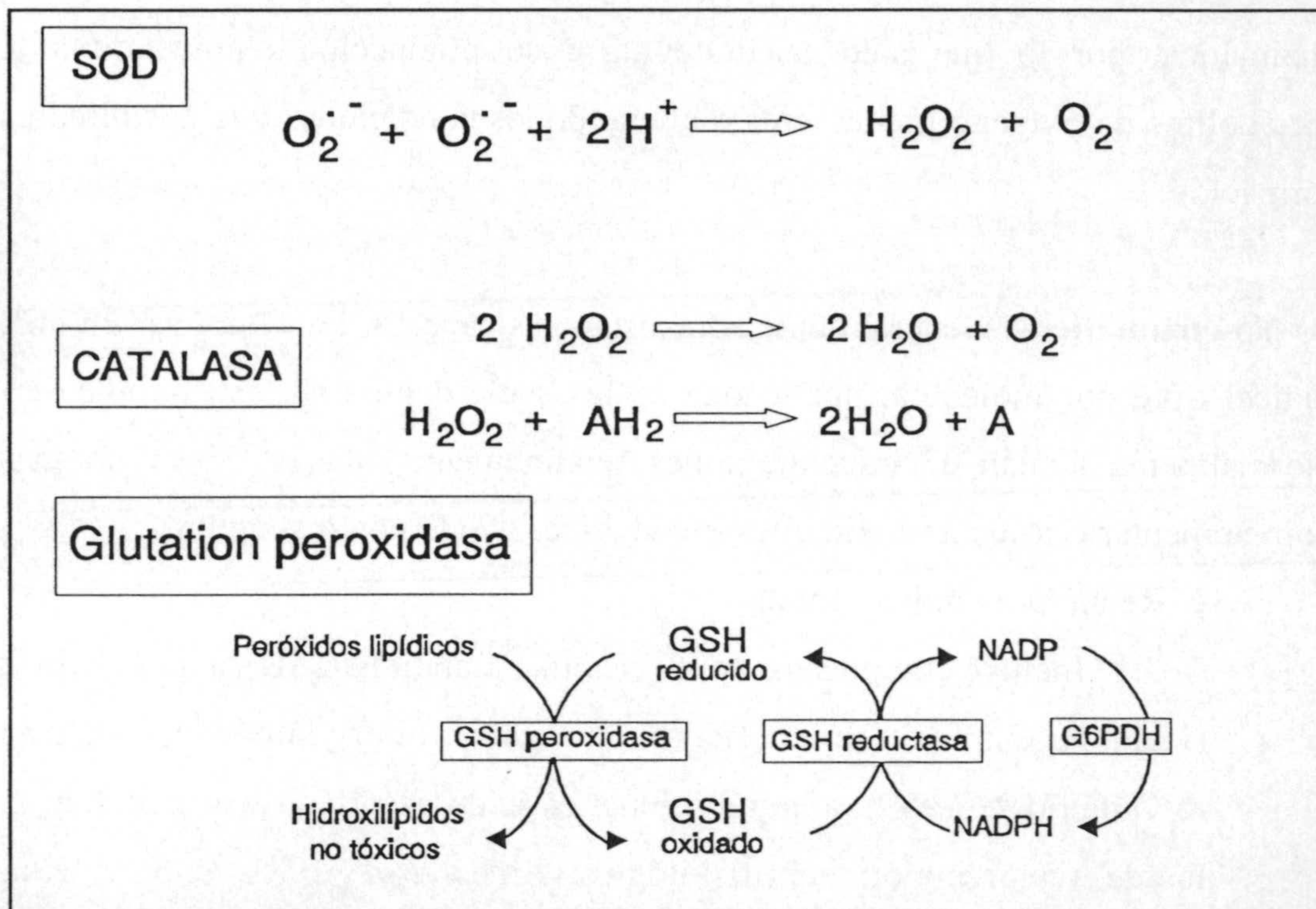


Fig. 2. Sistemas enzimáticos antioxidantes.

La glutacion peroxidasa es de gran importancia como defensa primaria frente al  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la peroxidación lipídica en células animales (Winston, 1990) y cuya presencia en plantas se ha puesto de manifiesto en años recientes (Dhinsa, 1987; Yokota *et al.*, 1988). Esta enzima no sólo transforma el  $\text{H}_2\text{O}_2$  sino también los peróxidos lipídicos requiriendo glutacion que se regenera por la glutacion reductasa en presencia de su cofactor, el NADPH, proporcionado por una enzima del Ciclo de las Pentosas Fosfato, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Fig. 2). A su vez, en plantas el  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado en cloroplastos es eliminado por el ciclo ascorbato-glutation que implica a las actividades ascorbato peroxidasa, dehidroascorbato reductasa y glutacion reductasa, dependiente de NADPH (Halliwell, 1982; Asada & Takahashi, 1987).

Tanto el  $\cdot\text{OH}$  como el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) escapan a la acción enzimática, por lo que sólo puede evitarse su producción eliminando a los metabolitos de oxígeno precursores o alterando las condiciones que posibilitan su formación.

**B) No enzimáticos.** Generalmente son sustancias capaces de neutralizar un único radical libre por molécula, por lo que se les suele denominar estequiométricos. Normalmente actúan a concentraciones relativamente altas y tienen un papel complementario a los antioxidantes enzimáticos. Podemos distinguir:

1. Reductores hidrosolubles.

Incluye compuestos como cisteína, glutatión (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), ácido úrico, etanol, glucosa, manitol y albúmina (Halliwell & Gutteridge, 1989), aunque *in vivo* el ácido ascórbico y el glutatión son los de mayor importancia fisiológica (Ames *et al.*, 1981; Chou & Khan, 1983; Cadenas, 1989; Alscher, 1989; Halliwell & Gutteridge, 1989; Packer & Glazer, 1990; Crystal & Bast, 1991).

2. Reductores liposolubles.

La vitamina E o  $\alpha$ -tocoferol reacciona con los radicales libres formando una radical tocoferilo que, por ser estable, suspende la cadena de reacciones en cascada producidas por los radicales libres, y es el antioxidante más importante presente en las membranas lipídicas (Diplock, 1983; McCay, 1985; Halliwell & Gutteridge, 1989; Fryer, 1992).

Los flavonoides, una familia de polifenoles de origen vegetal también denominados "vitamina P", son unos antioxidantes estequiométricos que pueden ser regenerados por la vitamina C. Actúan inhibiendo a las lipooxigenasas y a las ciclooxigenasas, aunque también se ha descrito que pueden inhibir a la xantina oxidasa (Hayashi *et al.*, 1988; Bors *et al.*, 1990).

El  $\beta$ -caroteno es un antioxidante no estequiométrico y actúa como atrapador físico del oxígeno singlete pues utiliza su energía para interconvertir la forma *cis* del  $\beta$ -caroteno en *trans* y viceversa (Kappus & Seis, 1981; Krinsky & Deneke, 1982; Halliwell & Gutteridge, 1989).

Recientemente, se ha propuesto que algunos sistemas proteolíticos intracelulares pueden intervenir como defensas antioxidante secundarias, degradando selectivamente las proteínas dañadas por procesos oxidativos evitando la acumulación de polipéptidos dañados (Kelvin & Davies, 1986; Davies, 1986; Pacifici *et al.*, 1989; Pacifici & Davies, 1990). Ciertos sistemas reparadores del ADN y la fosfolipasa A<sub>2</sub>, la cual corta selectivamente los fosfolípidos oxidados dentro de la membrana, también pueden ser considerados como defensas antioxidantes secundarias (Demple & Halbrook, 1983; Sevanian & Kim, 1985).

### 1.3. Superóxido dismutasa: función y localización celular.

La actividad superóxido dismutasa, puesta de manifiesto por primera vez por McCord & Fridovich en 1969, juega un papel primordial como mecanismo de defensa, llevando a cabo la dismutación o desproporcionamiento de los radicales 2libres O<sub>2</sub><sup>·-</sup> (Fig. 2) (Fridovich, 1983; Bannister *et al.*, 1987; Gralla & Kosman, 1992). Las SODs son un grupo de metaloenzimas que se presentan generalmente en tres formas moleculares distintas conteniendo Cu y Zn (Cu,Zn-SOD), Fe (Fe-SOD) o Mn (Mn-SOD) como grupos prostéticos metálicos. Sin embargo, también se han descrito Cu,Zn-SODs atípicas que contienen combinaciones distintas de estos metales en sus moléculas (Parker *et al.*, 1984; Duke & Salin, 1985; Barkley & Gregory, 1990).

Hasta ahora la única función conocida de estas enzimas es la protección



celular frente a los daños letales indirectos que pueden originar los radicales libres superóxido (Fridovich, 1983, 1986b; Bannister *et al.*, 1987; Halliwell & Gutteridge, 1989; Beyer *et al.*, 1991), aunque no se puede descartar la existencia de otras funciones para las SODs hasta ahora desconocidas (del Río, 1986).

La distribución de las SODs en distintos organismos está, de alguna manera, relacionada con el grupo prostético metálico que poseen. La Fe-SOD parece ser la isoenzima más primitiva ya que se encuentra fundamentalmente en organismos procariotas aunque también se ha detectado en algunos organismos superiores. En cambio, las Cu,Zn-SODs son casi exclusivamente eucariotas, y las Mn-SOD están ampliamente distribuidas en organismos procariotas y eucariotas. En las Tablas 2, 3 y 4 se muestra la distribución y localización celular de las tres familias de SODs.

**Tabla 2.** Distribución y localización celular de Cu,Zn-SODs.

Origen	Localización celular	Referencia
Hongos	Citoplasma	Steinman (1982); Fridovich (1983); Gralla & Kosman (1992)
Equisetos	Citoplasma	Kanematsu & Asada (1989)
	Cloroplastos	Kanematsu & Asada (1989)
Plantas superiores	Citoplasma	Kwiatowsky & Kaniuga (1986); Becana <i>et al.</i> (1989); Kanematsu & Asada (1989); Sakamoto <i>et al.</i> (1991)
	Cloroplastos	Asada & Takahashi (1987); Palma <i>et al.</i> (1986); Duke & Salin (1985); Salin (1985); Kanematsu & Asada (1989, 1990); Corpas <i>et al.</i> (1991)
	Glioxisomas	Sandalio & del Río (1987, 1988)
	Mitocondrias	Rabinowitch & Fridovich (1983); Reddy & Venkaiah (1982); Duke & Salin (1985); Sandalio <i>et al.</i> (1987)
Animales	Citoplasma	McCord (1979); Fridovich (1983)
	Lisosomas	Geller & Winge (1982)
	Mitocondrias	McCord (1979); Steinman (1982); Fridovich (1983)
	Núcleo	Patton <i>et al.</i> (1980); Yusa <i>et al.</i> (1984)
	Peroxisomas	Keller <i>et al.</i> (1991); Dhaunsi <i>et al.</i> (1992)

**Tabla 3.** Distribución y localización celular de Fe-SODs.

Origen	Localización celular	Referencia
PROCARIOTAS		
Bacterias	Matriz celular	Steinman & Ely (1990)
	Periplasma	Short & Blakemore (1989)
Algas	Citoplasma	Steinman (1982); Asada (1984); Asada & Takahashi (1987)
EUCARIOTAS		
Algas	Cloroplastos	Asada (1984); Asada & Takahashi (1987)
Plantas superiores	Citoplasma	Becana <i>et al.</i> (1989)
	Cloroplastos	Duke & Salin (1985); Kwiatowski & Kaniuga (1986); Salin (1988); Kanematsu & Asada (1990)
	Mitocondrias	Droillard & Paulin (1990)
	Peroxisomas	Droillard & Paulin (1990)
Tripanosomátidos	Citoplasma	Meshnick <i>et al.</i> (1983)

**Tabla 4.** Distribución y localización celular de Mn-SODs.

Origen	Localización celular	Referencia
PROCARIOTAS		
Bacterias	Matriz celular	Fridovich (1983)
	Periplasma	Short & Blakemore (1989)
EUCARIOTAS		
Hongos	Mitocondrias	McCord (1979); Fridovich (1983); Gralla & Kosman (1992)
Plantas superiores	Glioxisomas	Sandalio & del Río (1987, 1988)
	Mitocondrias	Rabinowitch & Fridovich (1983); Sandalio <i>et al.</i> (1987); Droillard & Paulin (1990); Corpas <i>et al.</i> (1991)
	Peroxisomas	del Río <i>et al.</i> (1983); Sandalio <i>et al.</i> (1987); Droillard & Paulin (1990)
Animales	Citoplasma	McCord <i>et al.</i> (1977); McCord (1979); Fridovich (1983); Parker <i>et al.</i> (1984)
	Mitocondrias	McCord <i>et al.</i> (1977)

## 2. METABOLISMO DEL OXÍGENO ACTIVADO EN PEROXISOMAS VEGETALES.

Los peroxisomas son unos orgánulos subcelulares respiratorios con un diámetro entre 0,1 a 1,7  $\mu\text{m}$ , rodeados por una membrana sencilla, que como constituyentes enzimáticos básicos poseen catalasa y, al menos, una flavin oxidasa productora de peróxido de hidrógeno (De Duve *et al.*, 1960; De Duve & Baudhuin, 1966; Tolbert & Essner, 1981; Huang *et al.*, 1983).

En células de vegetales, los peroxisomas están implicados en diversas funciones (Tolbert, 1980, 1981; Tolbert & Essner, 1981; Huang *et al.*, 1983; Kindl & Lazarow, 1982; Beervers, 1982; Gerhardt, 1986; Fahimi & Sies, 1987; del Río *et al.*, 1990), como se condensa en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Funciones de los peroxisomas en plantas

Función
Ciclo oxidativo fotosintético del carbono (fotorrespiración)
$\beta$ -Oxidación de ácidos grasos
Ciclo del glioxilato
Metabolismo de los ureidos
Metabolismo del metanol (hongos, levaduras)
Síntesis del oxalato (hongos)
Metabolismo de aminas (levaduras)
Metabolismo de alcanos (levaduras)

Los peroxisomas de plantas superiores han sido clasificados por Huang *et al.* (1983) en cuatro tipos:

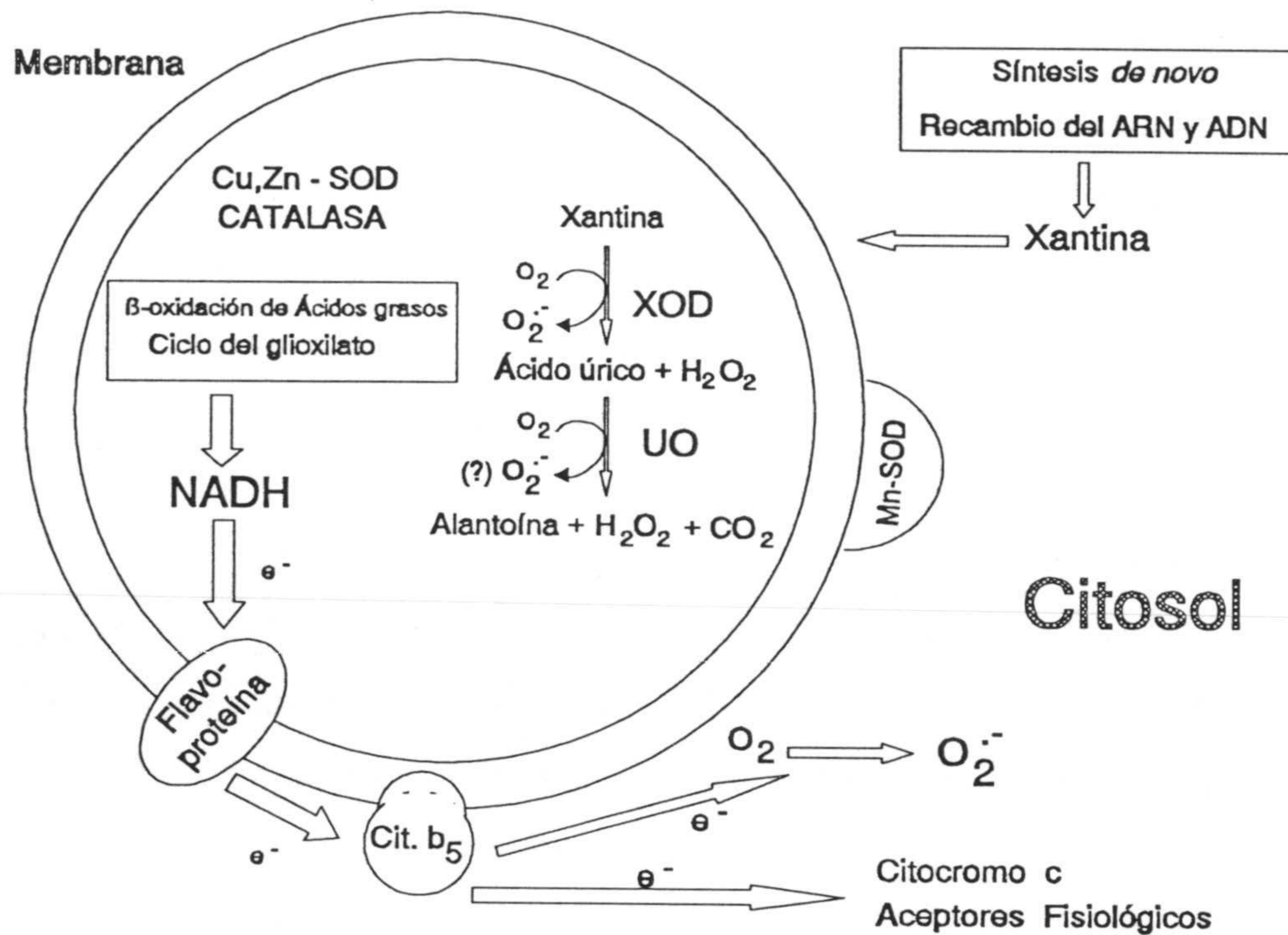
- a) Peroxisomas no especializados. Estos se presentan en una gran variedad de tejidos y contienen las enzimas básicas peroxisomales pero no desempeñan un papel fisiológico conocido.

- b) Glioxisomas. Son peroxisomas especializados presentes en semillas oleaginosas, que contienen las enzimas de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y del ciclo del glioxilato, lo que permite la transformación de los lípidos de reserva de la semilla en azúcares, que se utilizan durante la germinación y el crecimiento de la plántula (Tolbert, 1981; Tolbert & Essner, 1981; Beevers, 1982).
- c) Peroxisomas de hojas. Son peroxisomas especializados de los tejidos fotosintéticos que llevan a cabo las reacciones más importantes de la fotorrespiración (Tolbert, 1980, 1981).
- d) Peroxisomas de nódulos de raíz. Esta clase de peroxisomas están implicados en la síntesis de alantoína que tiene lugar en ciertas especies de plantas leguminosas tropicales (Schubert, 1986).

En la mayoría de los organismos eucariotas, la mayor parte del  $H_2O_2$  producido en el metabolismo oxidativo celular se localiza en los peroxisomas. La presencia en estos orgánulos de diferentes oxidasas productoras de peróxido de hidrógeno, como la xantina oxidasa, urato oxidasa, acil-CoA oxidasa, glicolato oxidasa, etc. (Angermüller, 1989), representa una generación continua de  $H_2O_2$ , pero en condiciones fisiológicas normales la catalasa controla la concentración de peróxido de hidrógeno para evitar que alcance niveles tóxicos, lo que podría producir daños oxidativos dentro de los peroxisomas y en el citoplasma circundante.

Respecto a los radicales  $O_2^{\cdot-}$ , muy recientemente se ha demostrado su generación en dos clases de peroxisomas especializados de plantas: glioxisomas y peroxisomas de hojas (Sandalió *et al.*, 1988; del Río, *et al.*, 1989). En estos orgánulos la producción de radicales superóxido tiene lugar en la matriz peroxisomal y en las membranas. En la matriz de peroxisomas el sistema

generador responsable es la xantina oxidasa (XOD) mientras que en la membrana la producción de  $O_2^{\cdot-}$  es probablemente debida al sistema de transporte de electrones dependiente de NADH presente en las membranas peroxisomales (Hicks & Donaldson, 1982; Fang *et al.*, 1987; Luster & Donaldson, 1987; del Río *et al.*, 1992) (Fig. 3).



**Fig. 3.** Lugares de producción de radicales  $O_2^{\cdot-}$  en glioxisomas. En la fracción soluble (matriz) de glioxisomas, la xantina oxidasa (XOD) es responsable de la generación de radicales superóxido, aunque la capacidad de producción de  $O_2^{\cdot-}$  de la urato oxidasa (UO) no pudo ser considerada hasta que la producción de  $O_2^{\cdot-}$  fue detectada *in vitro* en la reacción enzimática de la urato oxidasa por RSE (Sandalio *et al.*, 1988). El sistema de transporte electrónico en membranas glioxisomales consiste en una flavoproteína NADH reductasa que transfiere los electrones al citocromo b<sub>5</sub> (Fang *et al.*, 1987; Luster & Donaldson, 1987). Este citocromo podría usar  $O_2$  como aceptor de un electrón con la producción de  $O_2^{\cdot-}$  (del Río *et al.*, 1992).

La demostración de la presencia de SOD en peroxisomas tuvo lugar por primera vez en 1983 en protoplastos de hojas de guisante, y a partir de entonces

han ido apareciendo nuevos datos de especies vegetales y animales cuyos peroxisomas contienen SOD (Tabla 6). Esta ubicación peroxisomal de la SOD pone de manifiesto la importancia de esta enzima como primera barrera en el mecanismo antioxidante de los peroxisomas por localizarse en aquellos lugares donde tiene lugar la producción del radical libre superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ).

Tabla 6. Superóxido dismutasas localizadas en peroxisomas.

Fuente	Isoenzima	pI	Mr(kD)	Referencia
<b>MICROORGANISMOS</b>				
<i>S.cerevisiae</i> (céls. transformadas)	Cu,Zn-SOD	—	—	Keller <i>et al.</i> (1991)
<b>PLANTAS</b>				
Hojas de guisante	Mn-SOD	5,4	94	del Río <i>et al.</i> (1983), Sandalio <i>et al.</i> (1987), Sandalio & del Río (1988), Sevilla <i>et al.</i> (1980a,b)
Cotiledones de sandía	Cu,Zn-SOD	4,0	33	Sandalio & del Río (1987,1988)
Pétalos de clavel	Mn-SOD	—	82	Bueno & del Río (1992)
	Mn-SOD	4,8	75	Droillard (1990)
	Fe-SOD	5,0	48	Droillard & Paulin (1990)
<b>ANIMALES</b>				
Céls. hepatoma humano	Cu,Zn-SOD	—	—	Keller <i>et al.</i> (1990,1991)
Fibroblastos humanos	Cu,Zn-SOD	—	—	Keller <i>et al.</i> (1991)
Hígado de rata	Cu,Zn-SOD	—	—	Dhaunsi <i>et al.</i> (1992)

La presencia de la xantina oxidoreducta en peroxisomas tiene una importancia considerable desde el punto de vista del metabolismo oxidativo de los peroxisomas. La xantina oxidoreductasa es una flavo-molibdo-sulfoferroproteína y cuenta con varios lugares de transporte de electrones (FAD, molibdeno y grupos sulfoferricos) (Coughlan, 1980; Nichols & Low, 1986) (Fig. 4A). Esta metaloflavoproteína cataliza las dos primeras reacciones del catabolismo de las purinas.

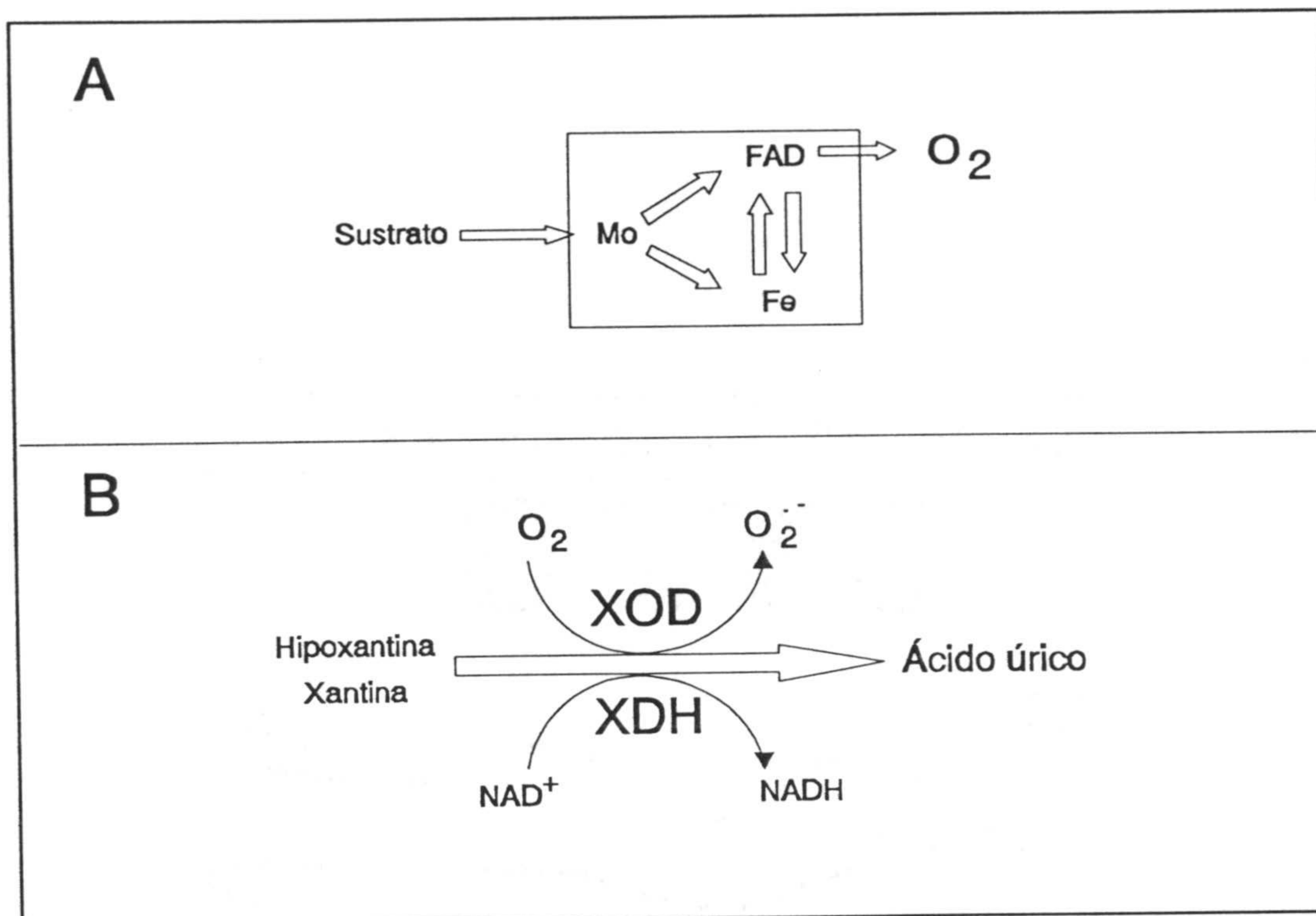


Fig. 4. A, Transporte electrónico en la XOD. B, Reacción catalizada por la xantina oxidoreductasa.

La xantina oxidoreductasa puede presentarse en dos formas moleculares interconvertibles (Bray, 1963; Nguyen, 1986) (Fig. 4B):

- a) La xantina deshidrogenasa (XDH) o forma D, que utiliza el nicotín adenín dinucleótido ( $NAD^+$ ) como aceptor de electrones.
- b) La xantina oxidasa (XOD) o forma O, que utiliza el oxígeno molecular como aceptor electrónico, produciendo radicales libres superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) como consecuencia de la actividad catalítica.

Algunos autores han puesto de manifiesto por resonancia de spin electrónico (RSE) que la XOD no solo produce  $O_2^{\cdot-}$  sino que también es capaz de producir el radical  $\cdot OH$  por reducción del  $H_2O_2$ , sugiriendo que el FAD es

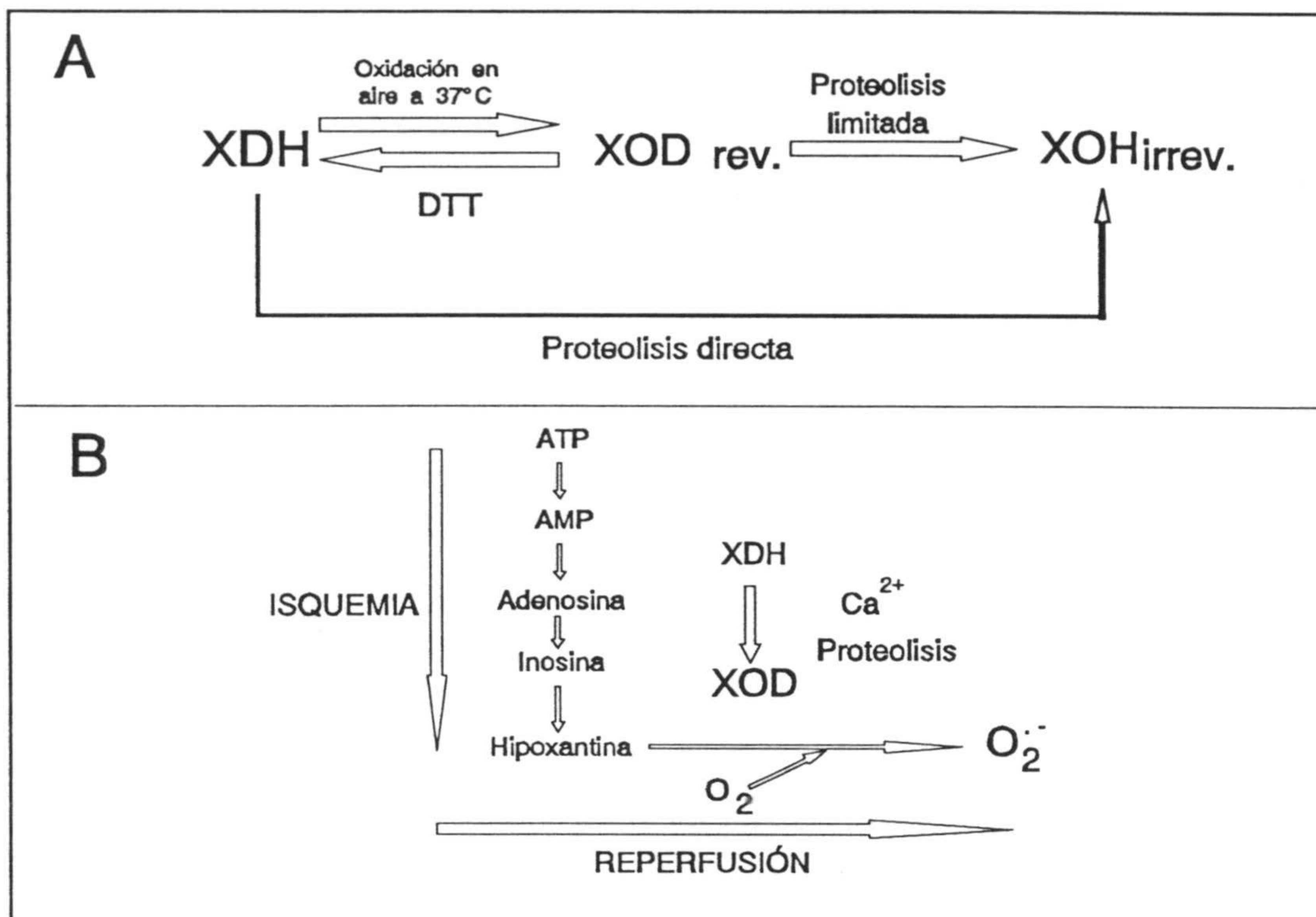
esencial para la reducción de  $O_2$  a  $O_2^{\cdot-}$  y la reducción del  $H_2O_2$  a  $\cdot OH$ , y que el FAD parece ser el lugar de generación del radical  $\cdot OH$  (Kuppusamy & Zweier, 1989). Por el contrario, Britigan *et al.* (1990) han demostrado que el radical hidroxilo no parece ser un producto de la oxidación de la xantina por la XOD sino que aparece en ciertas preparaciones de XOD que llevan asociadas hierro, siendo éste el posible generador de los radicales  $\cdot OH$ , pues preparaciones de XOD con quelantes de hierro o dializadas frente a desferrioxamina disminuyen o eliminan la generación del radical hidroxilo sin alterar la velocidad de producción de superóxido. Así, la detección del radical hidroxilo en XOD con  $H_2O_2$  sugiere que el hierro está presente en su estado reducido ( $Fe^{2+}$ ), posibilitando que el  $\cdot OH$  se genere, vía reacción del  $H_2O_2$  con un complejo del ión férrico, tal como lo han descrito Wallin *et al.* (1975) y Aruoma *et al.* (1989).

La XDH puede ser interconvertida a XOD por varios tratamientos (Della Corte *et al.*, 1969; Nguyen, 1986; McKevey, 1988; Stark *et al.*, 1989; Battelli *et al.*, 1992) (Fig. 5A):

- a) Por proteolisis, lo que origina una XOD irreversible.
- b) Por oxidación de grupos tiólicos, lo que origina una XOD que puede revertir a XDH al tratarla con ditioneitol (DTT).

Massey *et al.* (1989) y Saito *et al.* (1989) demostraron que existen diferencias en el entorno del FAD en la enzima de hígado de rata, con la presencia de carga negativa en la XDH pero no en la XOD, que son similares a las observadas entre la XDH de hígado de pollo y la XOD de leche (Walker *et al.*, 1991), y que ambas formas del enzimas parecen ser interconvertibles a través de la oxidación/reducción de residuos de cisteína.





**Fig. 5.** A, Modelo propuesto para la conversión de la XDH en XOD. B, Secuencia de reacciones desencadenadas durante procesos de isquemia–reperfusión donde se encuentra implicada la xantina oxidorreductasa (McCord, 1985b).

Un aspecto muy importante de la actividad xantina oxidorreductasa en medicina es su implicación en los daños tisulares debidos a procesos postisquémicos propiciados por radicales libres superóxido y  $H_2O_2$  (Granger *et al.*, 1981; McCord, 1985a,b; Groot & Littauer, 1988; Halliwell & Gutteridge, 1989; Linas *et al.*, 1990; Hasan *et al.*, 1992), denominados síndrome de isquemia–reperfusión, que no sólo está ligado a trastornos vasculares sino también al trasplante de órganos. Se explica por una interconversión de la XDH (forma D), que supone el 90% de la actividad xantina oxidorreductasa en el tejido sano, a la XOD (forma O) por proteasas activadas por calcio. Al disminuir el flujo de sangre y disminuir la disponibilidad de  $O_2$  se produce una inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial y una disminución del nivel de ATP (Hems & Brosnan, 1970; Roy

& McCord, 1983; McCord, 1985). Al disminuir la energía de la célula, ésta no es capaz de proporcionar un gradiente de iones a través de su membrana y se produce una salida de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citosol, donde el aumento de su concentración provoca la activación de proteasas capaces de convertir la forma D en la forma O. Concomitantemente, la caída del nivel de ATP origina una elevada concentración de AMP que se cataboliza a adenosina, inosina y a hipoxantina. Por lo tanto, no sólo aparece la XOD sino también su substrato la hipoxantina. Durante la reperfusión se suministra  $\text{O}_2$ , originándose así el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno (McCord, 1985a,b) (Fig. 5B). La patología por radicales libres de oxígeno en los síndromes de isquemia-reperfusión se observa por un aumento de la formación de peróxidos lipídicos y otros productos tóxicos. El uso experimental de enzimas antioxidantes, SOD y catalasa, reduce los efectos citotóxicos de estos radicales libres (Schlafer *et al.*, 1982; Liu *et al.*, 1989; Crystal & Bast, 1991; Kooij *et al.*, 1990). En peroxisomas de riñones de rata se han observado daños estructurales y funcionales por isquemia-reperfusión. Estos daños son reversibles hasta los 60 min de isquemia, en cambio se hacen irreversibles a tiempos mayores, siendo esta observación de gran importancia clínica en trasplantes de riñones y órganos en general, a la vez que pone de manifiesto la importancia de los peroxisomas en la patofisiología de los daños por isquemia-reperfusión (Gulati *et al.*, 1992).

### 3. BIOGÉNESIS DE UREIDOS EN PEROXISOMAS VEGETALES.

El nitrógeno es el nutriente más limitante en el crecimiento de la planta, especialmente en sistemas agrícolas, por ser un constituyente clave de las proteínas, los ácidos nucleicos y otros componentes celulares. Las plantas toman el nitrógeno del suelo en forma inorgánica (nitrato o amonio), pero en ausencia de la fuente adecuada de nitrógeno ciertas especies de plantas, principalmente leguminosas, son capaces de formar asociaciones simbióticas con microorganismos

que fijan el nitrógeno atmosférico (Vance *et al.*, 1988; Vance & Griffith, 1990; Layzell, 1990; Atkins, 1991).

Según la composición de la savia del xilema procedente de las raíces noduladas, las plantas pueden clasificarse en:

a) **Exportadoras de amidas:** asparragina (Asn), glutamina (Gln) o metilenglutamina (MeGln). Como son las leguminosas pertenecientes a las tribus Viciaeae, Genisteae y Trifoliaea, originarias de zonas templadas y que incluyen a especies tan importantes como el guisante, haba, alfalfa, trébol y altramuz (Lea & Miflin, 1980; Schubert, 1986).

b) **Exportadoras de ureidos:** alantoína (Aln), ácido alantóico (Alc) y citrulina. Como son las leguminosas pertenecientes a la tribu Phaseoleae, de origen tropical y que incluye a especies como la soja, judía y caupí (Sprent, 1980; Schubert, 1981; Schubert, 1986; Ireland, 1990).

Los ureidos son unos compuestos menos solubles que las amidas, por lo que Sprent (1980) sugirió que ésta podía ser la razón de por qué niveles altos de ureidos aparecían en leguminosas tropicales donde la disponibilidad de agua era mayor. Además, los ureidos son una forma más eficiente de transporte de nitrógeno en términos de uso del carbono (relación C/N) y de costo energético de su síntesis (relación ATP/N) (Schubert, 1986; Ireland, 1990).

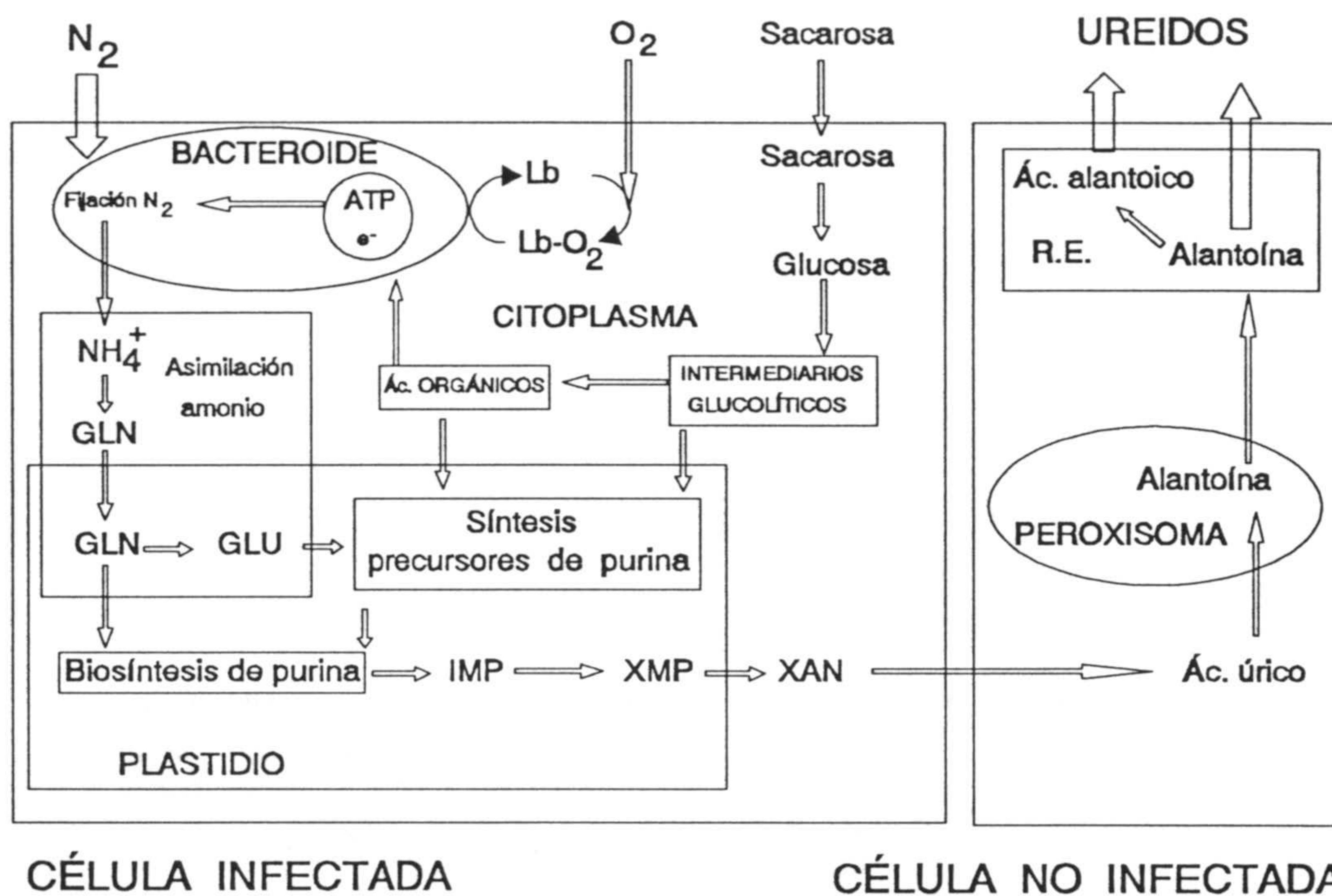
En plantas exportadoras de ureidos está demostrado que entre el 70–95% del nitrógeno orgánico total de la savia del xilema se encuentra en forma de ureidos (Thomas & Scharder, 1980; Reynolds *et al.*, 1982). Pero, los ureidos también aparecen en otras plantas, como el guisante, donde estos compuestos constituyen el 10% del nitrógeno orgánico, a pesar de que estas plantas son

exportadoras de amidas (Pate & Wallace, 1964). Por otra parte, el aumento de nitrógeno inorgánico ( $\text{NO}_3^-$  ó  $\text{NH}_4^+$ ) en el suelo provoca una disminución de la proporción relativa del nitrógeno orgánico en el xilema (Pate & Atkins, 1983). Muchas leguminosas exportadoras de ureidos pueden cambiar la síntesis de ureidos a síntesis de amidas cuando se dan estas circunstancias (Matsumoto *et al.*, 1977; Thomas *et al.*, 1980; Pate *et al.*, 1980).

### 3.1. Biogénesis de ureidos en nódulos de leguminosas.

La biogénesis de ureidos se realiza vía degradación oxidativa de purinas (adenina y guanina), como fue indicado por Mothes en 1961, y que estas purinas son sintetizadas *de novo* (Reynolds *et al.*, 1982; Schubert, 1986; Ireland, 1990). Este proceso en nódulos de leguminosas presenta una compartimentación a nivel celular y subcelular. Parece ser que la asimilación de amonio y la síntesis de purinas se da en las células infectadas mientras que la oxidación de las mismas a ureidos se produce en las células no infectadas (Schubert, 1986), tal como se indica en la Fig. 6. Mediante técnicas citoquímicas e inmunocitoquímicas se ha comprobado que la actividad uricasa está localizada en los peroxisomas de células no infectadas (Hanks *et al.*, 1981; Webb & Newcomb, 1987). Respecto a la XDH y alantoinasa, estas enzimas se hallan en el citoplasma y en el retículo endoplasmático (Shelp *et al.*, 1983; Schubert, 1986).

Una posible explicación de la compartimentación de la biosíntesis de los ureidos puede ser el hecho de que algunas enzimas implicadas en la asimilación del nitrógeno y en la biosíntesis de purinas son lábiles al oxígeno, y en células infectadas encuentran la protección de la leghemoglobina. En cambio, en las células no infectadas donde tiene lugar la oxidación de las purinas, hay enzimas que requieren oxígeno y allí lo pueden obtener por no estar estas células en condiciones anaeróbicas (Schubert, 1986, Atkins, 1991).



**Fig. 6.** Modelo propuesto de la organización celular de las reacciones de asimilación de amonio, síntesis *de novo* de purinas y biogénesis de ureidos en nódulos de plantas que producen ureidos (Schubert, 1986).

### 3.2. Metabolismo de ureidos en hojas.

Ya en los años 60 se describió que las hojas eran capaces sintetizar ureidos bajo ciertas condiciones. Aunque las raíces son consideradas el lugar principal de síntesis de ureidos, cuando hojas de plantas de soja cortadas eran incubadas en la oscuridad se comprobó que sintetizaban ureidos (Mothes, 1961).

En hojas de plantas de soja noduladas se han medido cantidades significativas de ureidos, y la concentración de estos compuestos es mayor en hojas jóvenes no expandidas, disminuye durante la expansión de la hoja y aumenta de nuevo con la madurez (Matsumoto *et al.*, 1977; Thomas *et al.*, 1980; Thomas & Schrader, 1981). Costigan *et al.* (1987) han puesto de manifiesto la presencia de ureidos y

de actividad alantoinasa en el mesófilo y en el mesófilo paravenal de hojas de soja, teniendo este último una posición anatómicamente clave para interceptar y acumular ureidos e hidratos de carbono que son transportados a la hoja (Franceschi & Giaquinta, 1983), de ahí que este mesófilo paravenal pueda ejercer un control sobre el transporte y metabolismo de los ureidos en plantas de soja a nivel de hoja.

Respecto a la localización subcelular de la xantina oxidoreductasa en tejidos de plantas, hasta hace poco tiempo se pensaba que esta enzima no estaba asociada a ningún orgánulo celular (Nguyen, 1986). Sin embargo, en trabajos más recientes realizados por Sandalio *et al.* (1988) se ha puesto de manifiesto la presencia de XOD en glioxisomas de cotiledones de sandía. Igualmente, en trabajos posteriores, se localizó la actividad XOD en peroxisomas de hojas de guisante (del Río *et al.*, 1989) y de XOD y XDH en peroxisomas de hojas de caupí (Corpas *et al.*, 1989). Esto unido al hecho de la presencia de urato oxidasa en estos orgánulos celulares, apunta hacia la posible implicación de los peroxisomas en la degradación de purinas, a nivel de hoja, como posible fuente de ureidos.

#### **4. ESTRÉS SALINO EN PLANTAS Y TOLERANCIA A LA SALINIDAD.**

Las plantas cultivadas en altas concentraciones de sal muestran una serie de síntomas que van desde una reducción en la tasa de crecimiento vegetativo hasta la muerte. Los efectos nocivos sobre la planta derivan de tres factores asociados a la salinidad: elevadas presiones osmóticas externas, presencia de iones en concentraciones tóxicas, y deficiencias nutricionales derivadas de interacciones iónicas (Levitt, 1980; Lerner, 1985; Munns & Termaat, 1986; Hasegawa *et al.*, 1986; Tal & Shalata, 1986; Speer *et al.*, 1989).

Desde el punto de vista de la salinidad, las plantas se clasifican en halófitas y glicófitas según que sean o no capaces de crecer en altas concentraciones de sal. La sensibilidad de las plantas a la salinidad varía con las condiciones ambientales, y con la etapa de desarrollo. Así, por ejemplo la germinación de semillas es mucho más resistente que el crecimiento posterior de la plántula, el tiempo de exposición, etc. (Munns & Termaat, 1986; Cheeseman, 1988). Todo esto hace que el límite de supervivencia se establezca cuando aparece un cese del crecimiento o muerte de los tejidos, en forma de una necrosis, seguido de una pérdida de turgor, caída de las hojas y finalmente muerte de la planta (Levitt, 1980). En la Fig. 7 se representa un esquema de los principales efectos del estrés salino sobre las plantas.



Fig. 7. Posibles daños por estrés salino causados por el sodio (Levitt, 1980).

La disminución del crecimiento se explica por una supresión de la absorción de nutrientes debido a la captación de NaCl en competencia con otros iones. Así, en raíces de cebada se ha observado una disminución del transporte de nitrato y fosfato (Maas *et al.*, 1979; Aslam *et al.*, 1984; Klobus *et al.*, 1988). No obstante, la inhibición del crecimiento por la salinidad también puede deberse a una diferencia de distribución del carbono que llega a la hoja *versus* al que llega a la raíz (Delane *et al.*, 1982; Brugnoli & Björkman, 1992).

#### 4.1. Efectos a nivel de membrana.

En las membranas la salinidad produce una alteración de su estructura y permeabilidad, dependiendo de la composición lipídica de las mismas. Se ha observado que en plantas sensibles la salinidad induce una disminución en el contenido de esteroides en las membranas de las células de la raíz, mientras que en plantas tolerantes provoca un aumento de estas moléculas (Erdei *et al.*, 1980; Prud'Home *et al.*, 1990). Además, determinadas enzimas localizadas en las membranas e implicadas en el transporte iónico de Na<sup>+</sup> y de otros iones se ven afectadas por el estrés salino. La H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plasmática juega un papel importante en el control del pH intracelular y extracelular, captación activa de nutrientes y en el turgor celular (Serrano, 1989). En plantas halófitas, la actividad de la enzima H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática se encuentra incrementada mientras que en glicófitas no se observan cambios (Braun *et al.*, 1986; Hassidim *et al.*, 1986; Roldán *et al.*, 1990). A nivel del patrón de polipéptidos de membranas, en maíz se han observado cambios cuantitativos inducidos por el NaCl, sin que tuviera lugar la aparición de ningún polipéptido nuevo (Belver & Travis, 1990). En el caso del patrón de polipéptidos integrales de membranas de peroxisomas de plantas de guisante, el tratamiento de las plantas con NaCl no producía cambios cualitativos, pero sí un aumento sustancial en el contenido del polipéptido de 32,5 kDa, y, en menor medida, en los polipéptidos de 66, 57, y 54



kDa (Sandalio & del Río, 1991). Por otro lado, en cultivos celulares de caupí se ha detectado un cambio en la proporción de lípidos polares como respuesta a procesos de halo adaptación, consistente en un aumento de la relación hexosa/fósforo de los lípidos de membrana (Vazquez-Duhalt *et al.*, 1991).

#### 4.2. Efectos sobre el metabolismo.

La salinidad también induce alteraciones a nivel metabólico afectando a la fotosíntesis, la respiración, al metabolismo de proteínas y de ácidos nucleicos (Hasegawa *et al.*, 1986). Sin embargo, como ha puesto de manifiesto Levitt (1980), es frecuente que bajas concentraciones de sal estimulen estos procesos mientras que altas concentraciones producen efectos inhibitorios sobre los mismos. En relación a la fotosíntesis, el efecto depende de la especie vegetal y de la concentración de la sal. La disminución de la actividad fotosintética podría deberse a una disminución de la conductancia estomática o del área foliar, o también a un efecto directo del NaCl sobre el aparato fotosintético (Guerrier, 1985; Brugnoli & Lauter, 1991; Brugnoli & Björkman, 1992). Si las halófitas son capaces de acumular niveles altos de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en sus hojas, obviamente debe existir una compartimentación de estos iones dentro de las células de la hoja para prevenir sus efectos inhibitorios sobre el metabolismo (Ball & Anderson, 1986; Speer & Kaiser, 1991). Generalmente, los cloroplastos acumulan Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> cuando los niveles en hojas de estos son bajos, pero en plantas de espinaca tratadas con sal, donde el Na<sup>+</sup> y el Cl<sup>-</sup> se acumulan en hoja, estos iones son excluidos del cloroplasto (Robinson & Downton, 1985).

La tasa de asimilación del CO<sub>2</sub>, en general, resulta disminuida por efecto de la salinidad. Esto se debe, en parte, a la reducción de la conductancia estomática y a la consiguiente restricción de la disponibilidad de CO<sub>2</sub> para la carboxilación (Downton *et al.*, 1985; Brugnoli & Lauteri, 1991; Brugnoli &

Björnkman, 1992). Sin embargo, en plantas halófitas y glicófitas el NaCl también puede tener un efecto directo sobre el aparato fotosintético, independientemente del cierre estomático (Ball & Farquhar, 1984; Seeman & Sharkey, 1986). La inhibición de la capacidad fotosintética ha sido atribuida a una reducción de la eficiencia de la ribulosa-1,5-bifosfo carboxilasa. Se ha observado que concentraciones medias de sal inducen cambios conformacionales en la Rubisco, principalmente en el tamaño y función de la subunidad pequeña que es codificada por el genoma nuclear, y sus ARNm se encuentran y se sintetizan en el citoplasma donde pueden sufrir los efectos tóxicos de los iones (Heuer & Plaut, 1982). La reducción de la capacidad fotosintética por la salinidad también puede ser debida a la sensibilidad del fotosistema II al NaCl, como se ha visto en partículas aisladas del FSII de tilacoides de halófitas y glicófitas (Ball & Anderson, 1986). Una consecuencia de la disminución en la tasa fotosintética es el hecho de que el exceso de energía de excitación no consumida en la fijación del carbono es potencialmente peligroso para el sistema fotosintético, ya que puede producir fotoinhibición, y, por lo tanto, debe ser disipada (Brugnoli & Björnkman, 1992).

En estudios del efecto del NaCl sobre cloroplastos aislados de hojas de dos cultivares de guisante con distinta sensibilidad al NaCl, se observó un incremento en las plantas relativamente tolerantes al NaCl de las actividades Cu,Zn-SOD II y ascorbato peroxidasa, relacionadas con el metabolismo del oxígeno activado (Hernández, 1992). En los cloroplastos de las plantas sensibles tenía lugar un aumento en el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en el nivel de peroxidación lipídica, a la vez que se producía una disminución de la funcionalidad del fotosistema II y de la concentración de clorofila. Estos resultados son indicativos de la posible participación de especies de oxígeno activado en la toxicidad por NaCl a nivel de cloroplastos, e implica a las enzimas Cu,Zn-SOD II y ascorbato peroxidasa en los procesos de tolerancia al NaCl en plantas de guisante (Hernández, 1992).

Otro efecto del estrés salino sobre el metabolismo del carbono es el aumento de intermediarios de la fotorrespiración a expensas de la síntesis de sacarosa (Downton, 1977; Rajmane & Karadge, 1986). Así, se ha observado un aumento de la actividad glicolato oxidasa de hojas de *Vigna* y *Oryza* que junto con la disminución de las actividades SOD y catalasa podría provocar un acúmulo de  $H_2O_2$  y de otras especies de oxígeno activado, lo que podría originar reacciones degradativas en los tejidos de plantas expuestas a estrés salino (Singha & Choudhuri, 1990; Chowdhury & Choudhuri, 1985). Entre las distintas funciones fisiológicas propuestas para la fotorrespiración está la de disipar el exceso de energía luminosa o de poder reductor (Tolbert, 1980), evitando de esta manera los procesos fotooxidativos (Tolbert, 1980; Halliwell, 1982; Halliwell & Gutteridge, 1989). La fotorrespiración parece que podría estar acentuada en condiciones de estrés hídrico y salino (Powles, 1984; Ogren, 1984).

La captación y compartimentación de iones en todos los órganos de la planta requiere energía, principalmente en forma de ATP, generada por la respiración (Veen, 1980). La producción de solutos compatibles no solo depende del aporte de poder reductor y de esqueleto carbonado, sino también de la producción de energía que depende de la eficacia de los procesos de fosforilación (Jolivet *et al.*, 1990). En mitocondrias aisladas de cultivos en suspensión de células de tabaco se observó una disminución de la incorporación de oxígeno, pero la fosforilación se mantenía a niveles más altos en el caso de líneas celulares adaptadas al NaCl (Schwarz *et al.*, 1991). La causa parece estar que en las líneas de células no adaptadas al NaCl presentan un aumento de la permeabilidad a los  $H^+$  de la membrana interna, mientras que las células resistentes mantienen mejor la integridad de su membrana en condiciones de estrés salino.

En estudios realizados con mitocondrias aisladas de hojas de guisante las actividades fumarasa y citocromo c oxidasa disminuían en condiciones de salinidad, afectando posiblemente al ciclo de los ácidos tricarbónicos y al transporte electrónico mitocondrial, lo que podría resultar en una disminución de la energía disponible para el crecimiento en condiciones de salinidad (Hernández, 1992; Hernández *et al.*, 1992). Estos mismos autores también observaron en partículas submitocondriales de hojas de guisante que el tratamiento de la planta con NaCl estimulaba la producción de radicales libres  $O_2^{\cdot-}$ , dependiente de NADH y de succinato, así como la peroxidación lipídica de las membranas. Simultáneamente tenía lugar una disminución de la actividad SOD en plantas sensibles al NaCl, mientras que en las plantas tolerantes aumentaba significativamente la actividad de la Mn-SOD mitocondrial. Esto sugiere que el tratamiento de las plantas con NaCl induce en mitocondrias, una situación de estrés oxidativo propiciado por especies de oxígeno activado, y que la Mn-SOD mitocondrial podría estar implicada en los mecanismos de tolerancia a la salinidad (Hernández *et al.*, 1992).

En estudios realizados comparando las propiedades respiratorias de mitocondrias aisladas de plántulas de cebada sometidas a salinidad con las actividades respiratorias de la planta completa, se observó una disminución en el transporte electrónico por la vía del citocromo c, mientras que la vía alternativa (resistente al cianuro) no cambiaba por efecto del NaCl, e incluso se observó que aumentaba su contribución al flujo total de electrones (Jolivet *et al.*, 1990). Así pues, la vía alternativa mitocondrial podría servir de control respiratorio y actuar desviando los solutos respiratorios hacia la síntesis de intermediarios carbonados que podrían ser precursores de osmóticos.

En plantas la salinidad disminuye la síntesis de proteínas y aumenta su hidrólisis. La disminución de la síntesis de proteínas puede ser debida a alteraciones del metabolismo de los aminoácidos, especialmente en la síntesis de cisteína y metionina, aunque el efecto más corriente es el acúmulo de prolina, tanto en glicófitas como halófitas (Storey & Jones, 1978; Greenway & Munns, 1980; Levitt, 1980). A pesar del hecho de que la síntesis de proteínas es inhibida por el NaCl, en determinados casos prevalece la síntesis de algunos polipéptidos (Hasegawa *et al.*, 1986). Entre estos se encuentran los siguientes: a) La osmotina, que es un polipéptido de 26 kD que se sintetiza y se acumula en las vacuolas de células de tabaco durante su adaptación a medios que contienen NaCl (Singh *et al.*, 1985, 1987) y que puede ejercer un efecto de ajuste osmótico; b) El NP24, que es un polipéptido de 26 kD relacionado inmunológicamente con la osmotina, que se encontró en cultivos celulares de tabaco adaptados a medios con NaCl (King *et al.*, 1986); c) El salT y el rab1, que son polipéptidos de 15 kD (Claes *et al.*, 1990) y 16,5 kD (Mundy & Chua, 1988), respectivamente, acumulados en plantas de arroz en respuesta al estrés salino; d) Los Gs1 y Gs2, que son polipéptidos de 26 kD y de pI de 6,3 y 6,5, respectivamente, los cuales aumentan en raíces de cebada durante el estrés salino (Hurkman *et al.*, 1991). Hay que hacer notar que tanto la osmotina como el salT y el rab1 son también inducidos en situaciones de deficiencia hídrica y de ácido abscísico (ABA). Por otra parte, la fosfoenolpiruvato carboxilasa también aumenta en hojas y tallos de *Mesembryanthemum crystallinum* sometidas a estrés salino (Ostrem *et al.*, 1987). Con la excepción de la fosfoenolpiruvato carboxilasa y, quizás de la osmotina, la función que pueden desempeñar las proteínas que aumentan con el estrés salino todavía no se conoce.

El metabolismo de ácidos nucleicos también resulta alterado por la salinidad. Así, por ejemplo, en *Phaseolus vulgaris* la salinidad reduce la tasa de síntesis de ARNm, y, en plantas de cebada, moderadamente resistentes al NaCl,

el contenido de AMP, ADP, ATP y UDP aumenta más en las hojas que en la raíz (Levitt, 1980). En cambio, en raíces de plantas de maíz se produce un aumento del catabolismo de purinas y una disminución de las pirimidinas como consecuencia de la salinidad (Peterson *et al.*, 1988).

Recientemente, utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* sometida a condiciones de estrés salino se ha aislado e identificado por primera vez un gen, HAL 1, que codifica para una proteína de 32 kD implicada en el aumento intracelular de  $K^+$  que contrarrestaría el efecto del  $Na^+$  (Gaxiola *et al.*, 1991,1992). Además, estos mismos autores han observado que la síntesis de metionina se ve afectada por la sal, y que en ésta se encuentra implicado un gen denominado HAL 2. Así, la levadura podría servir como un sistema modelo para conocer las etapas limitantes del crecimiento en condiciones salinas.

Ante todas estas alteraciones producidas por la salinidad, que hemos mencionado a lo largo de este apartado, más otras inducidas por distintos factores, como la acumulación de productos tóxicos, las modificaciones de diferentes actividades enzimáticas, etc., las plantas pueden adoptar algunos mecanismos de resistencia. En la Fig. 8 se representa un esquema propuesto por Levitt (1980) de posibles estrategias de resistencia de las plantas frente al sodio.



Fig. 8. Posibles mecanismos de resistencia a la sal (Levitt, 1980).

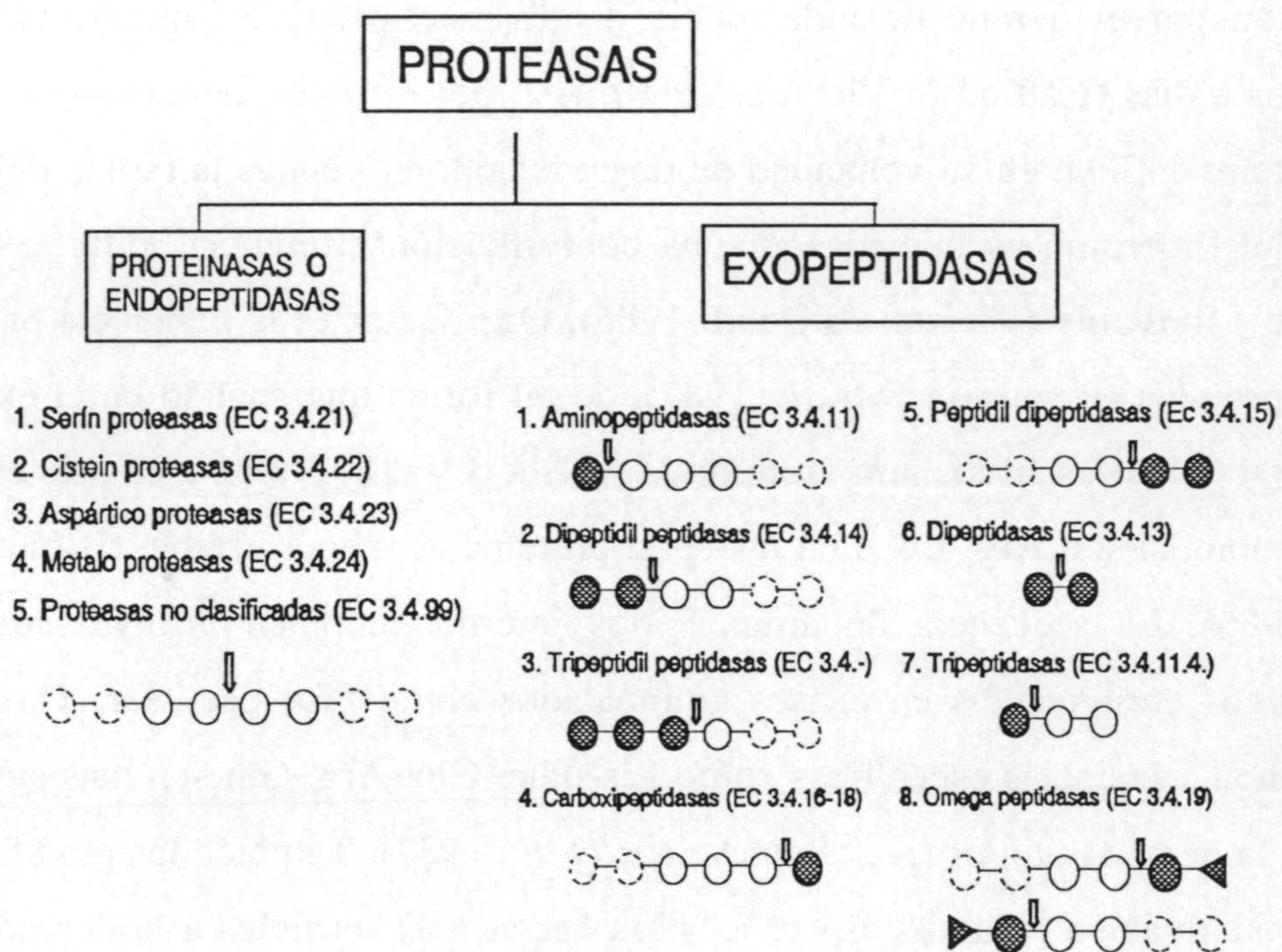
## 5. PROTEASAS EN CÉLULAS VEGETALES.

### 5.1. Aspectos generales.

Las proteasas, en general, son reconocidas como un componente integral en la regulación de las funciones celulares de procariontas y eucariotas (Orlowski, 1990; Huffaker, 1990), estando implicadas en procesos muy diversos tales como la renovación proteica, las modificaciones postraduccionales, la translocación de proteínas a través de membranas, movilización de las reservas proteicas en las semillas, el mecanismo de senescencia y de la maduración de frutos, etc. (Hatfield & Vierstra, 1990; Bewley & Greenwood, 1990).

Las proteínas son normalmente hidrolizadas a aminoácidos por una cooperación secuencial de enzimas (Davies, 1982; Matile, 1982; Storey, 1986;

Barret, 1986). Las grandes cadenas polipeptídicas son cortadas por endopeptidasas, que hidrolizan enlaces peptídicos en el interior de las cadenas con grados de especificidad variables. Luego, las exopeptidasas liberan residuos de aminoácidos o unidades dipeptídicas de ambos extremos de la cadena polipeptídica. Las enzimas que actúan en el extremo aminoterminal se denominan aminopeptidasas o dipeptidil aminopeptidasas, mientras que las que actúan en el extremo carboxiterminal se denominan carboxipeptidasas y dipeptidilcarboxipeptidasas. Finalmente, los dipéptidos son hidrolizados por dipeptidasas. En la Fig. 9 se presenta una clasificación genérica de enzimas proteolíticas (Barret, 1986).



**Fig. 9.** Clasificación de enzimas proteolíticas. Se dividen en endopeptidasas y exopeptidasas. Las endopeptidasas son clasificadas en base a su mecanismo catalítico y tienden a reflejar sus relaciones evolutivas, mientras que las exopeptidasas son clasificadas por su especificidad de sustrato (Barret, 1986).



El lugar principal donde se encuentran las proteasas son los lisosomas, en células animales, y las vacuolas en células vegetales (Matile, 1982; Vierstra, 1989) pero también han sido detectadas en otros compartimientos que incluyen mitocondrias, cloroplastos, retículo endoplasmático y citosol (Dahlhelm *et al.*, 1982; Pontremoli & Melloni, 1986; Vierstra, 1989; Huffaker, 1990; Whelan *et al.*, 1990; Müller, 1992). De ahí, que una distinta compartimentación celular de las proteínas y las proteasas pueda ser crucial para la regulación de los procesos proteolíticos (Canut *et al.*, 1987; van der Valk & van Loon, 1988).

Existen unos mecanismos selectivos de degradación de proteínas, que se observan por el tiempo de vida media de diversas proteínas, que varía desde minutos a días (Hatfield & Vierstra, 1990). Así, por ejemplo, la conformación de la proteína influye en su velocidad de degradación, en plantas la rápida degradación del fitocromo es iniciada por una conformación diferencial entre la forma estable e inestable (Vierstra & Quail, 1986). Otro factor es la secuencia primaria de la proteína (Rechsteiner *et al.*, 1987), de tal forma que cuando en el extremo amino terminal están los aminoácidos Met, Ala o Val la proteína es más estable. En cambio, si son Arg, Lis, Leu o Asp la proteína es menos estable (Bachmair *et al.*, 1986). La secuencia de aminoácidos internos también influye, dominios peptídicos enriquecidos en ciertos aminoácidos como Pro, Glu, Ser, Thr o que contienen secuencias específicas como Lis-Phe-Glu-Arg-Gln son más susceptibles a la degradación *in vivo* (Rechsteiner *et al.*, 1987). También las modificaciones oxidativas en residuos específicos las hacen más sensibles a la degradación. Por ejemplo, el aumento de la presión parcial de O<sub>2</sub> aumenta la proteólisis en cloroplastos aislados de avena, por estímulo de la actividad de endopeptidasas localizadas en las membranas tilacoidales (Casano *et al.*, 1990). Además, se ha observado que los radicales libres de oxígeno pueden intervenir en este proceso (Casano & Trippi, 1992). En general, las proteínas grandes tienen una vida media

más corta que las proteínas pequeñas. Según Davies (1982) las proteínas grandes son menos estables porque tienen más lugares sensibles a ataques proteolíticos o a daños oxidativos.

Recientemente, utilizando como modelo células de eritrocitos y reticulocitos se ha estudiado la degradación de proteínas relacionadas con estrés oxidativo, encontrando enzimas proteolíticos o sistemas proteolíticos capaces de degradar proteínas modificadas oxidativamente (Pacifci *et al.*, 1989). Así, se encontró un complejo de aproximadamente de 700 KDa responsable de la degradación selectiva de proteínas como albúmina, hemoglobina y Cu,Zn SOD de células sanguíneas modificadas por  $\cdot\text{OH}$  o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Salo *et al.*, 1988). Esto sería un mecanismo para prevenir la acumulación de proteínas modificadas no funcionales y potencialmente citotóxicas, y de fragmentos de proteínas.

En células de mamíferos se ha encontrado una vía específica que afecta a un polipéptido de 76 aminoácidos estable al calor, la **ubiquitina** (Hershko & Ciechanover, 1982; Ciechanover *et al.*, 1984). Ésta ha sido detectada en todas las células eucariotas hasta ahora examinadas, incluidas las plantas (Vierstra *et al.*, 1985; Veierskov & Ferguson, 1991; Veierskov *et al.*, 1992). Su secuencia de aminoácidos presenta un alto grado de conservación evolutiva que es idéntica en organismos tan diversos como humanos, peces e insectos (Schlesinger & Goldstein, 1975; Gavilanes *et al.*, 1982). La ubiquitina fue aislada por primera vez por Goldstein *et al.* en 1975 y más tarde, independientemente por Ciechanover *et al.* (1980) como un factor para la proteólisis dependiente de ATP en reticulocitos. En esta vía proteolítica, la ubiquitina es conjugada covalentemente a la proteína destinada a la degradación y luego es reciclada de forma libre. La unión es orquestada por un sistema multienzimático que requiere ATP y que se representa en la Fig. 10 (Hershko, 1991). La glicina, carboxilo terminal de la ubiquitina, se

une covalentemente a los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina de aquellas proteínas que han de ser degradadas. El ATP aporta la energía necesaria para la formación de estos enlaces isopeptídicos. En la conjugación de la ubiquitina a la proteína intervienen tres enzimas ( $E_1$ ,  $E_2$  y  $E_3$ ). En primer lugar, el grupo carboxilo terminal de la ubiquitina se une a un grupo sulfhidrilo de  $E_1$  por medio de un enlace tioéster, posteriormente la ubiquitina activada se transfiere al grupo sulfhidrilo de  $E_2$ . Por último, el enzima  $E_3$  cataliza la transferencia de la ubiquitina desde  $E_2$  a la proteína diana. Después de la conjugación de la ubiquitina con la proteína, ésta puede ser degradada por proteasas que requieren ATP, con liberación de la ubiquitina, o bien se regenera la proteína intacta por una isopeptidasa.

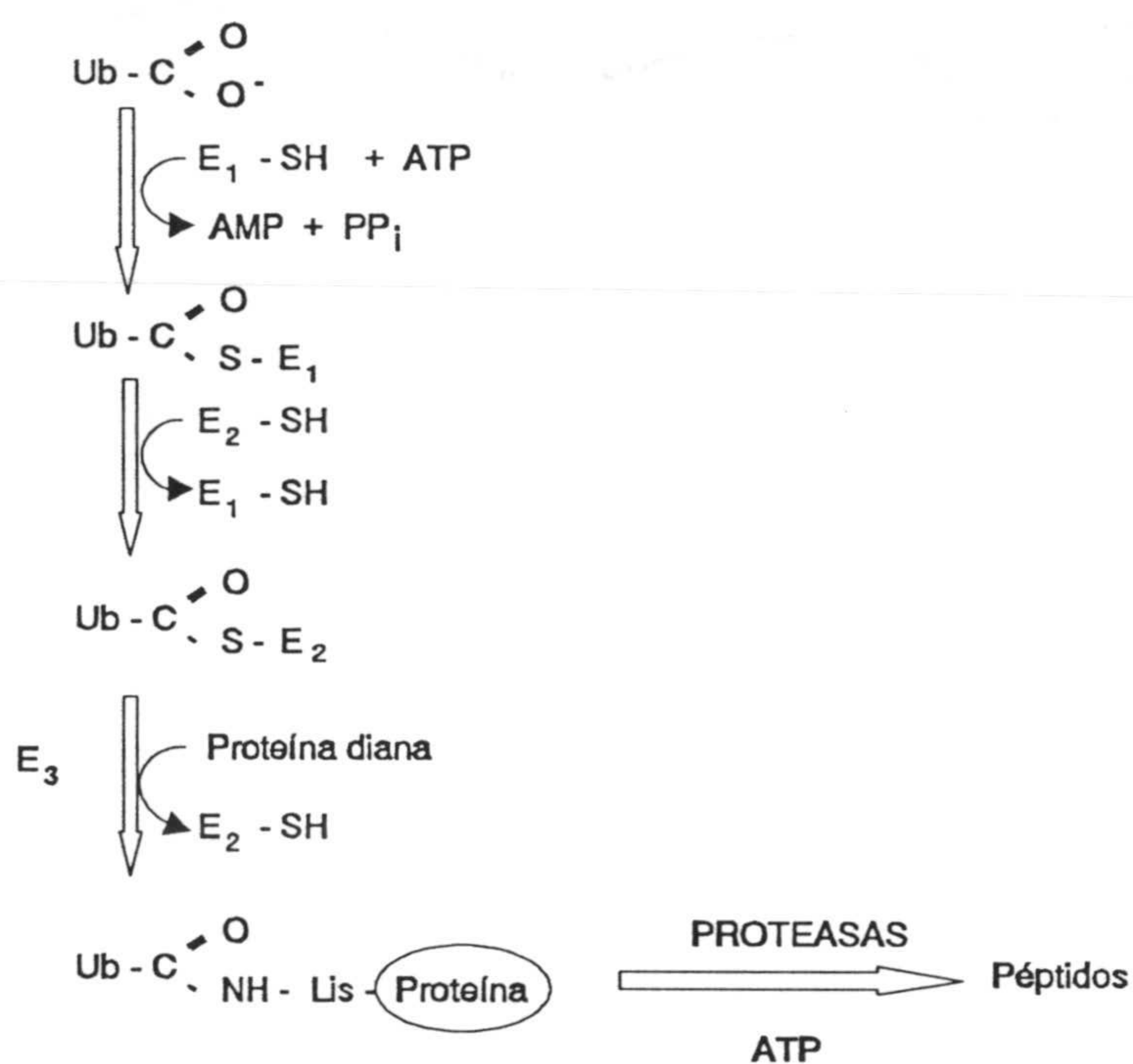


Fig. 10. Secuencia de reacciones implicadas en la proteólisis mediada por la ubiquitina.

## 5.2. Enzimas proteolíticas en la movilización de proteínas de reserva de las semillas.

Las proteínas de reserva proporcionan nitrógeno, azufre y esqueleto carbonado para el desarrollo del embrión durante la germinación (Bewley & Greenwood, 1990). La degradación de estas proteínas parece seguir un patrón común en muchas especies de plantas (Shutov & Vaintraub, 1987). La hidrólisis de las proteínas es iniciada por la acción de una cisteín proteasa (Boylan & Sussex, 1987; Yamaoka *et al.*, 1990) que corta uniones peptídicas sin causar grandes modificaciones. La primera cisteín proteasa que actúa, designada proteinasa A, es sintetizada *de novo*. Esta hidrólisis genera lugares para la acción de la proteinasa B, otro tipo de cisteín proteasa, la cual es inactiva frente a los substratos nativos. Los extremos carboxilo expuestos por la acción concertada de las proteinasas A y B son atacados por carboxipeptidasas, que son normalmente serín proteasas. Finalmente, los tripéptidos y dipéptidos son degradados a aminoácidos por la acción de aminopeptidasas (Elleman, 1974; Muntz *et al.*, 1985; Barros & Larkins, 1990).

## 5.3. Enzimas proteolíticas en la senescencia.

Una característica de la senescencia es la pérdida de proteínas, lo que permite la remobilización de las reservas de nitrógeno desde las hojas, u otras áreas de la planta, a las partes reproductivas (semillas y frutos) (Huffaker, 1990). Esto no tiene porque ir acompañado necesariamente por un aumento en la actividad proteolítica total (Davies, 1982), y esto sugiere que la senescencia no se dispara por la síntesis de nuevas proteasas, sino que antes de que la senescencia se inicie, las proteasas intracelulares están inactivadas o inhibidas, o sus substratos son inaccesibles. Las hormonas vegetales, especialmente las citoquininas y el ácido abscísico, influyen en la tasa de degradación de las proteínas durante la senescencia (Huffaker, 1990; Carrasco & Carbonell, 1990).

La vacuola posee gran número de proteasas y juega un papel importante en la degradación de proteínas citoplasmáticas cuando éstas pasan a su interior (Canut *et al.*, 1986), pero la evidencia de la existencia de proteasas en cloroplastos (Waters *et al.*, 1982; Martinoia *et al.*, 1983), tanto endopeptidasas y aminopeptidasas en estroma (Liu & Jagendorf, 1986; Thayer *et al.*, 1988) como en tilacoides (Musgrove *et al.*, 1989) restó algo de importancia a la vacuola. Durante la senescencia, las proteínas cloroplastídicas son de las primeras en ser degradadas, y los constituyente cloroplastídicos desaparecen más rápidamente que el propio orgánulo como tal (Mae *et al.*, 1984). Cloroplastos aislados de cebada y soja son capaces de degradar a la ribulosa bifosfato carboxilasa (Rubisco) (Ragster & Chrispeels, 1981; Dalling *et al.*, 1983), y se ha localizado una actividad proteolítica dependiente de ATP en tilacoides de cloroplastos de guisante (Liu & Jagendorf, 1984) y una endopeptidasa y tres aminopeptidasas en el estroma de cloroplastos de la misma planta (Liu & Jagendorf, 1986). Igualmente, en cloroplastos de hojas de cebada se ha demostrado la presencia de actividad endopeptidasa frente a Rubisco en la fracción estromática (Tang *et al.*, 1983; Tang & Huffaker, 1984).

#### **5.4. Enzimas proteolíticas en las modificaciones postraduccionales.**

Numerosas proteínas citoplasmáticas de procariotas y eucariotas deben atravesar las membranas de los distintos compartimientos celulares para llegar a su lugar de destino. En general, está aceptado que estas proteínas son diferenciadas del resto de las proteínas por una secuencia señal. La secuencia señal posee la información necesaria para guiar a una proteína e iniciar su transporte a través de la membrana (translocación) (Müller, 1992). Las secuencia señal se encuentran generalmente en el extremo amino terminal y en la mayoría de los casos, suelen ser eliminadas durante o después de los procesos de translocación (Varshvsky, 1991; Müller, 1992).

La importancia fisiológica de la proteólisis limitada fue reconocida en el estudio de la activación de zimógenos de proteasas pancreáticas como la tripsina y la quimotripsina. Actualmente se han observado secuencias señal en el transporte a través de membranas en bacterias (Saier *et al.*, 1989; Biecker & Silhavy, 1990), en retículo endoplasmático (Rapoport, 1990), en mitocondrias (Hartl & Neupert, 1990; Pfanner & Neupert, 1990), en cloroplastos (Keegstra, 1989; Smeekens *et al.*, 1990), y en peroxisomas (Gould *et al.*, 1989; Keller *et al.*, 1991).

En mitocondrias, la mayoría de los constituyentes proteicos se sintetizan en el citoplasma y luego son importados al orgánulo. El proceso es dirigido por secuencias señal hidrofóbicas específicas, que son procesadas por proteasas localizadas en la matriz. En *Neurospora crassa*, la enzima consta de dos subunidades, depende de metales divalentes ( $Zn^{2+}$  y  $Co^{2+}$ ) y es inhibida por quelantes de metales (1,10-fenantrolina, EDTA) (Hawlitshchek *et al.*, 1988). Algo similar ocurre en mitocondrias de levadura (Pollock *et al.*, 1988) e hígado de rata (Kleiber *et al.*, 1990). En cloroplastos de guisante se han encontrado proteasas que procesan péptidos señal asociadas al estroma (Robinson & Ellis, 1984) y a la membrana tilacoidal (Kirwin *et al.*, 1987).

Las proteínas peroxisomales son sintetizadas en polisomas libres e importadas postraduccionalmente en el orgánulo y, aparentemente, los polipéptidos precursores de estas proteínas son, en general, sintetizadas en su tamaño maduro sin que esté implicado ningún proceso proteolítico previo a su incorporación (Lazarow & Fujiki, 1985; Scandalios, 1990; Thieringer *et al.*, 1991). La importación de las proteínas peroxisomales depende de una secuencia conservada de aminoácidos, y una clase importante de secuencia señal consiste en un tripéptido conservado (Ser-Arg-Leu), generalmente situado en el extremo COOH-terminal de varias proteínas peroxisomales (Gould *et al.*, 1989).



P A R C H E M I N

G A L G O



**OBJETO Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO**





La bioquímica del oxígeno activado en peroxisomas vegetales constituye una de las líneas de investigación de la Unidad de Bioquímica Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín de Granada. Dentro de esta línea, en nuestro laboratorio se viene trabajando desde hace algún tiempo en nuevas funciones celulares de los peroxisomas relacionadas con radicales libres de oxígeno, particularmente en lo que concierne a la posible implicación de estos orgánulos celulares en determinadas situaciones de estrés.

En el contexto de la agricultura actual, los daños producidos por el estrés salino en plantas tienen una gran importancia si se considera que aproximadamente la tercera parte del área mundial irrigada está afectada de alguna forma por un exceso de salinidad (Staple & Toenniessen, 1984). Es un hecho establecido que el estrés salino en plantas puede inducir alteraciones en el metabolismo de las proteínas y de los ácidos nucleicos, y que también puede afectar a importantes procesos como la fotosíntesis y la respiración mitocondrial.

Los estudios de estrés salino en plantas se han llevado a cabo fundamentalmente a nivel citológico, de osmorregulación, de permeabilidad de membrana, y de genética de la resistencia al estrés. Sin embargo, existen pocos datos acerca de los efectos del estrés salino sobre la funcionalidad metabólica en compartimientos celulares, y la información es particularmente escasa por lo que se refiere a sistemas enzimáticos relacionados con formas de oxígeno activado. Hay muy poca información sobre cambios inducidos por NaCl en el metabolismo de los peroxisomas, y, concretamente, sobre la posible función que las especies de oxígeno activado pudieran desempeñar en el mecanismo del daño producido por el estrés salino. En plantas, al igual que en microorganismos y animales, se ha

demostrado que distintas situaciones de estrés pueden inducir la producción de especies de oxígeno activado las cuales pueden producir importantes daños en el metabolismo celular y en la funcionalidad de las membranas.

En estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, se ha demostrado la presencia de actividad superóxido dismutasa en peroxisomas vegetales, así como la generación de radicales libres superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en estos orgánulos celulares. Igualmente, se ha demostrado la ubicación en peroxisomas vegetales de la xantina oxidasa, generadora de  $O_2^{\cdot-}$ , junto con la urato oxidasa, lo que sugirió una función para los peroxisomas de hojas en el metabolismo de los ureidos, en general, y de la alantoína -producto de la oxidación del ácido úrico- en particular. Los ureidos constituyen en ciertas especies de plantas leguminosas los principales compuestos para el transporte y almacenamiento del nitrógeno fijado en las plantas noduladas, y suministran la mayor parte del nitrógeno utilizado en la síntesis de aminoácidos y proteínas durante el crecimiento de la planta, aunque no se conoce muy bien su localización celular. El hecho de que algunos ureidos pudieran ser sintetizados en peroxisomas de hojas es interesante desde el punto de vista del metabolismo de estos compuestos de bajo peso molecular, ricos en nitrógeno, y suscita interesantes cuestiones en torno a la vinculación de los peroxisomas con el metabolismo de los ureidos en la hoja y con algunas formas de oxígeno activado ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ).

En esta Tesis Doctoral se investiga el efecto del estrés por cloruro sódico sobre el metabolismo del oxígeno activado y de los ureidos en peroxisomas de hojas de *Pisum sativum* L., tratando de esclarecer algunos de los mecanismos bioquímicos potencialmente responsables de la tolerancia relativa a la salinidad en esta especie leguminosa. Este trabajo se aborda principalmente desde un punto de vista comparativo, empleando plantas con diferente sensibilidad al NaCl y

estudiando el efecto de la salinidad sobre la actividad de distintas enzimas peroxisomales del metabolismo del oxígeno activado y de los ureidos, así como sobre la ultraestructura celular de la hoja, examinando en particular la producción de especies de oxígeno activado que pudieran dar lugar a situaciones de estrés oxidativo. Finalmente, se estudia la posible existencia de actividad proteolítica en peroxisomas, con el fin de conocer si las proteasas peroxisomales pudieran participar en la interconversión en estos orgánulos celulares de la actividad xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa.



## MATERIAL Y MÉTODOS

P A R O H E M I N A

G A T E G O





## 1. MATERIAL VEGETAL.

Se han utilizado hojas de plantas de soja (*Glycine max* [L.] Merr., cv Williams), de caupí (*Vigna unguiculata* [L.] Walp), judía (*Phaseolus vulgaris* L., cv Contender) y de guisante (*Pisum sativum* L.). Se ensayaron los siguientes cultivares de guisante de la casa Ramiro Arnedo S.A. (La Rioja): Almota, Challis, Frescoroy, Granada y Lincoln.

## 2. CONDICIONES DE CULTIVO.

Las semillas se desinfectaron superficialmente con etanol 70% (tres minutos), se lavaron abundantemente con agua y se imbibieron 1 h con  $\text{CaSO}_4$  0,5 mM, se germinaron en vermiculitas a 22°C y en oscuridad durante 72 h. Después, las plántulas se hicieron crecer en una cámara de cultivo (Convicon PGW-36) a una temperatura de 28/18°C, una humedad relativa de un 75-85 %, y un fotoperiodo de 16 h. La luz, con un PAR de  $390 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ , fue obtenida con tubos fluorescentes Sylvania F96T12VHO/CW y con lámparas Arlite Philips de 40 W. Las plantas eran regadas con agua destilada periódicamente y las hojas se recolectaron a los 15-20 días. Sin embargo en el caso del guisante se siguió una metódica distinta. A los tres días de germinación se seleccionaron las plántulas más vigorosas y se cultivaron en una cámara botánica en soluciones nutritivas que contenían distintas concentraciones de NaCl (Merck) con el objeto de estudiar la susceptibilidad de distintos cultivares a esta sal. Inicialmente, las plantas fueron cultivadas en soluciones nutritivas con aireación forzada (del Río *et al.*, 1985) en las condiciones indicadas anteriormente durante 7 días. Seguidamente, las plantas se trasplantaron a medios hidropónicos similares pero conteniendo diferentes concentraciones de NaCl, entre 30-300 mM, donde se mantuvieron durante 14 días realizando un cambio de las soluciones nutritivas a los siete días, pero manteniendo las concentraciones de NaCl. Los recipientes contenían cada uno



cuatro plantas y 2,5 litros de solución nutritiva, y cada tratamiento (nivel de NaCl y tipo de cultivar) fue repetido cuatro veces. Transcurridos los 14 días, se recolectaron las plantas y se determinaron los parámetros siguientes: peso fresco y seco de las hojas, peso fresco de los tallos, área foliar (en cm<sup>2</sup>), peso seco y peso fresco de las raíces. El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo por el test de Duncan. Las hojas de estas plantas se utilizaron para los estudios posteriores.

### **3. CULTIVO *IN VITRO* DE CÉLULAS DE HOJAS DE GUISANTE.**

Paralelamente a los estudios con hojas de distintas plantas, se puso a punto la técnica de cultivo de callos y suspensiones celulares a partir de explantos de hojas de guisante, con el fin de utilizar posteriormente los cultivos celulares en las experiencias de salinidad.

#### **3.1. Inicio de callos de hojas de guisante.**

Los explantos de hojas se obtuvieron a partir de plántulas de 14 días, germinados *in vitro* o en vermiculita. La germinación de semillas *in vitro* requirió un proceso de desinfección superficial más riguroso, que consistió primeramente en un lavado de las semillas con agua para eliminar el fungicida, seguido de otro lavado de dos minutos en etanol al 70% (v/v). Después, se lavaron las semillas diez minutos con hipoclorito sódico al 0,5%, y tres veces con agua destilada, y se dejaron hasta que estuvieron turgentes. A continuación, en la cámara de flujo laminar se eliminaron las cubiertas, y se formaron grupos de semillas (aproximadamente cinco) que se esterilizaron de nuevo con hipoclorito sódico al 0,5% durante 10 minutos, lavándose después tres veces con agua estéril.

Las semillas se pasaron a un medio de germinación MMO (medio mínimo de compuestos orgánicos), cuya composición se refleja en la Tabla 7, y se

cultivaron en oscuridad a 25°C. Cuando aparecieron los primordios foliares y radicales las semillas se pasaron a la luz. El inicio del callo se realizó a partir de hojas de plántulas obtenidas *in vitro* y en invernadero. Una vez esterilizada superficialmente la hoja, se dividió en zona apical y basal, y cada una de estas partes se puso en tubos de 25 x 150 mm conteniendo 25 ml de los medios de cultivo M-1 y M-2 de Gantotti y Kartha (1986), y M-3 y M-4 de Jacobsen y Kysely (1984) (Fig. 11), cuya composición se indica en la Tabla 7. Las condiciones de cultivo eran luz con fotoperiodo de 16 horas (1500 Lux) u oscuridad continua, con una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y una humedad relativa de 80–90%.

El subcultivo se realizó a partir de 0,5 g de callo de la zona más superficial, que se pasó a tubos con medio nuevo, y con una frecuencia de 4 semanas.

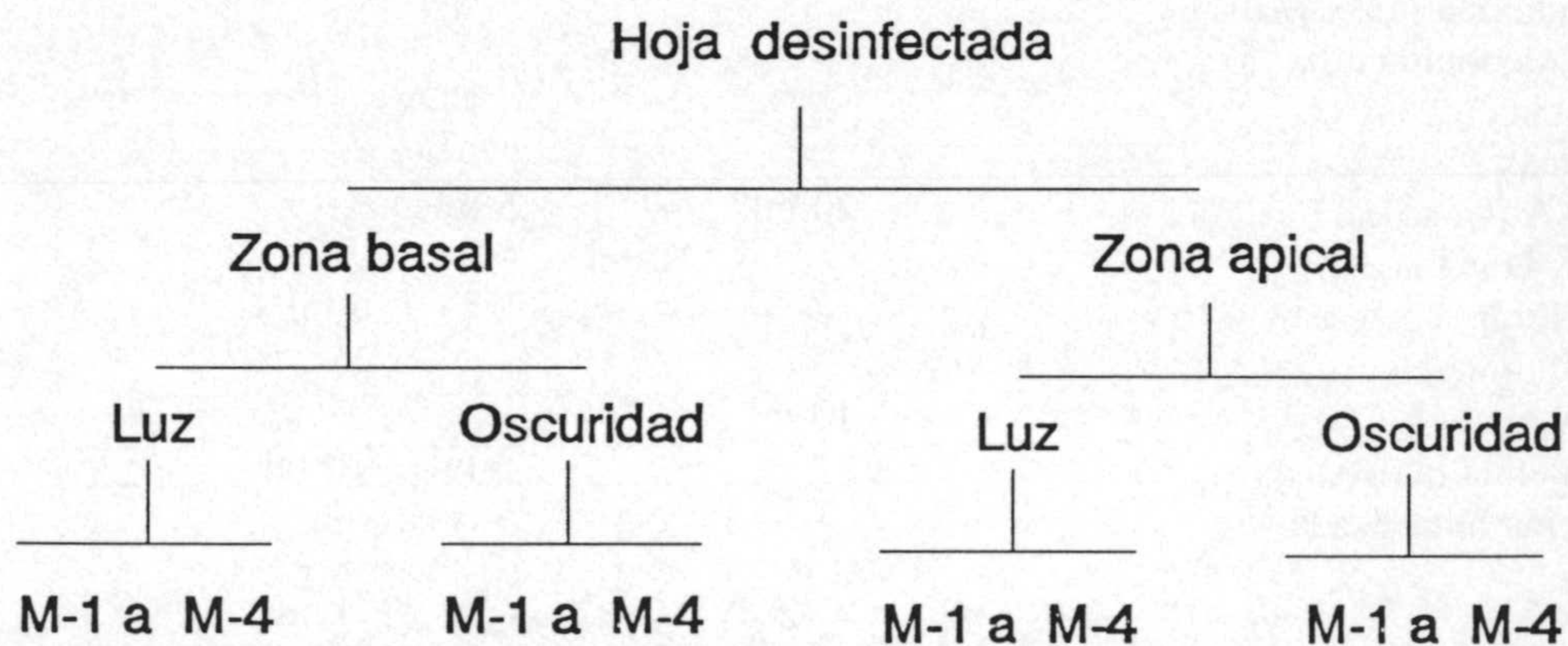


Fig. 11. Inicio de callos a partir de explantos de hojas de *Pisum sativum* L. cv Granada.

Tabla 7. Composición de los medios de cultivo para 1 litro

Componentes	MMO	M-1	M-2	M-3	M-4
<b>SALES INORGÁNICAS:</b>					
Stock $\text{NH}_4\text{NO}_3$ (165 g/l)	10 ml	10 ml	-	10 ml	10 ml
" $\text{KNO}_3$ (190 g/l)	10 "	10 "	13,2 ml	10 "	10 "
" $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (44 g/l)	10 "	10 "	3,4 "	10 "	10 "
" $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (37 g/l)	10 "	10 "	6,8 "	10 "	10 "
" $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (17 g/l)	10 "	10 "	-	10 "	10 "
" NaFe EDTA:	10 "	10 "	10 "	10 "	10 "
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,79 g/l)					
$\text{Na}_2\text{EDTA}$ (3,72 " )					
Stock Micronutrientes:	10 "	10 "	10 "	10 "	10 "
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,690 g/l)					
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,860 g/l)					
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2,5 mg/l)					
KI (83 mg/l)					
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2,5 mg/l)					
$\text{H}_3\text{BO}_3$ (0,620 g/l)					
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (25 mg/l)					
Stock $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (17 g/l)	-	-	8,8 "	-	-
Stock $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (13,4 g/l)	-	-	10 "	-	-
<b>COMPUESTOS ORGÁNICOS:</b>					
Sacarosa	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g
Stock vitaminas:	10 ml	10 ml	10 ml <sup>1</sup>	10 ml	10 ml
Tiamina (0,1 mg/ml)					
Piridoxina (0,05 mg/ml)					
Ác.nicotínico (0,05 " )					
Glicina (0,2 mg/ml)					
Auxinas					
NAA (0,1 mg/ml)	-	20 ml	-	5 ml	-
2,4-D (0,1 mg/ml)	-	-	10 ml	-	-
Piclorán (0,1 mg/ml)	-	-	-	-	6 ml
Citoquininas					
BA (0,1 mg/ml)	-	10 ml	-	-	-
Kinetina (0,1 mg/ml)	-	-	-	5 ml	10 ml
Caseína hidrolizada	-	-	2 g	-	-
Agar	-	8 g	8 g	8 g	8 g
pH	5,74	5,74	5,74	5,74	5,74

<sup>1</sup>En este caso la composición de las vitaminas B-5 en los 10 ml era la siguiente: tiamina (1 mg/ml), piridoxina (0,1 mg/ml) y ácido nicotínico (0,1 mg/ml).

### 3.2. Inicio de suspensiones celulares.

Se realizó a partir de 1 g de callo de los medios M-2 y M-4, que contenían todos los componentes excepto el agar. Se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 50 ml, con 15 ml de medio y una agitación entre 100–150 rpm, bajo las mismas condiciones que los callos.

## 4. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ORGÁNULOS CELULARES.

### 4.1. Guisante.

Se realizó a partir de hojas de guisante (*Pisum sativum* L.) de los cultivares seleccionados y todas las operaciones se llevaron a cabo entre 0–4°C. Los orgánulos se purificaron por centrifugación diferencial seguida de centrifugación en un gradiente de densidad de Percoll (15–53%; v/v) según el método descrito por Sandalio *et al* (1987) (Fig. 12).

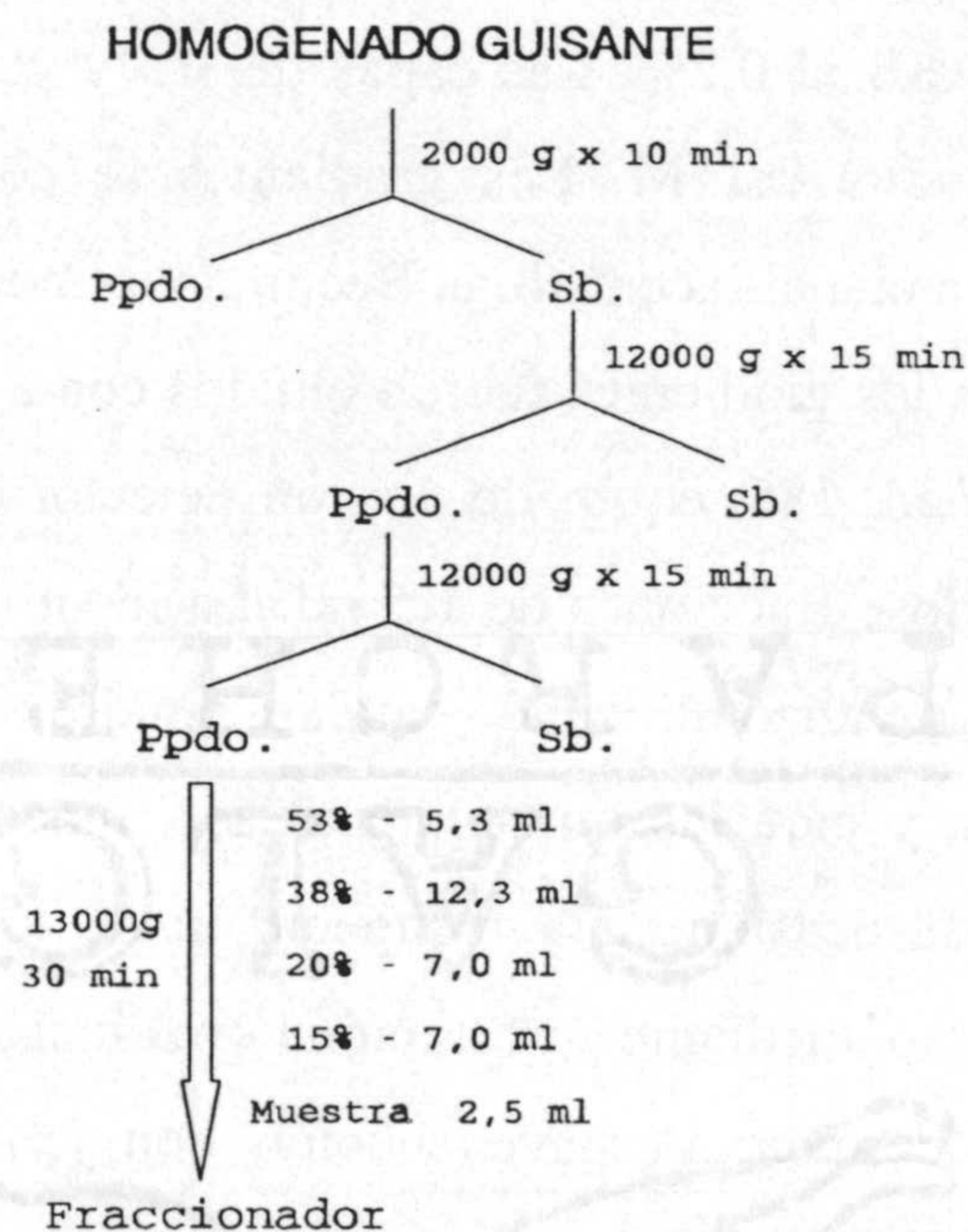


Fig. 12. Proceso de purificación de peroxisomas y mitocondrias de guisante.

Se partió de 50 g de hojas lavadas con agua destilada que se homogeneizaron en 200 ml de un medio que conteniendo tampón Mops 30 mM (pH 7,5), manitol 0,35 M, cisteína 4 mM, EDTA 1 mM y ASB al 0,2% (p/v). El proceso se realizó con un homogenizador Sorvall Omnimixer dando dos o tres golpes de dos segundos cada uno a velocidad alta. El homogenado se filtró a través de dos capas de entretela y se centrifugó a 2.000 g durante 10 minutos para eliminar los cloroplastos. El sobrenadante se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos y el precipitado, enriquecido en peroxisomas y mitocondrias, se suspendió suavemente, con ayuda de un pincel fino, en 30 ml de un medio que contenía tampón Mops 20 mM (pH 7,2), manitol 0,3 M, EDTA 1 mM y ASB al 0,2% (medio de lavado) y se volvió a centrifugar a 12.000 g durante 15 minutos. El precipitado se resuspendió con sumo cuidado en unos 3 ml de medio de lavado y de éstos se depositaron 2,5 ml en un gradiente de Percoll con la siguiente composición: 5,3 ml del 53%, 12,3 ml del 38%, 7,0 ml del 20% y 7,0 ml del 15% de Percoll (v/v). Las soluciones de Percoll se prepararon en tampón Mops 10 mM (pH 7,2), sacarosa 0,25 M y ASB al 0,2%. Las capas del 15 y 20% de Percoll contenían además, 1,2-propanodiol 0,1 M. Los gradientes se centrifugaron a 13.000 g durante 30 minutos en una ultracentrífuga Beckman usando un rotor 60Ti. Después de la centrifugación los gradientes fueron eluidos con ayuda de un fraccionador de gradientes Isco mod. 185, equipado con un detector de UV y un colector de fracciones, recogiendo fracciones de 1,5 ml. La identificación de los peroxisomas en el gradiente se realizó utilizando catalasa e hidroxipiruvato reductasa como enzimas marcadoras, y para las mitocondrias se empleó citocromo c oxidasa y fumarasa. En algunas ocasiones, la recuperación de los peroxisomas y de las mitocondrias se efectuó, mediante perforación horizontal de los tubos de centrifuga con una aguja hipodérmica y suave succión con jeringa, en el caso de los peroxisomas, y por la parte superior del gradiente, en el caso de las mitocondrias.

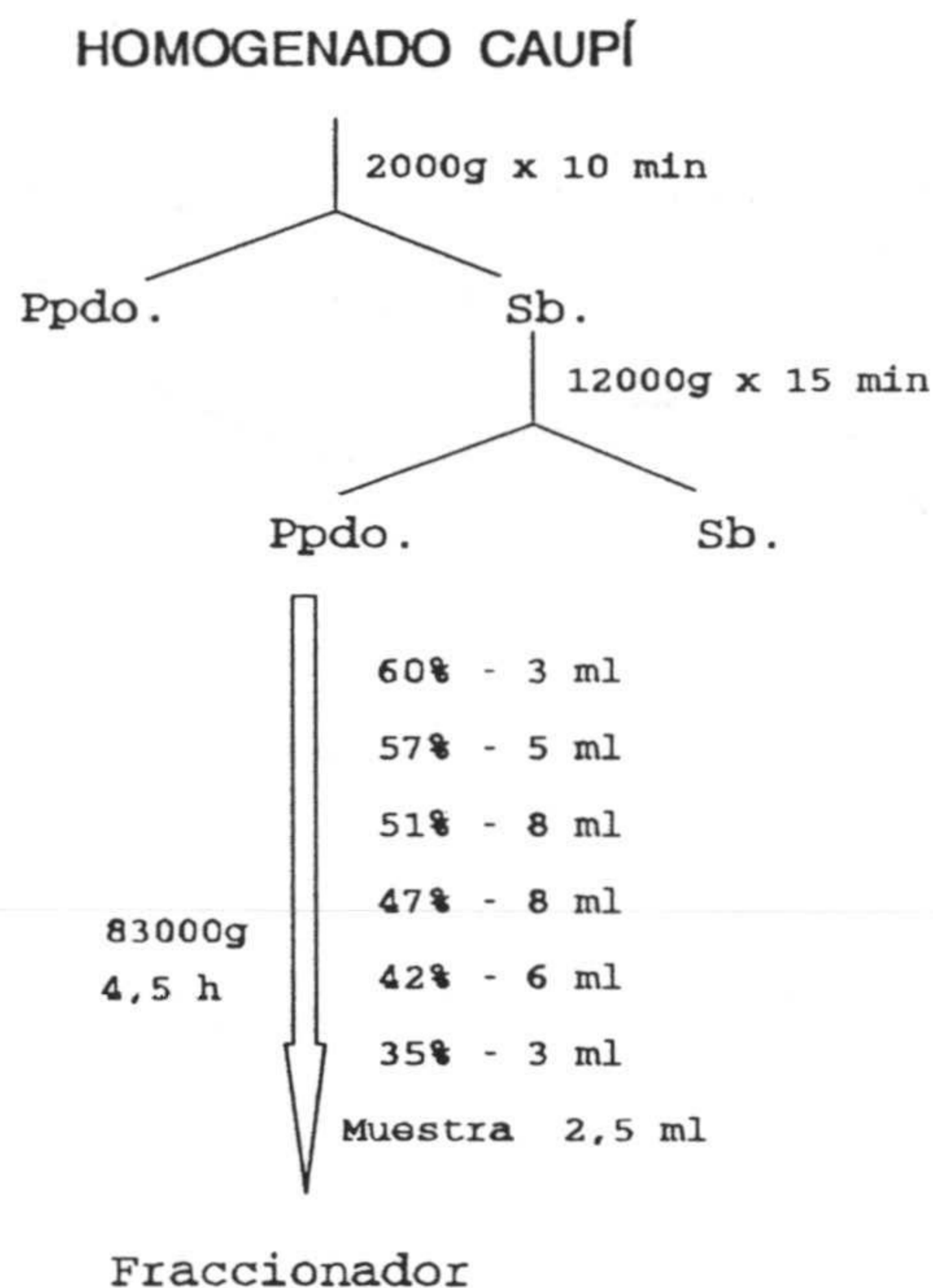
Para reducir la concentración de Percoll en los peroxisomas y mitocondrias, las fracciones correspondientes se diluyeron unas diez veces en el medio de lavado sin ASB, recuperándose los orgánulos por centrifugación a 12.000 g durante 15 minutos. Los precipitados de peroxisomas y de mitocondrias se resuspendieron en un pequeño volumen del medio anterior y se utilizaron para los distintos ensayos.

Para la preparación de membranas y fracción soluble (matrices), los peroxisomas se rompieron por choque hipotónico en tampón fosfato 50 mM (pH 7,8), FAD 0,02 mM y DETAPAC 0,1 mM, y se centrifugaron a 237.000 g durante 90 minutos (del Río et al, 1989). El sobrenadante (fracción soluble) se concentró con sulfato amónico al 80% de saturación, y se centrifugó a 27.000 g durante 60 minutos. Las proteínas de la matriz peroxisomal obtenidas en el precipitado fueron resuspendidas en el medio de choque hipotónico.

#### 4.2. Caupí, judía y soja.

Se llevó a cabo a partir de hojas de caupí (*Vigna unguiculata* [L.] Walp), de judía (*Phaseolus vulgaris* L., cv Contender) y de soja (*Glycine max* L., cv Williams) y todas las operaciones se llevaron a cabo entre 0–4°C. Los peroxisomas y mitocondrias se purificaron por centrifugación diferencial seguida de centrifugación en un gradiente de sacarosa (35–60%; p/p) siguiendo una modificación del método descrito por Gerhardt (1981). Se partió de hojas jóvenes desnervadas (15 g) que se homogenizaron con un Polytron en 75 ml de medio consistente en tampón Tricina–KOH 170 mM (pH 7,5), KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, EDTA 1 mM, DTT 5 mM, sacarosa 1 mM, PVPP 0,2% y ASB 0,3% (p/v). El homogenado se filtró por dos capas de entretela y se centrifugó a 2.000 g durante 10 min. El sobrenadante se centrifugó a 12.000 g durante 15 min y el precipitado, enriquecido en peroxisomas y mitocondrias, se suspendió muy

suavemente con ayuda de un pincel fino en unos 2,5 ml del medio de homogeneización sin PVPP, y se depositó en un gradiente de densidad de sacarosa con la siguiente composición: 3 ml del 60%, 5 ml del 57%, 8 ml del 51%, 8 ml del 47%, 6 ml del 42% y 3 ml del 35% de sacarosa (p/p) (Fig. 13). Las soluciones de sacarosa se prepararon en EDTA 1 mM a pH 7,5.



**Fig. 13.** Esquema del proceso de purificación de peroxisomas y mitocondrias de hojas de caupí.

Los gradientes se centrifugaron a 83.000 g durante 4,5 horas en una ultracentrifuga Beckman usando un rotor SW-28. Después de la centrifugación, los gradientes se eluyeron por desplazamiento ascendente con sacarosa del 66% (p/p) con un fraccionador Isco mod. 185, registrándose la transmitancia a 280 nm. Se recogieron fracciones de 1,5 ml. La identificación de los orgánulos en los gradientes se realizó utilizando marcadores de los mismos: catalasa para peroxisomas, y fumarasa para mitocondrias.

## 5. DETERMINACIÓN DE INTEGRIDAD DE ORGÁNULOS CELULARES.

### 5.1. Peroxisomas.

La integridad de los peroxisomas purificados se determinó por la medida de la actividad hidroxipiruvato reductasa a 25°C en un medio de reacción isosmótico conteniendo sacarosa 0,25 M, en ausencia y en presencia de Tritón X-100 al 0,025%, según el método de Schwitzguébel y Siegenthaler (1984). El porcentaje de integridad se calculó utilizando la fórmula:

$$\% \text{ Integridad} = \left[ 100 - \left( \frac{\text{Actividad intactos}}{\text{Actividad rotos}} \times 100 \right) \right]$$

### 5.2. Mitocondrias.

Las fracciones del pico de mitocondrias en los gradientes se reunieron y se trataron igual que los peroxisomas, para la eliminación del Percoll y la recuperación de los orgánulos. Una vez suspendidas las mitocondrias en medio de lavado sin ASB, se determinó la integridad de las mismas por el método descrito por Douce *et al* (1972). Con este método se obtienen valores de integridad de la membrana externa de las mitocondrias midiendo la actividad de la succinato:citocromo c oxidorreductasa (EC 1.3.99.1) que se encuentra en la cara exterior de la membrana interna mitocondrial. La reacción se llevó a cabo a 25°C, y la mezcla de reacción hipotónica contenía tampón fosfato 50 mM (pH 7,2), citocromo c 0,05 mM, CNK 1 mM y 50 µl de la suspensión de mitocondrias. La reacción en condiciones isotónicas se realizó en presencia de sacarosa 0,3 M, y en ambos casos el ensayo se inició añadiendo succinato sódico 10 mM (Douce *et al.*, 1972). El porcentaje de integridad de las mitocondrias se obtuvo utilizando una expresión similar a la indicada para los peroxisomas.



## 6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y CITOQUÍMICA DE CATALASA.

En las hojas de guisante los peroxisomas fueron localizados por citoquímica electrónica de catalasa, mediante un método basado en la actividad peroxidásica de la catalasa sobre la DAB (diaminobencidina) (Müller y Beckman, 1978). El producto de la oxidación de la DAB por la catalasa y el  $H_2O_2$  forma un precipitado con  $OsO_4$  (negro de osmio), el cual, es fácilmente reconocible por su alta densidad electrónica. Las muestras de hojas de ambos cultivares de *Pisum sativum* tratados y no tratados con NaCl fueron primero fijadas con glutaraldehído al 0,5% en tampón fosfato potásico 50 mM (pH 6,8) durante 2,5 horas a temperatura ambiente, y luego se lavaron con este mismo tampón. Después de la fijación, un lote de muestras se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 1 h en una solución de DAB (Sigma) de 2 mg/ml en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 9,0). Después, las muestras se incubaron a 37°C en oscuridad durante 2 h en una solución recién preparada del mismo tampón conteniendo 2 mg/ml de DAB y  $H_2O_2$  (Merck) al 0,02%. En este paso, se usaron dos clases de controles de la actividad peroxidásica: muestras incubadas con DAB sin  $H_2O_2$  durante 1 h y 2 h, respectivamente; y muestras incubadas con DAB durante 1 hora y con DAB más  $H_2O_2$  más 3-amino-1,2,4-triazol (AT) 50 mM durante 2 h. Las muestras y los controles se lavaron cuidadosamente con tampón fosfato 50 mM (pH 6,8) durante 30 min y se posfijaron con  $OsO_4$  al 1% en el mismo tampón, a temperatura ambiente, durante 30 min, y posteriormente se lavaron con tampón fosfato 50 mM (pH 6,8). La deshidratación de las muestras se llevó a cabo con una serie gradual de etanol (30%, 50%, 70%, 90% y 100%). Finalizada la deshidratación, se eliminó el etanol y se lavaron las muestras dos veces con óxido de propileno, y se incluyeron en resina CY212 (Emscope). Los cortes ultrafinos se realizaron con un ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut E (Viena, Austria) y se tiñeron con citrato de plomo y acetato de uranilo. La visualización de los orgánulos celulares se realizó en un microscopio electrónico Zeiss EM 10C.

## 7. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

### 7.1.- Superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1).

Se empleó el método del citocromo c basado en la medida a 550 nm de la inhibición por la SOD de la reducción del citocromo c por los radicales libres  $O_2^{\cdot-}$  generados por el sistema enzimático xantina/xantina oxidasa (McCord y Fridovich, 1969). El ensayo se llevó a cabo a 25°C en un volumen de 3 ml de una mezcla de reacción que contenía: citocromo c 13,5  $\mu$ M, xantina 96,7  $\mu$ M, en tampón fosfato 50 mM, pH 7,8, EDTA- $Na_2$  0,1 mM, saturado de aire, y 25-100  $\mu$ l de muestra. La reacción se inició añadiendo una suspensión de xantina oxidasa preparada en el tampón anterior y se siguió la reducción del citocromo c a 550 nm.

Una unidad de actividad SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para producir una inhibición de un 50% en la velocidad inicial de reducción del citocromo c en la reacción control a 25 °C. El cálculo de la actividad enzimática, en U/ml, se efectuó mediante la determinación del porcentaje de inhibición producido por la muestra según la expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\Delta E_{550}/\text{min} (\text{control}) - \Delta E_{550}/\text{min} (\text{problema})}{\Delta E_{550}/\text{min} (\text{control})} \times 100$$

$$\text{Unidades SOD/ml} = \frac{\% \text{ inhibición}}{50\% \cdot v} \cdot \text{factor de dilución}$$

donde v es el volumen de la muestra en ml.

Los porcentajes de inhibición determinados deben ser como máximo de un

50% para que exista una relación lineal con la concentración de SOD de la muestra.

Las distintas isoenzimas de SOD fueron individualizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida, utilizando el procedimiento vertical en geles cilindricos (técnica de disco) según el método de Orstein (1964) y Davis (1964). Los desarrollos se realizaron a 10°C en una cubeta de electroforesis Haackebuchler, modelo "Polyanalyst". Se emplearon geles al 10% en acrilamida y 0,53% en bis-acrilamida, polimerizándose con persulfato amónico. Se utilizó una capa de gel concentrador al 2,5% en acrilamida y 0,13% de bis-acrilamida. La actividad SOD fue localizada en los geles por el método fotoquímico de Weisiger y Fridovich (1973), basado en la reducción del NBT por los radicales libres  $O_2^{\cdot-}$  generados por la acción de la luz sobre una solución de riboflavina y TEMED. En estas condiciones los geles se tiñen uniformemente de azul debido a la formación de azul formazano, excepto en aquellas zonas donde hay actividad SOD, que permanecen incoloras. La identificación de las distintas isoenzimas de SOD se efectuó mediante el uso de inhibidores específicos (CNK y  $H_2O_2$ ) (Tabla 8). La cuantificación de las distintas bandas de actividad SOD presentes en los geles, se realizó mediante registro en un densitómetro Shimadzu CS-9000, calculándose el porcentaje de actividad de las distintas bandas a partir de las áreas de los picos obtenidos en los densitogramas.

**Tabla 8.** Identificación de las isoenzimas de SOD por el uso de inhibidores específicos.

Inhibidor	Mn-SOD	Fe-SOD	Cu,Zn-SOD
CNK 2mM	Resistente	Resistente	Sensible
$H_2O_2$ 5mM	Resistente	Sensible	Sensible

### 7.2. Catalasa (EC 1.11.1.6).

Se midió espectrofotométricamente según el método descrito por Aebi (1984) basado en la medida de la disminución de la absorbancia a 240 nm, ocasionada por la desaparición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La determinación se efectuó a  $25^\circ\text{C}$  en una mezcla de reacción (2,9 ml) que contenía  $\text{H}_2\text{O}_2$  10,6 mM en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,0. La actividad enzimática, en nmoles de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $\times$   $\text{min}^{-1}$   $\times$   $\text{mg}^{-1}$  prot, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_{240}$ ) para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  de  $39,58 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (del Río *et al.*, 1977).

### 7.3. Urato oxidasa o uricasa (EC 1.7.3.3).

Fue determinada siguiendo la desaparición de ácido úrico a 293 nm, según el método de Christensen y Jochimsen (1983). El ensayo se realizó a  $30^\circ\text{C}$  en un volumen de reacción de 1,1 ml que contenía ácido úrico 50  $\mu\text{M}$  en tampón glicina-NaOH 85 mM, pH 9,0. La actividad enzimática, en nmoles de ácido úrico  $\times$   $\text{min}^{-1}$   $\times$   $\text{mg}^{-1}$  prot, se determinó a partir de la velocidad inicial de reacción utilizando un coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_{293}$ ) para el ácido úrico de  $1,22 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (Hong y Schopfer, 1981).

### 7.4. Alantoinasa o alantoína amidohidrolasa (EC 3.5.2.5).

Se basa en la medida de formación de ácido alantoico según un método modificado descrito por Ory *et al.* (1969). Se partió de 50–100  $\mu\text{l}$  de muestra que se incubó con 2 ml de alantoína 12,5 mM a  $37^\circ\text{C}$  durante 20 min, posteriormente se adicionó 0,5 ml de HCl 0,2 N se calentó a  $100^\circ\text{C}$  durante 4 min y a continuación se pasó a baño de hielo durante 45 s, después a temperatura ambiente 5 min, añadiéndole 0,5 ml de fenilhidracina 21 mM. Toda la mezcla se incubó a  $30^\circ\text{C}$  durante 10 min, se agitó y se pasó a baño de hielo donde se adicionó 1,2 ml de

HCl concentrado a 0°C y 0,5 ml de ferricianuro 61 mM, dejándolos incubar a 30°C durante 20–30 min. Trascurrido este tiempo se midió la absorbancia a 520 nm, determinándose la cantidad de ácido alantoico formado por interpolación en una curva patrón de ácido alantoico (10–100 mM) que recibió el mismo tratamiento que la muestra problema.

## **7.5.– Xantina oxidorreductasa.**

### **7.5.1. Xantina oxidasa o forma O (EC 1.1.3.22).**

Se determinó espectrofotométricamente midiendo a 293 nm la formación, dependiente de O<sub>2</sub>, de ácido úrico (Rajagopalan, 1985). La reacción se llevó a cabo a 25°C en una mezcla de reacción de 1,05 ml saturada de oxígeno que contenía xantina 50 µM y CNK 0,1 mM en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,8. La actividad enzimática, en nmoles de ácido úrico x min<sup>-1</sup> x mg<sup>-1</sup> prot se determinó a partir de la velocidad inicial de reacción utilizando un coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_{293}$ ) para el ácido úrico de  $1,22 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (Hong y Schopfer, 1981).

### **7.5.2. Xantina deshidrogenasa o forma D (EC 1.1.1.204).**

Fue determinada de forma similar a la XOD pero midiendo la formación de ácido úrico en presencia de NAD 0,5 mM, en una solución tamponada en la que se había eliminado el oxígeno, por borboteo con N<sub>2</sub>.

## **7.6. Glicolato oxidasa (EC 1.1.3.15).**

Se determinó midiendo a 30°C la incorporación de O<sub>2</sub> en la presencia de glicolato sódico, utilizando un electrodo de oxígeno Hansatech mod DW1. El ensayo se llevó a cabo en ausencia de luz y en un volumen de 2 ml de una mezcla de reacción saturada de O<sub>2</sub> que contenía: tampón Tris–HCl 46,9 mM, pH 8,3, FMN 62,5 µM, NaN<sub>3</sub> 93,8 mM, muestra 25–100 µl y glicolato sódico 93,8 mM

(Kerr y Groves, 1975). La actividad se expresó en nmoles de  $O_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  prot, teniendo en cuenta que una solución saturada de  $O_2$  a  $30^\circ\text{C}$  posee  $0,230 \mu\text{mol } O_2 \times \text{ml}^{-1}$ .

#### 7.7. Hidroxipiruvato reductasa (EC 1.1.1.29).

Se empleo el método de Schwitzguébel y Siegenthaler (1984) basado en la medida a 340 nm de la oxidación del NADH acoplada a la reducción del hidroxipiruvato a glicerato. El ensayo se realizó a  $25^\circ\text{C}$  en un volumen de reacción de 1,1 ml que contenía tampón fosfato potásico 50 mM, pH 6,2, CNK 1 mM, NADH 0,2 mM, muestra 25–100  $\mu\text{l}$  e hidroxipiruvato 2 mM. La actividad enzimática en  $\mu\text{moles de NADH} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  prot, se calculó a partir de la velocidad inicial de la reacción utilizando un coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_{340}$ ) para el NADH de  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (Vigil, 1983).

#### 7.8. Fumarasa (EC 4.2.1.2).

Se determinó por el método espectrofotométrico descrito por Walk y Hock (1977) basado en la medida a 240 nm de la conversión de malato en fumarato. El ensayo se realizó en un volumen de reacción de 2 ml que contenían L-malato 4,3 mM, Tritón X-100 al 0,02% (v/v), tampón Tricina 0,1 M, pH 7,5 y 20–100  $\mu\text{l}$  de muestra. La actividad enzimática, en  $\mu\text{moles de fumarato} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  prot, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_{240}$ ) para el ácido fumárico de  $2,44 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (Hill y Bradshaw, 1969).

#### 7.9. Citocromo c oxidasa (EC 1.9.3.1).

El método utilizado fue una combinación de los descritos por Smith (1955) y Tolbert *et al.*(1968), basado en la medida a 550 nm de la velocidad inicial de

oxidación del citocromo c reducido por la citocromo c oxidasa. La reacción se llevó a cabo a 25°C, y la mezcla de reacción (3,0 ml) contenía citocromo c reducido 24 µM, Tritón X-100 0,1% (v/v), tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7,0, y 25-100 µl de muestra. La actividad enzimática, en µmoles de citocromo c reducido x min<sup>-1</sup> x mg<sup>-1</sup> prot, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_{550}$ ) para el citocromo c reducido de  $21 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (Tolbert *et al.*, 1968).

## 7.10. Actividad proteasa.

### 7.10.1. Endopeptidasas.

La actividad endopeptidasa se determinó espectrofotométricamente utilizando dos tipos de sustratos: azocaseína y azocoll (calidad de SIGMA).

La hidrólisis de la azocaseína se llevó a cabo a 37 °C durante 24 horas en una mezcla de reacción (1 ml) que contenía tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, azocaseína al 0,5% (p/v) y 0,1 ml de muestra, transcurrido este tiempo la reacción se paró con 2 ml de ácido tricloroacético al 12% (p/v). La actividad endopeptidasa se expresó en Unidades x mg<sup>-1</sup> prot x h<sup>-1</sup>, siendo una unidad la cantidad de enzima que causa un incremento de absorbancia de 0,01 a 340 nm respecto al tiempo cero (Casano *et al.*, 1989).

La hidrólisis del azocoll se llevó a cabo a 37 °C durante 24 horas en una mezcla de reacción (1,1 ml) que contenía tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, azocoll al 1% y 0,1 ml de muestra, transcurrido este tiempo la reacción se paró con 0,5 ml de ácido tricloroacético al 12% (p/v) (Asahi *et al.*, 1985). La actividad se expresó también en Unidades x mg<sup>-1</sup> prot x h<sup>-1</sup>, considerándose una unidad como la cantidad de enzima que produce un cambio de absorbancia de 10<sup>-3</sup> a 520 nm en una hora y por mililitro (Canut *et al.*, 1987).

## 7.10.2. Exopeptidasas.

### 7.10.2.1. Actividad carboxiaminopeptidasa.

Se utilizó el método de Walker-Simmons y Ryan (1977) con la N-benzoyl-L-tirosina-*p*-nitroanilida (BTPA) como sustrato y basado en la medida a 410 nm de la liberación de *p*-nitroanilida. La hidrólisis se llevó a cabo a 35°C durante 2 h en una mezcla de reacción (3,45 ml) que contenía tampón Tris-HCl 0,1 M pH 8,5, BTPA 3 mM y 0,1 ml de muestra, transcurrido este tiempo la reacción se paró con 1 ml de ácido acético al 30% (v/v). La actividad se expresó en nmoles de *p*-nitroanilida  $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  prot. Utilizando un coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_{410}$ ) para la *p*-nitroanilida de  $10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (Tuppy *et al.*, 1962).

### 7.10.2.2. Aminopeptidasa (EC 3.4.11.11).

Se determinó espectrofotométricamente usando L-leucina-*p*-nitroanilida como sustrato, según el método descrito por Casano *et al* (1989), basado en la medida a 410 nm de la liberación de *p*-nitroanilida. La hidrólisis se llevó a cabo a 39°C durante 30 min en una mezcla de reacción (1,05 ml) contenía tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7,5, 2-mercaptoetanol 10 mM, L-leucina-*p*-nitroanilida 1 mM y 50  $\mu\text{l}$  de muestra, transcurrido este tiempo la reacción se paró con 0,5 ml de ácido acético al 30% (v/v). La actividad enzimática se expresó en nmoles de *p*-nitroanilida  $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  prot, utilizando un coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_{410}$ ) para la *p*-nitroanilida de  $10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (Tuppy *et al.*, 1962).

La actividad aminopeptidasa también se determinó en desarrollos electroforéticos en geles cilíndricos de poliacrilamida al 7,5% en condiciones nativas. Las condiciones de la electroforesis fueron descritas en el apartado 7.1. Después de la electroforesis los geles se incubaron a 37°C durante 30 min con concentraciones 0,5 mM de derivados L-aminoacil- $\beta$ -naftilalmida de distintos



aminoácidos en tampón Tris-HCl 250 mM, pH 7,5. A continuación, los geles se tiñeron con el colorante "Fast Black K" (calidad Sigma) al 0,1% en tampón acetato-NaOH 0,1 M, pH 4,2, según el método descrito por Carrasco y Carbonell (1989). Las bandas de actividad aminopeptidasa, de color azul-violáceo, se cuantificaron por registro de los geles en un densitómetro Shimadzu CS-9000. Muestras con actividad aminopeptidasa también fueron sometidas a electroforesis en condiciones desnaturizantes (EGPA-SDS) utilizando geles de acrilamida-SDS del 12%. Las muestras se calentaron a 37°C durante 45 min en presencia de SDS al 2% y de 2-mercaptoetanol al 5%, según el método de Laemmli (1970).

## 8. ANÁLISIS DE PURINAS Y ALANTOÍNA POR HPLC Y FPLC.

Se puso a punto un método analítico de identificación y cuantificación de alantoína, xantina, hipoxantina y ácido úrico en peroxisomas por HPLC para ser aplicado a la determinación de la concentración de estos compuestos en peroxisomas purificados de hoja. Previamente a su procesamiento por HPLC, las muestras de

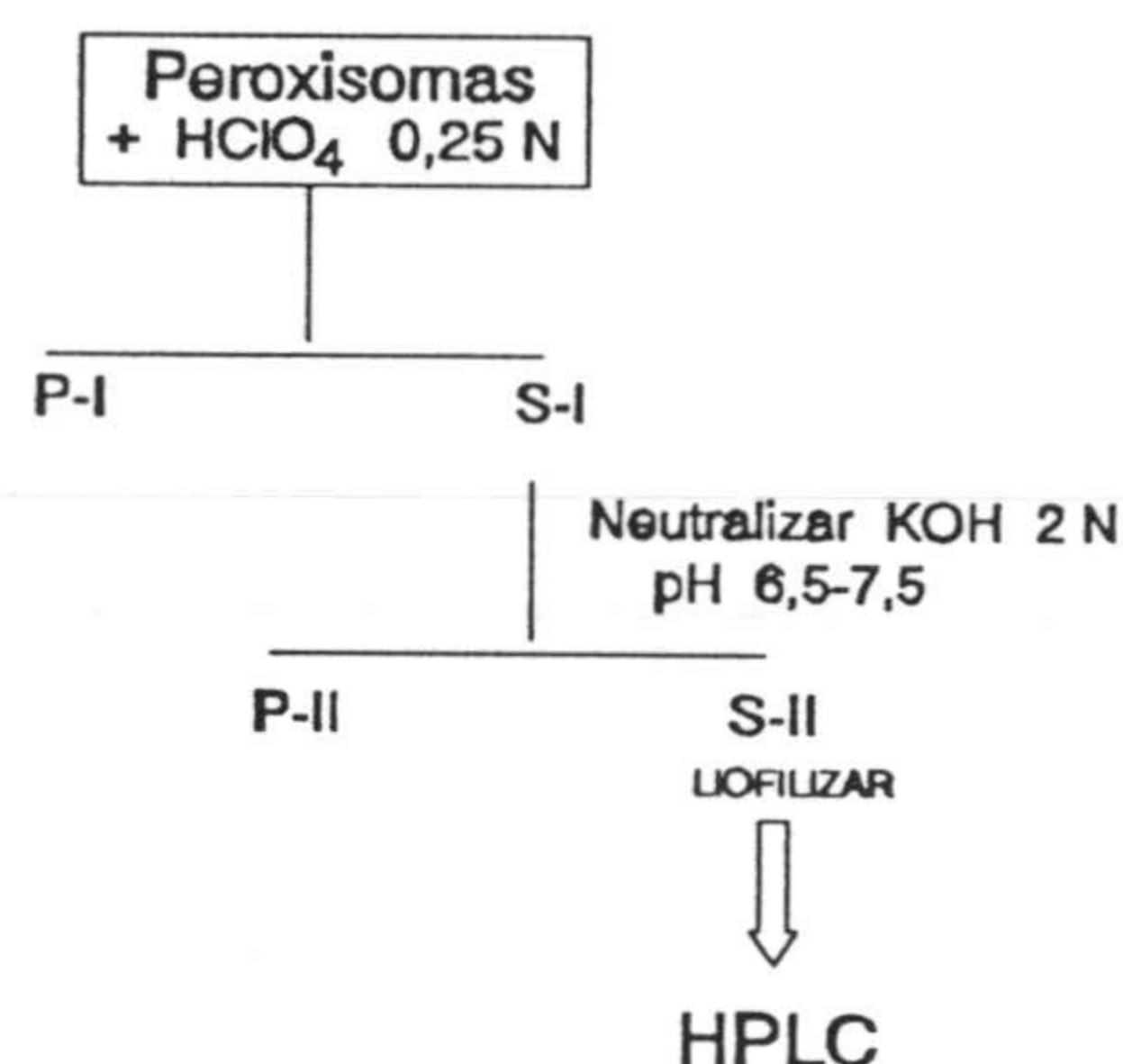


Fig. 14. Tratamiento de las muestras de peroxisomas antes de su análisis por HPLC.

peroxisomas se sometieron a un tratamiento de desproteinización. Las suspensiones de peroxisomas (aproximadamente 0,5 ml) se trataron con 5 ml HClO<sub>4</sub> 0,25N (concentración final), con agitación durante 15 min, y después se centrifugaron a 12.000 g durante 15 min. El sobrenadante obtenido se neutralizó con KOH 2N hasta un pH entre 6,5-7,5, y se volvió a centrifugar a 12.000 g durante 15 min. El sobrenadante (5 ml) se liofilizó y finalmente, se disolvió en aproximadamente en 200 µl de una mezcla 1:1 de citrato sódico 30mM y acetato sódico 55mM, pH 4,75, quedando listo para su inyección en el cromatógrafo líquido (Fig. 14).

Para las determinaciones por HPLC se utilizaron dos cromatógrafos líquidos Hewlett-Packard distintos, los modelos 1080-B y 1090-A. El cromatógrafo líquido 1080-B está equipado con un detector de longitud de onda variable de 190-600 nm y se utilizó con columna de 200 x 4,6 mm rellenas con "Hypersil" de 10  $\mu$ m C-8 (Merck). La fase móvil estaba formada por una mezcla 1:1 de citrato sódico 30 mM y acetato sódico 55 mM con un pH de 4,75, y se utilizó un flujo de 2 ml/min. Se inyectaron volúmenes de muestra de 10-20  $\mu$ l y las concentraciones de los patrones utilizados estaban entre 1-10 mg/l. Se utilizaron alantoína, xantina, hipoxantina y ácido úrico de la casa Fluka como patrones y todos los demás reactivos eran de calidad HPLC. Las lecturas se efectuaron a 224 nm una vez estandarizados los tiempos de retención con los distintos patrones a sus correspondientes máximos de absorción al UV. El otro cromatógrafo líquido empleado (el mod. 1090-A) está equipado con detector de diodos en cadena (DAD) e integrador multicanal, y se utilizó con una precolumna C<sub>18</sub> (Merck) y con una columna de 100 x 2,1 mm rellena con "Hypersil" de 5  $\mu$ m C-18 (Merck). La fase móvil era la misma que se indicó anteriormente y el flujo de 0,2 ml/min. Se inyectaron volúmenes de muestra de 1-5  $\mu$ l y las lecturas empleadas eran de 224 nm para la alantoína y el ácido úrico, y de 268 nm para la xantina y la hipoxantina.

Para el análisis preparativo de purinas y alantoína se puso a punto un método de FPLC que permite la separación de alantoína, xantina y ácido úrico. Se utilizó una columna Mono-Q HR 5/5, de intercambio aniónico, conectada a un sistema de FPLC (Pharmacia LKB Biotecnologic). La columna se equilibró en tampón etanolamina-HCl 20 mM, pH 9,0, y se cargaron volúmenes de muestra de 500  $\mu$ l mediante un aplicador de muestra. La columna se lavó con 7 ml de tampón de equilibrado y después se eluyó con 25 ml de un gradiente lineal de

NaCl 0–0,1 M en tampón etanolamina–HCl 20 mM, pH 9,0. Se controló la densidad óptica de los eluidos de la columna a 280 nm y se recogieron fracciones de 1 ml, a un flujo de 1,0 ml x min<sup>-1</sup>. En las fracciones eluidas se identificó la presencia de alantoína, xantina y ácido úrico utilizando los criterios siguientes: a) por los espectros de absorción al UV característicos de estos compuestos; b) por colorimetría mediante el método de Vogels y Van der Drift (1970), en el caso de la alantoína; y c) por la actividad alantoinasa, xantina oxidasa y urato oxidasa de las muestras.

### 9. DETERMINACIÓN DE RADICALES SUPERÓXIDO.

En membranas de peroxisomas de plantas de guisante obtenidas según se indico en el apartado 4.1, se estudio la producción de radicales superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), utilizando NADH como inductor. Se empleó el método espectrofotométrico del ferricitocromo c. Este procedimiento se basa en la medida a 550 nm de la reducción del citocromo c por los radicales libres superóxido (Fridovich, 1985). Se empleó citocromo c acetilado preparado según el método de Boveris (1984). La modificación por acetilación de los grupos ε-amino de los restos de lisina del ferricitocromo c disminuye en un 95% la posibilidad de ser reducido por la NADH:citocromo c reductasa o de ser reoxidado por la citocromo c oxidasa y peroxidasa, mientras que el citocromo c conserva la capacidad de ser reducido por el radical superóxido (Fridovich, 1985). El ensayo se llevó a cabo a 25°C, y la mezcla de reacción (1,05 ml) contenía: tampón fosfato 50 mM, pH 7,8, saturado de aire, con DETAPAC 0,1 mM; ferricitocromo c acetilado 23 μM; CNK 0,1 mM; y membranas peroxisomales conteniendo de 8–30 μg de proteínas. La reacción se inició al añadir NADH (100 μM, concentración final) y, se midió a 550 nm frente a un blanco con idéntica composición pero conteniendo Cu,Zn–SOD 1 μM (Sigma). Se realizó también un control adicional con los componentes de la mezcla de reacción pero sin muestra biológica. La cantidad de radicales O<sub>2</sub><sup>·-</sup>

producidos se calculó según el método de Asada (1984) utilizando para el citocromo c un  $\Delta E_{550}$  de  $19 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Keister y San Prieto, 1963).

## 10. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR.

La masa molecular de la actividad aminopeptidasa de los peroxisomas se determinó por EGPA a distintas concentraciones de gel, según el método de Hedrick y Smith (1968). Este método se fundamenta en la variación exponencial de la movilidad relativa de una proteína ( $R_f$ ) al variar la concentración de acrilamida del gel. La representación de los logaritmos de los  $R_f$  de la proteína frente a los distintos porcentajes de acrilamida del gel da lugar a unas rectas (diagramas de Ferguson), cuya pendiente está relacionada con el peso molecular de la proteínas.

Se utilizaron geles cilíndricos de acrilamida con los siguientes porcentajes: 7,5, 9, 10,5 y 12%. Para cada una de las concentraciones de acrilamida se llevó a cabo el desarrollo electroforético de patrones y problemas. Como patrones de peso molecular, se utilizaron las siguientes proteínas: lactoalbúmina ( $M_r=14.200$ ); anhidrasa carbónica ( $M_r=29.000$ ); ovoalbúmina ( $M_r=45.000$ ); y ASB (monómero  $M_r=66.000$ ; dímero  $M_r=132.000$ ). La actividad aminopeptidasa se detectó en los geles como se indicó en el apartado 7.10.2.2, y las bandas de proteínas se revelaron con azul Coomassie G en ácido perclórico al 0,04% (Reisner, 1984). Los geles se registraron en un densitómetro Shimadzu CS-9000, calculándose los valores de  $R_f$  correspondientes a cada banda de proteína a partir de los densitogramas.

Tanto para los patrones como para el problema, se representaron los logaritmos de los  $R_f$  en ordenadas y las concentraciones de acrilamida en abcisas.

Las pendientes de las rectas resultantes se representaron frente a las masas moleculares de las proteínas estándar, y por interpolación de la proteína problema se calculó su masa molecular.

## **11. DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO.**

El punto isoeléctrico de la leucina aminopeptidasa de peroxisomas de guisante se determinó utilizando la técnica de isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida, en un sistema Multiphor 2117 de LKB. Se emplearon geles al 7,5% en acrilamida y 0,231% en bis-acrilamida, de 2 mm de grosor, y conteniendo un 5% de anfolinas con un rango de pH de 2,5 a 7 (LKB-Pharmacia). Las muestras se prepararon en glicina al 1% (p/v) y se depositaron en trozos de papel Whatman nº 3 de 0,5 x 1 cm. El desarrollo se llevó a cabo a 10°C iniciándose con un preelectroenfoque sin muestra, a una potencia de 25 W durante 1 h, tiempo en el cual se formó el gradiente de pH. A continuación se colocaron las muestras y se aplicó una potencia constante de 25 W hasta alcanzar los 800 V, manteniéndose constante este voltaje durante 4 h. Finalizado el desarrollo, en una zona del gel exenta de muestra, se cortó longitudinalmente una tira de gel de 0,5 cm de ancho, la cual se subdividió en trozos de 0,5 cm que se incubaron durante toda la noche a 4°C en tubos de ensayo conteniendo 1,2 ml de agua destilada recién hervida. Transcurrido este tiempo, en cada uno de estos tubos se midió el pH para establecer el gradiente formado durante el proceso de electroenfoque. Para la localización e identificación de la actividad aminopeptidasa en los geles, se siguió el mismo método empleado en EGPA nativa, y las bandas de actividad se registraron en un densitómetro Shimadzu CS-9000.

## **12. OTRAS DETERMINACIONES.**

### **12.1. Peroxidación lipídica.**

La peroxidación lipídica de las membranas peroxisomales se determinó

midiendo la concentración de malondialdehído (MDA) con ácido tiobarbitúrico según el método Buege y Aust (1978).

Para el ensayo se tomaron 200  $\mu$ l de muestra y se le adicionó 1 ml de la siguiente mezcla: ácido tricloroacético al 15% (p/v), ácido tiobarbitúrico al 0,375% (p/v) y butilhidroxitolueno al 0,01% (p/v), preparada en HCl 0,25 N. Posteriormente, la mezcla se calentó durante 15 min a 95°C con agitación. Se dejó enfriar y se centrifugó a 2.000 g durante 5 min, efectuándose la lectura a 535 nm. La concentración de MDA en las muestras problema se determinó a partir de una recta de calibración con distintas concentraciones de malondialdehído dimetil acetal (0,1, 0,25, 1,5 y 10  $\mu$ M) que habían sufrido el mismo tratamiento que las muestras problema.

## 12.2. Peróxido de hidrógeno.

La concentración de peróxido de hidrógeno en los peroxisomas intactos se determinó según el método de Frew *et al.* (1983), basado en la medida a 505 nm de la formación de una quinona-imina como resultado de la oxidación, catalizada por peroxidasa, del fenol y de la 4-aminoantipirina. La mezcla de reacción (4 ml) contenía tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 6,9, 4-aminoantipirina 5 mM, fenol 2,5 mM, peroxidasa  $2 \times 10^{-9}$  M y  $\text{H}_2\text{O}_2$   $2,5 \times 10^{-6}$  M, a la cual se adicionaba 200  $\mu$ l de muestra y se llevaba a un volumen final de 10 ml con agua ultrapura. Transcurridos 5 min, a temperatura ambiente, se efectuó la lectura a 505 nm. La concentración se determinó a partir de una recta de calibración con distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,625, 1,25, 2,5, 5,0 y 10  $\mu$ M) que habían sufrido el mismo tratamiento que las muestras problema.

### 12.3. Ureidos.

Los ureidos alantoína y ácido alantoico fueron determinados según el método de Vogels y Van der Drift (1970), que se basa en la formación de un difenilformazano del glioxilato ( $\epsilon_{535} = 49,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) que tiene un máximo de absorción a 535 nm.

Para la determinación de la alantoína se partió de 0,1 ml de muestra, se adicionó 0,2 ml de agua y 0,1 ml de NaOH 0,5 N, se calentó a 100°C durante 8 min, una vez enfriados se añadió 0,1 ml de HCl 0,65 N y se volvió a calentar a 100°C pero esta vez 4 min. Posteriormente se adicionó 0,1 ml de tampón fosfato 0,4 M, pH 7,0 y 0,1 ml de fenilhidracina-HCl 23 mM, y se dejó a temperatura ambiente durante 5 min e inmediatamente se llevó a baño de hielo, adicionándole 0,5 ml de HCl concentrado (a 0°C) y 0,1 ml de ferricianuro potásico 50,6 mM. Todo ello se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min y se procedió a su lectura a 535 nm.

En el caso del ácido alantoico también se partió de 0,1 ml de muestra a la que se adicionó 0,3 ml de agua y 0,1 ml de HCl 0,15 N, todo ello se calentó a 100°C durante 4 min, una vez enfriados se adicionó 0,1 ml de tampón y 0,1 ml de fenilhidracina de las mismas concentraciones anteriormente mencionadas. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 5 min e inmediatamente se puso en baño de hielo y se adicionó 0,5 ml de HCl concentrado (a 0°C) y 0,1 ml de ferricianuro potásico 50,6 mM. Al igual que en el caso de la alantoína, se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min y una vez transcurridos se midió a 535 nm.

Para la alantoína y para el ácido alantoico fue necesario determinar el glioxilato presente en la muestra de partida y que se utilizó de blanco. Para ello se partió de una mezcla que contenía 0,1 ml de muestra, 0,4 ml de agua, 0,1 ml

de tampón fosfato y 0,1 ml de fenilhidracina-HCl (de las concentraciones anteriormente mencionadas) que una vez mantenida a temperatura ambiente durante 5 min se pasó a baño de hielo y se adicionó 0,5 ml de HCl concentrado a 0°C y 0,1 ml de ferricianuro potásico 50,6 mM. Se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min y se midió a 535 nm.

El cálculo se realizó según la ecuación siguiente:

$$\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} = \frac{A_{535} \times V}{\epsilon \times v}$$

#### 12.4. Proteínas.

Fueron determinadas por el método de Bradford (1966), usando albúmina de suero bovino como patrón, con concentraciones de 60, 120, 240, 480 y 600  $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ . Para el ensayo se tomaron volúmenes de 0,1 ml de cada una de las soluciones de la curva patrón y de la muestra, convenientemente diluida, y se les añadió 5 ml del reactivo de azul Coomassie G preparado previamente (Sandalo, 1987). Se agitaron bien los tubos y, entre 5 min y 1 h, se midió la densidad óptica a 595 nm. La concentración se determinó por interpolación sobre la recta de calibración.

#### 12.5. Clorofila.

La concentración de clorofila se determinó utilizando 1 ml de muestra y midiendo espectrofotométricamente la densidad óptica de la misma a dos longitudes de onda 649 y 665 nm. A los resultados obtenidos se le aplicó la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g clorofila/ml} = A_{665} \cdot 6,45 + A_{649} \cdot 17,72$$



### 12.6. Densidad.

La determinación de la densidad aproximada de las soluciones de sacarosa y de Percoll se efectuó a partir de medidas de refractometría a temperatura ambiente, utilizando un refractómetro Atago mod. 500 con capacidad para medir concentraciones en el rango 0-90% (p/p). En soluciones de sacarosa, los porcentajes obtenidos por refractometría se transformaron en densidad ( $\text{g/cm}^3$ ) utilizando las "International Critical Tables" (Griffith, 1983), mientras que, para soluciones de Percoll la conversión se realizó mediante una fórmula desarrollada en nuestro laboratorio a partir de datos de densidad de Percoll (Pharmacia Fine Chemicals, 1980).

$$\text{densidad (g/cm}^3\text{)} = 0,0093 \times C + 0,9549$$

donde C es la concentración medida por el refractómetro en %.

### 12.7. Determinación química de Na, Cl, Fe, Cu, Mn y Zn en hojas de guisante.

Previamente al análisis se procedió a la mineralización sulfúrica de la muestra (Wolf, 1982). Se pesó 0,1 g, aproximadamente de hojas secas y molidas, se colocó en un matraz Erlenmeyer de 50 ml y se adicionó 2 ml de ácido sulfúrico concentrado, procurando mojar bien toda la muestra. A continuación, se calentó en placa a  $110^\circ\text{C}$  hasta que finalizarse la emisión de vapores de  $\text{CO}_2$  (aproximadamente 3 h), se retiró el Erlenmeyer y se dejó enfriar. Posteriormente, se adicionó  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% libre de fósforo lentamente para evitar proyecciones de la muestra. Una vez que la muestra se tornaba completamente incolora se procedió a calentar a  $150^\circ\text{C}$  durante unos 15 min para eliminar los restos de peróxido que pudiesen quedar. Una vez fría la muestra, y comprobar que seguía transparente se enrasó a un volumen de 100 ml.

El análisis de sodio se llevó a cabo directamente sobre el mineralizado o previa dilución, mediante fotómetro de llama (C.I.I., 1969). Los cloruros se

determinaron espectrofotométricamente mediante un kit *Spectroquant* 14755 de Merck. El análisis de Fe, Mn, Cu y Zn (C.I.I., 1973 se realizó directamente sobre el mineralizado mediante un espectrofotómetro de absorción atómica IL 357.



GALLO  
P A R O H E M I N





RESULTADOS\*

GALGO  

---

PARCHEMIN



## 1. DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE SUPERÓXIDO DISMUTASA EN HOJAS DE LEGUMINOSAS PRODUCTORAS DE UREIDOS.

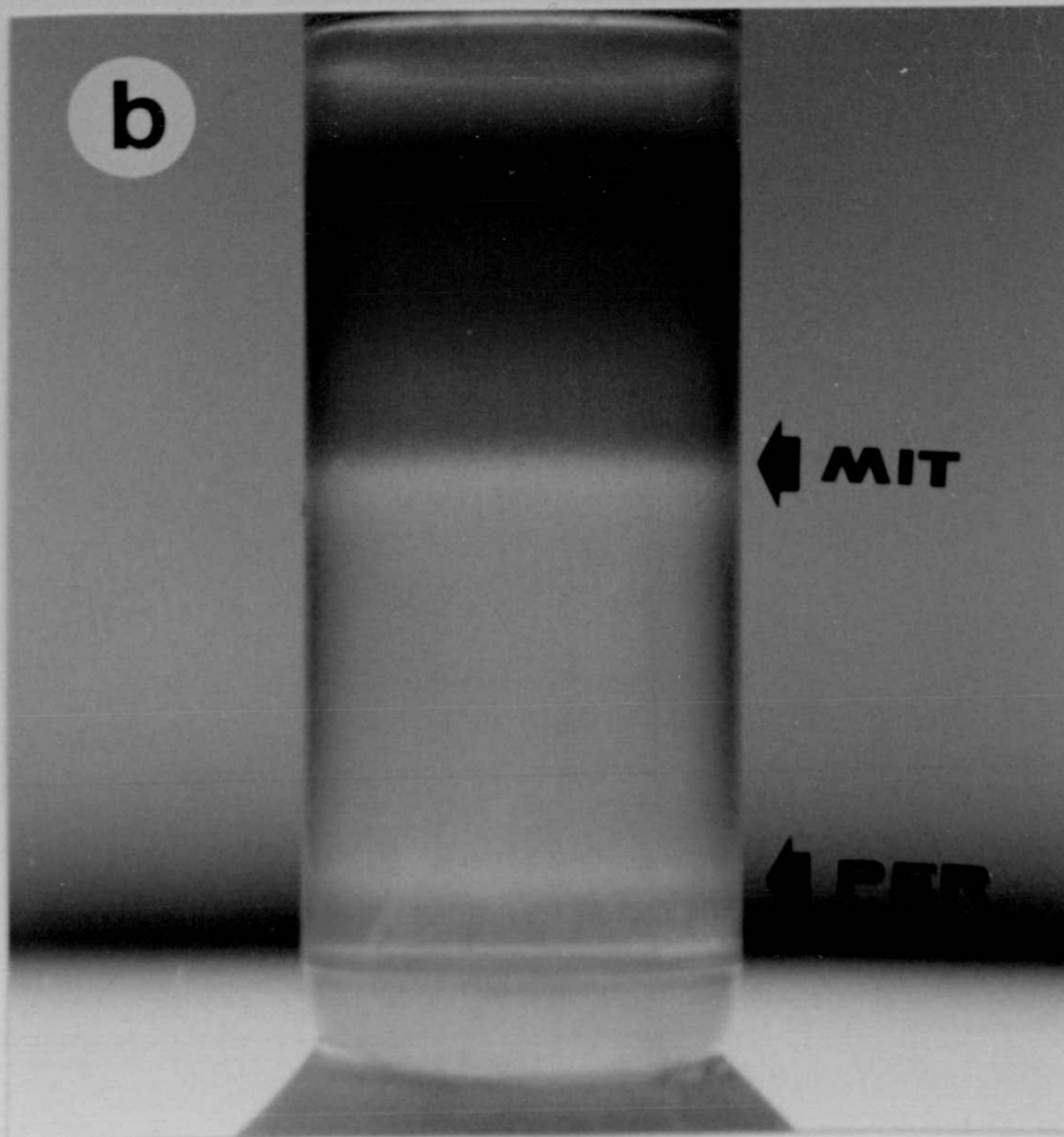
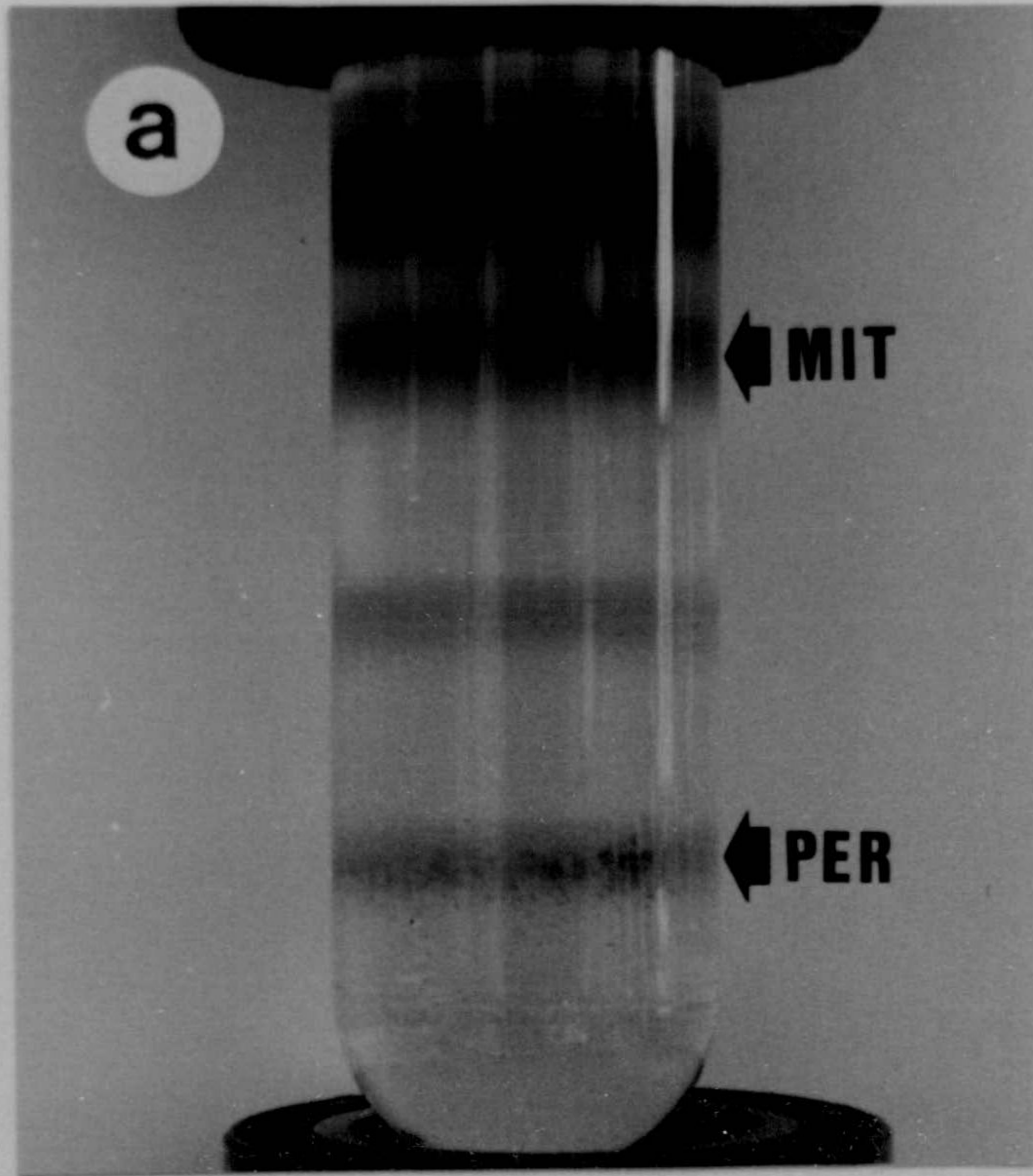
En una etapa preliminar de este trabajo, y con el fin de seleccionar la planta que se utilizaría para los distintos ensayos, se estudió la localización subcelular de SOD en peroxisomas y mitocondrias de tres leguminosas con el metabolismo de los ureidos (caupí, judía y soja). Para la puesta a punto del método de purificación de peroxisomas y mitocondrias se ensayaron distintos procedimientos de homogeneización utilizando medios de extracción de diferente composición, y los orgánulos celulares se purificaron por centrifugación en diversos gradientes de densidad de sacarosa y/o Percoll. En general, la centrifugación en gradientes de sacarosa proporcionó mejores resultados que el Percoll. En judía (*Phaseolus vulgaris* L.) y en soja (*Glycine max* L.), se obtuvieron bajos rendimientos de peroxisomas (2–12%) en el precipitado particulado lavado (12.000 g), y las bandas de peroxisomas apenas eran visibles en los gradientes. Por el contrario, en hojas de caupí (*Vigna unguiculata*), utilizando las mismas condiciones de aislamiento, se obtuvieron rendimientos de peroxisomas del 40%, y aparecían bandas de peroxisomas bien definidas en su zona de equilibrio de los gradientes de densidad. Por lo tanto, se utilizaron hojas de caupí para la purificación de los peroxisomas y mitocondrias según el procedimiento descrito en Material y Métodos (Fig. 13 y 15a).

Los peroxisomas se localizaban en los gradientes de densidad en las fracciones 19 a 21, a una densidad de equilibrio media de 1,24 g/cm<sup>3</sup> (Fig. 16), característica de estos orgánulos intactos en gradientes de sacarosa (Huang *et al.*, 1983). Los peroxisomas purificados estaban bien separados de las mitocondrias que, como se deduce de la actividad fumarasa, en las fracciones 7 a la 11, a una densidad media de 1,20 g/cm<sup>3</sup>. La integridad de los peroxisomas y mitocondrias

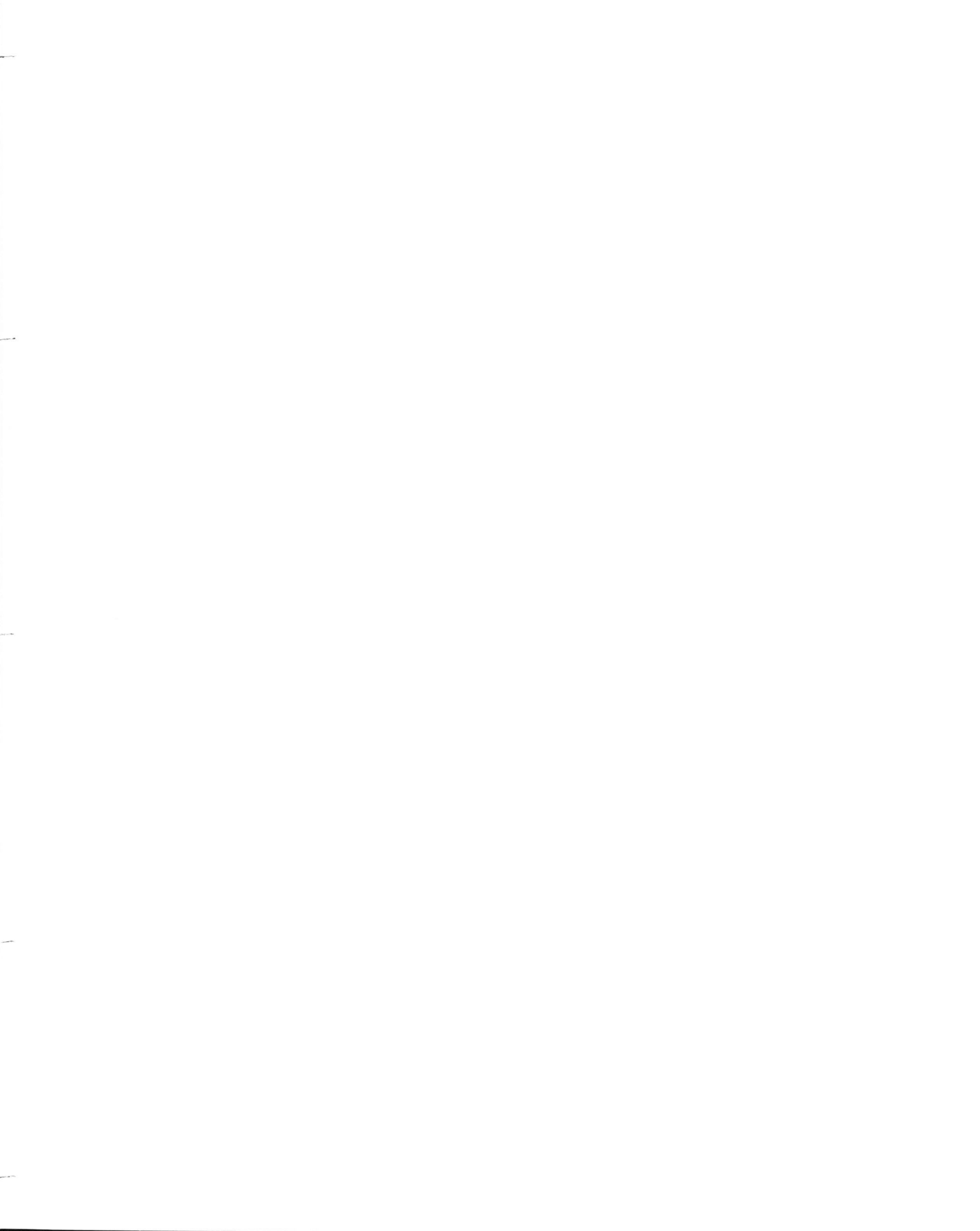
obtenidos era de un 50% y un 60%, respectivamente.

Se estudió la presencia de SODs en los peroxisomas y mitocondrias purificadas de caupí por EGPA (Fig. 17). En las mitocondrias de caupí, estaban presentes las isoenzimas Mn-SOD y Cu,Zn-SOD I. Sin embargo, en los peroxisomas purificados no se detectó actividad SOD en ninguno de los numerosos experimentos de aislamiento realizados. La distribución subcelular de SOD en hojas de *Vigna unguiculata* también era la misma cuando las plantas estaban noduladas con *Bradyrhizobium* sp. (resultados no incluidos). La ausencia de actividad SOD en peroxisomas de hojas de caupí sugiere que en estas plantas probablemente no tiene lugar la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en peroxisomas de hojas en condiciones normales y por lo tanto, cabría esperar un bajo metabolismo del oxígeno activado de peroxisomas de hojas de caupí. Por lo tanto, para investigar la posible participación de especies de oxígeno activado en el mecanismo del estrés salino a nivel de peroxisomas se decidió utilizar hojas de plantas de guisante (*Pisum sativum* L.), otra leguminosa donde en trabajos anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio se demostró la presencia de SOD en peroxisomas así como la generación de radicales libres superóxido en distintos lugares de estos orgánulos que, por lo tanto, tiene un metabolismo del oxígeno activado más intenso.

**Fig. 15.** a, Purificación de peroxisomas y mitocondrias de hojas de caupí en gradientes de sacarosa (35–60 %; p/v). b, Purificación de peroxisomas y mitocondrias de hojas de guisante en gradientes de Percoll (15–53 %; p/v). MIT, mitocondrias; PER, peroxisomas.







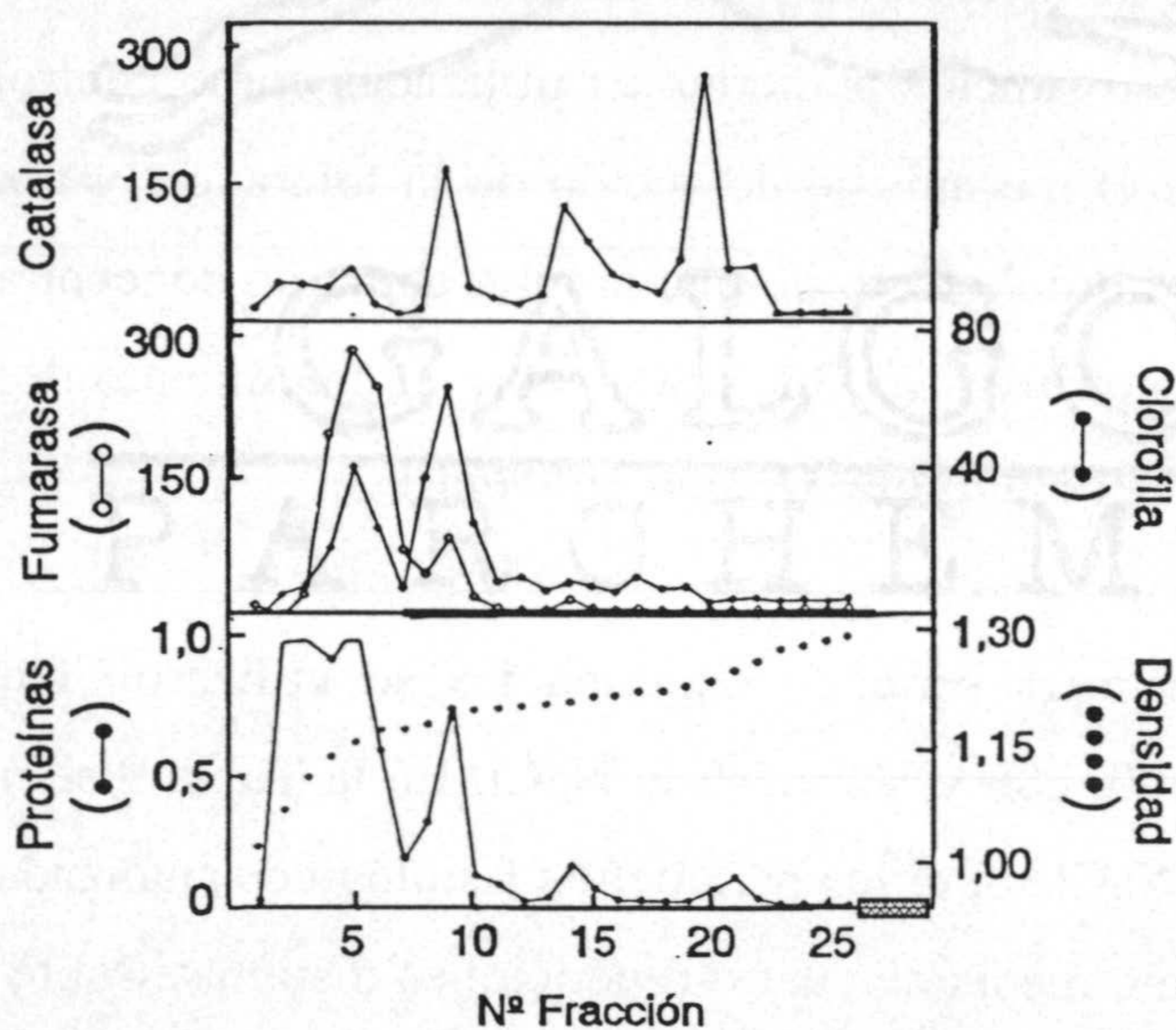
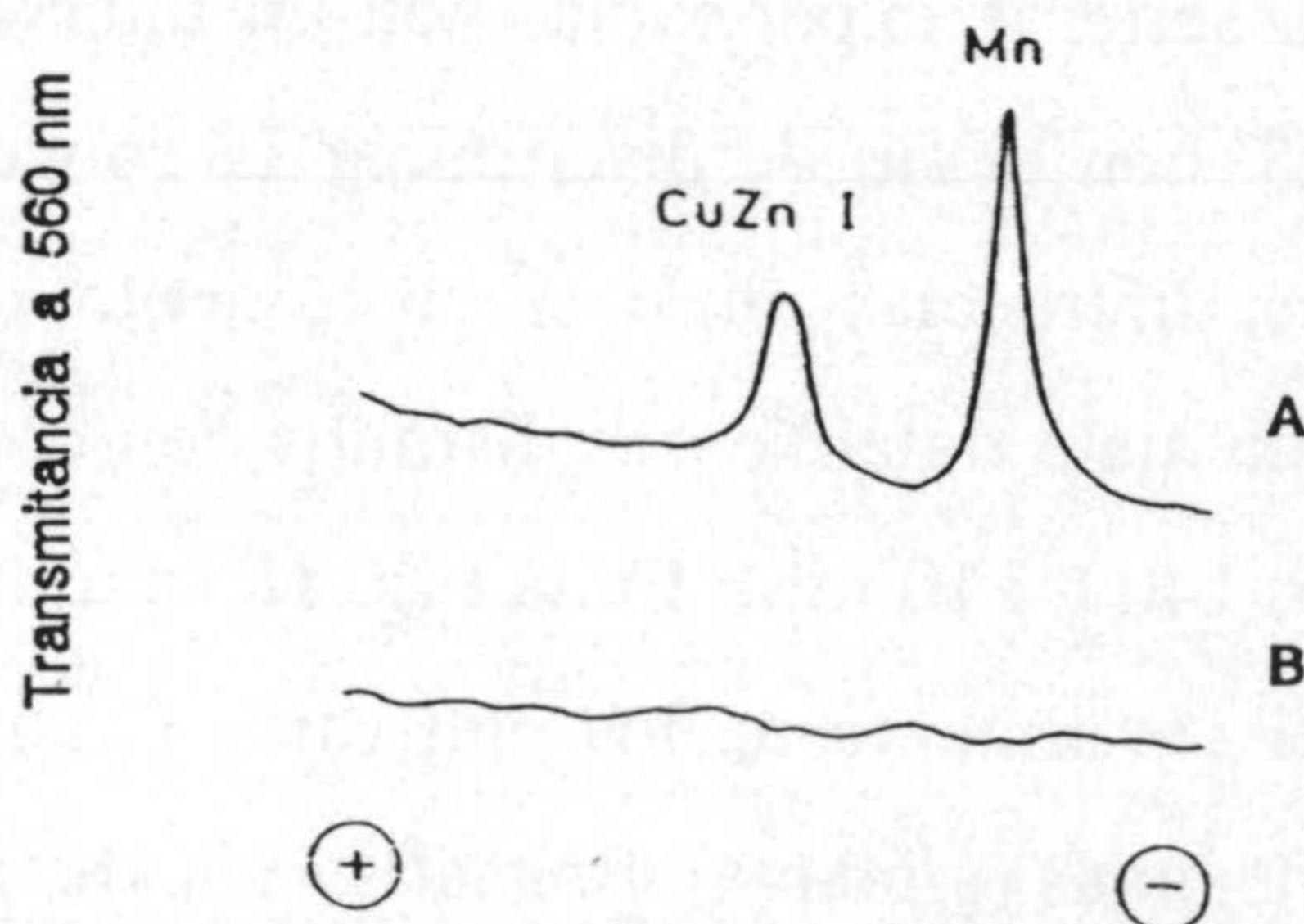


Fig. 16. Purificación de peroxisomas y mitocondrias de hojas de caupí. La actividad catalasa y fumarasa están expresadas en  $\text{nmoles} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ . Las proteínas y la clorofila en  $\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  y la densidad en  $\text{g/cm}^3$ .

Fig. 17. Distribución de actividad SOD en peroxisomas y mitocondrias purificadas de hojas de caupí (*Vigna unguiculata*). Los orgánulos se purificaron como se indicó en la Fig. 16. Antes de la electroforesis, las fracciones celulares se diluyeron con tampón fosfato 50 mM, pH 7,8, conteniendo Tritón X-100 (concentración final del 0,1%). Las SODs se separaron por EGPA y se localizaron en los geles por revelado enzimático. Los geles se registraron en un densitómetro, representándose la transmitancia de los geles a 560 nm. A, mitocondrias de hojas de *Vigna unguiculata* (fracciones 7-11). B, peroxisomas de hojas de *Vigna unguiculata* (fracciones 19-21).



## 2. EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CLORURO SÓDICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE GUISANTE.

Con el fin de seleccionar variedades relativamente tolerantes y sensibles al NaCl que respectivamente pudieran ser utilizadas como control y problema en los estudios sobre el mecanismo de acción de la tolerancia y toxicidad al NaCl, se realizó un estudio del efecto de una amplia gama de concentraciones de NaCl en las soluciones nutritivas (0–300 mM) sobre el crecimiento de cinco cultivares distintos de plantas de guisante (*Pisum sativum* L.).

En una primera serie de experiencias se utilizaron cinco tratamientos distintos: 0, 50, 100, 200 y 300 mM de NaCl. En la Tabla 9 se muestra el efecto de cada nivel de NaCl sobre los parámetros fisiológicos analizados, expresándose los resultados como media de cuatro repeticiones distintas. Sobre la base de estos resultados, se eligieron como plantas: control (relativamente tolerantes al NaCl) al cv Granada y problema (sensibles al NaCl) al cv Challis, ya que mostraban diferencias en los parámetros de crecimiento cuando se comparaban plantas tratadas con niveles altos de NaCl frente a plantas crecidas sin sal.

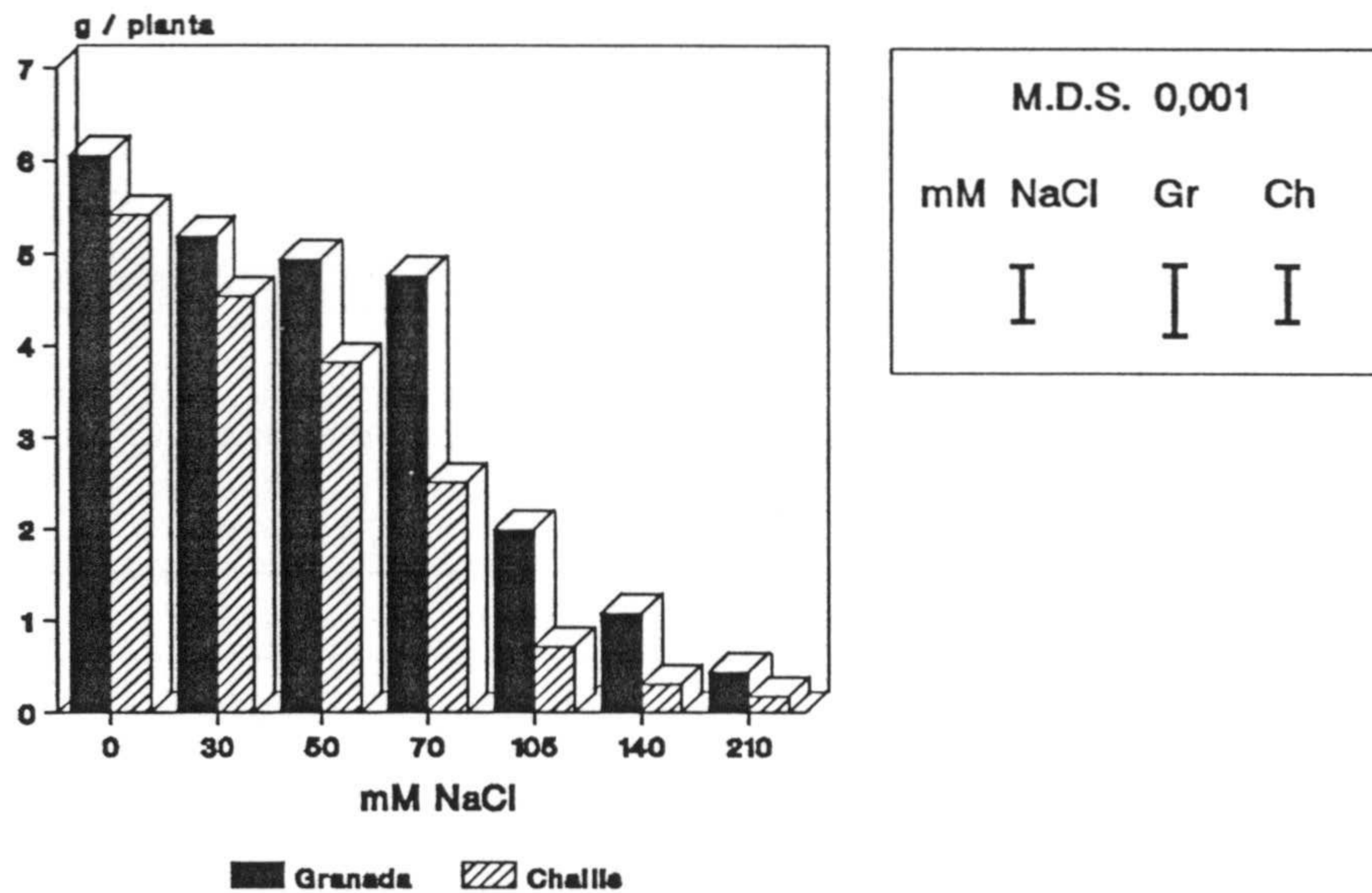
Una vez seleccionados el cultivar control y problema, se realizó una segunda serie de experiencias con un intervalo más estrecho de concentraciones de NaCl, con el fin de discriminar la concentración de NaCl que produjera las mayores diferencias entre el crecimiento del cultivar control y problema. Se utilizaron siete tratamientos distintos con concentraciones de NaCl de: 0, 30, 50, 70, 105, 140 y 210 mM. En la Fig. 18 se muestra el efecto de cada nivel de NaCl sobre el crecimiento de los cultivares Granada y Challis, expresado como peso fresco de hojas (g/planta). El análisis estadístico de los resultados obtenidos mostró que en el cultivar Challis se encontraban mayores diferencias significativas entre las concentraciones de NaCl 0 mM (control) y 70 mM, mientras que en el cultivar

Granada estas diferencias eran casi nulas. Sobre la base de estos resultados, se eligió la concentración de NaCl 70 mM en la solución nutritiva para efectuar estudios comparativos sobre el metabolismo del oxígeno activado y de los ureidos en peroxisomas de hojas de los dos cultivares.

**Tabla 9.** Efecto de distintos niveles de NaCl sobre el crecimiento de cinco cultivares de *Pisum sativum* L.

Cultivar	NaCl (mM)	AF	PSH	PST	PSR
Almota	0	367,42	0,815	0,596	0,431
	50	354,04	0,798	0,654	0,471
	100	255,23	0,596	0,444	0,457
	200	59,88	0,161	0,078	0,135
	300	48,86	0,163	0,089	0,085
Challis	0	315,10	0,658	0,596	0,431
	50	197,10	0,432	0,394	0,301
	100	169,71	0,421	0,360	0,297
	200	58,61	0,190	0,104	0,123
	300	42,01	0,149	0,073	0,069
Frescoroy	0	241,38	0,564	0,398	0,311
	50	149,45	0,359	0,246	0,263
	100	124,19	0,293	0,183	0,211
	200	44,95	0,168	0,065	0,088
	300	38,07	0,169	0,056	0,058
Granada	0	385,89	0,907	0,629	0,578
	50	344,08	0,858	0,755	0,731
	100	196,99	0,504	0,385	0,443
	200	129,95	0,361	0,176	0,263
	300	64,22	0,267	0,124	0,160
Lincoln	0	355,30	0,823	0,458	0,498
	50	282,15	0,666	0,403	0,543
	100	201,76	0,549	0,287	0,417
	200	81,28	0,239	0,088	0,198
	300	55,18	0,185	0,071	0,106

AF: área foliar (cm<sup>2</sup>/planta); PSH: peso seco hojas (g/planta); PST: peso seco tallos (g/planta); PSR: peso seco raíz (g/planta).



**Fig. 18.** Efecto de distintas concentraciones de NaCl sobre el crecimiento de dos variedades de guisante (Gr: Granada, y Ch: Challis) seleccionadas como tolerante y sensible al NaCl respectivamente. M.D.S.: Mínima Diferencia Significativa.

### 2.1. Efecto del NaCl sobre el contenido de Na, Cl, Fe, Cu, Mn y Zn en hojas de plantas de guisante.

En hojas de plantas de guisante tolerantes y sensibles al NaCl, tanto control como sometidas al NaCl 70 mM se llevó a cabo el análisis del contenido de sodio y cloruro así como de los micronutrientes Fe, Cu, Mn y Zn.

En la Tabla 10 se expresan los resultados obtenidos para el Na y el Cl<sup>-</sup>, observándose que en plantas sometidas al NaCl 70 mM presentaban un mayor acúmulo de Na y de Cl<sup>-</sup>, siendo aproximadamente unas setenta veces para el sodio y unas tres veces para el cloruro en ambos cultivares de guisante.

**Tabla 10.** Contenido de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  en hojas de plantas de *Pisum sativum* en ausencia y en presencia de NaCl.

Tratamiento	Na	$\text{Cl}^-$
	$\mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$ peso seco	
Cv tolerante		
Control	$0,67 \pm 0,04$	$0,13 \pm 0,01$
NaCl 70 mM	$50,78 \pm 3,17$	$0,40 \pm 0,04$
Cv sensible		
Control	$0,59 \pm 0,03$	$0,10 \pm 0,002$
NaCl 70 mM	$40,24 \pm 0,47$	$0,35 \pm 0,02$

Se presenta los valores de la media  $\pm$  SEM de cinco lotes distintos de plantas control y tratadas con NaCl

En la Tabla 11 se expresa el contenido de Fe, Cu, Mn y Zn para ambos cultivares, y tanto las controles como las sometidas al NaCl 70 mM no muestran diferencias significativas por el efecto del NaCl.

**Tabla 11.** Contenido de micronutrientes en hojas de plantas de *Pisum sativum* crecidas en ausencia y en presencia de NaCl.

Tratamiento	Fe	Cu	Mn	Zn
	$\text{nmol} \times \text{g}^{-1}$ peso seco			
Cv tolerante				
Control	$39,46 \pm 3,04$	$2,81 \pm 0,16$	$32,36 \pm 2,00$	$18,31 \pm 0,62$
NaCl 70 mM	$35,36 \pm 0,36$	$2,66 \pm 0,06$	$33,09 \pm 1,82$	$18,77 \pm 0,77$
Cv sensible				
Control	$34,29 \pm 1,79$	$2,34 \pm 0,16$	$30,91 \pm 1,64$	$14,62 \pm 0,62$
NaCl 70 mM	$34,46 \pm 0,89$	$2,34 \pm 0,05$	$32,73 \pm 1,82$	$16,77 \pm 0,62$

Se presenta los valores de la media  $\pm$  SEM de cinco lotes distintos de plantas control y tratadas con NaCl.

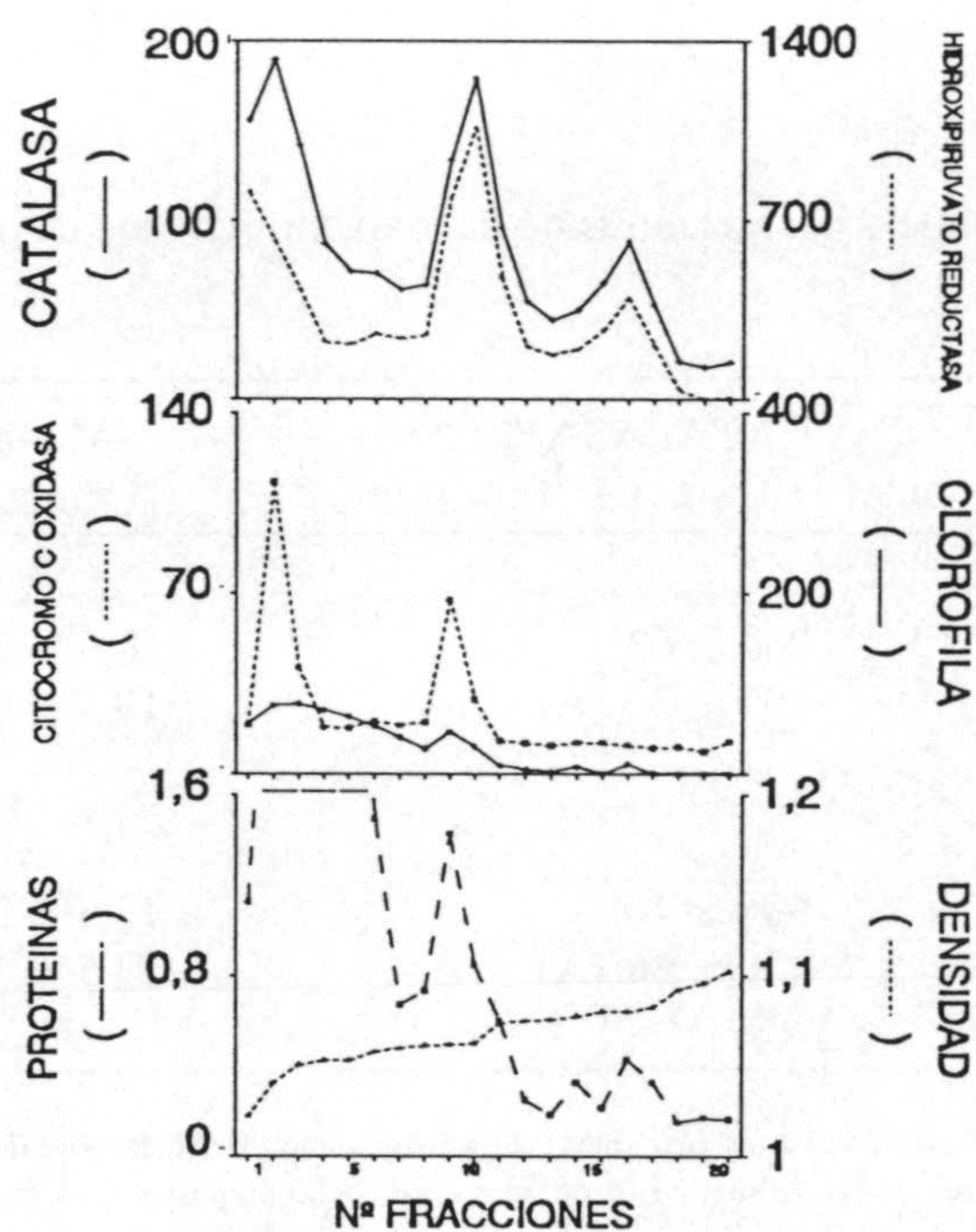
### 3. EFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE EL METABOLISMO DEL OXÍGENO ACTIVADO EN PEROXISOMAS.

A partir de hojas de guisante se procedió al aislamiento de orgánulos celulares según el método descrito en Material y Métodos. La caracterización de los gradientes de Percoll (Fig. 15b) obtenidos se hizo mediante el uso de marcadores enzimáticos específicos de cada orgánulo, y según su distribución a lo largo del gradiente se observó que las mitocondrias tenían su máximo en la fracción 9, como lo indicó el marcador citocromo c oxidasa, y una densidad media de equilibrio de  $1,062 \text{ g/cm}^3$  (Fig. 19). Respecto a los peroxisomas, estos se separaron en la fracción 16, máximo de actividad de catalasa e hidroxipiruvato reductasa y tenían una densidad media de equilibrio de  $1,081 \text{ g/cm}^3$  (Fig. 19). En ciertas ocasiones, la fracción de mitocondrias aparecía contaminada con actividades peroxisomales, debido probablemente a peroxisomas parcialmente rotos que eluían junto con la fracción de mitocondrias (Palma, 1988). La mayor parte de los plastidios fueron eliminados en la primera etapa de la centrifugación diferencial y los cloroplastos que habían quedado rotos se localizaron en las bandas superiores del gradiente de Percoll, como lo evidencia el pico de clorofila que aparece en las primeras fracciones.

Por lo tanto, la fracción de peroxisomas purificados se encontraba bien separada de la fracción mitocondrial, lo que permitió abordar los estudios, a nivel subcelular, del efecto de la salinidad sobre dichos orgánulos. La integridad de los peroxisomas de hojas purificados por este método oscilaba entre un 70–80 %.

Se estudió la evaluación de las actividades enzimáticas xantina oxidoreductasa generadora de radicales  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , y glicolato oxidasa y urato oxidasa productoras de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Igualmente, se determinó la actividad de las enzimas catalasa y Mn-SOD, que desarrollan una función protectora en los peroxisomas

frente al  $\text{H}_2\text{O}_2$  y al  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , respectivamente, y también se ensayó la actividad de la hidroxipiruvato reductasa como indicadora del efecto de la salinidad sobre el metabolismo peroxisomal. Por otra parte, también se analizaron los niveles de generación de radicales  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por las membranas peroxisomales, así como los efectos del estrés salino sobre la concentración endógena de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Como indicador de posibles daños oxidativos provocados por la salinidad en las membranas peroxisomales, se determinó la tasa de peroxidación lipídica de dichas membranas.



**Fig. 19.** Purificación de peroxisomas y mitocondrias de hojas de *Pisum sativum* por centrifugación en gradiente de densidad de Percoll (15-53%; v/v). La actividad catalasa y citocromo c oxidasa viene dada en  $\text{nmol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ , la HPRasa en  $\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ . Las proteínas en  $\text{mg} \times \text{ml}^{-1}$ , la clorofila en  $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$  y la densidad en  $\text{g}/\text{cm}^3$



En peroxisomas de ambos cultivares, la actividad catalasa resultó disminuida por la salinidad, mientras que la actividad Mn-SOD no mostró variaciones significativas (Tabla 12). Por el contrario, la glicolato oxidasa, urato oxidasa e hidroxipiruvato oxidasa mostraron un comportamiento distinto en plantas tolerantes y sensibles al NaCl. La glicolato oxidasa era estimulada por el NaCl en el cultivar tolerante, mientras que en el cultivar sensible el NaCl no producía variaciones estadísticamente significativas en su actividad (Tabla 13). Sin embargo, la urato oxidasa y la hidroxipiruvato reductasa (HPRasa) eran inhibidas por el NaCl sólo en el cultivar sensible.

**Tabla 12.** Actividades enzimáticas del metabolismo del oxígeno activado en peroxisomas de plantas control y tratadas con NaCl.

Tratamiento	CATALASA nmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x mg <sup>-1</sup> prot x min <sup>-1</sup>	Mn-SOD U x mg <sup>-1</sup> prot
<b>Cv tolerante</b>		
Control	856 ± 63	14,4 ± 2,3
NaCl 70 mM	497 ± 20 (A)	19,5 ± 2,8 (NS)
<b>Cv sensible</b>		
Control	906 ± 40	17,3 ± 2,3
NaCl 70 mM	479 ± 36 (A)	23,5 ± 3,3 (NS)

Las actividades se determinaron en sobrenadantes (matrices) de peroxisomas de hojas obtenidos por choque osmótico y centrifugación. Se presenta los valores de la media ± SEM de, al menos, ocho preparaciones distintas de peroxisomas tanto de plantas control como tratadas con NaCl. Las diferencias respecto a los valores control eran significativas para: P<0,001 (A); NS, diferencias no significativas (P<0,1).

**Tabla 13.** Actividades enzimáticas del metabolismo del oxígeno activado en peroxisomas de plantas control y tratadas con NaCl.

Tratamiento	GLICOLATO OXIDASA	URATO OXIDASA	HPRasa
Cv tolerante			
Control	1074 ± 223	4,74 ± 0,30	8,93 ± 1,13
NaCl	2541 ± 154 (A)	5,06 ± 0,59	10,9 ± 0,77 (NS)
Cv sensible			
Control	2333 ± 625	8,41 ± 0,60	11,7 ± 0,67
NaCl	3097 ± 252 (NS)	3,79 ± 0,59 (A)	9,10 ± 0,75 (C)

Las actividades se determinaron en sobrenadantes (matrices) de peroxisomas de hojas obtenidos por choque osmótico y centrifugación. La actividad glicolato oxidasa se expresa en  $\text{nmol O}_2 \times \text{mg}^{-1} \text{prot} \times \text{min}^{-1}$ , la urato oxidasa en  $\text{nmol ác.úrico} \times \text{mg}^{-1} \text{prot} \times \text{min}^{-1}$ , y la HPRasa en  $\mu\text{mol NADH} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ . Se presentan los valores de la media  $\pm$  SEM de, al menos ocho preparaciones distintas de peroxisomas tanto de plantas control como tratadas con NaCl. Las diferencias respecto a los valores control eran significativas para:  $P < 0,001$  (A);  $P < 0,05$  (C). NS, diferencias no significativas ( $P < 0,1$ ).

Las actividades específicas de xantina oxidoreductasa (XOD y XDH) en peroxisomas de plantas control y tratadas con NaCl se presentan en la Tabla 14. En general, la actividad XOD (forma O) era más alta (aproximadamente en un 60 %) que la XDH (forma D), y el tratamiento con NaCl afectaba a ambas formas de manera distinta dependiendo del cultivar. La actividad XOD era más fuertemente inhibida (aproximadamente un 70 %) en plantas tolerantes al NaCl, mientras que la actividad XDH era deprimida en una cuantía similar en las plantas sensibles. Sin embargo, en ningún caso la disminución de la actividad XOD o XDH fue acompañada por un aumento paralelo en la actividad de la forma correspondiente, XDH o XOD, respectivamente. A pesar de esto, llamó bastante la atención el alto grado de dispersión de los valores obtenidos de actividad XOD y XDH, que fluctuaban considerablemente de una preparación a otra de peroxisomas. Esto hizo pensar en una posible participación de proteasas favoreciendo la interconversión de la forma D (XDH) en la forma O (XOH). El estudio de la presencia de actividad proteolítica se llevó a cabo y los resultados se presentan en el apartado 7.

**Tabla 14.** Actividad xantina oxidoreductasa (formas O y D) en peroxisomas de plantas control y tratadas con NaCl.

Tratamiento	XOD	XDH
	nmol ácido úrico x mg prot <sup>-1</sup> x min <sup>-1</sup>	
Cv tolerante		
Control	13,2 ± 2,33	4,20 ± 0,60
NaCl 70 mM	4,29 ± 0,33 (B)	3,40 ± 0,18
Cv sensible		
Control	5,61 ± 0,84	7,08 ± 1,47
NaCl 70 mM	3,54 ± 0,33 (D)	2,19 ± 0,37 (B)

Las actividades fueron determinadas en peroxisomas intactos purificados de hojas de guisante. Los resultados representan el valor medio ± SEM de, al menos, once preparaciones distintas de peroxisomas tanto de las plantas control como problema. Las diferencias respecto a los valores control eran significativas para: P<0,01 (B); P<0,05 (D).

Los resultados de los estudios de generación de radicales libres O<sub>2</sub><sup>•-</sup> por membranas de peroxisomas de plantas tratadas con NaCl se muestran en la Tabla 15. En membranas peroxisomales, la tasa de producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> dependiente de NADH era muy parecida en las plantas tolerantes y las sensibles crecidas con NaCl, en comparación con las plantas control. En peroxisomas tratados con NaCl, la concentración endógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era significativamente más baja que en los peroxisomas de las plantas control (Tabla 15). Sin embargo, la peroxidación lipídica de las membranas, medida como formación de malondialdehído, no experimentaba variaciones como consecuencia del cultivo de las plantas con NaCl.

**Tabla 15.** Producción de superóxido, peroxidación lipídica y concentración de peróxido de hidrógeno en peroxisomas de plantas control y tratadas con NaCl.

Tratamiento	nmol $O_2^{\cdot-}$ x $mg^{-1}$ prot x $min^{-1}$	nmol MDA x $mg^{-1}$ prot	nmol $H_2O_2$ x $mg^{-1}$ prot
Cv tolerante			
Control	5,93 ± 0,60	1,02 ± 0,15	3,08 ± 0,37
NaCl 70 mM	4,25 ± 0,63 (NS)	1,47 ± 0,28	2,10 ± 0,10 (B)
Cv sensible			
Control	4,67 ± 0,20	1,59 ± 0,25	2,54 ± 0,21
NaCl 70 mM	4,85 ± 0,56	1,06 ± 0,25	1,71 ± 0,09 (B)

La generación de radicales superóxido y la peroxidación lipídica fue determinada en membranas peroxisomales, y la concentración de  $H_2O_2$  en peroxisomas intactos. Para la producción de superóxido, el NADH se adicionó a la mezcla de reacción que contenía alrededor de 10  $\mu$ g de proteínas de membranas peroxisomales. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de, al menos, seis preparaciones distintas de peroxisomas de plantas control y tratadas con NaCl. Las diferencias respecto a los valores control fueron significativas para:  $P < 0,01$  (B). NS, diferencias no significativo ( $P < 0,1$ ).

#### 4. EFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE EL METABOLISMO DE LOS UREIDOS EN PEROXISOMAS.

La enzima xantina oxidoreductasa y urato oxidasa, presentes en peroxisomas de hojas de guisante, están implicadas en el metabolismo de los ureidos, y como se ha indicado en el apartado anterior su actividad enzimática resulta afectada por el estrés salino.

La ubicación de estas enzimas en peroxisomas implica la presencia en estos orgánulos de las purinas xantina y ácido úrico (substratos de la xantina oxidoreductasa y urato oxidasa, respectivamente), así como del ureido alantoína, producto de la reacción de la urato oxidasa. Por ello, se llevaron a cabo experiencias encaminadas a la detección y cuantificación de estos metabolitos en

los peroxisomas, así como el estudio de la influencia del estrés salino sobre los niveles peroxisomales de xantina, ácido úrico y alantoína, en los dos cultivares de guisante.

Tras múltiples experiencias preliminares, se puso a punto un método de HPLC que permite la separación y cuantificación de mezclas de alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina.

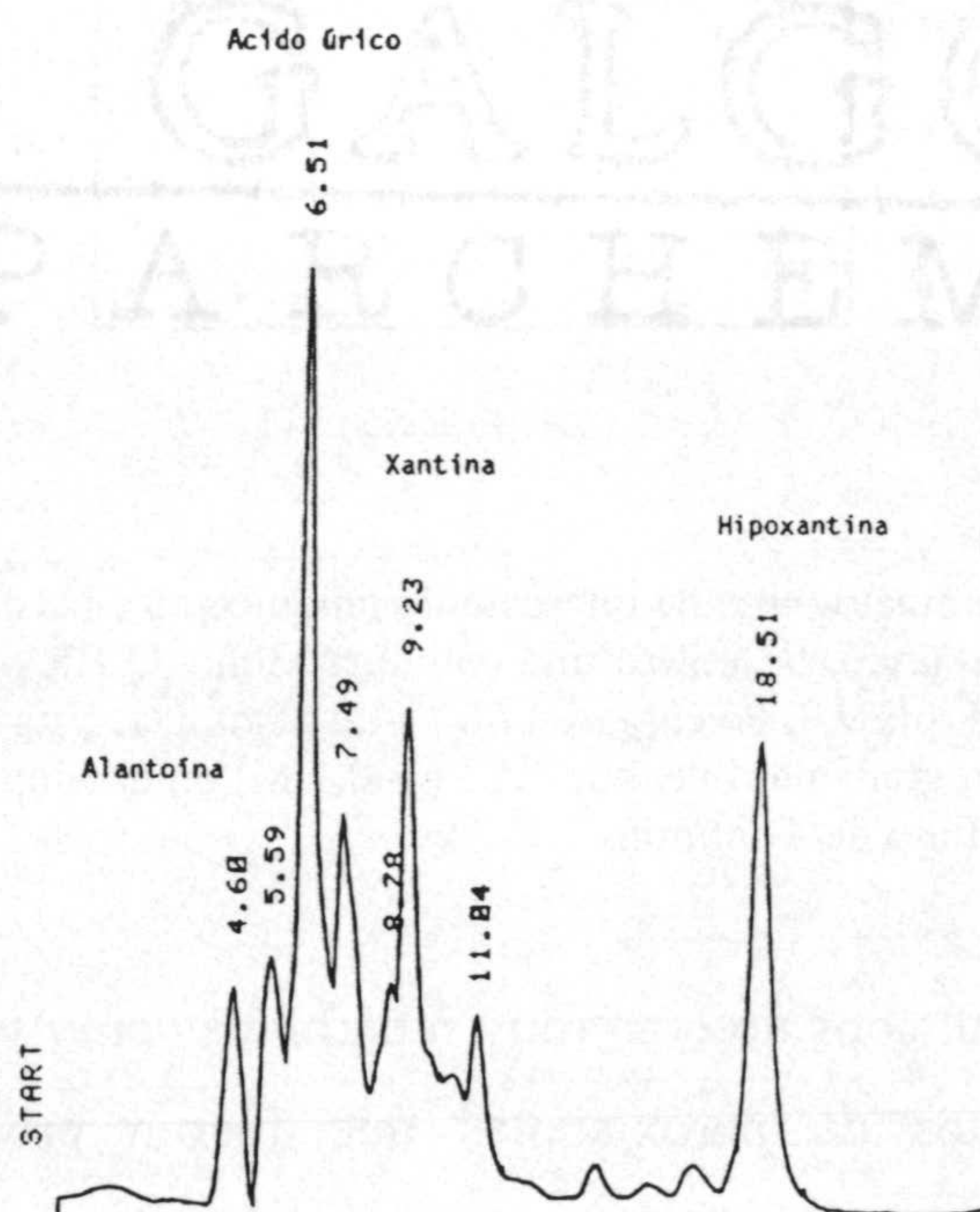
En la Fig. 20 se presenta un cromatograma obtenido con patrones de estos metabolitos. Adicionalmente, se puso a punto otra técnica de HPLC unas 20–30 veces más sensible en un cromatógrafo con detector de diodos en cadena, con una columna de 100 x 2,1 mm y con un flujo de 0,2 ml/min, frente a los 2 ml/min del método anterior. En estas condiciones los tiempos de retención de las purinas y de la alantoína eran los siguientes:

Alantoína.....	1,96 min
Ácido úrico.....	2,42 min
Hipoxantina.....	3,55 min
Xantina.....	3,60 min

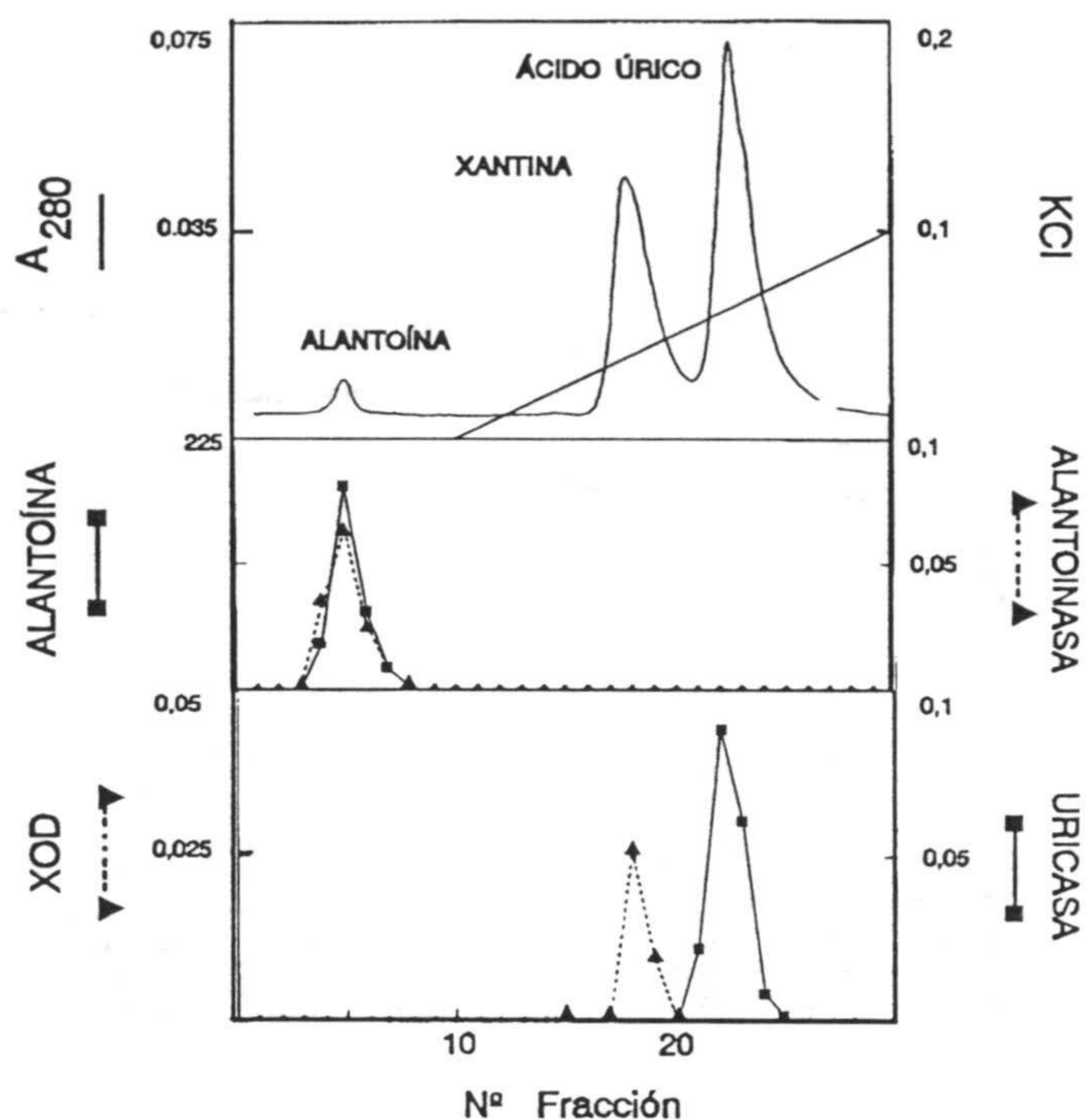
Con vista al análisis preparativo de estos metabolitos peroxisomales también se diseñó un método de FPLC que, después de numerosas experiencias de puesta a punto utilizando distintas columnas a distintos pH, permitió la separación de mezclas de xantina, ácido úrico y alantoína, y la recuperación en fracciones separadas de cada uno de estos compuestos (Fig. 21).

Para el análisis por HPLC de las muestras peroxisomales, se partió de aproximadamente de 300 µg de proteínas peroxisomales por ensayo. Cuando las muestras pretratadas, como se indicó en Material y Métodos, se analizaron por

HPLC se encontraron concentraciones muy bajas de purinas y alantoína, casi en el límite de detección del método. Sólo se identificó claramente la presencia de ácido úrico y xantina y, posiblemente, de alantoína, aunque esto no se pudo demostrar debido a las múltiples interferencias producidas a 224 nm por los reactivos y componentes de las muestras en la zona de la alantoína en los cromatogramas. Los niveles de ácido úrico y de xantina detectados eran de aproximadamente 20 µg/mg proteína peroxisomal.



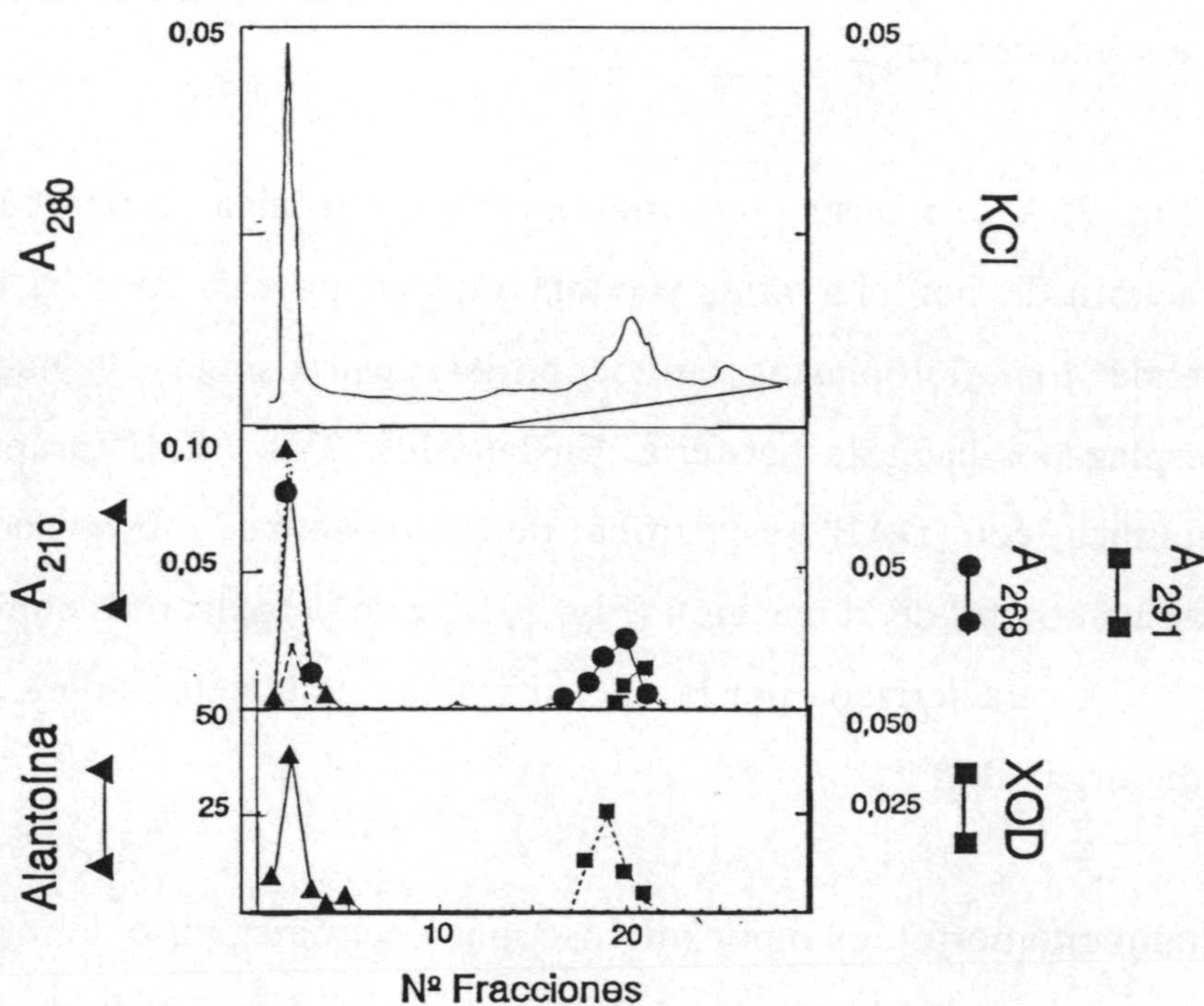
**Fig. 20.** Separación de alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina por HPLC en un cromatógrafo líquido Hewlett-Packard 1080-B, utilizando una columna de 200 x 4,6 mm rellena con "Hypersil" de 10 µm C-8. La fase móvil estaba constituida por una mezcla 1:1 de citrato-acetato a pH 4,75 y el flujo era de 2 ml/min. Se utilizaron concentraciones de patrones de 1-10 mg/l, inyectándose volúmenes de muestra de 10-20 µl.



**Fig. 21.** Separación por cromatografía de intercambio aniónico en un sistema FPLC de mezclas de alantoína, xantina y ácido úrico. Se utilizó una columna Mono-Q HR 5/5 equilibrada en tampón etanolamina-HCl 20 mM, pH 9,0. Se cargaron 50  $\mu$ g de alantoína, 5  $\mu$ g de ácido úrico, y 5  $\mu$ g de xantina y se eluyó con un gradiente lineal de KCl (0-0,1 M) en el tampón anterior, recogiendo fracciones de 1 ml a un flujo de 1 ml/min.

Sin embargo, los resultados no eran muy repetitivos como se pudo comprobar en los 30 lotes distintos de peroxisomas que fueron procesados por HPLC, probablemente debido tanto a la baja concentración de estos metabolitos en las muestra empleadas como al método seguido para el pretratamiento de las muestras. Por esta razón, no se pudo llevar a cabo el estudio comparativo del efecto del estrés salino sobre las concentraciones peroxisomales de purinas y alantoína. Por lo que se refiere al método de FPLC, cuando las muestras de peroxisomas pretrados se cargaron en la columna Mono-Q (aproximadamente 400  $\mu$ g de

proteínas peroxisomales) y se analizaron por HPLC y por ensayos bioquímicos (concentración de alantoína y actividades xantina oxidasa y urato oxidasa), no fue posible detectar la presencia de alantoína, xantina, hipoxantina o ácido úrico. Únicamente se localizaron algunos de estos metabolitos por ensayos bioquímicos, cuando se fraccionaron por FPLC los precipitados particulados de 12.000 g, enriquecidos en peroxisomas y mitocondrias (Fig. 22), esto es, las muestras más concentradas antes de su purificación por centrifugación en gradientes de densidad.



**Fig. 22.** Separación por cromatografía de intercambio aniónico en un sistema FPLC del precipitado de 12.000 g. Se utilizó una columna Mono-Q HR 5/5 equilibrada en tampón etanolamina-HCl 20 mM, pH 9,0. Se eluyó con un gradiente lineal de KCl (0-0,05 M) en el tampón anterior, recogiendo fracciones de 1 ml a un flujo de 1 ml/min.



## 5. EFECTO DEL CLORURO SÓDICO SOBRE LA ULTRAESTRUCTURA CELULAR DE HOJAS DE GUISANTE.

En la Fig. 23A se muestra una foto al microscopio óptico de un corte transversal de una hoja de guisante, donde se aprecia la epidermis superior e inferior al igual que el mesófilo, que constituye el tejido fotosintético, donde se encuentra el parénquima en empalizada y el parénquima lagunar o esponjoso. El parénquima en empalizada se caracteriza por estar formado por células alargadas que contienen numerosos cloroplastos y que se disponen regularmente en una o varias capas. El parénquima lagunar, por el contrario, se caracteriza por presentar grandes espacios intercelulares.

En la Fig. 25A se muestra una micrografía electrónica de una célula de mesófilo, caracterizada por una gran vacuola que ocupa casi todo el espacio celular, y donde los cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y núcleo se encuentran desplazados hacia la periferia. En las Figs. 23B y 23C se aprecia la tinción citoquímica con DAB, específica de peroxisomas, observándose la diferencia entre un control de la reacción (Fig. 23B) y un peroxisoma con reacción positiva (Fig. 23C), caracterizada por la intensificación de la densidad electrónica de la matriz del orgánulo.

El estudio citomorfológico por microscopía electrónica puso de manifiesto diversas alteraciones producidas por el NaCl en la ultraestructura de la hoja, particularmente en las membranas y en la estructura tilacoidal de los cloroplastos (Fig. 24A) que resultaban considerablemente desorganizados en las hojas tratadas con NaCl (Fig. 25B y 26). La ultraestructura de las mitocondrias y de los peroxisomas (Fig. 24B y 24C) aparentemente no resultó afectada por el NaCl (Fig. 25B y 26), y el efecto citomorfológico de esta sal era esencialmente el mismo en ambos cultivares de *Pisum sativum* L.

Por otra parte, se llevó a cabo un recuento de la población de peroxisomas, mitocondrias y cloroplastos) en el cultivar sensible y en el tolerante (Tabla 16), observándose un número similar de orgánulos en plantas tratadas y no con NaCl, no existiendo diferencias significativas.

**Tabla 16.** Efecto del NaCl sobre el número de peroxisomas, mitocondrias y cloroplastos de células de hojas de guisante.

Tratamiento	PEROXISOMAS	MITOCONDRIAS	CLOROPLASTOS
Cv tolerante			
Control			
NaCl 70 mM	1,79 ± 0,14	5,62 ± 0,27	7,85 ± 0,32
	1,72 ± 0,12	4,97 ± 0,23	6,03 ± 0,31
Cv sensible			
Control	1,81 ± 0,12	7,21 ± 0,30	8,70 ± 0,31
NaCl 70 mM	1,77 ± 0,12	5,20 ± 0,20	7,00 ± 0,27

Los valores representan la media ± SEM de los orgánulos contados en al menos cuarenta células distintas elegidas al azar de plantas tratadas y no tratadas con NaCl.

Se efectuaron estudios citométricos sobre micrografías electrónica de hojas de los cultivares tratados y no tratados con NaCl (Tabla 17). Al igual que en el recuento de población de orgánulos celulares, no se observaron diferencias significativas a causa del tratamiento con el NaCl. Se determinó el diámetro medio de los peroxisomas de hojas de guisante que resultó ser de 1,48 µm, valor de un orden similar a los diámetros descritos para los peroxisomas de hojas de otras plantas.

**Tabla 17.** Citometría de orgánulos celulares en hojas de plantas de guisante.

Tratamiento	Peroxisomas	Mitocondrias	Cloroplastos
Cv tolerante			
Control	1,71 ± 0,14	0,68 ± 0,07	12,65 ± 1,31
NaCl 70 mM	1,50 ± 0,16	0,51 ± 0,03	11,68 ± 0,69
Cv sensible			
Control	1,62 ± 0,19	0,56 ± 0,06	11,78 ± 0,76
NaCl 70 mM	2,11 ± 0,16	0,49 ± 0,03	12,39 ± 0,47

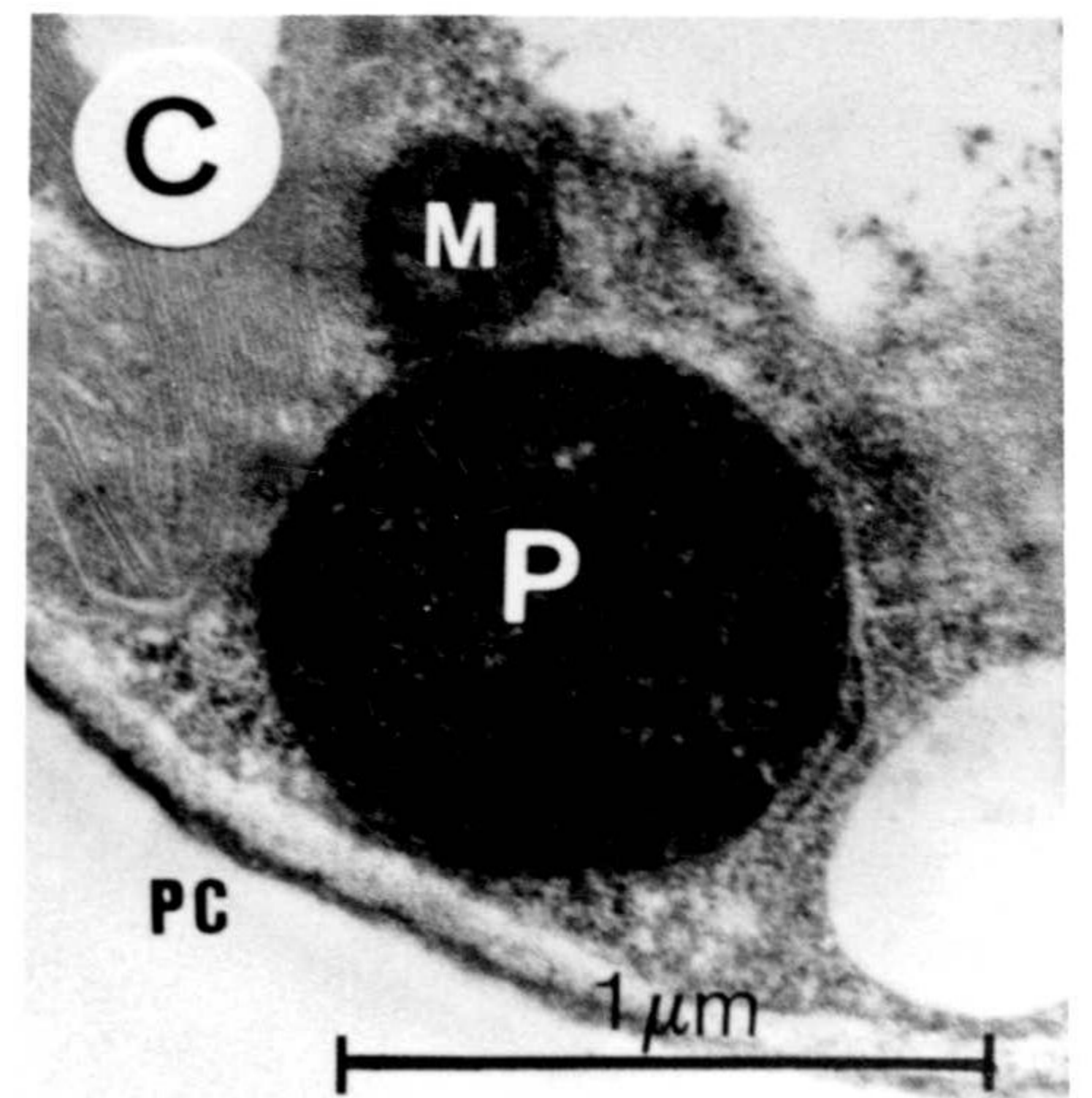
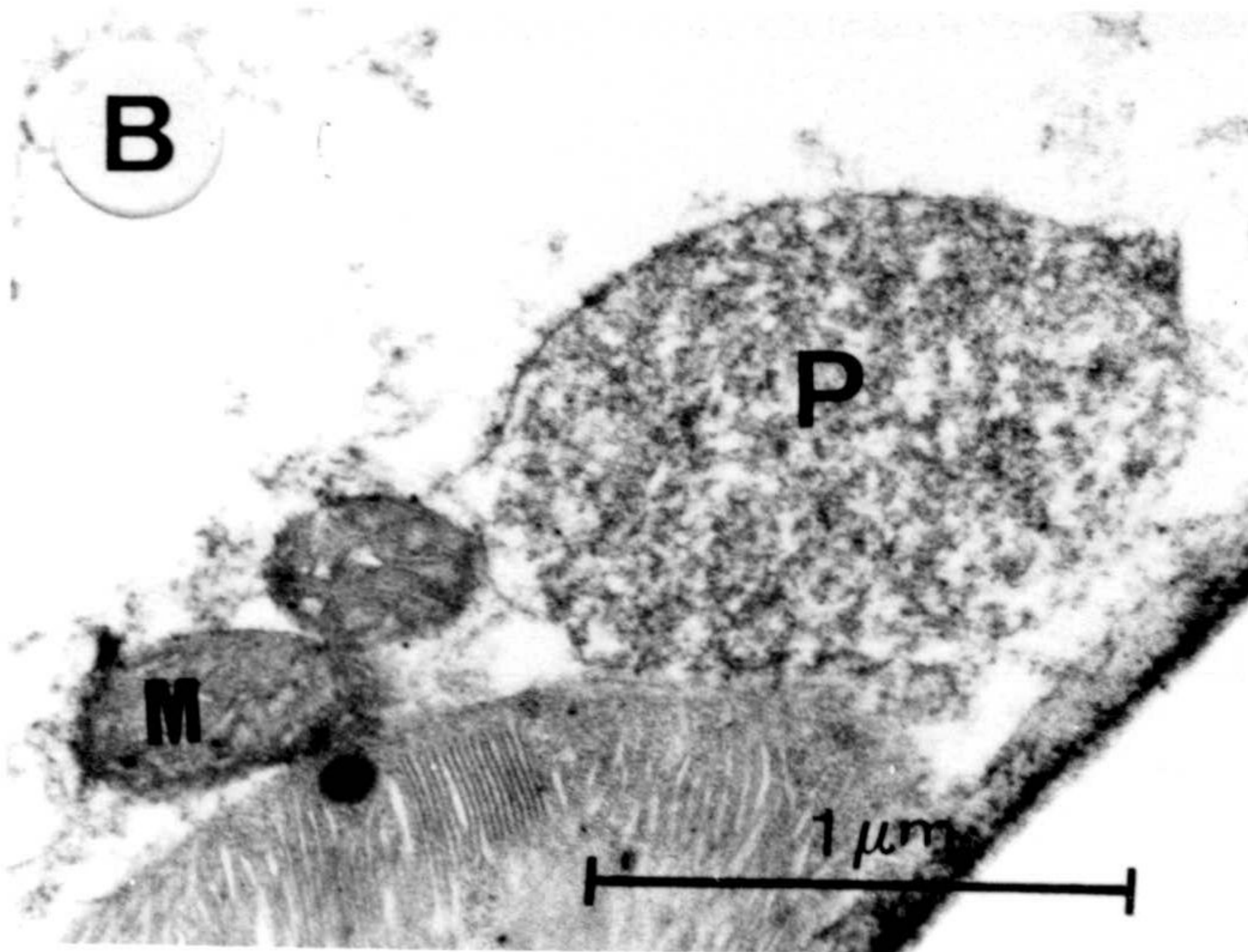
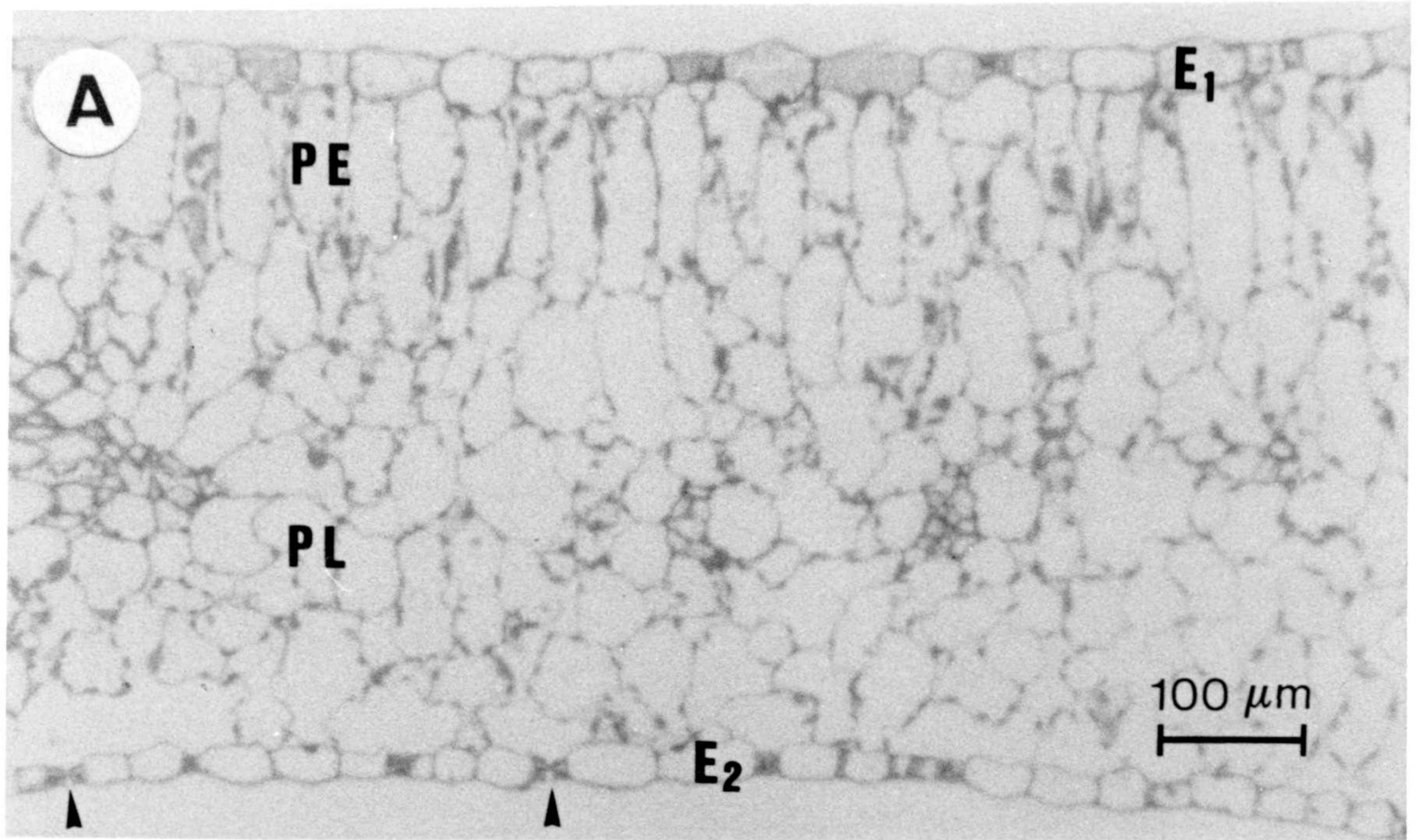
Los resultados vienen dados en  $\mu\text{m}^2$  y representan la media  $\pm$  SEM de al menos treinta medidas.

**Fig. 23.** A, Micrografía de un corte transversal de hoja de guisante (x 125). B y C, Tinción citoquímica de peroxisomas con DAB, específica de catalasa (x 32.500). PE: parénquima en empalizada; PL: parénquima lagunar; E<sub>1</sub>: epidermis superior; E<sub>2</sub>: epidermis inferior; y, ▶: estomas.

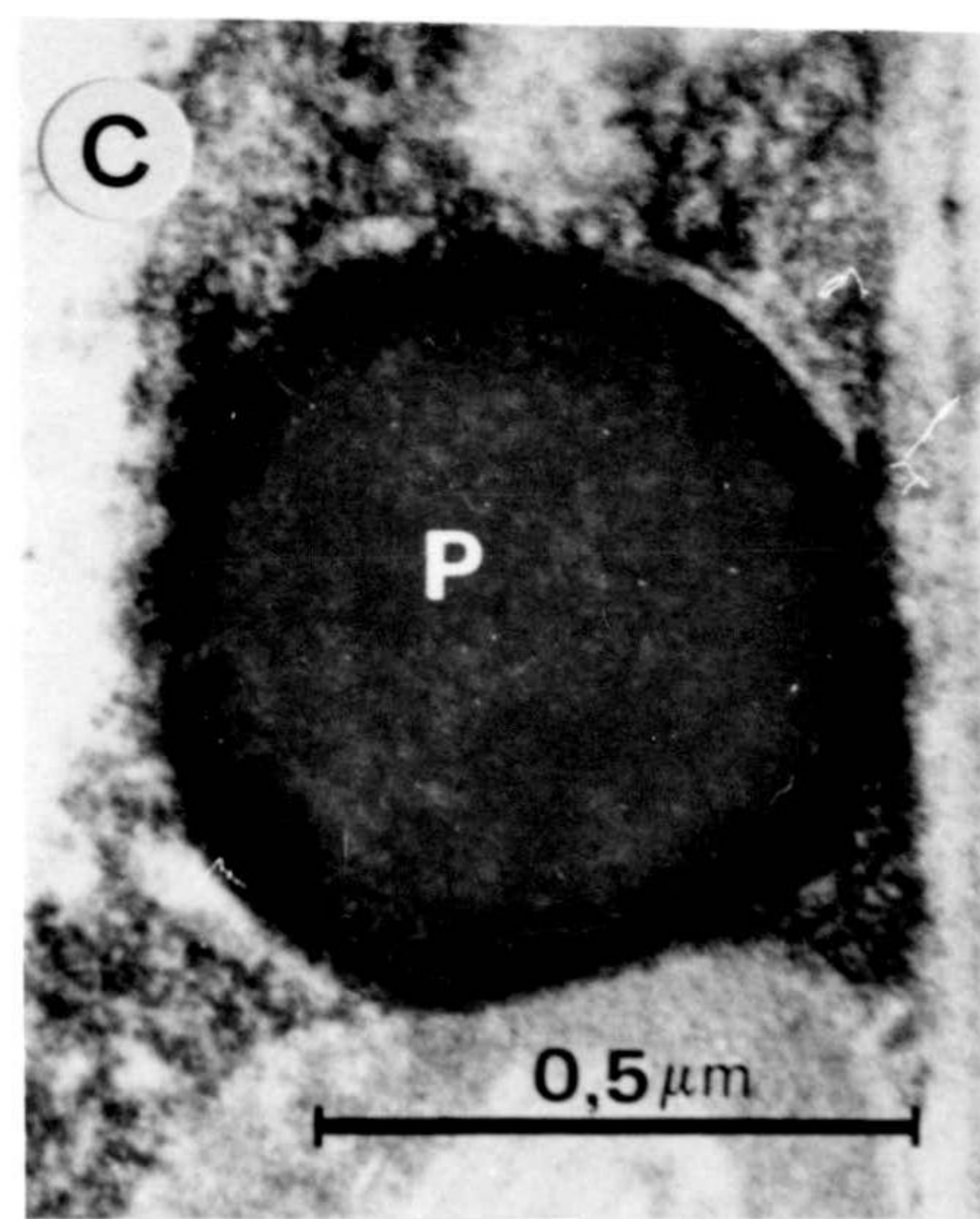
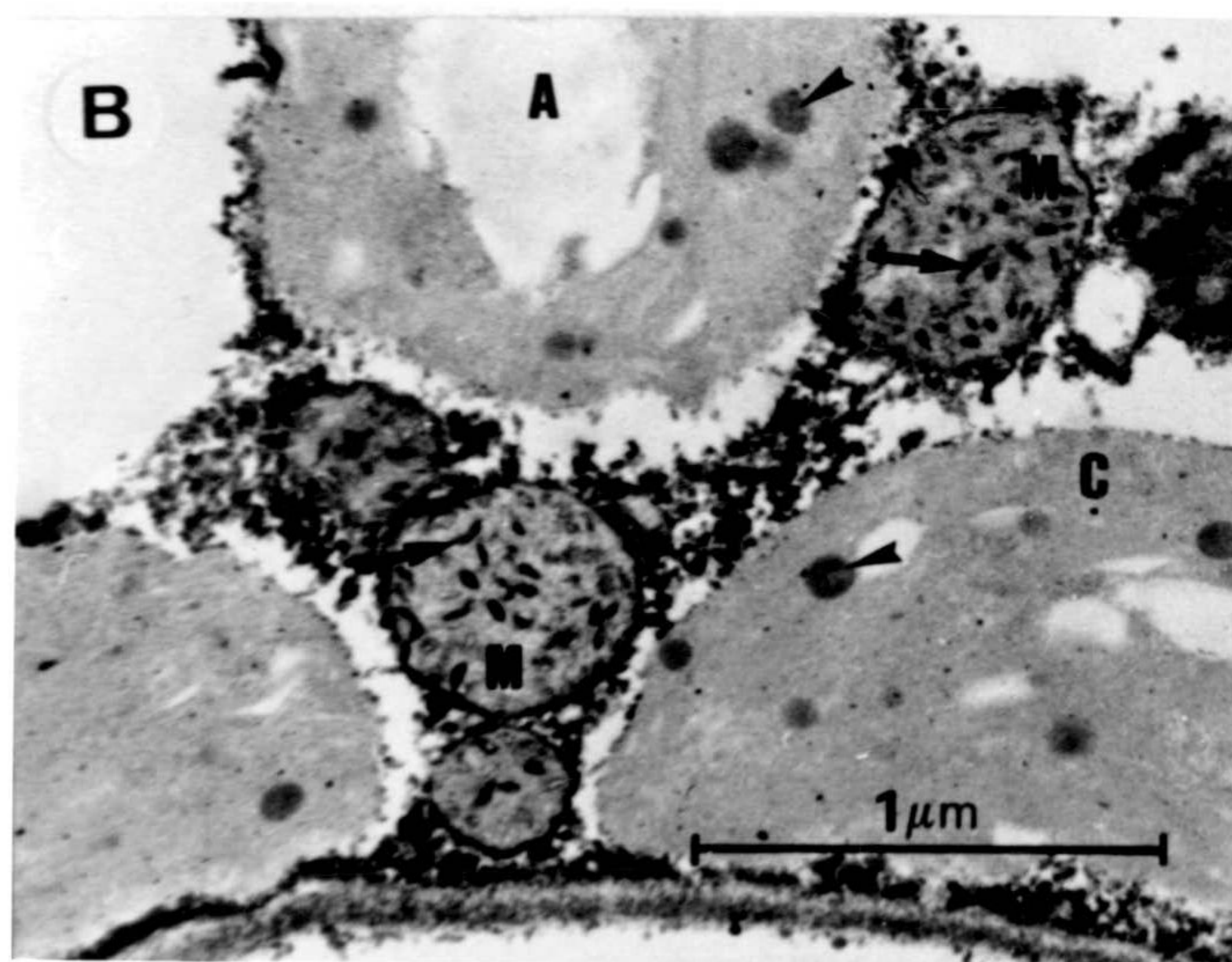
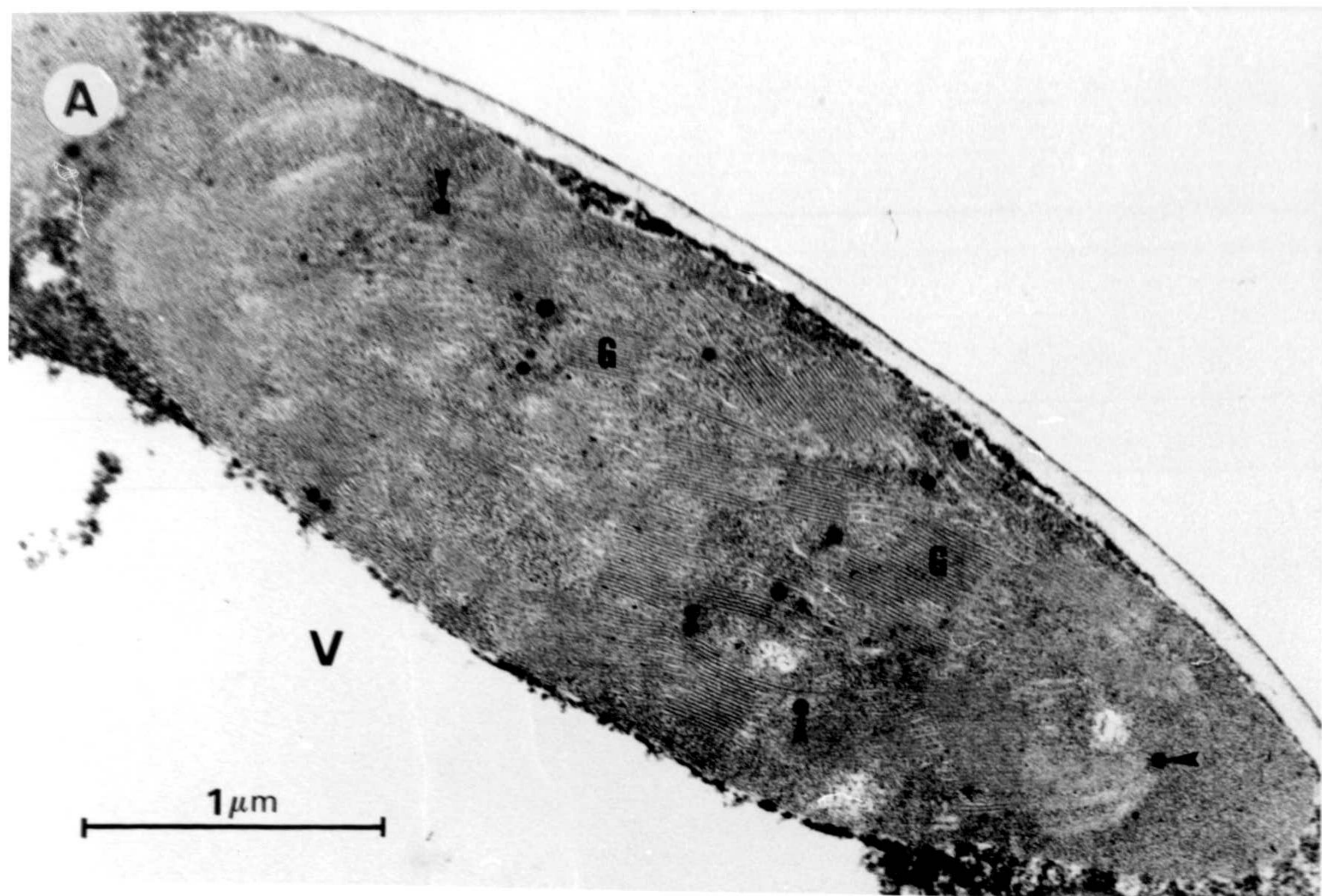
**Fig. 24.** Micrografía electrónica de tejido foliar de plantas de *Pisum sativum* crecidas en ausencia de NaCl. A, Cloroplasto (x 40.000). B, Mitocondrias (x 40.000). C, Peroxisomas (x 80.000). A: almidón; C: cloroplastos; G: grana; M: mitocondria; P: peroxisoma; V: vacuola; y, ▶: gránulos osmiófilos.

**Fig. 25.** Micrografía electrónica de tejido foliar de plantas de *Pisum sativum* crecidas en presencia de NaCl 70 mM. A, Célula completa (x 8.125). B, Cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas. A: almidón; C: cloroplasto; Cr: cromatina condensada; M y ▶: mitocondria; N: núcleo; P: peroxisoma; PC: pared celular; y, V: vacuola.

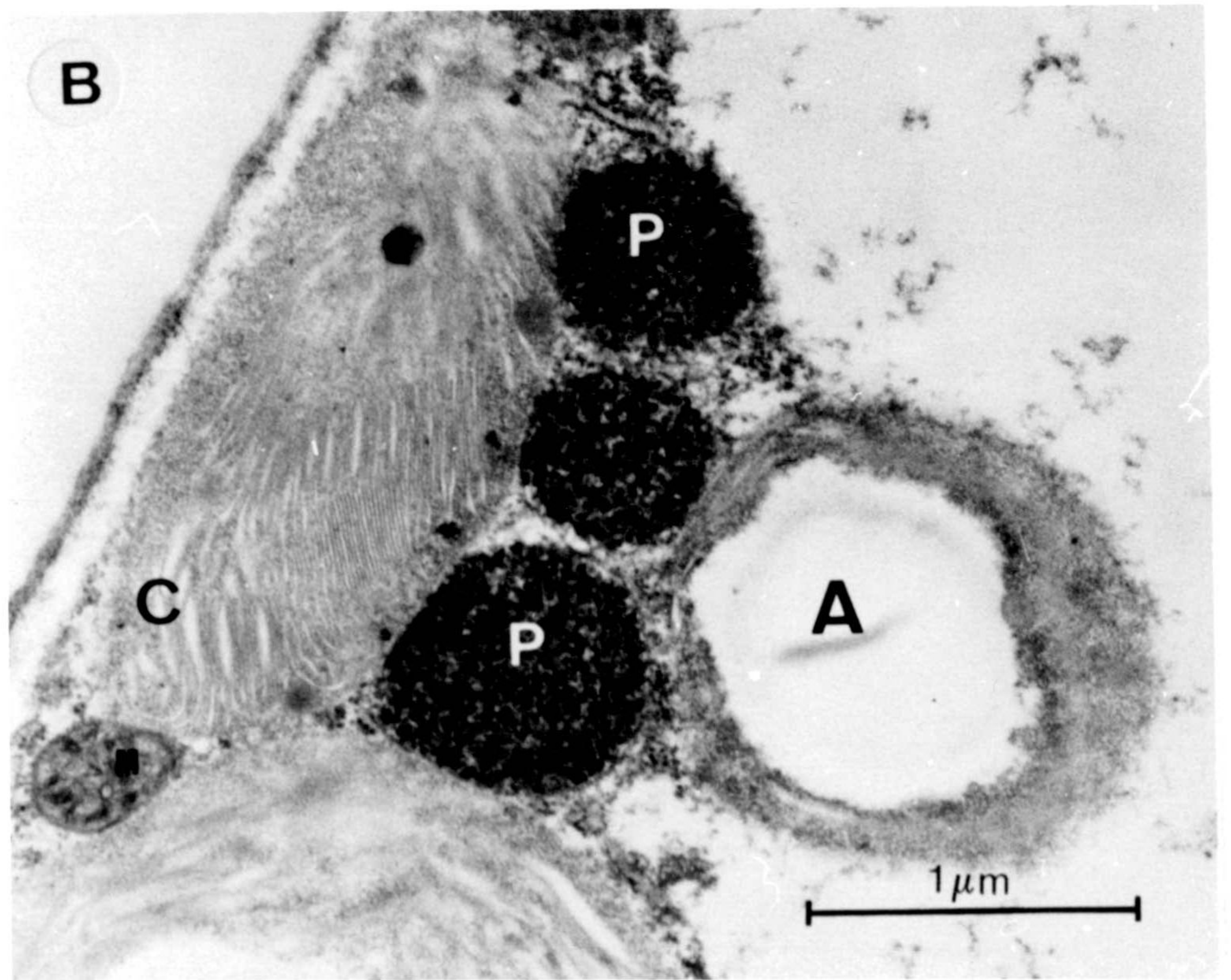
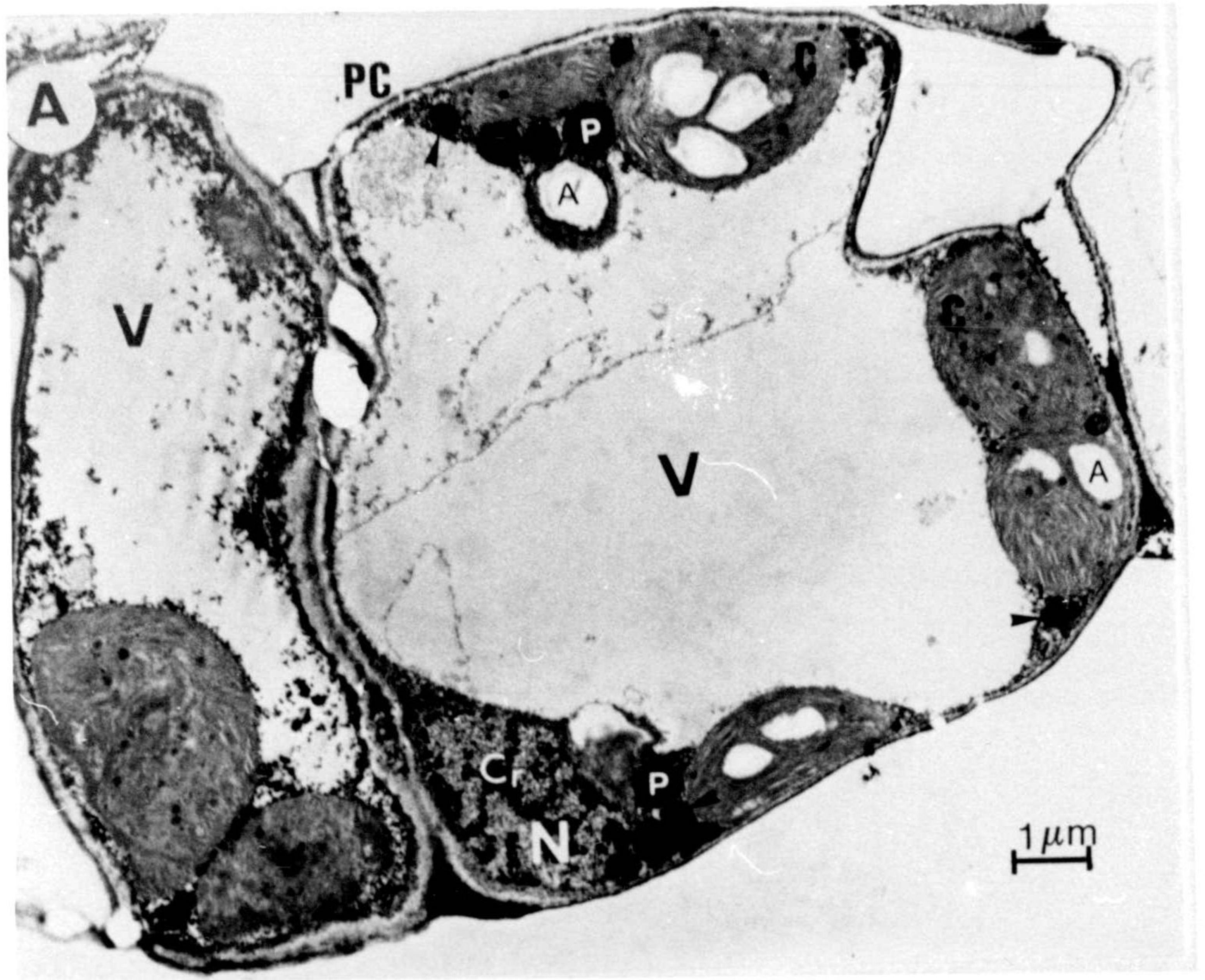
**Fig. 26.** Micrografía electrónica de tejido foliar de plantas de *Pisum sativum* crecidas en presencia de NaCl 70 mM (x 32.500). A: almidón; C: cloroplasto; M: mitocondria; P: peroxisoma; y, ▶: gránulo osmiófilo.



















## 6. ACTIVIDAD SOD EN CULTIVOS CELULARES DE HOJAS DE GUISANTE.

En el inicio de esta Tesis Doctoral se tenía la intención de utilizar cultivos de células de hojas de guisante para los estudios del efecto del estrés salino a nivel subcelular, paralelamente a los trabajos efectuados con hojas, pero la puesta a punto de esta técnica resultó bastante laboriosa y consumió mucho más tiempo del inicialmente pensado. Por ello, los cultivos celulares no se pudieron emplear en dichas experiencias.

Como se observa en la Fig. 27, el medio que ofreció una tasa de crecimiento mayor para los callos de explantos de hoja era el M-2, que se caracterizaba principalmente por contener la hormona 2,4-D, por estar suplementado con caseína hidrolizada y por estar mantenido en condiciones de oscuridad. Después de 14 subcultivos (aproximadamente cada cuatro semanas) todavía mantenía una tasa de crecimiento del  $369 \pm 19 \%$ . Por esta razón, estos callos se emplearon para iniciar las suspensiones celulares.

Como primer paso para una utilización posterior de los cultivos celulares en experiencias de estrés salino y de inducción metabólica, se procedió a la caracterización del patrón de isoenzimas de SOD presentes en homogenados de callos y de suspensiones celulares de hojas de guisante. Tanto en callos como en suspensiones celulares se identificaron las distintas isoenzimas utilizando inhibidores específicos (Fig. 28 y 29, Tabla 18). Así, se observó que tanto en homogenados de callos como de suspensiones celulares la isoenzima mayoritaria era la Mn-SOD, y en las suspensiones celulares no se detectó la actividad Cu,Zn-SOD II.

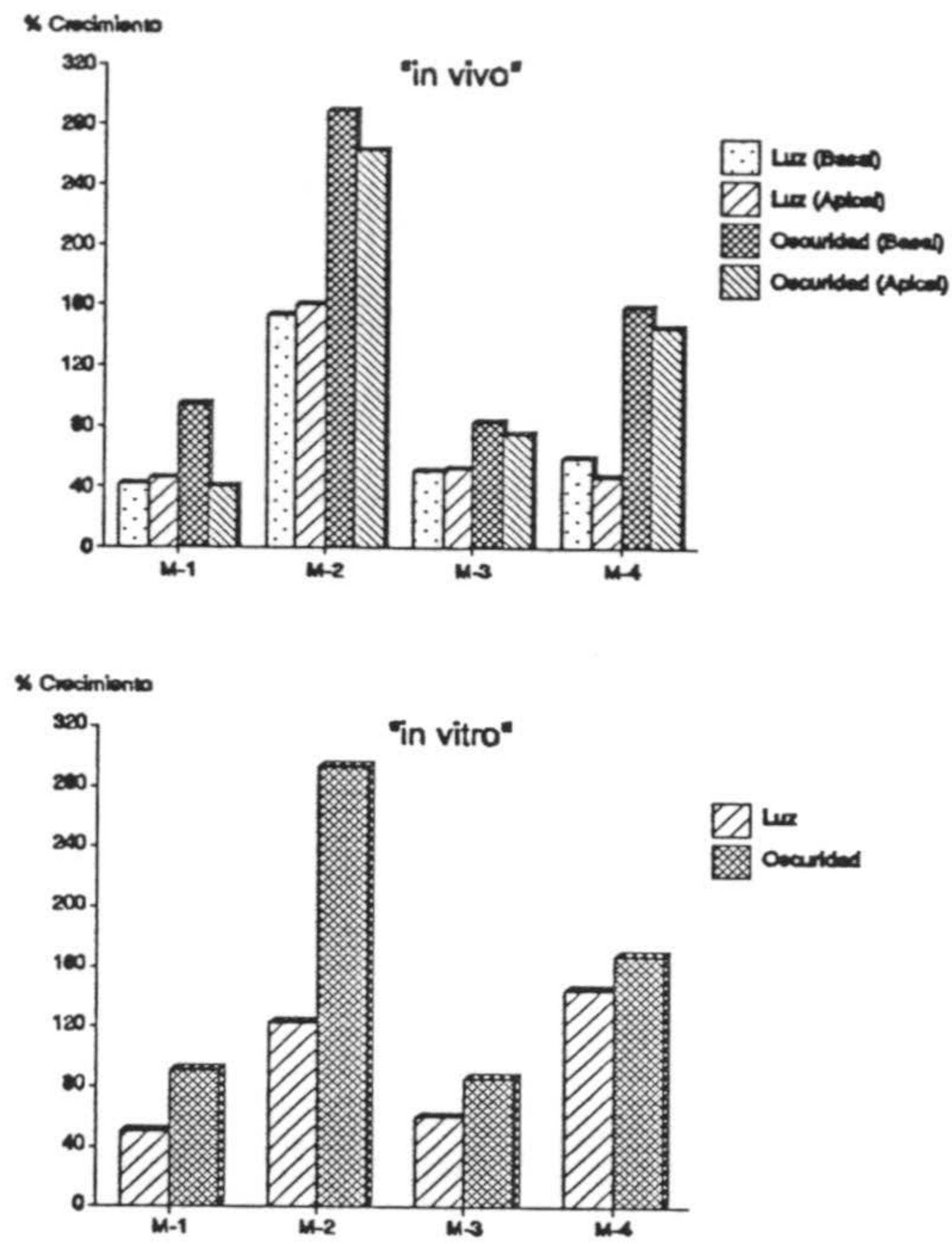
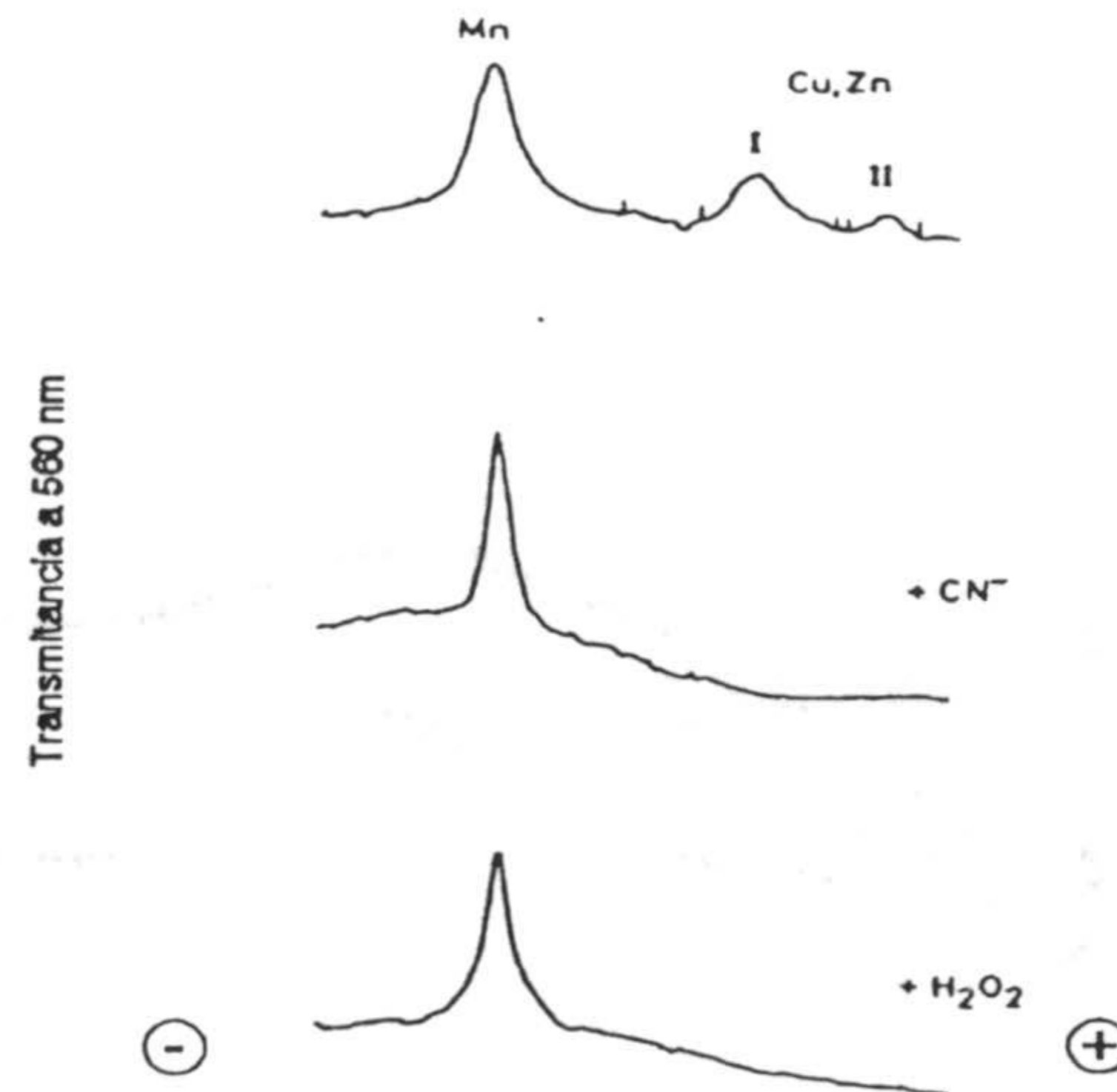
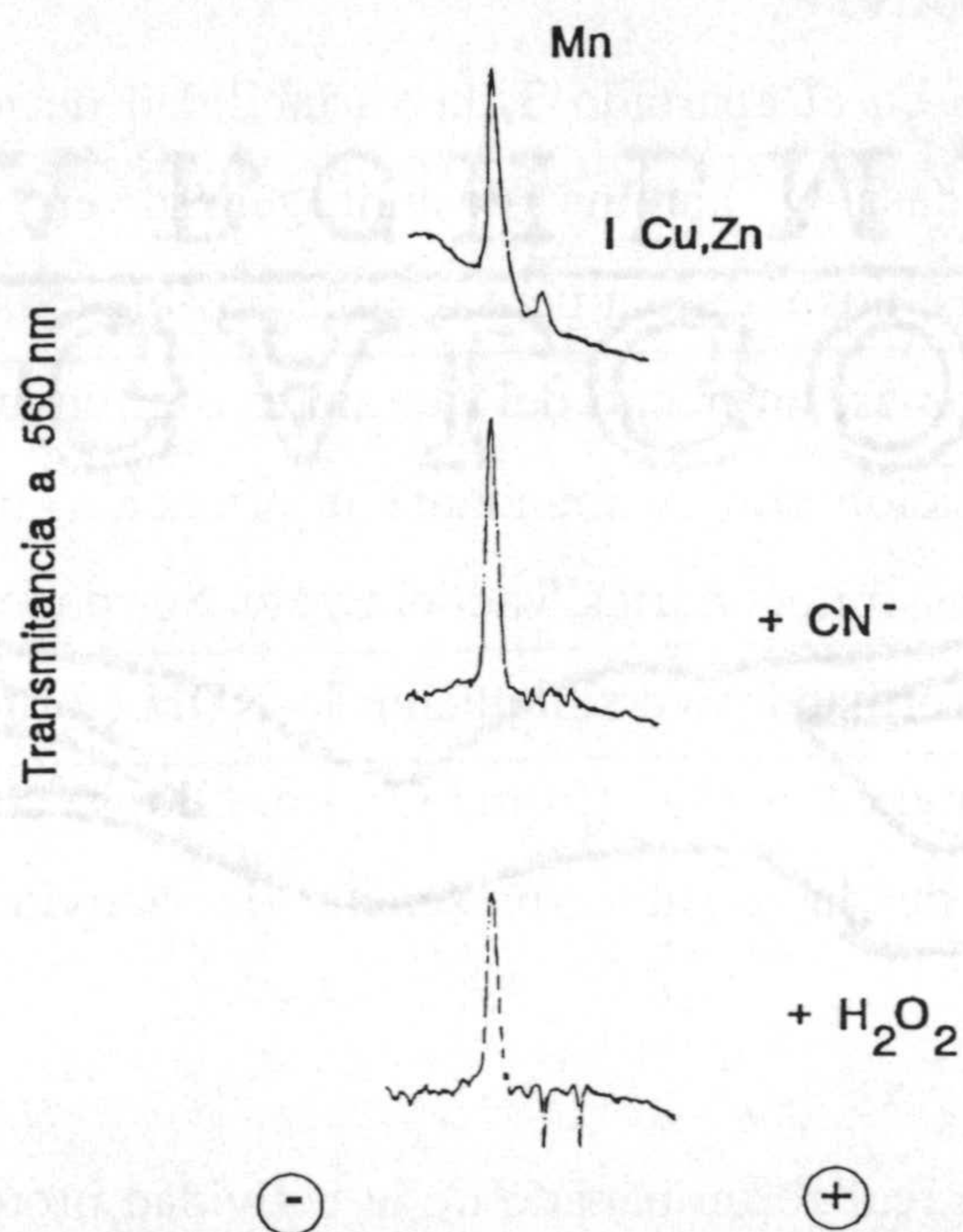


Fig. 27. Efecto del medio de cultivo sobre la tasa de crecimiento de callos de *Pisum sativum* cv Granada.

Fig. 28. Electroforesis en geles de poliacrilamida de callos de hojas de guisante. Los geles se tiñeron para actividad SOD en ausencia y en presencia de cianuro y peróxido de hidrógeno.





**Fig. 29.** Electroforesis en geles de poliacrilamida de suspensiones celulares de hojas de guisante. Los geles se tiñeron para actividad SOD en ausencia y en presencia de cianuro y peróxido de hidrógeno.

**Tabla 18.** Patrón de actividad de las isoenzimas de SOD presentes en homogenados de hojas, de callos y de suspensiones celulares de *Pisum sativum*. El porcentaje de las distintas isoenzimas se determinó por densitometría de los geles de poliacrilamida donde previamente se habían localizado las bandas de actividad SOD por un método fotoquímico.

Homogenado	% Actividad isoenzimática		
	Mn-SOD	Cu,Zn-SOD I	Cu,Zn-SOD II
Hojas	15	33	51
Callos (M-2)	65	30	5
Suspensiones celulares	87	13	-

## 7. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN PEROXISOMAS Y MITOCONDRIAS DE HOJAS DE GUISANTE.

Como se indicó en el apartado 3, la variabilidad de los resultados de la actividad xantina oxidasa y xantina deshidrogenasa en distintos lotes de peroxisomas purificados, nos indujo a pensar en la posible existencia de actividad proteolítica en peroxisomas, un hecho del que no existe ninguna referencia en la literatura, en contraposición con la abundante información disponible acerca de proteasas en cloroplastos, mitocondrias, vacuolas, etc. Se conoce que determinadas proteasas pueden transformar irreversiblemente la XDH (forma D) en la xantina oxidasa productora de radicales  $O_2^{\cdot-}$  (forma O). Por ello, se consideró interesante acometer el estudio de la posible presencia de actividad proteolítica en peroxisomas.

Inicialmente, se realizó un barrido de la actividad proteolítica presente en el precipitado particulado de 12.000 g enriquecido en peroxisomas y mitocondrias, ensayándose la actividad tanto endopeptidasa como exopeptidasa. Se detectaron los dos tipos de proteasas en dicho precipitado y se procedió a determinar el pH óptimo de cada una de ellas. Como se muestra en la Fig. 30, tanto para la actividad endopeptidasa como para la actividad exopeptidasa con BTPA como sustrato (carboxipeptidasa), el pH óptimo fue de 8,5, mientras que para la actividad exopeptidasa con L-Leu-pNA como sustrato, el pH óptimo fue de 7,5.

En una segunda etapa, se ensayaron estas mismas actividades proteolíticas en peroxisomas y mitocondrias purificadas de hojas de guisante, poniéndose de manifiesto la presencia de ambas actividades en estos dos orgánulos celulares (Tabla 19).

La actividad endopeptidasa utilizando azocoll como substrato era mayor en peroxisomas que en mitocondrias, mientras que en mitocondrias la actividad exopeptidasa era más alta. La casi nula actividad exopeptidasa determinada con el substrato BTPA parece indicar la ausencia de actividad carboxipeptidasa en ambos orgánulos.

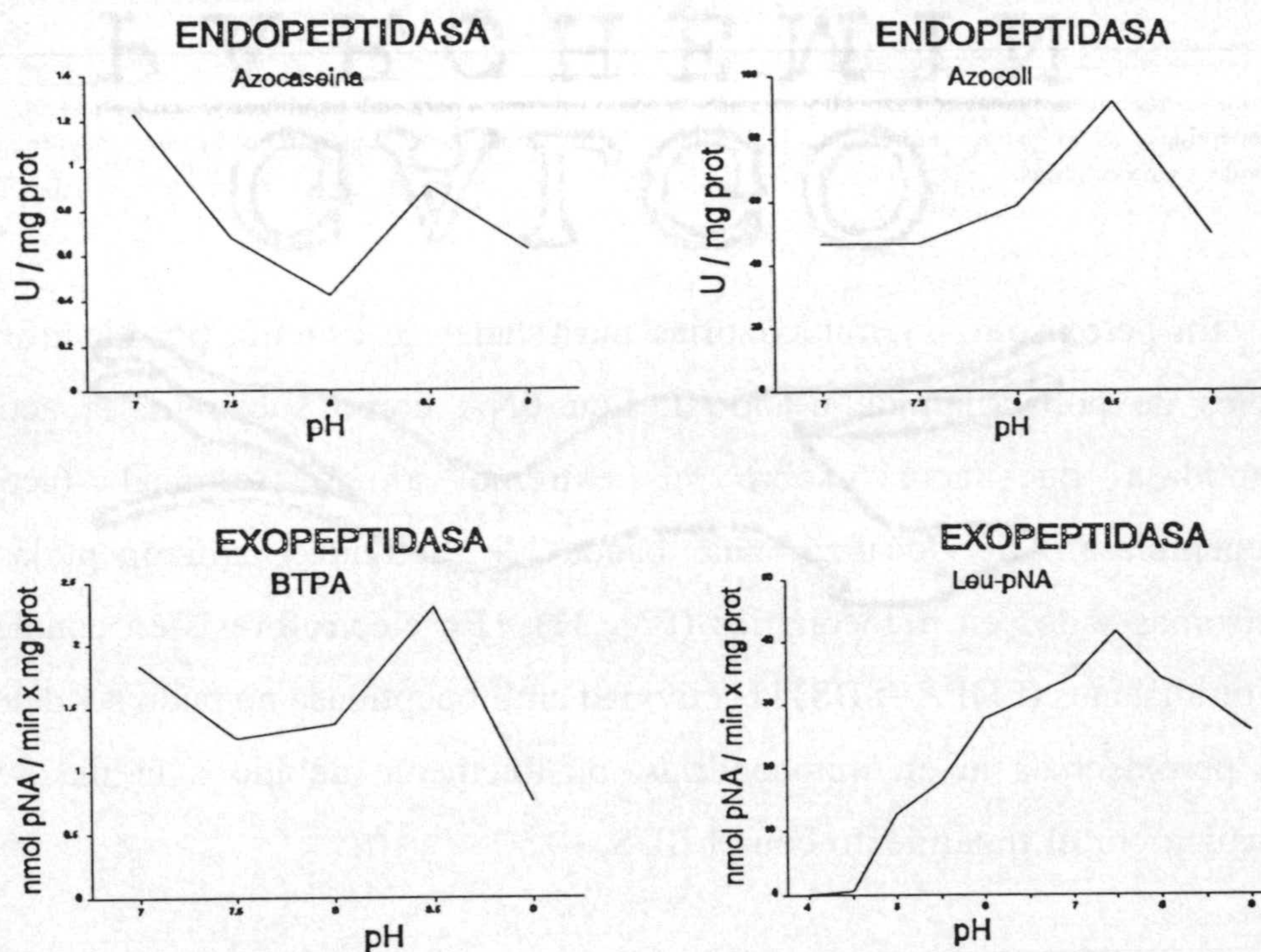


Fig. 30. Determinación del pH óptimo de las actividades endopeptidasa y exopeptidasa del precipitado de 12.000 g de hojas de guisante, enriquecido en peroxisomas y mitocondrias.



**Tabla 19.** Actividad proteolítica en peroxisomas y mitocondrias purificadas de hojas de guisante.

Orgánulo	ACTIVIDAD ENDOPEPTIDASA		ACTIVIDAD EXOPEPTIDASA	
	Azocoll U x mg prot <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup>	Azocaseína U x mg prot <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup>	Leu- <i>p</i> NA nmol <i>p</i> NA x mg prot <sup>-1</sup> x min <sup>-1</sup>	BTPA nmol BTPA x mg prot <sup>-1</sup> x min <sup>-1</sup>
Peroxisomas	103,8 ± 38,0	0,69 ± 0,02	12,7 ± 1,0	0
Mitocondrias	65,5 ± 10,6	0	28,4 ± 1,9	0,27 ± 0,02

Las actividades fueron ensayadas con azocoll y azocaseína como sustratos para endopeptidasas y con L-leu-*p*NA y BTPA para exopeptidasas. Los valores representan la media ± SEM de al menos cinco preparaciones independientes de peroxisomas y mitocondrias.

En peroxisomas y mitocondrias purificadas se estudió, por electroforesis en geles de poliacrilamida usando L-Leu βNA como sustrato, la actividad exopeptidasa que actúa sobre el extremo amino terminal (actividad aminopeptidasa). Se localizó una banda de actividad aminopeptidasa en peroxisomas y dos en mitocondrias (Fig. 31). En electroforesis en condiciones desnaturizantes (EGPA-SDS) la actividad aminopeptidasa no pudo ser detectada ni en peroxisomas ni en mitocondrias, posiblemente debido a la inactivación enzimática por el tratamiento con el SDS.

**Fig. 31.** Electroforesis en geles de poliacrilamida usando L-Leu βNA como sustrato. A, precipitado de 12.000 g. B, peroxisomas. C, mitocondrias.

⊖

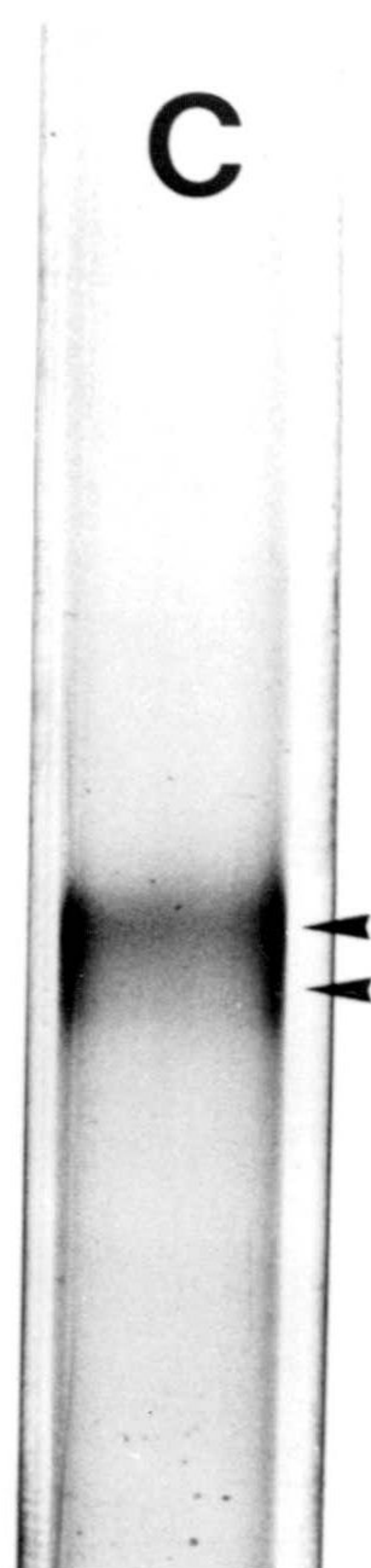
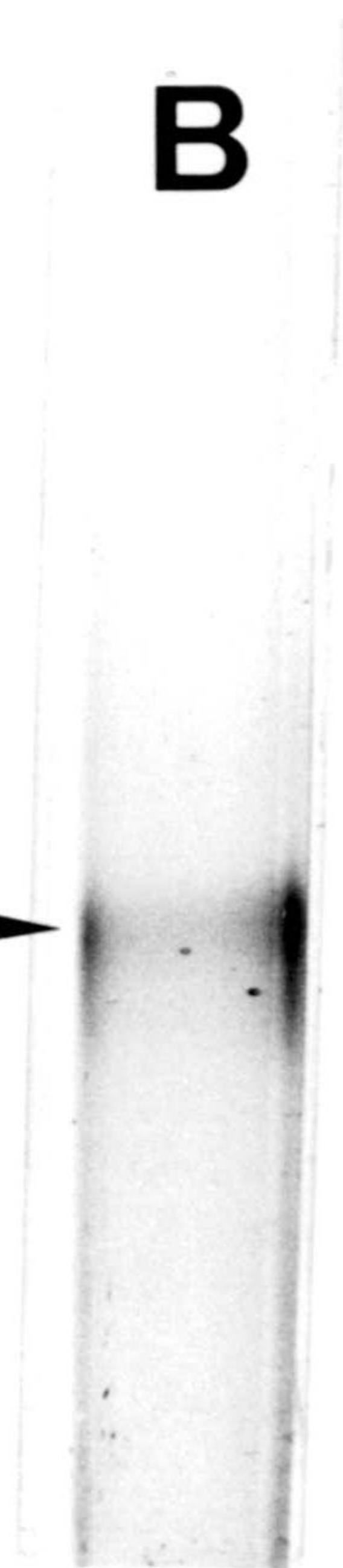
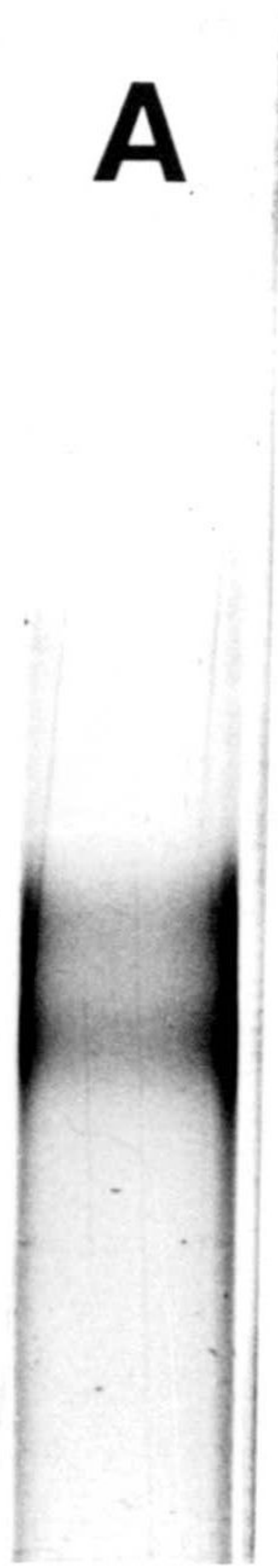
**A**

**B**

**C**



⊕





Para tratar de identificar el tipo de actividad aminopeptidasa detectada se analizó el efecto de distintos inhibidores de proteasas, así como de diferentes iones y ATP sobre la actividad enzimática. Por otra parte, también se llevó a cabo un estudio de la actividad aminopeptidasa frente a diversos substratos. Respecto al efecto de inhibidores de proteasas, la actividad aminopeptidasa de peroxisomas y mitocondrias era fuertemente deprimida por inhibidores de proteasas con grupos sulfhidrilo (PHMB, HgCl<sub>2</sub>), por el inhibidor serín proteasas PMSF, y por el quelante de metales 1,10-fenantrolina (Tabla 20). Sorprendentemente, el ATP inhibía la actividad aminopeptidasa de peroxisomas y mitocondrias pero no el E-64, un inhibidor de cisteín proteasas (Tabla 20). Tampoco diversos cationes ensayados tenían ningún efecto significativo sobre esta actividad.

**Tabla 20.** Efecto de inhibidores y activadores sobre la actividad aminopeptidasa de peroxisomas y mitocondrias.

Inhibidor (mM)	Peroxisomas	Mitocondrias
	% Inhibición	
PHMB (1)	91	95
PMSF (2)	85	99
1,10-fenantrolina (2)	83	74
HgCl <sub>2</sub> (1)	86	94
E-64 (0,003)	0	0
Mg <sup>2+</sup> + Ca <sup>2+</sup> (1)	0	0
Zn <sup>2+</sup> + Mn <sup>2+</sup> (1)	15	5
ATP (5)	55	53

Las muestras fueron preincubadas con los inhibidores y la actividad AP fue ensayada con L-Leu-pNA. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones con diferentes lotes de peroxisomas y mitocondrias.

La actividad aminopeptidasa de peroxisomas y mitocondrias se ensayó con distintos sustratos, derivados de aminoacil- $\beta$ NA de nueve aminoácidos (Tabla 21). La actividad aminopeptidasa peroxisomal era más específica para la L-Leu- $\beta$ NA, pero también hidrolizaba, aunque en menor medida a la D,L-Met- $\beta$ NA y la L-Phe- $\beta$ NA. En mitocondrias se detectaron tres aminopeptidasas (AP1, AP2 y AP3) con diferente especificidad de sustrato. La AP1 tenía una especificidad parecida a la aminopeptidasa peroxisomal, excepto que también era activa frente a la L-Ala- $\beta$ NA. La AP2 hidrolizaba la L-Leu- $\beta$ NA y la L-Ala- $\beta$ NA, pero la AP3 era específica para la L-Ala- $\beta$ NA.

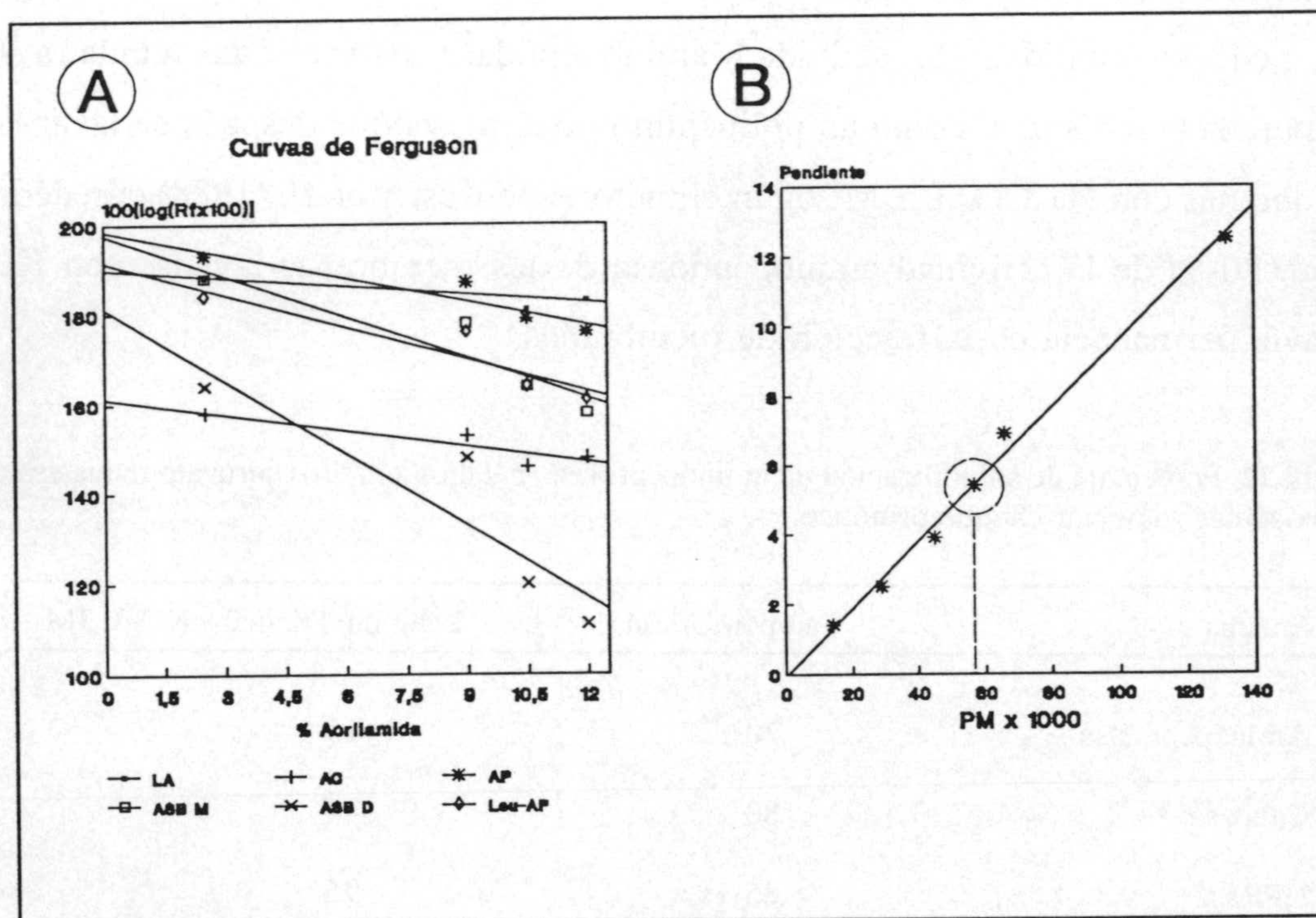
**Tabla 21.** Especificidad de sustrato de las aminopeptidasas presentes en peroxisomas y mitocondrias.

Sustrato	Actividad específica relativa		
	Peroxisomas	AP1	Mitocondrias AP2    AP3
L-Leu- $\beta$ NA	24,3	29,8	20,9    0
DL-Met- $\beta$ NA	8,3	15,3	0        0
L-Phe- $\beta$ NA	5,3	13,7	0        0
L-Ala- $\beta$ NA	0	12,2	9,5     94
L-Pro- $\beta$ NA	0	0	0        0
L-Arg- $\beta$ NA	0	0	0        0
L-Tyr- $\beta$ NA	0	0	0        0
L-Try- $\beta$ NA	0	0	0        0
L-Glu- $\beta$ NA	0	0	0        0

Los peroxisomas y las mitocondrias se analizaron por EGPA y la actividad aminopeptidasa se localizó en los geles por incubación con distintos sustratos L-aminoacil- $\beta$ NA. Las bandas de actividad fueron cuantificadas por densitometría y la actividad se expresó como actividad específica relativa (área/ $\mu$ g proteína).

Posteriormente, el estudio se centró en la actividad aminopeptidasa peroxisomal; determinándose su peso molecular, y punto isoeléctrico, así como su distribución dentro del peroxisoma. La masa molecular se determinó por EGPA

en condiciones nativas. Para ello, inicialmente se obtuvieron las curvas de Ferguson para los distintos patrones empleados, representando en abscisas la concentración de acrilamida y en ordenadas el valor de  $100 \times \log(R_f \times 100)$  (Fig. 32). A continuación se representaron las pendientes de cada una de las proteínas patrón frente a sus respectivos pesos moleculares, y por interpolación en la recta de regresión resultante, se obtuvo una masa molecular para la aminopeptidasa de peroxisomas de **56,8 KDa**.



**Fig. 32.** Determinación del peso molecular de la aminopeptidasa de peroxisomas. A. Curvas de Ferguson para los distintos patrones y para la aminopeptidasa. LA: lactoalbúmina; AC: anhidrasa carbónica; AP: albúmina de pollo; ASB M: monómero de albúmina de suero bovino; ASB D: dímero de albúmina de suero bovino; y, Leu-AP: leucina aminopeptidasa. B. Representación de las pendientes de cada una de las curvas de Ferguson frente a sus respectivos pesos moleculares.

Mediante isoelectroenfoque en placa de poliacrilamida, en un intervalo de pH de 2,5–7, se determinó un pI de 5,3 para la aminopeptidasa de peroxisomas.

Se llevó a cabo un estudio de la distribución intraorganular de la actividad aminopeptidasa peroxisomal en membranas y matrices de estos orgánulos lisados por choque osmótico en la presencia y en ausencia de KCl 0,3 M (Tabla 22). La actividad aminopeptidasa presentaba un patrón de solubilización muy similar al de la catalasa, una enzima típicamente soluble de peroxisomas junto con la HPRasa (Tolbert y Essner, 1981), lo que indica que la aminopeptidasa se encuentra mayoritariamente en la fracción soluble de los peroxisomas (matriz). Sin embargo, una pequeña cantidad de actividad aminopeptidasa parece estar unida a la membrana peroxisomal como un polipéptido integral, ya que después de lavar las membranas con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 M según el método de Luster *et al.* (1988), alrededor de un 20 % de la actividad aminopeptidasa de las membranas lavadas con KCl todavía permanecía en la fracción de membranas.

**Tabla 22.** Porcentaje de solubilización de aminopeptidasa, catalasa e hidroxipiruvato reductasa en peroxisomas rotos por choque osmótico.

Enzima	Tampón Tricina	Tampón Tricina + KCl 0,3M
	%	
Aminopeptidasa	70	76
Catalasa	80	84
HPRasa	85	96

Los experimentos se realizaron en tampón Tricina 50 mM (pH 7,5) en ausencia (control) y en presencia de KCl 0,3 M. La fracción soluble y de membranas de peroxisomas fue aislada como se describe en el Material y Métodos. El porcentaje de solubilización fue calculado al dividir la actividad del sobrenadante por la suma de la actividad en el sobrenadante y en el precipitado.

А В Р О Е Е И И  
С В Т С О



DISCUSIÓN





Los rendimientos obtenidos en el aislamiento de peroxisomas de las leguminosas productoras de ureidos *Phaseolus vulgaris* L. y *Glycine max* L. eran considerablemente bajos comparados con los datos descritos en la literatura para otras plantas leguminosas productoras de amidas (Foster & Edwards, 1980; Sandalio *et al.*, 1987). Estos bajos rendimientos no pudieron ser mejorados a pesar de las numerosas modificaciones ensayadas, tanto en la metódica de homogeneización como en las técnicas de centrifugación en gradientes de densidad. Una razón de esta situación podría ser la textura de las hojas jóvenes de *Phaseolus* y de *Glycine*, que presentan unos tricomas epidérmicos, al contrario que *Vigna*. Esto podría ocasionar una rotura sustancial de orgánulos durante el proceso de homogeneización de la hoja. Otra posibilidad es que los peroxisomas de las hojas de aquellas plantas pudieran ser más frágiles y/o menos abundantes que en otras especies donde la purificación de estos orgánulos ha sido llevada a cabo con éxito. En cualquier caso, los resultados obtenidos muestran que *Vigna unguiculata* es una especie muy conveniente para la purificación de peroxisomas y mitocondrias de hojas de una leguminosa productora de ureidos, con un alto porcentaje de integridad, para su utilización posterior en estudios metabólicos.

En mitocondrias purificadas de *Vigna unguiculata* estaban presentes dos isoenzimas de SOD, una Mn-SOD y la Cu,Zn-SOD I, una localización similar a la descrita para la SOD en mitocondrias de hojas de *Pisum sativum* (Sandalio *et al.*, 1987) y de otras especies vegetales (Salin & Bridges, 1981; Rabinowitch & Fridovich, 1983; Sandalio & del Río, 1987). Sin embargo, no se detectó en peroxisomas de *Vigna unguiculata*. Esta situación contrasta con los resultados encontrados en *Pisum sativum* L., una leguminosa con el metabolismo de las amidas, en donde se demostró la presencia de Mn-SOD en peroxisomas de hojas (del Río *et al.*, 1983; Sandalio *et al.*, 1987) así como la generación de radicales

$O_2^{\cdot-}$  por determinados metabolitos endógenos (del Río *et al.*, 1989).

El diferente comportamiento de los peroxisomas de hojas de *Vigna unguiculata*, por lo que se refiere a la ausencia de actividad SOD, podría ser debido al distinto metabolismo celular de esta especie, por lo que se refiere al metabolismo de los ureidos. Se sabe que los peroxisomas pueden presentar una composición enzimática variable, dependiendo no sólo de la función del tejido, sino también de la inducción por substratos, de la etapa de desarrollo, y de distintos factores genéticos y medio ambientales (Tolbert & Essner, 1981; Tolbert, 1981; Tolbert *et al.*, 1987). En consecuencia, la localización peroxisomal de la SOD también podría cambiar con el metabolismo del tejido, las condiciones de crecimiento, y durante diferentes etapas del desarrollo. Un ejemplo podría ser el hecho de que células de mamíferos, la Cu,Zn-SOD de hepatocitos de hígado de rata se localizó, por inmunomicroscopía electrónica, en la matriz citoplasmática (Chang *et al.*, 1988), mientras que en hígado de rata se demostró la presencia de Cu,Zn-SOD en peroxisomas por métodos bioquímicos e inmunoquímicos (Dhaunsi *et al.*, 1992). Y en células de hepatoma humano, empleando microscopía de inmunofluorescencia, se localizó prácticamente toda la actividad celular de Cu,Zn-SOD en los peroxisomas (Keller *et al.*, 1991). En este último caso, es posible que la expresión de la Cu,Zn-SOD en peroxisomas haya podido ser inducida por la naturaleza tumoral de las células hepáticas, independientemente de otros factores.

La ausencia de actividad SOD en peroxisomas de hojas de *Vigna* sugiere que en estas plantas, en condiciones normales, probablemente no tiene lugar la producción de radicales de  $O_2^{\cdot-}$  en peroxisomas de hojas. Esta hipótesis parece estar confirmada por resultados obtenidos en nuestro laboratorio, que muestran la presencia mayoritaria en peroxisomas de hojas de *Vigna* de la forma D de la xantina oxidorreductasa (Corpas *et al.*, 1989) en lugar de la xantina oxidasa (forma

O), productora de radicales  $O_2^{\cdot-}$ , encontrada en peroxisomas de hojas de guisante (del Río *et al.*, 1989). Por lo tanto, en condiciones no limitantes, la presencia de SOD en peroxisomas de hojas de *Vigna* no sería necesaria para eliminar los radicales superóxido producidos, toda vez que el sistema generador de estos radicales, la XOD, estaría fuertemente reprimida.

Por estas razones, se decidió abordar el estudio del efecto del estrés salino sobre el metabolismo del oxígeno activado y de los ureidos en peroxisomas utilizando plantas de guisante. En esta leguminosa se había demostrado previamente la presencia de SOD en peroxisomas de hojas (del Río *et al.*, 1983; Sandalio *et al.*, 1987), así como la generación de radicales libres superóxido (del Río *et al.*, 1989), y además se habían efectuado estudios que indicaban una participación de los peroxisomas en los mecanismos celulares responsables del estrés oxidativo (Palma *et al.*, 1987, 1988, 1991).

Una vez seleccionada la planta se abordó el estudio de la salinidad trabajando con una gama de concentraciones amplia y sobre distintos cultivares de guisante, apreciándose una reducción del crecimiento a una concentración de 100 mM de NaCl, que coincide con los datos aportados por Weimberg (1970) y, observándose que el guisante, tal como ha indicado Laüchli (1984), es una leguminosa sensible a esta sal. Esto nos permitió distinguir, según su sensibilidad al NaCl, cultivares: uno, relativamente tolerante (cv Granada) y, otro, más sensible (cv Challis), lo que nos indica que deben existir mecanismos moleculares de regulación que les permita tolerar esta sal. Posteriormente, se realizó un estudio del crecimiento de ambos cultivares usando una gama de concentraciones de NaCl más restringida, lo que nos permitió encontrar la concentración en la que las diferencias eran más acentuadas.

Una de las respuestas más corrientes a las condiciones salinas es la exclusión de sales, sodio y/o cloro, desde las hojas hacia otras partes de la planta (Laüchli, 1984). En hojas de plantas de guisante se encontró un acúmulo de sodio y cloro en ambos cultivares, que era de unas setenta veces para el sodio y de unas tres veces para el cloro en relación a sus respectivos controles, indicando que el mecanismo de exclusión de cloro era más acentuado. Estos mismos resultados han sido obtenidos con la especie halófito *Suaeda australis*, aunque con tratamientos de NaCl de 600 mM (Robinson & Downton, 1985) lo que implicaría un desequilibrio de iones orgánicos o un acúmulo de ácidos orgánicos. También en *Phaseolus vulgaris*, el estrés por NaCl producía un aumento en los contenidos foliares de sodio, que se intensificaba en relación con la concentración externa de la sal (Kawasaki *et al.*, 1983). Con nuestros resultados no se puede correlacionar capacidad exclusora de cloro o sodio con la distinta sensibilidad al NaCl observada en ambos cultivares. Lo que concuerda con algunos autores que afirman que la sensibilidad mostrada por las plantas de guisante frente al NaCl se debe a su baja capacidad de exclusión de sales (Speer *et al.*, 1989).

Con respecto a los metales analizados en la hoja completa, no se apreciaron cambios en ninguno de los cultivares por efecto del NaCl, lo que no excluye el que produzcan variaciones en las concentraciones metálicas a nivel subcelular. Sin embargo, no se pudo llevar a cabo la determinación de los niveles de metales en los peroxisomas aislados debido a que el Percoll, el medio empleado en los gradientes de densidad para el aislamiento de peroxisomas, contiene concentraciones altas de metales contaminantes (Palma, 1988).

Los resultados mostraron que en hojas de *Pisum sativum* L. del cultivar sensible al NaCl (cv Challis) había claras diferencias en las actividades específicas de las enzimas del metabolismo del oxígeno activado, en comparación con los

valores determinados para el cultivar relativamente tolerante al NaCl (cv Granada). La salinidad causaba una disminución de las actividades urato oxidasa e hidroxipiruvato reductasa en las plantas sensibles al NaCl, mientras que la actividad glicolato oxidasa era estimulada por el tratamiento con NaCl en las plantas tolerantes. Como la glicolato oxidasa es una enzima clave de la vía del glicolato de la fotorrespiración (Huang *et al.*, 1983), estos resultados parecen indicar que este proceso está afectado por la salinidad en plantas tolerantes al NaCl.

En muchas plantas bajo condiciones salinas hay una inhibición de la incorporación de CO<sub>2</sub> inducida por el cierre estomático con el fin de limitar la transpiración (Cavalié, 1982). En hojas de leguminosas se ha observado que la salinidad afecta negativamente a la tasa de fijación fotosintética del CO<sub>2</sub> (Rajmane & Karadge, 1986). Tan pronto como disminuye la concentración de CO<sub>2</sub> dentro del cloroplasto también hay una menor disponibilidad de NADP para aceptar electrones del fotosistema I iniciándose de esta manera la reducción del O<sub>2</sub> con la generación concomitante de especies de oxígeno activado (O<sub>2</sub><sup>·-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Halliwell, 1982). Se ha sugerido que la función de la vía fotorrespiratoria en plantas C<sub>3</sub> es prevenir los daños fotooxidativos que podrían resultar de una producción excesiva de radicales libres de oxígeno, mediante el continuo reciclaje del CO<sub>2</sub>, de modo que los cloroplastos siempre tendrían algo de CO<sub>2</sub> (Halliwell, 1982; Halliwell & Gutteridge, 1989). Las plantas de guisante tolerantes al NaCl podrían contrarrestar la inhibición de la incorporación de CO<sub>2</sub>, inducida por la sal, incrementando su tasa fotorrespiratoria. Esto podría explicar el aumento significativo observado en la actividad glicolato oxidasa de estas plantas en comparación con la del cultivar sensible. Otra evidencia es la inhibición de la enzima peroxisomal hidroxipiruvato reductasa, la cual también está implicada en la vía del glicolato de la fotorrespiración (Huang *et al.*, 1983) (Fig. 33).



de hojas de guisante están presentes las formas O y D de la xantina oxidoreductasa, pero la XOD (forma O) es la predominante, constituyendo alrededor del 60 % de la actividad total. Es conocido que la forma D puede ser convertida en la forma O por la acción de proteasas y agentes reductores (Parks & Granger, 1986), y por lo tanto, se estudió la posibilidad de que el NaCl pudiera propiciar la interconversión XDH en XOD en peroxisomas de hojas. Los resultados mostraron que, en plantas sensibles y tolerantes al NaCl crecidas con esta sal, las formas O y D de la xantina oxidoreductasa eran desigualmente inhibidas. La salinidad inhibía fuertemente a la XOD en el cv tolerante, mientras que en el cv sensible era la actividad XDH la más afectada. En ningún caso había un aumento concomitante de la actividad específica de cualquiera de las formas O o D. Esto indica que la salinidad aparentemente no afecta la transformación de la XDH en XOD. Sin embargo, la presencia de ambas formas junto con la preponderancia de la forma O contrasta con lo normalmente admitido, en células animales y vegetales en las que la forma D es la mayoritaria en condiciones fisiológicas normales y de que la XOD sólo aparece en procesos de estrés oxidativo. En nódulos de leguminosas, la XDH es la única forma detectada, quizá, por el hecho de que el nódulo es rico en leghemoglobina, proteína necesaria para mantener un entorno anaeróbico a las enzimas implicadas en la fijación de nitrógeno (Schubert, 1986). Pero también en algas unicelulares se ha puesto de manifiesto la presencia de XDH (Fernández & Cárdenas, 1981), y en peroxisomas de hojas de caupí (*Vigna unguiculata* L.) la forma D es la mayoritaria y además en estos orgánulos no se detectó la presencia de SOD (Corpas *et al.*, 1989). En células animales la forma O aparece en procesos de isquemia-reperfusión, como se comentó en la Introducción de esta memoria, siendo también la forma D la predominante. Sin embargo, recientemente, utilizando como modelo cultivos celulares de células de ratón y hámster, se analizó la relación de ambas formas de la xantina oxidoreduc-



tasa encontrándose resultados discrepantes (Hasan *et al.*, 1992). El análisis de células intactas procedentes del cultivo indicaba un mayor porcentaje de XOD que de XDH en comparación con los homogenados celulares y la producción de radicales superóxido por adición de xantina al cultivo era también mayor en células intactas que en células homogeneizadas. Además, se observó interconversión de la XOD en XDH cuando las células eran homogeneizadas en presencia del agente reductor, DTT (Hasan *et al.*, 1992).

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio sobre la actividad xantina oxidoreductasa en hojas de guisante inducen a pensar que en peroxisomas de hojas la producción de  $O_2^{\cdot-}$  quizá pueda estar controlada no sólo por la actividad SOD sino también por algún mecanismo de interconversión entre ambas formas, siendo la proteólisis controlada un posible candidato (Della Corte *et al.*, 1969; Nguyen, 1986), lo que permitiría un control molecular más fino de la producción de radicales superóxido dentro del orgánulo.

La actividad Mn-SOD peroxisomal, y la generación de radicales  $O_2^{\cdot-}$  dependiente de NADH por membranas peroxisomales no resultó alterada por la salinidad. El hecho de que el NaCl no afecte a la actividad Mn-SOD y a la generación de radicales  $O_2^{\cdot-}$  por peroxisomas de hoja contrasta con la respuesta a la salinidad observada en otros orgánulos celulares, tales como mitocondrias y cloroplastos. En experimentos recientes llevados a cabo con cloroplastos y mitocondrias de hojas de plantas de guisante crecidas con NaCl, se encontró que el estrés salino aumentaba las actividades Cu,Zn SOD II y ascorbato peroxidasa en cloroplastos de plantas tolerantes al NaCl (Hernández, 1992) y también producía un aumento en la generación de radicales  $O_2^{\cdot-}$  en mitocondrias de plantas sensibles al NaCl (Hernández, 1992; Hernández *et al.*, 1992). Por otra parte, en células de raíces de plantas de *Pisum sativum* crecidas en presencia de NaCl 75

mM Kayupova y Klysher (1984, 1987) obtuvieron una disminución en la actividad Mn-SOD, acompañada de un aumento en la formación de especies de oxígeno activado.

La concentración interna de  $H_2O_2$  en peroxisomas de hojas disminuyó ligeramente como consecuencia del crecimiento de los dos cultivares con NaCl, a pesar de la inhibición de la actividad catalasa y del aumento de la actividad glicolato oxidasa productora de  $H_2O_2$ . Esto sugiere que el  $H_2O_2$  quizás podría reaccionar no enzimáticamente dentro del peroxisoma con algún metabolito endógeno cuya concentración también pudiera resultar inducida por la salinidad, tal como el glioxilato (Eltner & Heupel, 1973; Kasaki & Tolbert, 1965; Zelitch, 1972). Sin embargo, considerando que en membranas de células vegetales el NaCl puede producir filtraciones considerables de solutos de bajo peso molecular (Leopold & Willing, 1984), el peróxido de hidrógeno pudiera simplemente difundir al citosol como resultado del aumento de la porosidad de las membranas peroxisomales inducida por el NaCl. Esto podría explicar la ausencia de peroxidación lipídica en las membranas de estos peroxisomas como consecuencia del aumento de la concentración endógena de  $H_2O_2$  debida a la disminución de la actividad catalasa y al incremento de la actividad glicolato oxidasa. La exportación del  $H_2O_2$  desde los peroxisomas hacia el citosol es peligrosa para las células vegetales, pues este compuesto puede participar en diversas reacciones oxidativas tóxicas para la célula (Halliwell, 1982; Elstner, 1990). Adicionalmente, la reacción del peróxido de hidrógeno con radicales  $O_2^{\cdot-}$  mediante una reacción de Haber-Weiss local catalizada por metales (Halliwell & Gutteridge, 1989; Elstner, 1990; Halliwell & Gutteridge, 1992) da lugar a la formación de radicales libres hidroxilo ( $\cdot OH$ ) altamente reactivos. Estas especies son unos oxidantes muy fuertes que dañan a las membranas biológicas y son capaces de reaccionar con la

mayoría de los compuestos presentes en los sistemas biológicos (Halliwell & Gutteridge, 1989; Elstner, 1990).

Las diferencias observadas entre las actividades enzimáticas peroxisomales de los dos cultivares con distinta sensibilidad al NaCl, sugiere lo que pueden ser algunos de los mecanismos moleculares de respuesta intracelular al estrés por NaCl a nivel de peroxisomas. La estimulación de la glicolato oxidasa por NaCl en plantas tolerantes indica que la intensificación del segmento peroxisomal de la glicolato oxidasa dentro del proceso de la fotorrespiración podría ser un mecanismo molecular de la tolerancia al NaCl. Por otra parte, la inhibición de la actividad urato oxidasa por NaCl en plantas sensibles a esta sal es indicativo de un efecto de la salinidad sobre el metabolismo de los ureidos. La urato oxidasa cataliza la oxidación del ácido úrico con formación de alantoína y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Huang *et al.*, 1983). Esta enzima ha sido localizada en peroxisomas de hojas de *Pisum sativum* (del Río *et al.*, 1989) y de *Vigna unguiculata* (Corpas *et al.*, 1991), y en peroxisomas purificados de hojas de guisante también se ha detectado por HPLC la presencia de xantina y de ácido úrico. Los niveles de xantina y de ácido úrico determinados son del orden de 20 µg por mg de proteína peroxisomal y representa el primer dato existente sobre concentración de estas purinas en peroxisomas de hojas de una planta superior. Es comprensible la ausencia de información sobre esta materia en la literatura, habida cuenta de la escasez de muestra disponible para los ensayos debido a los bajos rendimientos obtenidos en los aislamientos de peroxisomas, un problema inherente a la purificación de estos orgánulos celulares de hojas de plantas superiores, debido, en gran parte, a la escasa población celular de peroxisomas en el tejido utilizado.

La presencia en peroxisomas de hojas de guisante de xantina y ácido úrico, junto con las enzimas xantina oxidoreductasa y urato oxidasa, indican que la

oxidación de la xantina y la biogénesis del ureido alantoína pueden tener lugar en estos peroxisomas. Esto es particularmente importante desde el punto de vista de la fisiología vegetal, ya que hasta ahora, con la única excepción de un trabajo de Mothes (1961), hoy día tristemente olvidado, estaba generalmente admitido que la alantoína se sintetizaba exclusivamente a partir del nitrógeno fijado en los nódulos de las raíces de ciertas leguminosas tropicales, y después transportada a las partes aéreas de la planta para allí ser metabolizada (Schubert, 1986). El hecho de que una leguminosa exportadora de amidas, como el guisante, posea la maquinaria de biosíntesis de ureidos a nivel de hoja nos permite pensar que este mecanismo quizá actúe como vía alternativa en el transporte y movilización de nitrógeno cuando se den alteraciones de la vía normal de síntesis y de transporte de amidas, sirviendo, por tanto, como un sistema de compensación ante situaciones de emergencia. Por otra parte, tampoco se puede descartar que la biosíntesis a nivel foliar de ureidos en peroxisomas de hojas constituya un mecanismo de adaptación de la planta a determinadas situaciones de estrés que impongan serias limitaciones en la disponibilidad de nitrógeno. En estas condiciones, los peroxisomas foliares podrían intensificar la síntesis de un compuesto rico en nitrógeno como es la alantoína para un posterior metabolismo celular.

En relación al estudio ultraestructural a nivel de hoja, los resultados pusieron de manifiesto que tanto en mitocondrias como en peroxisomas no se observaba ningún daño apreciable por efecto del NaCl en ninguno de los dos cultivares, lo que estaría de acuerdo con la ausencia de peroxidación lipídica en peroxisomas como indicador de posibles daños oxidativos inducidos por NaCl a nivel de membrana. En determinadas situaciones, cambios bioquímicos como aumentos en la tasa de peroxidación lipídica, en el contenido de  $H_2O_2$  y en la producción de radicales  $O_2^{\cdot-}$  por efecto del clofibrato, sí se reflejaban en cambios

estructurales como un aumento en el número de peroxisomas de hojas de guisante y en su tamaño (Palma *et al.*, 1991). De la misma forma, el tratamiento de plantas de *Lolium rigidum* con el herbicida isoproturon provocaba un aumento en el número de peroxisomas en células de mesófilo (de Felipe *et al.*, 1988).

En cambio, en cloroplastos se apreció una desorganización de sus membranas y de las estructuras tilacoidales, hecho que concuerda con los datos aportados por Hernández (1992) en cloroplastos de hojas de plantas de guisante tratadas con NaCl, donde se observó un aumento de la peroxidación lipídica y del contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estos daños por efecto del NaCl también se han encontrado en cloroplastos de plantas de *Oryza sativa* (Flowers *et al.*, 1985) y en células de *Euglena gracillis* (Nazarenko & Serebryakova, 1990).

Respecto al número de orgánulos (peroxisomas, mitocondrias y cloroplastos) y sus áreas respectivas, éstas no se veían afectados en ninguno de los cultivares por el tratamiento con NaCl, lo que indica que, en general, el efecto del NaCl 70 mM sobre la ultraestructura de la hoja se centra principalmente en alteraciones en la estructura de la membrana y, sobre todo, de la membrana de los cloroplastos. Por lo tanto, cabría esperar, como consecuencia de la salinidad, que se produjesen alteraciones en el transporte y permeabilidad entre orgánulos celulares, debido al hecho de que generalmente los cloroplastos se encuentran asociados a peroxisomas y mitocondrias (Fig. 24), pudiéndose afectar procesos bioquímicos en los que están implicados los tres orgánulos, como es el caso de la fotorrespiración (Fig. 33) (Huang *et al.*, 1983). Esto estaría de acuerdo con los datos bioquímicos encontrados en este trabajo para las actividades glicolato oxidasa e hidroxipiruvato reductasa por efecto del NaCl. La asociación entre peroxisomas y otras estructuras celulares con las que pueden estar relacionados metabólicamente han sido descritas por algunos autores (Frederick & Newcomb,

1969; Gruber *et al.*, 1970; Vigil, 1970). Por ejemplo, en tres tipos de peroxisomas especializados de soja, el orgánulo al que se asociaba era distinto. Así, en hojas, los peroxisomas se asociaban a los cloroplastos; en cotiledones, a los cuerpos lipídicos, y en nódulos, al retículo endoplasmático liso (Vaughn, 1985), lo que refleja, a su vez, la función metabólica que desempeña el peroxisoma en los distintos órganos de la planta (Tabla 5).

Los resultados descritos en esta Memoria Doctoral muestran, por primera vez, la presencia de actividad endopeptidasa y exopeptidasa en una clase de peroxisomas. La actividad exopeptidasa caracterizada en peroxisomas de hojas es una aminopeptidasa neutra, de bajo peso molecular, que por su sensibilidad a inhibidores de proteasas, pertenece a la clase de serín proteasas, y tiene un grupo(s) tiol y metal(es) en el centro activo. Esta aminopeptidasa de peroxisomas, por su masa molecular, pH óptimo, especificidad de substrato y sensibilidad a inhibidores, se parece a la AP1 de semillas de guisante, implicada tal vez en la movilización de proteínas de reserva durante la germinación (Elleman, 1974). La aminopeptidasa peroxisomal también tiene semejanza con la AMP 4 de maíz (Vodkin & Scandalios, 1980) y con la leucina APasa 2 de hojas de *Euonymus* (Tazaki & Ishikura, 1983, 1984) que puede estar implicada en el recambio proteico de las hojas durante la senescencia. El efecto inhibitorio observado del ATP sobre las aminopeptidasas de peroxisomas y mitocondrias de hojas de guisante podría ser debido a una proteólisis inespecífica, dependiente de ATP, del substrato de la aminopeptidasa (L-Leu-pNA) por la actividad endopeptidasa presente en estos orgánulos. Este supuesto parece probable ya que se ha demostrado la presencia de actividades proteolíticas dependientes de ATP en hojas de espinaca (Hammond & Preiss, 1983) y en extractos de epicotilos de guisante (Nakazawa *et al.*, 1991), e incluso se ha detectado actividad dependiente de ATP por conjugación a la

ubiquitina en plantas superiores (Vierstra *et al.*, 1985; Vierstra, 1987; Veierskov *et al.*, 1992).

La aminopeptidasa peroxisomal es muy específica para la L-Leu- $\beta$ NA y, por lo tanto, parece ser una leucina aminopeptidasa. La enzima fue localizada mayoritariamente en la fracción soluble del peroxisoma, si bien una pequeña parte de aminopeptidasa aparece unida a la membrana peroxisomal. En mitocondrias de guisante fueron detectadas tres aminopeptidasas distintas, con diferente especificidad de sustrato para los L-aminoacil- $\beta$ NAs (AP 1, AP 2 y AP 3). Las aminopeptidasas han sido localizadas mayoritariamente en cloroplastos y en el citosol (Huffaker, 1990) pero se conoce poco sobre su presencia en mitocondrias.

Las actividades proteolíticas peroxisomales podrían desempeñar una función en el sistema de recambio de proteínas de estos orgánulos. Datos recientes han demostrado la rápida degradación en microcuerpos del enzima específico de glioxisoma, malato sintasa, durante la transición de glioxisomas a peroxisomas de hojas inducida por la luz (Mori & Nishimura, 1989). La actividad aminopeptidasa peroxisomal podría actuar en conjunción con endopeptidasas en el mecanismo de la transición del microcuerpo propiciada por la luz. Adicionalmente, la aminopeptidasa podría cooperar en la desestabilización de proteínas para promover posteriores ataques proteolíticos, según la regla del extremo amino terminal de recambio selectivo de proteínas, propuesto por Varshavsky *et al.* (1988). Las proteasas peroxisomales también podrían estar implicadas en el procesamiento postraducional de polipéptidos peroxisomales sintetizados en el citoplasma. Aunque la mayoría de las proteínas peroxisomales no son procesadas proteolíticamente a su entrada en este orgánulo (Lazarow & Fujiki, 1985; Lazarow, 1989), recientemente ha sido identificada una nueva señal de reconocimiento peroxisomal ("peroxisomal targeting signal") degradable, en el extremo amino terminal de la 3-cetoacil-CoA

tiolasa de peroxisomas de rata (Swinkels *et al.*, 1991). La actividad proteolítica endopeptidasa y exopeptidasa encontrada en peroxisomas podrían tener una función en el corte de prepiezas amino terminales en la translocación de la proteína al interior de los peroxisomas. Finalmente, es importante tener en cuenta que de las proteasas encontradas en los peroxisomas de hojas de guisante podrían desempeñar un papel en la interconversión entre las formas D y O de la xantina oxidorreductasa. Realmente, se sabe muy poco de la proteasa o proteasas que puedan regular esta interconversión, y sólo se conoce que proteasas como la tripsina, quimotripsina y subtilisina (todas ellas del tipo serín proteasa), y la papaína (una SH-proteasa), pueden actuar en la conversión irreversible *in vitro* de la XDH en XOD (McKevey *et al.*, 1988). La caracterización de la actividad endopeptidasa peroxisomal y de su substrato nativo específico podría ayudar a clarificar esta cuestión, así como el mecanismo del recambio de proteínas y del procesamiento de ciertos polipeptídicos precursores importados a los peroxisomas.

El cultivo *in vitro* de células de hojas supone para éstas un proceso de desdiferenciación y de estrés, debido a que se está forzando su maquinaria metabólica, no sólo por las condiciones ambientales sino también por los niveles hormonales a las que están sometidas. Un ejemplo de esto lo constituye el patrón isoenzimático de la actividad SOD en cultivos celulares de hojas de guisante, donde se observó un aumento en la actividad Mn-SOD tanto en callos como en suspensiones celulares, y una disminución paralela en la actividad Cu,Zn-SOD de callos, que casi llega a desaparecer en las suspensiones celulares. Todo esto puede ser un reflejo de la actividad metabólica del compartimiento celular en el que estas enzimas están ubicadas. Así, los incrementos en los niveles de Mn-SOD, que está localizada en mitocondrias y peroxisomas, puede ser una indicación del protagonismo que en estas condiciones pueden desempeñar estos orgánulos, en contraste



con lo que ocurre con la actividad Cu,Zn-SOD II, localizada en cloroplastos, unos orgánulos que en las condiciones de cultivo celular utilizadas pierden pigmentación manteniéndose en estado de proplastidios. De hecho, la Mn-SOD está considerada como una proteína de estrés y su inducción en situaciones limitantes ha sido descrita por distintos investigadores (del Río *et al.*, 1985; Palma *et al.*, 1987; Sevilla *et al.*, 1987; Droillard *et al.*, 1990; Bowler, 1989,1991). Desafortunadamente, en esta Memoria Doctoral no se ha podido llevar a cabo el estudio del efecto del estrés salino sobre el metabolismo del oxígeno activado en peroxisomas de cultivos celulares de hojas de guisante, lo que hubiera proporcionado una información más directa que en el caso de la planta completa, salvando las diferencias existentes entre las condiciones fisiológicas de la planta y las condiciones *in vitro* de las células no organizadas, que constituyen los cultivos celulares.

Los resultados descritos en esta Memoria Doctoral han puesto de manifiesto el papel que los peroxisomas de la hoja desempeñan en situaciones de estrés salino en plantas de *Pisum sativum*, tanto por lo que concierne al metabolismo del oxígeno activado como al metabolismo de los ureidos. La utilización de dos cultivares de guisante con distinta sensibilidad al NaCl ha permitido adentrarse en el estudio de algunos mecanismos moleculares de la tolerancia al NaCl en peroxisomas de hojas. Los resultados obtenidos sugieren que los peroxisomas de hojas son capaces de biosintetizar alantoína y apuntan nuevas funciones celulares de estos orgánulos en el metabolismo de la hoja. Finalmente, la demostración de la presencia de la actividad proteolítica en una clase de peroxisomas sugiere que las proteasas peroxisomales pueden estar implicadas en la regulación de muchos procesos metabólicos que tienen lugar en peroxisomas, además de desempeñar otras funciones importantes en estos orgánulos celulares.



## CONCLUSIONES

GALGO  
PARCHEMIN



1. Se estudió el efecto de la salinidad sobre el metabolismo del oxígeno activado y de los ureidos en peroxisomas de hojas de dos cultivares de *Pisum sativum* L. con distinta sensibilidad al NaCl. Los resultados obtenidos indicaron la existencia de diferencias entre las actividades específicas de algunas enzimas intraperoxisomales de hojas de plantas sensibles y relativamente tolerantes al NaCl. El aumento de la actividad glicolato oxidasa por la salinidad en plantas tolerantes sugiere que la intensificación de la fotorrespiración, a nivel del segmento peroxisomal de la glicolato oxidasa, podría constituir un mecanismo molecular de la tolerancia al cloruro sódico.
2. La detección en peroxisomas de hojas de guisante de xantina y de ácido úrico, junto con la presencia de las enzimas xantina oxidoreductasa y urato oxidasa, indica que la biosíntesis del ureido alantoína también tiene lugar en peroxisomas de hojas, al igual que en peroxisomas de nódulos de la raíz, único lugar donde hasta ahora, estaba documentada la biogénesis de alantoína. Este hecho asigna a los peroxisomas de hojas una nueva función celular relacionada con el catabolismo de las purinas y la biosíntesis de ureidos.
3. En peroxisomas de hojas de guisante se han detectado las dos formas interconvertibles de la xantina oxidoreductasa, siendo la xantina oxidasa la forma más abundante. Tanto la xantina deshidrogenasa como la xantina oxidasa eran inhibidas por el NaCl en plantas sensibles y tolerantes, pero la salinidad aparentemente no afectaba a la interconversión de la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa.

4. En membranas de peroxisomas, ni la generación de  $O_2^{\cdot-}$  dependiente de NADH ni la peroxidación lipídica resultaban alteradas por la salinidad. Sin embargo, los resultados obtenidos de la concentración de  $H_2O_2$  en peroxisomas sugieren que el peróxido de hidrógeno podría difundir al citosol como consecuencia de la salinidad, con el consiguiente peligro para la célula vegetal debido a la posible participación del  $H_2O_2$  en distintas reacciones oxidativas de carácter tóxico.
  
5. Se ha demostrado por primera vez la presencia de actividad proteolítica en una clase de peroxisomas. En orgánulos purificados de hojas de *Pisum sativum* L. se identificó la existencia de actividad endopeptidasa y exopeptidasa. Esta última actividad se caracterizó como una leucina aminopeptidasa perteneciente a la clase de las serín proteasas. La localización de proteasas en los peroxisomas sugiere que estas enzimas podrían estar implicadas en la interconversión de la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa, además de desempeñar otras funciones relacionadas con el recambio de proteínas y el procesamiento de polipéptidos precursores importados a los peroxisomas.

## ABREVIATURAS





- L-Aa  $\beta$ NA: L-aminoacil  $\beta$ -naftilamida.  
ASB: Albúmina de suero bovino.  
AT: 3-amino-1,2,4-triazol.  
BA: Benciladenina.  
BTPA: N-benzoil-L-tirosina-*p*-nitroanilida.  
2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.  
DAB: 3,3'-diaminobencidina.  
DETAPAC o DTPA: Ácido dietilentriaminopentaacético.  
DTT: Ditioneitol.  
E-64: N-[N-(L-3-trans-carboxioxirano-2-carbonil)-L-leucil]-agmatino.  
EDTA: Ácido etilendiamino tetraacético.  
FAD: Flavín adenín dinucleótido.  
FMN: Flavín mononucleótido.  
FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography  
GSH: Glutathion.  
HPRasa: Hidroxipiruvato reductasa.  
L-Leu *p*NA: L-leucina *p*-nitroanilida.  
MDA: Malondialdehido.  
MMO: Medio mínimo de compuestos orgánicos.  
Mops: Ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico.  
NAA: Ácido naftalenacético.  
NBT: Azul de nitrotetrazolio.  
PAR: "Photosynthetically active radiation" (radiación fotosintéticamente activa).  
PHMP: *p*-Hidroximercuribenzoato.  
Picloran: Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico.  
PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.  
PVPP: Polivinil polipirrolidona.  
SOD: Superóxido dismutasa.  
TEMED: N,N'-N'-N'-tetrametil-etilendiamida.  
Tris: Tris (hidroxipiruvato)-aminometano.  
XDH: Xantina deshidrogenasa.  
XOD: Xantina oxidasa.







GALGO  
P A R O H E M I N

**BIBLIOGRAFÍA**



- Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol.** **105**: 121–126.
- Alkins, C.A. (1981) Metabolism of purine nucleotides to form ureides in nitrogen-fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **FEBS Lett.** **125**:89–93.
- Alscher, R.G. (1989) Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. **Physiol. Plant.** **77**: 457-464.
- Ames, B.N. (1989) Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. **Free Rad. Res. Comm.** **7**: 121-128.
- Ames, B.N., Catheart, R., Schwiers, E. & Hochstein, P. (1981) Uric acid provides an antioxidant defenses in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **78**: 6858–62.
- Angermüller, S. (1989) Peroxisomal oxidases: cytochemical localization and biological relevance. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Gajewski, E. & Dizdaroglu, M. (1989) Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. **J. Biol. Chem.** **264**: 20509–20512.
- Asada, K. (1984) Chloroplast: formation of active oxygen and its scavenging. **Methods Enzymol.** **105**: 422–429.
- Asada, K. & Takahashi, M. (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. En: Photoinhibition (Kyle, D.I., Osmond, C.R. & Arntzen, C.J., eds.), pp. 227-286. Elsevier Science Publishers B.V. Oxford.
- Aslam, M., Huffaker, R.C. & Rains, D.W. (1984) Early effects of salinity on nitrate assimilation in barley seedlings. **Plant Physiol.** **76**: 321–325.
- Atkins, C.A. (1991) Ammonia assimilation and export of nitrogen from the legume nodule. En: Biology and biochemistry of nitrogen fixation (Dilworth, M.J. & Glen, A.R., eds.), pp. 293-319. Elsevier.
- Bachmair, A., Finley, D. & Varshausky, A. (1986) *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. **Science** **234**: 179–186.
- Ball, M.C. & Anderson, J.M. (1986) Sensitivity of Photosystem II to NaCl in relation to salinity. Comparative studies with thylakoids sensitive pea, *Pisum sativum*. **Aust. J. Plant Physiol.** **13**: 689–98.
- Ball, M.C. & Farquhar, G.D. (1984) Photosynthetic and stomatal response of two mangrove species, *Aegiceras corniculatum* and *Avicennia masiva* to long term salinity and humidity conditions. **Plant Physiol.** **74**: 1–6.

- Bannister, J.V., Bannister, W.H. & Rotilio, G. (1987) Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. **CRC Crit. Rev. Biochem.** **22**: 111-180.
- Barkley, K.B. & Gregory, E.M. (1990) Tetrameric manganese dismutase from *Actinomyces*. **Arch. Biochem. Biophys.** **280**: 192-200.
- Barret, A.J. (1986) The classes of proteolytic enzymes. En: *Plant proteolytic enzymes* (Dalling, M.J., ed.). Vol I pp. 2-16. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida.
- de Barros, E.G. & Larkins, B.A. (1990) Purification and characterization of zein-degrading proteases from endosperm of germinating maize seeds. **Plant Physiol.** **94**: 297-303.
- Battelli, M.G., Abbondanza, A. & Stirpe, F. (1992) Effects of hypoxia and ethanol on xanthine oxidase of isolated rat hepatocytes: conversion from D to O form and leakage from cells. **Chem. Biol. Interactions** **83**: 73-84.
- Becana, M., Paris, F.J., Sandalio, L.M. & del Río, L.A. (1989) Isoenzymes of superoxide dismutase in nodules of *Phaseolus vulgaris* L., *Pisum sativum* L., and *Vigna unguiculata* (L.) Walp.. **Plant Physiol.** **90**: 1286-1292.
- Beevers, H. (1982) Glyoxysomes in higher plants. **Ann. Rev. Plant Physiol.** **33**: 243-253.
- Behar, D., Czapski, G., Rabani, J., Dorfman, L.M. & Schwartz, H.A. (1970) The acid dissociation constant and decay kinetics of the perhydroxyl radical. **J. Phys. Chem.** **74**: 3209-3213.
- Belver, A. & Travis, R.L. (1990) Effect of NaCl and mannitol on plasma membrane in corn roots. **Protoplasma** **155**: 76-84.
- Bewley, J.D. & Greenwood, J.S. (1990) Protein storage and utilization in seeds. En: *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (Dennis, D.T. & Turpin, D.H., eds.), pp. 456-469. Longman Scientific & Technical.
- Beyer, W., Imlay, J. & Fridovich, I. (1991) Superoxide dismutases. **Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.** **40**: 221-253.
- Biecker, K.L. & Silhavy, T.J. (1990) The genetics of protein secretion in *E.coli*. **Trends Genet. Sci.** **6**: 329-334.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C. & Saran, M. (1990) Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods Enzymol.** **106**: 343-355.
- Boveris, A. (1984) Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. **Methods Enzymol** **105**: 429-435.

- Boveris, A. & Cadenas, E. (1982) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. En: Superoxide dismutase (Oberley, L.W., ed.). Vol. 2, pp. 15-30. CRC Press, Inc. Boca Ratón, FL.
- Boveris, A., Sanchez, R.A. & Becon, M.T. (1978) Antimycin and cyanide-resistant respiration and superoxide anion production in fresh and aged potato tuber mitochondrial. **FEBS Lett** 92: 333-338.
- Bowler, C., Alliotte, T., De Loose, van Montagu, M. & Inzé, D. (1989) The induction of manganese superoxide dismutase in response to stress in *Nicotiana plumbaginifolia*. **EMBO J.** 8(1): 31-38.
- Bowler, C., Slooten, L., Vandenbraden, S., De Rycke, R. Botterman, J., Sybesma, C., van Montagu, M. & Inzé, D. (1991) Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic. **EMBO J.** 10(7): 1723-1732.
- Boylan, M.T. & Sussex, I.M. (1987) Purification of an endopeptidase involved with storage-protein degradation in *Phaseolus vulgaris* L. cotyledons. **Planta** 170: 343-352.
- Bradford, M.M. (1966) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
- Braun, Y., Hassidim, M., Lerner, H.R. & Reinhold, L. (1986) Studies on H<sup>+</sup>-translocating ATPases in plants of varying resistance to salinity. I. Salinity during growth modulates the proton pump in the halophyte *Atriplex nummularia*. **Plant Physiol.** 81: 1050-1056.
- Bray, R.C. (1963). Xanthine oxidase. En: The Enzymes (Boyer, P.D., Lardy, H. & Myrbäck, K., eds.), vol. 7, pp. 533-556. Academic Press, New York.
- Britigan, B.E., Pou, S., Rosen, G.M., Lilleg, D.M. & Buettner, G.R. (1990) Hydroxyl radical is not a product of the reaction of xanthine oxidase and xanthine. The confounding problem of adventitious iron bound to xanthine oxidase. **J. Biol. Chem.** 265(29): 17533-17538.
- Brugnoli, E. & Björkman, O. (1992) Growth of cotton under continuous salinity stress: influence on allocation pattern, stomatal and non-stomatal components of photosynthesis and dissipation of excess light energy. **Planta** 187: 335-347.
- Brugnoli, E. & Lauteri, M. (1991) Effects of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity and carbon isotope discrimination of salt-tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and salt-sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C<sub>3</sub> non-halophytes. **Plant Physiol.** 95: 628-635.
- Buege, J.A. & Aust, S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol** 52: 302-310.

- Bueno, P. & del Río, L.A. (1992) Purification and properties of glyoxysomal cuprozinic superoxide dismutase from watermelon cotyledons (*Citrullus vulgaris* Schrad.). **Plant Physiol.** 98: 331–336.
- C.I.I. (1969) Métodos de referencia para la determinación de elementos minerales en vegetales. I. Nitrógeno, fósforo, potasio, sodio, calcio y magnesio. **Anal. Edaf. Agrobiol.** 28: 409–430.
- C.I.I. (1973) Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux. Détermination des éléments Ca, Fe, Mg, Cu, Mn et Zn par absorption atomique. **Oleagineux** 28: 87–92.
- Cadenas, E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. **Ann. Rev. Biochem.** 58: 79–110.
- Canini, A., Civitareale, P., Marini, S., Caida, M. G. & Rotilio, G. (1992) Purification of iron superoxide dismutase from the cyanobacterium *Anabaena cylindrica* Lemm. and localization of the enzyme in heterocysts by immunogold labeling. **Planta** 181:438–444.
- Canut, H., Alibert, G., Carrasco, A. & Boudet, A.M. (1986) Rapid degradation of abnormal protein in vacuoles from *Acer pseudoplatanus* L. cells. **Plant Physiol.** 81: 460–463.
- Canut, H., Dupré, M., Carrasco, A. & Boudet, A.M. (1987) Proteases of *Melilotus alba* mesophyll protoplasts. II. General properties and effectiveness in degradation of cytosolic and vacuolar enzymes. **Planta** 170: 541–549.
- Carrasco, P. & Carbonell, J. (1990) Changes in the level of peptidase activities in pea ovaries during senescence and fruit set induced by gibberellic acid. **Plant Physiol.** 92: 1070–74.
- Casano, L.M., Desimone, M. & Trippi, V.S. (1989) Proteolytic activity at alkaline pH in oat leaves, isolation of an aminopeptidase. **Plant Physiol.** 91: 1414–18.
- Casano, L.M., Gómez, L.D. & Trippi, V.S. (1990) Oxygen- and light-induced proteolysis in isolated oat chloroplasts. **Plant Cell Physiol.** 31(3): 377–382.
- Casano, L.M. & Trippi, V.S. (1992) The effect of oxygen radicals on proteolysis in isolated oat chloroplasts. **Plant Cell Physiol.** 33(3): 329–332.
- Cavalié, G. (1982) Photorespiration. **Bull. Soc. Bot. Fr.** 129: 37-52.
- Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H., Ferber, S. & Hershko, A. (1980) Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. **J. Biol. Chem.** 255: 7525–28.
- Ciechanover, A., Finley, D. & Varshavsky, A. (1984) The ubiquitin-mediated proteolytic pathway and mechanisms of energy-dependent intracellular protein degradation.

- J. Cell Biochem. 24: 27-53.**
- Claes, B., Dekeyser, R., Villarroel, R., van den Bulcke, M., Bauw, G., van Montagu, M. & Caplan, A. (1990) Characterization of a rice gene showing organ-specific expression in response to salt stress and drought. **Plant Cell 2: 19-27.**
- Corpas, F.J., Gómez, M. & del Río, L.A. (1991) Metabolismo del oxígeno activado en peroxisomas de dos cultivares de *Pisum sativum* con distinta sensibilidad al NaCl. Libro Resúmenes del II Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal (Madrid), pp. 80.
- Corpas, F.J., Sandalio, L.M. & del Río, L.A. (1989) Actividad xantina oxidoreductasa (formas O y D) en peroxisomas de *Vigna unguiculata* L.. Libro Resúmenes del XVI Congreso Nacional de Bioquímica (Alicante): abst. 22-5.
- Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Leidi, E.O., Hernández, J.A., Sevilla, F. & del Río, L.A. (1991) Subcellular distribution of superoxide dismutase in leaves of ureide-producing leguminous plant. **Physiol. Plantarum 82: 285-291.**
- Costigan, S.A., Franceschi, V.R. & Ku, M.S.B. (1987) Allantoinase activity and ureide content of mesophyll and paraveinal mesophyll of soybean leaves. **Plant Science 50: 179-187.**
- Coughlan, M.P. (1980) Aldehyde oxidase, xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase: hydroxylase containing molybdenum-iron-sulphur and flavin. En: Molybdenum and molybdenum-containing enzymes (Coughlan, M.P., ed.) pp 119-185. Pergamon Press, Oxford.
- Crystal, R.G. & Bast, A. (1991) Proceedings of a Symposium. Oxidants and antioxidants: pathophysiologic determinants and therapeutic agents. The American Journal of Medicine, vol. 91.
- Czapski, G. (1971) Radiation chemistry of oxygenated aqueous solutions. **Ann. Rev. Phys. Chem. 22: 171-208.**
- Czapski, G., Aronovitch, J. Samuni, A. & Chevion, M. (1983) The sensitization of the toxicity of superoxide and vitamin C by copper and iron. A site specific mechanism. En: Oxy Radicals and their Scavenger Systems (Chen, G. & Greenwald, R.A., eds), vol. 1, pp 111-115. Elsevier Biomedical, New York.
- Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev. 59: 527-35.**
- Chang, L.Y., Slot, J.W., Genze, H.J. & Crapo, J.P. (1988) Molecular immunocytochemistry of the Cu,Zn superoxide dismutase in rat hepatocytes. **J. Cell Biol. 107: 2169-2179.**
- Cheeseman, J.M. (1988) Mechanisms of salinity tolerance in plants. **Plant Physiol. 87: 547-550.**



- Chou, P.T. & Khan, A.U. (1983) L-Ascorbic acid quenching of singlet delta molecular oxygen in aqueous media: generalized antioxidant property of vitamin C. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **115**: 932-37.
- Chowdhury, S.R. & Choudhuri, M.A. (1985) Hydrogen peroxide metabolism as an index of water stress tolerance in jute. **Physiol. Plant.** **65**: 503-507.
- Christensen, T.M.I.E. & Jochimsen, B.U. (1983) Enzymes of ureide synthesis in pea and soybean. **Plant Physiol.** **72**: 56-59.
- Chua, N.H. & Schmidl, G.J. (1979) Transport of proteins into mitochondria and chloroplasts. **J. Cell Biol.** **81**: 461-483.
- Dahlhelm, H., Schober, H. & Ficker, K. (1982) Investigations on the subcellular localization of proteolytic enzymes in *Pisum sativum* L. I. Proteolytic activity in mitochondria. **Biochem. Physiol. Pflanzen.** **177**: 156-166.
- Dalta, D.B., Triplett, E.W. & Newcomb, E.H. (1991) Localization of xanthine dehydrogenase in cowpea root nodules. Implications for the interaction between cellular compartments during ureide biogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **88**: 4700-02.
- Dalling, M.J., Tang, A.B. & Huffaker, R.C. (1983) Evidence for the existence of peptide hydrolase activity associated with chloroplasts from barley mesophyll protoplasts. **Z. Pflanzenphysiol** **111**: 311-318.
- Davies, D.D. (1982) Physiological aspects of protein turnover. En: Encyclopedia of Plant Physiology (Boulter, D. & Parthier, B., eds.), vol. 14A, pp 189-228. Springer-Verlag, Berlin.
- Davies, K.J.A. (1986) Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses: a hypothesis. **J. Free Radic. Biol. Med.** **2**: 155-73.
- Davis, B.J. (1964) Disc electrophoresis II. Methods and application to human serum proteins. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** **121**: 407-427.
- De Duve, C. & Bandhuim, P. (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles). **Physiol. Rev.** **46**: 323-357.
- De Duve, C., Beaufay, H., Jacques, P., Rahman-Li, Y., Sellinger, O.Z., Wattiaux, R. & De Connic, S. (1960) Intracellular localization of catalase and some oxidases in rat liver. **Biochim. Biophys. Acta** **40**: 186-187.
- Delane, R., Greenway, H., Munns, R. & Gibbs, J. (1982) Ion concentration and carbohydrate status of the elongating leaf tissue of *Hordeum vulgare* growing at high external NaCl. I. Relation-ship between solute concentration and growth. **J. Exp. Bot.** **33**: 557-573.

- Della Corte, E., Gozzetti, G., Novello, F. & Stirpe, F. (1969) Properties of xanthine oxidase from human liver. *Biochem. Biophys. Acta* **191**: 164–166.
- Demple, B. & Halbrook, J. (1983) Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature* **304**: 466–68.
- Dhaunsi, G.S., Gulati, S., Singh, A.K., Orak, J.K., Asayama, K. & Singh, I. (1992) Demonstration of Cu,Zn superoxide dismutase in rat liver peroxisomes. Biochemical and immunochemical evidence. *J. Biol. Chem.* **267** (10): 6870–73.
- Dhinsa, R.S. (1987) Glutathione status and protein synthesis during drought and subsequent rehydration in *Tortula ruralis*. *Plant Physiol.* **83**: 816–19.
- Diplock, A.T. (1983) The role of vitamin E in biological membranes. En: CIBA Foundation Symposium 101: Biology of vitamin E (Porter, R. & Whelan, J., eds) pp 45–55. London, Pitman.
- Doke, N. (1985) NADPH-dependent  $O_2^{\cdot-}$  generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infectans*. *Physiol. Plant. Pathol.* **27**: 311–12.
- Douce, R., Christensen, E.L. & Bonner, W.D. Jr. (1972) Preparation of intact plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **275**: 148–160.
- Douce, R., Mannella, C.A. & Bonner, W.D. Jr. (1973) External NADH dehydrogenases of intact plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **292**: 105–116.
- Downton, W.J.S. (1977) Photosynthesis in salt-stressed grapevines. *Aust. J. Plant Physiol.* **4**: 183–192.
- Downton, W.J.S., Grant, W.J.R. & Robinson, S.P. (1985) Photosynthetic and stomatal responses of spinach leaves to salt stress. *Plant Physiol.* **77**: 85–88.
- Droillard, M.J. (1992) Rôle joué par les radicaux libres et les superoxyde dismutases au cours de la sénescence du pétale d'oeillet coupé (*Dianthus caryophyllus* L., cv Ember). Tesis Doctoral. Universidad de París.
- Droillard, M.J. & Paulin, A. (1990) Isoenzymes of superoxide dismutase in mitochondrias and peroxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Plant Physiol* **94**: 1187-1192.
- Duke, M.V. & Salin, M.L. (1985) Purification and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Ginkgo biloba*. *Arch. Biochem. Biophys.* **243**: 305–314.
- Elstner, E.F. (1982) Oxygen activation and oxygen toxicity. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**: 73–96.

- Elstner, E.F. (1987) Metabolism of activated oxygen species. En: *The Biochemistry of Plants* (Davis, D.D., ed.) pp 253–315. Academic Press, San Diego.
- Elstner, E.F. (1990) *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin*. BI-Wissenschafts-Verlang, Mannheim.
- Elstner, E.F. & Heupel, A. (1973) On The carboxylation of  $\alpha$ -keto acids by isolated chloroplasts. **Biochem. Biophys. Acta** **325**: 182-188.
- Elleman, T.C. (1974) Aminopeptidases of pea. **Biochem. J.** **141**: 113–118.
- Epel, B.L. & Neuman, J. (1973) The mechanism of the oxidation of ascorbate and  $Mn^{2+}$  by chloroplast, the role of the radical superoxide. **Biochem. Biophys. Acta** **325**: 520–29.
- Erdei, L., Stuiver, B. & Kuiper, P. (1980) The effect of salinity on lipid composition and on activity of  $Ca^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  stimulated ATPases in salt-sensitive and salt-tolerant *Plantago* species. **Physiol Plant.** **49**: 315–19.
- Fahimi, H.D. & Sies, H. (1987) *Peroxisomes in biology and medicine*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Fang, T.K., Donaldson, R.P. & Vigil, E.L. (1987) Electron transport in purified glyoxysomal membranes from castor-bean endosperm. **Planta** **172**: 1-13.
- de Felipe, M.R., Lucas, M.M. & Pozuelo, J.M. (1988) Cytochemical study of catalase and peroxidase in the mesophyll of *Lolium rigidum* plants treated with isoproturon. **J. Plant Physiol.** **132**: 67–73.
- Fernández, E. & Cárdenas, J. (1981) Occurrence of xanthine dehydrogenase in *Chlamydomonas reinhardtii*: A common cofactor shared by xanthine dehydrogenase and nitrate reductase. **Planta** **153**: 254-257.
- Flowers, T.J., Duque, E., Hajibagheri, M.A., McGonigle, T.P. & Yeo, A.R. (1985) The effect of salinity on leaf ultrastructure and net photosynthesis of two varieties of rice: further evidence for a cellular component of salt-resistance. **New Phytol.** **100**: 37-43.
- Foster, J.G. & Edwards, G.E. (1980) Localization of superoxide dismutase in leaves of  $C_3$  and  $C_4$  plants. **Plant Cell Physiol.** **21**: 895-906.
- Franceschi, V.R. & Giaquinta, R.T. (1983) The paraveinal mesophyll of soybean leaves in relation to assimilate transfer and compartmentation. I. Ultrastructure and histochemistry during vegetative development. **Plant** **157**: 411–421.
- Franceschi, V.R. & Giaquinta, R.T. (1983) The paraveinal mesophyll of soybean leaves in relation to assimilate transfer and compartmentation. II. Structural, metabolic and compartmental changes during reproductive growth. **Planta** **157**: 422–431.

- Frank, L. (1985). Oxygen toxicity in eukaryotes. En: Superoxide dismutase vol 3. Pathological states (Oberley, L.W., ed.), pp. 1-43. CRC Press, Inc., Boca Ratón, Florida.
- Frederick, S.E. & Newcomb, E.H. (1969) Cytochemical localization of catalase in leaf microbodies (peroxisomes). **J. Cell Biol.** **43**: 343-353.
- Frew, J.E., Jones, P. & Scholes, G. (1983) Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides. **Anal. Chim. Acta** **155**: 139-150.
- Fridovich, I. (1983) Superoxide radical. An endogenous toxicant. **Ann. Rev. Pharmacol.** **23**: 239-257.
- Fridovich, I. (1985) Cytochrome c. En: CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research (Greenwald, R.A., ed.) pp. 121-122. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida.
- Fridovich, I. (1986a) Biological effects of the superoxide radical. **Arch. Biochem. Biophys.** **247**: 1-11.
- Fridovich, I. (1986b) Superoxide dismutases. En: Advances in enzymology and related areas of molecular biology (Meister, A., ed.), pp. 61-97. John Wiley & Sons, New York.
- Fryer, M.J. (1992) The antioxidant effects of thylakoid vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol). **Plant, Cell Environ.** **15**: 381-392.
- Gabarino, J. & Dupont, F.M. (1988) NaCl induces a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport in tonoplast vesicles from barley roots. **Plant Physiol.** **86**: 231-236.
- Gantotti, B.V. & Kartha, K.K. (1986) Pea. Handbook of Plant Cell Culture (Evans, D.A., Sharp, W.R. & Ammirato, P.V., eds.) Vol. 4 pp 370-418. Macmillan Publishing Company, New York.
- Gavilanes, J.G., Gonzales de Buitrago, G., Perez-Castells, R. & Rodriguez, R. (1982) Isolation, characterization, and amino acid sequence of a ubiquitin-like protein from insect eggs. **J. Biol. Chem.** **257**: 10267-10270.
- Gaxiola, R., de Larrinoa, I.F., Villaba, J.M. & Serrano, R. (1992) A novel and conserved salt induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. **EMBO J.** **9**(2): 3157-3165.
- Gaxiola, R., de Larrinoa, I.F. & Serrano, R. (1991) Isolation and characterization of genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involved in salt tolerance mechanisms. Workshop on salt tolerance in microorganisms and plants: physiological and molecular aspects. Fundación Juan March (Madrid), pp. 41.
- Geller, B.L. & Winge, D.R. (1982) Rat liver Cu,Zn-superoxide dismutase. Subcellular location in lysosomes. **J. Biol. Chem.** **257**: 8945-8952.

- Gerhardt, B. (1981) Enzyme activities of  $\beta$ -oxidation pathway in spinach leaf peroxisomes. **FEBS Lett.** **126**: 71-73.
- Gerhardt, B. (1986) Basic metabolic function of the higher plant peroxisome. **Physiol. Vég.** **24**: 397-410.
- Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P. & Fenn, W.V. (1954) Oxygen poisoning and X-irradiation: Mechanism in common. **Science** **119**: 623-626.
- Goldstein, G.M., Scheid, M., Hammerling, U., Boyse, E. Schlesinger, P.H. & Niall, H.D. (1975) Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **72**: 11-15.
- Goned, S.J., Keller, G.A., Hosken, N., Wilkinson, J. & Subramani, S. (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. **J. Cell Biol.** **108**: 1657-1664.
- Gralla, E.B. & Kosman, D.J. (1992) Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and related fungi. **Adv. Genet.**: en prensa.
- Granger, D.N., Rotilio, G. & Mc Cord, J.M. (1981) Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. **Gastroenterology**, **81**: 22.
- Greenway, H. & Munns, R. (1980) Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Ann. Rev. Plant Physiol** **31**: 149-90.
- Griffith, O.M. (1983) Techniques of preparative, zonal and continuous flow ultracentrifugation. Beckman Instruments Inc.
- Gronwald, J.W., Suhayda, C.G., Tal, M. & Shannon, M.C. (1990) Reduction in plasma membrane ATPase activity of tomato roots by salt stress. **Plant Science** **66**: 145-153.
- de Groot, H. & Littauer, A. (1988) Reoxygenation injury in isolated hepatocytes: cell death precedes conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** **155** (1): 278-282.
- Gruber, P.J., Trelease, R.N., Becker, W.M. & Newcomb, E.H. (1970) A correlative ultrastructural and enzymatic study of cotyledonary microbodies following germination of fatstoring seeds. **Planta** **93**: 262-288.
- Guerrier, G. (1985) Influence du NaCl sur la capacité photosynthétique des chloroplastes isolés et sur la capacité photorespiratoire (activité glycolate oxidase) des cotylédons de jeunes plantes sensible ou tolérante a la salinité. **Photosynthetica** **19**(4): 542-549.
- Gulati, S., Singh, A.K., Irazu, C., Orak, J. Rajagopalan, P.R., Fitts, C.T. & Singh, I. (1992) Ischemia-reperfusion injury: biochemical alterations in peroxisomes of rat

- kidney. *Arch. Biochem. Biophys.* 295(1): 90–100.
- Halliwell, B. (1982) The toxic effects of oxygen in plant tissues. En: Superoxide dismutase (Oberley, L.W., ed.), vol I, pp. 89-123. CRC Press. Boca Ratón, FL.
- Halliwell, B. (1984) Chloroplast metabolism. Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell, B. (1987) Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chem. Phys. Lips.* 44: 327-340.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1989) Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, London.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. *FEBS Letters* 307(1): 108–112.
- Hammond, J.B.W. & Preiss, J. (1983) ATP-dependent proteolytic activity from spinach leaves. *Plant Physiol* 73: 902–905.
- Hanks, J.F., Schubert, K. & Tolbert, N.E. (1980) Subcellular localization of allantoinase in soybean leaves. *Plant Physiol. Suppl.* 67: 6.
- Hanks, J.F., Tolbert, N.E. & Schubert, K.R. (1981) Localization of enzymes of ureide biosynthesis in peroxisomes and microsomes of nodules. *Plant Physiol* 68: 65–69.
- Hasan, N.M., Cundall, R.B. & Adams, G.E. (1992) Xanthine oxidase/ dehydrogenase activity in intact cultured cells (*in situ* analysis). *Free Rad. Res. Comms.* 16(3): 175–182.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. & Handa, A.K. (1986) Cellular metabolisms of salinity tolerance. *Hortscience* 21(6): 1317–1324.
- Hassidim, M., Braun, Y., Lerner, H.R. & Reinhold, L. (1986) Studies on H<sup>+</sup>-translocating ATPases in plants of varying resistance to salinity. II. K<sup>+</sup> strongly promoted development of membrane potential in vesicles from cotton roots. *Plant Physiol.* 81: 1057–1061.
- Hatfield, P.M. & Viertra, R.D. (1990) Protein turnover. En: Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology (Dennis, D.T. & Turpin, D.H., eds.), pp. 448-455. Longman Scientific & Technical.
- Hawlitsek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschung, M., Hartl, F.U. & Neupert, W. (1988) Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell* 53: 795-806.
- Hayashi, T., Sawa, K., Kawasaki, M., Arisawa, M., Shimizu, M. & Morita, N. (1988) Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J. Nat. Products* 51(2): 345–48.

- Heikoop, J.C., van den Berg, M., Strijland, A., Weijers, P.J., Just, W.W., Meijer, A.J. & Tager, J.M. (1992) Turnover of peroxisomal vesicles by autophagic proteolysis in cultured fibroblasts from Zellweger patients. **Eur. J. Cell Biol.** **57**: 165–171.
- Hems, D.A. & Brosnan, J.T. (1970) Effects of ischemia on control of metabolites in rat liver and kidney *in vivo*. **Biochem. J.** **120**: 105–111.
- Hernández, J.A. (1992) Metabolismo del oxígeno activado en cloroplastos y mitocondrias de plantas de *Pisum sativum* L. en condiciones de salinidad. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Hernández, J.A., Corpas, F.J., Gómez, M., del Río, L.A. & Sevilla, F. (1992) Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria (enviado a publicación).
- Hershko, A. (1991) The ubiquitin pathway for protein degradation. **Trends Biochem. Sci.** **16**: 265–267.
- Hershko, A. & Ciechanover, A. (1982) Mechanisms of intracellular protein breakdown. **Ann. Rev. Biochem.** **51**: 335–364.
- Heuer, B. & Plaut, Z. (1982) Activity and properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase of sugarbeet plants grow under saline conditions. **Physiol. Plant.** **54**: 505–509.
- Hicks, D.B. & Donalson, R.P. (1982) Electron-transport in glyoxysomal membranes. **Arch. Biochem. Biophys.** **215**: 280–288.
- Hill, R.A. & Bradshaw, R.A. (1969) Fumarase. **Methods Enzymol.** **13**: 91–99.
- Hodgson, R.A.J. & Raison, J.K. (1991) Superoxide production by thylakoids during chilling and its implication in the susceptibility of plants to chilling-induced photoinhibition. **Planta** **183**: 222–28.
- Hong, Y.N. & Schopfer, P. (1981) Control by phytochrome of urate oxidase and allantoinase activities during peroxisome development in the cotyledons of mustard (*Sinapsis alba* L.) seedlings. **Planta** **152**: 325–335.
- Huang, A.H.C., Trelease, R.N. & Moore, T.S. (1983) Plant peroxisomes. Academic Press, New York.
- Huffaker, R.C. (1990) Proteolytic activity during senescence of plants. **New Phytol.** **116**: 199–231.
- Hurkman, W.J., Tao, H.P. & Tanaka, C. (1991) Germin-like polypeptides increase in barley roots during salt stress. **Plant Physiol** **97**: 366–374.

- Ireland, R. (1990) Amino acid and ureide biosynthesis. En: Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology (Dennis, D.T. & Turpin, D.H., eds.), pp. 407-421. Longman Scientific & Technical.
- Jacobsen, H.J. & Kysely, W. (1984) Induction of somatic embryos in pea, *Pisum sativum* L.. **Plant Cell Tissue Organ Culture** 3: 319-324.
- Jolivet, Y., Pireaux, J.C. & Dizengremel, P. (1990) Changes in properties of barley leaf mitochondria isolated from NaCl-treated plants. **Plant Physiol.** 94: 641-646.
- Kanematsu, S. & Asada, K. (1989) Cu,Zn-superoxide dismutases from the fern *Equisetum arvense* and the green alga *Spirogyra* sp. Occurrence of chloroplast and cytosol types of enzyme. **Plant Cell Physiol.** 30: 717-727.
- Kanematsu, S. & Asada, K. (1990) Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of Cu,Zn-superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. **Plant Cell Physiol.** 31: 99-112.
- Kappus, H. & Sies, H. (1981) Toxic drug effects associated with oxygen metabolism, redox cycling and lipid peroxidation. **Experientia** 37: 1233-1241.
- Kawasaki, T., Akiba, T. & Moritsugu, M. (1983) Effects of high ion concentration of sodium chloride and polyethylene glycol on the growth and ion absorption in plants. **Plant and Soil** 75: 75-85.
- Kayupova, G.A. & Klyshev, L.K. (1984) Superoxide dismutase of pea roots under the influence of high NaCl concentrations. **Sov. Plant Physiol.** 31: 441-445.
- Kayupova, G.A. & Klyshev, L.K. (1987) Effect of chloride salinization on some intracellular processes in pea roots. **Vestn. Akad. Nauk. SSR** 4: 67-71.
- Keegstra, K. (1989) Transport and routing of protein into chloroplasts. **Cell** 56: 247-253.
- Keister, D.L. & San Pietro, A. (1963) The photoreduction of cytochrome c by chloroplasts. **Arch. Biochem. Biophys.** 103: 45-53.
- Kelvin, J. & Davies, A. (1986) Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses: an hypothesis. **J. Free Radicals Biol. Med.** 2: 155-173.
- Keller, G.A., Warner, T.G., Steimer, K.S. & Hallewell, R.A. (1990) Copper-zinc superoxide (Cu,Zn-SOD) is a peroxisomal enzyme in human hepatoma cells Hep G-2. Thirtieth Annual Meeting of the American Society for Cell Biology (San Diego, CA): abst. 2543.
- Keller, G.A., Warner, T.G., Steimer, K.S. & Hallewell, R.A. (1991) Cu,Zn-superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88: 7381-85.



- Kerr, M.V. & Groves, D. (1975) Purification and properties of glycollate oxidase from *Pisum sativum* leaves. **Phytochemistry** **14**: 359–362.
- Kindl, H. & Lazarow, P.B. (1982) Peroxisomes and glyoxysomes. The New York Academy of Sciences, New York.
- King, G.J., Hussey, C.E. & Turner, V.A. (1986) A protein induced by NaCl in suspension cultures of *Nicotiana tabacum* accumulated in whole plants roots. **Plant Mol. Biol.** **7**: 441–449.
- Klobus, G., Ward, M.R. & Huffaker, R.C. (1988) Characteristics of injury and recovery of net NO<sub>3</sub> transport of barley seedling from treatment of NaCl. **Plant Physiol.** **87**: 878–882.
- Kirwin, P.M., Elderfield, P.D. & Robinson, C. (1987) Transport of protein into chloroplasts. Partial purification of a thylakoidal processing peptidase involved in plastocyanin biogenesis. **J. Biol. Chem.** **262**: 16386–16390.
- Kisaki, T. & Tolbert, N.E. (1965) Glycolate and glyoxylate metabolism by isolated peroxisomes or chloroplast. **Plant Physiol.** **44**: 249–250.
- Kleiber, J., Kalousek, F., Swaroop, M. & Rosenberg, L.E. (1990) The general mitochondria matrix processing protease from rat liver: structural characterization of the catalytic subunit. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **87**: 7978–7982.
- Kooij, A., Frederiks, W.M., Gobran, R. & van Noorden, C.J.F. (1990) On the localization on xanthine oxidoreductase activity with respect to ischemia-reperfusion injury in rat tissues. **Acta histochemica, Suppl.-Band XL**, S: 101–104.
- Krinsky, N.I. & Deneke, S.M. (1982) Interaction of oxygen and oxy-radical with carotenoids. **JNCI** **69**: 205–210.
- Kuppusamy, P. & Zweier, J. (1989) Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. **J. Biol. Chem.** **264**(17): 9880–9884.
- Kwiatoski, J. & Kaniuga, Z. (1986) Isolation and characterization of cytosolic and chloroplast isoenzymes of Cu,Zn-superoxide dismutase from tomato leaves and their relationships to other Cu,Zn-superoxide dismutase. **Biochem. Biophys. Acta** **874**: 99–115.
- Läuchli, A. (1984) Salt exclusion: an adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions. En: Salinity tolerance in plants (Staples, R.C. & Toenniessen, G.H., eds.) pp 171–187. Wiley-Interscience.
- Layzell, D.B. (1990) N<sub>2</sub> fixation, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reduction and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> assimilation. En: Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology (Dennis, D.T. & Turpin, D.H., eds.), pp. 389–406. Longman Scientific & Technical.

- Lazarow, P.B. (1989) Peroxisome biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1**: 630–634.
- Lazarow, P.B. & Fujiki, Y. (1985) Biogenesis of peroxisomes. *Ann. Rev. Cell Biol.* **1**: 489–530.
- Lea, P.J. & Mifflin, B.J. (1980) Transport and metabolism of asparagine and other nitrogen compounds within the plant. En: *The Biochemistry of Plants* (Mifflin, B.J., ed.), vol. 5, pp. 569-607. Academic Press, New York.
- Leopold, A.C. & Willing, R.P. (1984) Evidence for toxicity effects of salt on membranes. En: *Salinity Tolerance in Plants. Strategies for Crop Improvement* (Staples, R.C. & Toenniessens, G.H., eds.), pp. 67-76. John Wiley & Sons, New York.
- Lerner, H.R. (1985) Adaptation to salinity at the plant cell level. *Plant and Soil* **89**(3): 3-14.
- Levitt, J. (1980) Salt and ion stresses. En: *Responses of Plants to environmental stresses* 2nd ed. pp. 365–488. Academic Press, New York.
- Linás, S.L., Whittenburg, D. & Repine, J.E. (1990) Role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion injuri. *Am. J. Physiol.* : F711-F716.
- Liu, T.H., Beckman, J.S., Freeman, B.A., Hogan, E.L. & Hsu, C.Y. (1989) Polyethylene glycol–conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am. J. Physiol.* **256**: H589–H593.
- Liu, X.Q. & Jagendorf, A.T. (1984) ATP–dependent proteolysis in pea chloroplasts. *FEBS Lett.* **166**: 248–252.
- Liu, X.Q. & Jagendorf, A.T. (1986) Neutral peptidases in the stroma of pea chloroplasts. *Plant Physiol* **81**: 603–608.
- Luster, D.G., Bowditch, M.I., Eldridge, K.M. & Donaldson, R.P. (1988) Characterization of membrane–bound electron transport enzymes from castor bean glyoxysomes and endoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* **265**: 50–61.
- Luster, D.G. & Buckhout, T.J. (1988) Characterization and partial purification of multiple electron transport activities in plasma membranes from maize (*Zea mays*) roots. *Physiol. Plant.* **73**: 339–47.
- Luster, D.G. & Donaldson, R.P. (1987) Orientation of electron transport activities in the membrane of intact glyoxysomes isolated from castor bean endosperm. *Plant Physiol* **85**: 796-800.
- Maas, E.V. & Hoffman, G.J. (1977) Crop salt tolerance. Current assessment. *J. Irrig. Drainage Div. ASCE* **103**: 115–134.

- Maas, E.V., Ogata, E. & Finkel, M.H. (1979) Salt-induced inhibition of phosphate transport and release of membrane proteins from barley roots. **Plant Physiol** **63**: 139-143.
- Mae, T., Makino, A. & Ohira, K. (1984) Relation between ribulose bisphosphate carboxylase content and chloroplast number in naturally senescing primary leaves of wheat. **Plant Cell Physiol.** **25**: 333-336.
- Martinoia, E., Heck, U., Dalling, M.J. & Matile, P. (1983) Changes in chloroplasts number and chloroplast constituents in senescing barley leaves. **Biochem. Physiol. Pflanz.** **178**: 147-155.
- Massey, V., Schopfer, L.M. & Nishino, T. (1989) Differences in protein structure of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase revealed by reconstitution with flavin active site probes. **J. Biol. Chem.** **264**: 10567-10573.
- Matile, P. (1982) Protein degradation. En: Encyclopedia of Plant Physiology (Boulter, D. & Parthier, B., eds.), pp. 169-188. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Matsumoto, T., Yatazawa, M. & Yamamoto, Y. (1977) Effects of exogenous nitrogen-compounds on the concentrations of allantoin and various constituents in several organs of soybean plants. **Plant Cell Physiol.** **18**: 613-24.
- Mayak, S., Ledge, R.L. & Thompson, J.E. (1983) Superoxide radical production by microsomal membranes from senescing carnation flowers. An effect on membrane fluidity. **Phytochemistry** **22**: 1375-80.
- McCay, P.B. (1985) Vitamin E: interaction with free radicals and ascorbate. **Ann. Rev. Nutr.** **5**: 323-340.
- McCord, J.M. (1979) Superoxide dismutases. Occurrence, structure, function and evolution. En: Isozymes: Currents Topics in Biological and Medical Research (Alan, B.R., ed.), pp. 1-21. Liss. Inc., New York.
- McCord, J.M. (1985) Oxygen derived free radicals in post ischemic tissue injury. **N. Engl. J. Med.** **312**: 159-163.
- McCord, J.M., Boyle, J.A., Day, E.D. Jr., Rizzolo, L.J. & Salin, M.L. (1977) A manganese-containing superoxide dismutase from human liver. En: Superoxide and Superoxide Dismutases (Michelson, A.M., McCord, J.M. & Fridovich, I., eds.), pp. 129. Academic Press, London.
- McCord, J.M. & Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.** **244**: 6049-55.
- McKevey, T.G., Höllwarth, M.E., Granger, D.N., Engerson, T.D., Landler, U. & Jones, H.P. (1988) Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine

- oxidase in ischemic rat liver and kidney. *Am. J. Physiol.* **254**: G753–G760.
- Mehler, A.H. (1981) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. Mechanism of the reduction of  $O_2^-$  and other Hill reagents. *Arch. Biochem. Biophys.* **33**: 65–67.
- Meshnick, S.R., Trang, N.L., Kitchener, K., Cerami, A. & Eaton, J. (1983) Iron-containing superoxide dismutases in trypanosomatids. En: *Oxy Radicals and their Scavenger Systems. I. Molecular Aspects* (Cohen, G. & Greenwald, R.A., eds.) pp. 348-351. Elsevier Biomedical, New York.
- Michaelis, L. (1946) Fundamentals of oxidation and respiration. *Amm Sci.* **34**: 573
- Mori, H. & Nishimura, M. (1989) Glyoxysomal malate synthetase is specifically degraded in microbodies during greening of pumpkin cotyledons. *FEBS Lett.* **244**: 163–166.
- Mothes, K. (1961) The metabolism of urea and ureides. *Can. J. Bot.* **39**: 1785–1807.
- Müller, M. (1992) Proteolysis in protein import and export: signal peptide processing in eu- and prokaryotes. *Experientia* **48**: 118–129.
- Müller, W.C. & Beckman, C.H. (1978) Ultrastructural localization of polyphenoloxidase and peroxidase in roots and hypocotyls of cotton seedlings. *Can J. Bot.* **56**: 1579–1589.
- Mundi, J. & Chua, N.H. (1988) Abscisic acid and water stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* **7**: 2279–2286.
- Munns, R. & Termaat, A. (1986) Whole-plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* **13**: 143-160.
- Musgrove, J.E., Elderfield, P.D. & Robinson, C. (1989) Endopeptidases in the stroma and thylakoids of pea chloroplasts. *Plant Physiol* **90**: 1616–21.
- Mutz, K., Bassuner, R., Lichtenfeld, C., Scholz, G. & Weber, E. (1985) Proteolytic cleavage of storage proteins during embryogenesis and germination of legume seeds. *Physiol. Veg.* **23**: 75–94.
- Nakazawa, M., Satoh, S. & Fujii, T. (1991) Demonstration of an ATP-dependent proteolysis in etiolated pea extracts. *Phytochemistry* **30**(5): 1401–1403.
- Nazarenko, L.V. & Serebryakova, V.N. (1990) Ultrastructural changes in *Euglena* cells of different nutritional types under the influence of salinity. *Fiziol. Rast.* **37**: 142-146.
- Nguyen, J. (1986) Plant xanthine dehydrogenase: its distribution, properties and function. *Physiol. Veg.* **24**(2): 263–281.

- Nichols, M.B. & Low, P. (1986) The redox centers of xanthine oxidase are on independent structural domains of the enzyme. **Arch. Biochem. Biophys.** **256**(2): 488–497.
- Oberley, L.W. (1985) Superoxide dismutase. Vol. 3. Pathological states. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Ogren, W.L. (1984) Photorespiration: pathways, regulation and modification. **Ann. Rev. Plant Physiol.** **35**: 415–442.
- Orlowski, M. (1990) The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. **Biochemistry** **29**: 10289–97.
- Ornstein, L. (1964) Disc electrophoresis I. Background and theory. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** **121**: 321–403.
- Ory, R.L., Gordo, C.V. & Singht, R. (1969) Ureide metabolism in castor beans. Evidence for a particle-bound allantoinase. **Phytochemistry** **8**: 401–404.
- Ostrem, J.A., Olson, S.W., Schmitt, J.M. & Bohnert, H.J. (1987) Salt stress increases the level of translatable mRNA for phosphoenol pyruvate carboxylase in *Mesembryanthemum crystallinum*. **Plant Physiol.** **84**: 1270–1275.
- Pacifici, R.E. & Davies, K.J.A. (1990) Protein degradation as an index of oxidative stress. **Methods Enzymol.** **186B**: 485-502.
- Pacifici, R.E., Salo, D.C. & Davies, K.J.A. (1989) Macroxyproteinase (M.O.P.): A 670 KDa proteinase complex that degrades oxidatively denatured proteins in red blood cells. **Free Radical Biol. Med.** **7**: 521–536.
- Packer, L. & Glazer, A.N. (1990) Oxygen radicals in biological systems. Part B. Oxygen radicals and antioxidants. **Methods Enzymol.** vol **186**. Academic Press, San Diego, CA.
- Palma, J.M. (1988) Mecanismo de la tolerancia al cobre en plantas de *Pisum sativum* L.: cupro-proteínas y metabolismo peroxisomal. Tesis Doctoral. Universidad de Granada,
- Palma, J.M., Garrido, M., Rodríguez-García, M.I. & del Río, L.A. (1991) Peroxisome proliferation and oxidative stress mediated by activated oxygen species in plant peroxisomes. **Arch. Biochem. Biophys.** **287**: 68–74.
- Palma, J.M., Gómez, M., Yañez, J. & del Río, L.A. (1987) Increased levels of peroxisomal active oxygen-related enzymes in copper-tolerant pea plants. **Plant Physiol.** **85**: 570-574.

- Palma, J.M., Sandalio, L.M. & del Río, L.A. (1986) Manganese superoxide dismutase and higher plant chloroplasts: A reappraisal of controverted cellular localization. **J. Plant Physiol.** **125**: 427-439.
- Parker, M.V., Schina, M.E., Bossa, F. & Bannister, J.V. (1984) Chemical aspects of the structure, function and evolution of superoxide dismutases. **Inorg. Chim. Acta** **91**: 307-317.
- Parks, D.A. & Granger, D.N. (1986) Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. **Acta Physiol. Scand.** **548**: 87-99.
- Pate, J.S. & Atkins, C.A. (1983) Nitrogen uptake, transport and utilization in nitrogen fixation. En: Ecology of nitrogen fixation (Broughton, W.J., ed.), vol. 3, pp. 245-298. Clarendon Press, Oxford.
- Pate, J.S., Atkins, C.A., White, S.T., Rainbird, R.M. & Woo, K.C. (1980) nitrogen nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. **Plant Physiol.** **65**: 961-65.
- Pate, J.S. & Wallace, W. (1964) Movement of assimilated nitrogen from the root system of the field pea (*Pisum arvense* L.). **Ann. Bot.** **28**: 83-89.
- Patton, S.E., Rosen, G.M. & Rauchman, E.I. (1980) Superoxide production by purified hamster hepatic nuclei. **Mol. Pharmacol.** **18**: 588-593.
- Peterson, T.A., Lovatt, C.J. & Nieman, R.H. (1988) Salt stress causes acceleration of purine catabolism and inhibition of pyrimidine salvage in *Zea mays* root tips. **Journal of Experimental Botany** **39**(207): 1389-95.
- Pharmacia Fine Chemicals (1980) Percoll. Methodology and applications. Uppsala, Suecia.
- Poljalkoff-Maiber, A. (1982) Biochemical and physiological responses of higher plants to salinity stress. En: Biosaline Research. A look to the future plenum (San Prieto, A., ed.) pp 145-265. New York.
- Pollock, R.A., Hartl, F.U., Cheng, M.Y., Osterman, J., Horwich, A. & Neupert, W. (1988) The processing peptidase of yeast mitochondria: the two co-operating components MPP and PEP are structurally related. **EMBO J.** **7**: 3493-3500.
- Pontremoli, S. & Melloni, E. (1986) Extralysosomal protein degradation. **Ann. Rev. Biochem.** **55**: 455-481.
- Powles, S.B. (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. **Ann. Rev. Plant Physiol.** **35**: 15-44.
- Prud'Homme, M.P., Le Saos, J., Boucand, J., Oursel, A. & Tremolieres, A. (1990) Effect of NaCl on lipid metabolism in roots of the halotolerant species *Cochlearia anglica*. **Plant Physiol. Biochem.** **28**: 71-78.

- Pupilo, P., Valenti, V., de Luca, L. & Hertel, R. (1986) Kinetic characterization of reduced pyridine nucleotide dehydrogenases (duroquinone-dependent) in *Cicurbita microsomes*. **Plant Physiol.** **80**: 384–89.
- Rabinowitch, H.D. & Fridovich, I. (1983) Superoxide radicals, superoxide dismutase and oxygen toxicity in plants. **Photochem Photobiol.** **37**: 679–690.
- Ragster, L.E. & Chrispeels, M.J. (1981) Autodigestion in crude extracts of soybean leaves and isolated chloroplasts as a measure of proteolytic activity. **Plant Physiol.** **67**: 104–109.
- Rajagopalan, K.V. (1985) Purification of bovine milk xanthine oxidase. En: CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research (Greenwald, R.A., ed) pp 21–23. CRC Press, Boca Ratón, FL.
- Rajmane, N.A. & Karadge, B.A. (1986) Photosynthesis and photorespiration in winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* L.) grow under saline conditions. **Photosynthetica** **20**(2): 139–145.
- Rapoport, T.A. (1990) Protein transport across the ER membranes. **Trends Biochem. Sci.** **15**: 355–358.
- Rechtein, M., Rogers, S. & Rote, K. (1987) Protein structure and intracellular stability. **Trends Biochem. Sci.** **12**: 390–4.
- Reddy, C.D. & Venkaiah, B. (1982) Isozymes of superoxide dismutase from mung bean (*Phaseolus aureus*) seedlings. **Curr. Sci.** **51**: 987–988.
- Reisner, A.H. (1984) Gel Protein stain: a rapid procedure. **Methods Enzymol.** **104**: 439–441.
- Reynolds, P.H.S., Boland, M.J., Blevins, D.G., Randall, D.D. & Schubert, K.R. (198 ) Ureide biogenesis in leguminous plants. **Trends Biochem. Sci.** **7**: 366–368.
- Rich, P.R. & Bonner, W.D. (1978) The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.** **118**: 206–13.
- del Río, L.A. (1986) Superóxido dismutasas: propiedades, localización celular y utilidad en estudios nutricionales de oligoelementos. **Laboratorio** **81** (485): 339–355.
- del Río, L.A., Fernández, V.M., Rupérez, F.L., Sandalio, L.M. & Palma, J.M. (1989) NADH induces the generation of superoxide radicals in leaf peroxisomes. **Plant Physiol** **89**: 728–731.
- del Río, L.A., Gómez Ortega, M., Leal, A. & López Gorgé, J. (1977) A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark Oxygen electrode. **Anal. Biochem.** **80**: 409–415.

- del Río, L.A., Lyon, D.S., Olah, I., Glick, B. & Salin, M.L. (1983) Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplasts from a higher plant. **Planta** **158**: 216-224.
- del Río, L.A., Sandalio, L.M. & Palma, J.M. (1989) Superoxide and oxygen free radicals in plant peroxisomes. En: Free Radicals, Metal Ions and Biopolymers (Beaumont, P.C., Deeble, D.J., Parson, B.J. & Ree-Evans, C., eds.), pp. 355-362. London.
- del Río, L.A., Sandalio, L.M. & Palma, J.M. (1990) A new cellular function for peroxisomes related to oxygen free radicals? **Experientia** **46**: 989-992.
- del Río, L.A., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Bueno, P. & Corpas, F.J. (1992) Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. **Free Radical Biology & Medicine** **13**: en prensa.
- del Río, L.A., Sandalio, L.M., Yañez, J. & Gómez, M. (1985) Induction of a manganese-containing superoxide dismutase in leaves of *Pisum sativum* L. by high nutrient level of zinc and manganese. **J. Inorg. Biochem.** **24**: 25-34.
- Robinson, S.P. & Downton, W.J.S. (1985) Potassium, sodium and chloride ion concentrations in leaves and isolated chloroplasts of the halophyte *Suaeda australis* R.Br.. **Aust. J. Plant Physiol.** **12**: 471-9.
- Roldán, M., Donaire, J.P., Pardo, J.M. & Serrano, P. (1991) Regulation of root plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in sunflower seedlings. **Plant Science** **79**: 168-172.
- Roy, R.S. & McCord, J.M. (1982) The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** **60**: 1346-1352.
- Roy, R.S. & McCord, J.M. (1983) Superoxide and ischemia: conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. En: Oxy Radicals and their scavenger systems (Greenwald, R. & Cohen, G., eds.), vol. 2, pp. 145-153. Elsevier, New York.
- Saier, M.H.Jr., Werner, P.K. & Müller, M. (1989) Insertion of proteins into bacterial membranes: Mechanism, characteristics, and comparisons with the eucaryotic process. **Microbiol. Rev.** **53**: 333-366.
- Saito, T., Nishino, T. & Massey, V. (1989) Differences in environment of FAD between NAD-dependent and O<sub>2</sub>-dependent types of rat liver xanthine dehydrogenase shown by active site probe study. **J. Biol. Chem.** **264**(27): 15930-15935.
- Sakamoto, A., Ohsuga, H., Wakaura, M., Mitsukawa, Hibino, T., Masumura, T., Sasaki, Y. & Tanaka, K. (1990) Nucleotide sequence of cDNA for the cytosolic Cu,Zn-superoxide dismutase from spinach (*Spinacea oleracea* L.) **Nucleic Acids Research** **18**: 4923.
- Salin, M.L. (1988) Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplasts. **Physiol. Plant.** **72**: 681-689.



- Salin, M.L. & Bridges, S.M. (1981) Absence of the iron-containing superoxide dismutase in mitochondria from mustard (*Brassica campestris*). **Biochem. J.** **195**: 229-233.
- Salo, D.C., Liu, S.W., Pacifici, R.E. & Davies, K.J.A. (1988) Superoxide dismutase is preferentially degraded by a proteolytic system from red blood cells following oxidative modification by hydrogen peroxide. **Free Radical Biol. Med.** **5**: 335-339.
- Sandalio, L.M. & del Río, L.A. (1987) Localization of superoxide dismutase in glyoxysomes from *Citrullus vulgaris*. Functional implications in cellular metabolism. **J. Plant Physiol.** **127**: 395-409.
- Sandalio, L.M. & del Río, L.A. (1988) Intraorganellar distribution of superoxide dismutase in plant peroxisomes (glyoxysomes and leaf peroxisomes). **Plant Physiol.** **98**: 331-36.
- Sandalio, L.M. & del Río, L.A. (1991) Salinity response of membrane polypeptides from leaf peroxisomes of *Pisum sativum* L.. IV Portuguese-Spanish Biochemistry Congress (Póvoa de Varzim, Portugal): abstract: 6P26.
- Sandalio, L.M. & del Río, L.A. (1991) Especies de oxígeno activado en situaciones de estrés en plantas. **Sociedad Española de Fisiología Vegetal** **15**: 3-10.
- Sandalio, L.M., Fernández, V.M., Rupérez, F.L. & del Río, L.A. (1988) Superoxide free radicals are produced in glyoxysomes. **Plant Physiol.** **87**: 1-4.
- Sandalio, L.M., Palma, J.M. & del Río, L.A. (1987) Localization of manganese superoxide dismutase in peroxisomes isolated from *Pisum sativum* L.. **Plant Sci.** **51**: 1-8.
- Scandalios, J.G. (1990) Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. **Adv. Genet.** **27**: 1-41.
- Schalafer, M., Kane, P.F. & Kirsh, M.M. (1982) Superoxide dismutase plus catalase enhances the efficacy of hypothermic cardioplegia to protect the globally ischemic, perfused heart. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** **83**: 830.
- Schlesinger, D.N. & Goldstein, G. (1975) Molecular conservation of 74 amino acid sequence of ubiquitin between cattle and man. **Nature** **255**: 423-424.
- Schubert, K.R. (1981) Enzymes of purine biosynthesis and catabolism in *Glycine max*. I. Comparison of activities with N<sub>2</sub> fixation and composition of xylem exudate during nodule development. **Plant Physiol** **68**: 1115-1122.
- Schubert, K.R. (1986) Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. **Ann. Rev. Plant Physiol.** **37**: 539-574.

- Schwarz, M., Lerner, H.R. & Reinhold, L. (1991) Mitochondria isolated from NaCl-adapted tobacco cell lines (*Nicotiana tabacum/gossii*) maintain their phosphorylative capacity in highly saline media. **Plant Physiol** 96: 69-76.
- Schwitzguebel, J.P. & Siegenthaler, P.A. (1984) Purification of peroxisomes and mitochondria from spinach leaf by Percoll gradient centrifugation. **Plant Physiol.** 75: 670-674.
- Seemann, J.R. & Sharkey, T.D. (1986) Salinity and nitrogen effects on photosynthesis ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and metabolite pool size in *Phaseolus vulgaris* L.. **Plant Physiol.** 82: 555-560.
- Serrano, R. (1989) Structure and function of plasma membrane ATPase. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 40: 61-94.
- Sevanian, A. & Kim, E. (1985) **J. Free Radicals Biol. Med.** 1: 263-271.
- Sevilla, F., Hellin, E., Alcaraz, C.F. & del Río, L.A. (1987) Induction of iron and manganese superoxide dismutases in *Citrus limonum* leaves by iron. **Plant Physiol. (Life Sci. Adv.)** 6: 133-139.
- Sevilla, F., López Gorgé, J. & del Río, L.A. (1980b) Preliminary characterization of a Mn-containing superoxide dismutase from a higher plant (*Pisum sativum* L.). En *Chemical and biomedical aspects of superoxide and superoxide dismutase* (Bannister, J.V. & Hill, H.A.D., eds.), pp. 185-195. Elsevier/North-Holland, New York.
- Sevilla, F., López Gorgé, J., Gómez, M. & del Río, L.A. (1980a) Manganese superoxide dismutase from a higher plant. Purification of a new Mn-containing enzyme. **Planta** 150: 153-157.
- Shelp, B.J., Atkins, C.A., Storer, P.J. & Canvin, D.T. (1983) Cellular and subcellular organization of ammonia assimilation and ureide synthesis in nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Arch. Biochem. Biophys.** 224: 429-441.
- Short, K.A. & Blakemore, R.P. (1989) Periplasmic superoxide dismutases in *Aquaspirillum magnetotacticum*. **Arch. Microbiol.** 152: 342-346.
- Shutov, A.D. & Vaintraub, I.A. (1987) Degradation of storage proteins in germinating seeds. **Phytochemistry** 26(6): 1557-66.
- Singh, N.K., Bracker, C.E., Hasegawa, P.M., Handa, A.K., Buckel, S., Hermodson, M.A., Plankoch, E., Regmer, F.E. & Bressan, R.A. (1987) Characterization of osmotin: A thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. **Plant Physiol.** 85: 529-536.
- Singh, N.K., Handa, A.K., Hasegawa, P.M. & Bressan, R.A. (1985) Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. **Plant Physiol.** 79: 126-137.

- Singha, S. & Choudhuri, M.A. (1990) Effect of salinity (NaCl) stress on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism in *Vigna* and *Oryza* seedlings. **Biochem. Physiol. Pflanzen** **186**: 69–74.
- Smeekens, S., Weisbeck, P. & Robinson, C. (1990) Protein transport into and within chloroplasts. **Trends Biochem. Sci.** **15**: 73–76.
- Smith, L. (1955) Spectrophotometric assay of cytochrome c oxidase. En: *Methods of Biochemical Analysis* (Glick, ed.) vol. 2, pp 427–434. Interscience Publishers Inc. New York.
- Speer, M., Schmidt, W. & Kaiser, W.M. (1989) Solute concentration in roots, leaves and chloroplasts of peas and spinach under salinity. En: *Plant Water Relations and Growth under stress. Proceeding of the Yamada Conference XXII, Osaka, Japan* (Myu, K.K., ed.), pp. 101–108, Yamada Science Foundation, Tokio.
- Sprent, J.I. (1980) Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some Leguminosae. **Plant Cell Environ.** **3**: 35–43.
- Staples, R.C. & Toenniessen, G.H. (1984) Salinity tolerance in plants. *Strategies for crop Improvement*. John Wiley & Sons. New York.
- Stark, K., Seubert, P., Lynch, G. & Baudry, M. (1989) Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase: evidence against a role for calcium-activated protease (calpain). **Biochem. Biophys. Res. Comm.** **165**(2): 858–864.
- Steinman, H.M. (1982) Superoxide dismutases: protein chemistry and structure–function relationships. En: *Superoxide dismutase* (Oberley, L.W., ed.), pp. 11–68. CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida.
- Steinman, H.M. & Ely, B. (1990) Copper, Zinc superoxide dismutase of *Caulobacter crescentus*, cloning, sequencing and mapping on the gene periplasmic location of the enzyme. **J. Biochem.** **172**: 2901–2910.
- Storey, R. & Wyn Jones, R.G. (1978) Salt stress and comparative physiology in Gramineae. III. Effect of salinity upon ion relations and glycinebetaine and proline levels in *Spartina townsendii*. **Aust. J. Plant Physiol.** **5**: 831–38.
- Swinkels, B.V., Gould, S.J., Bodnar, A.G., Rachunbinski, R.A. & Subramani, S. (1991) A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino–terminus of the rat 3–ketoacyl–CoA thiolase. **EMBO J.** **10**: 3255–3262.
- Tajima, S. & Yamamoto, Y. (1975) Enzymes of purine catabolism in soybean plants. **Plant Cell Physiol.** **16**: 271–82.
- Takahashi, M. & Asada, K. (1988) Superoxide production in aprotic interior of chloroplast thylacoids. **Arch. Biochem. Biophys.** **267**: 714–22.

- Tal, M. & Shalata, A. (1986) Ionic and osmotic effects of salt on leaf membranes of tomato species. **J. Plant Physiol.** **126**: 301-304.
- Tang, A.B., Dalling, M.G. & Huffaker, R.C. (1983) A proteolytic activities associated with barley chloroplasts and chloroplast components. **Plant Physiol** **72**: S-156.
- Tang, A.B. & Huffaker, R.C. (1984) Characterization of proteolytic activities localized in thilakoid, stroma, and envelope of barley chloroplasts. **Plant Physiol** **75**: S-119.
- Tazaki, K. & Ishikura (1983) Multiple forms of aminopeptidase in *Euonymus* leaves. **Plant Cell Physiol.** **24**: 1263-1268.
- Tazaki, K. & Ishikura (1984) Purification and characterization of an aminopeptidase, LPAase 2 from *Euonymus* leaves. **Plant Cell Physiol.** **25**(5): 731-737.
- Thayer, S.S., Choe, H.T., Rausser, S. & Huffaker, R.C. (1988) Characterization and subcellular localization of aminopeptidases in senescing barley leaves. **Plant Physiol.** **87**: 894-897.
- Thieringer, R., Shio, H., Han, Y., Cohen, G. & Lazarow, P.B. (1991) Peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*: immunofluorescence analysis and import catalase A into isolated peroxisomes. **Mol. Cell. Biol.** **11**(1): 510-522.
- Thomas, R.J., Feller, U. & Erisman, K.H. (1980) Ureide metabolism in non nodulated *Phaseolus vulgaris* L.. **J. Exp. Bot.** **31**: 409-17.
- Thomas, R.J. & Schrader, L.E. (1981) Ureide metabolism in higher plants. **Phytochemistry** **20**: 361-371.
- Tolbert, N.E. (1980) Photorespiration. En: *The Biochemistry of Plants* (Davies, D.D., ed.), vol. 2, pp. 487-523. Academic Press, London.
- Tolbert, N.E. (1981) Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. **Ann. Rev. Biochem.** **50**: 133-157.
- Tolbert, N.E. & Essner, E. (1981) Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. **J. Cell Biol.** **91**: 271s-283s.
- Tolbert, N.E., Gee, R., Husic, D.W. & Dietrich, S. (1987) Peroxisomal glyoxylate metabolism and the C<sub>2</sub> oxidative photosynthetic carbon cycle. En: *Peroxisomes in biology and medicine* (Fahimi, H.D. & Sies, H., eds.), pp. 213-222. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg.
- Tolbert, N.E., Oeser, A., Kasaki, T., Hageman, R.H. & Yamazaki, R.K. (1968) Peroxisomes from spinach leaves containing enzymes related to glycolate metabolism. **J.Biol.Chem** **243**: 5179-84.

- Tuppy, H., Wiesbaner, U. & Wintersberger, E. (1962) Amino säure-*p*-nitroanilide als substrate für aminopeptidasen und andere proteolytische fermente. **Z. Physiol. Chem.** **379**: 278.
- van der Valk, H.C.P.M. & van Loon, L.C. (1988) Subcellular localization of proteases in developing leaves of oats (*Avena sativa* L.). **Plant Physiol.** **87**: 536-541.
- Vance, C.P., Egli, M.A., Griffith, S.M. & Miller, S.S. (1988) Plant regulated aspects of nodulation and N<sub>2</sub> fixation. **Plant Cell Environ.** **11**: 413-427.
- Vance, C.P. & Griffith, S.M.: (1990) The molecular biology of N metabolism. En: *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (Dennis, D.T. & Turpin, D.H., eds.), pp. 373-388. Longman Scientific & Technical.
- Varshavsky, A., Bachmair, A., Finley, D., Gonda, D. & Wunning, I. (1988) The N-end rule of selective protein turnover. Mechanical aspects and functional implications. En: *Ubiquitin* (Rechsteiner, M., ed.), pp. 287-324. Plenum Publishing Corp., New York.
- Vaughn, K.C. (1985) Structural and cytochemical characterization of three specialized peroxisome types in soybean. **Physiol. Plant.** **64**: 1-12.
- Vazquez-Duhalt, R., Alcaraz-Meléndez, L. & Greppin, H. (1991) Variation in polar-group content in lipids of cowpea (*Vigna unguiculata*) cell cultures as a mechanism of haloadaptation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** **26**: 83-88.
- Veen, B.W. (1980) Energy cost on ion transport. En: *Genetic engineering of osmoregulation. Impact on plant productivity for food, chemicals and energy, basic life science* (Rains, D.W., Valentine, R.C. & Hollaender, A., eds.) vol. 14, pp 187-195. Plenum Press, London.
- Veierskov, B. & Ferguson, I.B. (1991) Conjugation of ubiquitin to proteins from green plant tissue. **Plant Physiol.** **96**: 4-9.
- Veierskov, B., Ferguson, I.B. & Lay-Yee, M. (1992) Conjugation of ubiquitin to proteins during greening of etiolated oat plants. **J. Plant Physiol.** **139**: 749-754.
- Vianello, A. & Macrì, F. (1991) Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide at the surface of plant cells. **J. Bioenerg. Biomembr.** **23**: 409-423.
- Vierstra, R.D. (1987) Demonstration of ATP-dependent, ubiquitin-conjugating activities in higher plants. **Plant Physiol.** **84**: 332-336.
- Vierstra, R.D. (1989) Protein degradation. En: *Biochemistry of Plants* (Abraham, M., ed.), pp. 521-536. Academic Press, Inc. San Diego, CA.
- Vierstra, R.D., Langan, S.M. & Haas, A.L. (1985) Purification and initial characterization of ubiquitin from the higher plant, *Avena sativa*. **J. Biol. Chem.** **260**: 12015-21.

- Vierstra, R.D. & Quail, P.H. (1986) Phytochrome the protein. En: Photomorphogenesis in plants (Kendrick, R.E. & Kroneberg, G.H.M., eds.), pp. 35–60. Martinus-Nijhoff, Boston.
- Vigil, E.L. (1970) Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm. *J. Cell Biol.* **46**(3): 435–454.
- Vigil, E.L. (1983) Microbodies. En: Isolation of membranes and organelles from plant cells (Hall, J.L. & Moore, A.L., eds.) pp. 211–236. Academic Press, London.
- Vodkin, L.O. & Scandalios (1980) Comparative properties of genetically defined peptidases in maize. *Biochemistry* **19**: 4660–4667.
- Vogels, G.D. & Van der Drift, C. (1970) Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Anal. Biochem.* **33**: 143–157.
- Walk, S.J. & Hock, B. (1977) Glyoxysomal and mitochondrial malate dehydrogenase of watermelon (*Citrulus vulgaris*) cotyledons. II. Kinetic properties of the purified isoenzymes. *Planta* **136**: 221–228.
- Walker, M.C., Hazzard, J.T. & Tollin, G. (1991) Kinetic comparison of reduction and intramolecular electron transfer in milk xanthine oxidase and chicken liver xanthine dehydrogenase by laser flash photolysis. *Biochemistry* **30**(24): 5912–17.
- Walker-Simmons, M. & Ryan, C.A. (1977) Immunological identification of proteinase inhibitors I and II in isolated tomato leaf vacuoles. *Plant Physiol.* **60**: 61–63.
- Walling, C, Partch, R.E. & Weil, T. (1975) Kinetics of the decomposition of hydrogen peroxide catalyzed by ferric ethylenediaminetetraacetate complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**: 140–142.
- Waters, S.P., Noble, E.R. & Dalling, M.J. (1982) Intracellular localization of peptide hydrolases in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant Physiol.* **69**: 575–579.
- Webb, M.A. & Newcomb, E.H. (1987) Cellular compartmentation of ureide biogenesis in root nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) *Planta* **172**: 162–175.
- Weisiger, R.A. & Fridovich, I. (1973) Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J. Biol. Chem.* **248**: 3582–3592.
- Whelan, J., O'Mahony, P. & Harme, M.A. (1990) Processing of precursor proteins by plant mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **279**: 281–285.
- Winston, G.W. (1990) Physicochemical basis for free radical formation in cells: production and defences. En: Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms, pp 57–86. Wiley-Liss, Inc.

- Wolf, J. (1982) A comprehensive system of leaf analysis and its use for diagnostic crop nutrient status. **Comm. Sci. Plant Anal.** **13**: 1035–1039.
- Yamaoka, Y., Takenchi, M. & Morohashi, Y. (1990) Purification and characterization of a cysteine endopeptidase in cotyledons of germinated mung bean seeds. **Plant Physiol.** **94**: 561–566.
- Yokota, A., Shigeoka, S., Onishi, T. & Kinaolea, S. (1988) Selenium as inducer of glutathione peroxidase in low-CO<sub>2</sub> grow *Chlamidomonas reinhardii*. **Plant Physiol.** **86**: 649–51.
- Yusa, T., Crapo, J.D. & Freeman, B.A. (1984) Hyperoxia enhances lung and liver nuclear superoxide generation. **Biochem. Biophys. Acta** **798**: 167-174.
- Zelitch, I. (1972) The photooxidation of glyoxylate by envelop-free spinach chloroplasts and its relation to photorespiration. **Arch. Biochem. Biophys.** **150**: 698-707.

