



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**“ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE
ASCORBATO OXIDASA DURANTE EL
DESARROLLO DE LA PLANTA DE FRIJOL
(*Phaseolus vulgaris* L. var. FLOR DE MAYO)”**

TESIS

QUE PRESENTA:

IBQ. PALMIRA HERRERA GÓMEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

ASESOR DE TESIS:

D. C. ERNESTO GARCÍA PINEDA

COASESOR DE TESIS:

D. C. MAURO M. MARTÍNEZ PACHECO

MORELIA, MICHOACÁN

JUNIO 2006

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**“ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE ASCORBATO
OXIDASA DURANTE EL DESARROLLO DE LA PLANTA
DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L. var. FLOR DE MAYO)”**

TESIS

QUE PRESENTA:

IBQ. PALMIRA HERRERA GÓMEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

ASESOR DE TESIS:

D. C. ERNESTO GARCÍA PINEDA

COASESOR DE TESIS:

D. C. MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO

MORELIA. MICHOACÁN

JUNIO 2006

DEDICATORIA

A la Suprema Personalidad de Dios.

AGRADECIMIENTOS

Toda mi gratitud x e[∞] para mi Amigo Supremo, quien me manda su ayuda a través de varias boquillas abiertas, entre las cuales quiero agradecer en esta ocasión...

A mis maestros espirituales, por explicar la Ciencia Suprema tal como es y poner el ejemplo de cómo se actúa por ende.

A la boquilla siempre abierta y dispuesta, Palmira Gómez. A Gustavo y Abraham, con quienes convivo desde que nacieron. A todos mis parientes, principalmente a mis abuelas.

A las personas que colaboraron en la realización de esta tesis:

A mi asesor, D. C. Ernesto García Pineda, quien misericordiosamente me encaminó durante la parte experimental y hasta terminar el escrito, mil gracias.

A mi coasesor, D. C. Mauro Manuel Martínez Pacheco, quien me invitó a estudiar la maestría y me permitió trabajar en su laboratorio desde que estaba estudiando la ingeniería.

A mi sinodal, D. C. Eva Luz Soriano Bello, quien me dio licencia de utilizar su cámara de crecimiento y aparatos en su laboratorio, sin los cuales no hubiese podido llevar a cabo mis experimentos.

A mi sinodal, D. C. José López Bucio, quien contribuyó con excelentes ideas para la conclusión de esta tesis.

A los compañeros del Laboratorio de Bioquímica Vegetal, a los maestros en ciencias... Elda Castro Mercado, -quien me introdujo a la dinámica de trabajo en este laboratorio-, Araceli Arreola, -buena compañera de trabajo-, Chema, Georgina, Yessenia, Micaela, Alan Richards y biólogas Brenda y Laura.

A los compañeros del Laboratorio de Fisiología Celular, a los amigos, los M. C. María Eugenia Morales, Nora de los Ángeles Rubio, Alberto Flores, Laura Alejandra Ojeda, Atahualpa Guzmán y Lilia Nereyda; a los IBQ. Sandra Oropeza, Odilia Rosas y Girineldo Tovar, a los D. C. Luz María Damián y David Raya, Biol. José Noel Ríos, a los QFB. Rafael Sambrano, Estéfany, Naxieli y César Adbel.

A D. C. Raúl Cárdenas Navarro y a M. C. Vilma del Carmen Castellanos Morales, ambos del Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, por sus consejos y puntos de vista.

A mis compañeros de generación: Lugarda, Marta Lucía, Marta Alicia, Mary Chuy, mi amiga Nefertiti del Socorro, Francisco Gabriel, Francisco Javier, Christian, Carlos Alberto, Giovanni Ricardo, Erick, Ricardo Frías, Jaime Héctor y Atahualpa. A los compañeros de laboratorios vecinos, los M. C. Beatriz Adriana, Alma Laura, César, Elizabeth, Claudia, Leobardo. También a todos mis compañeros de generación del Instituto Tecnológico de Morelia.

A CONACYT por su apoyo económico al otorgarme la beca con número de registro 167126 y a la UMSNH por la extensión de beca.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LOS LABORATORIOS DE BIOQUÍMICA VEGETAL Y FISIOLÓGIA CELULAR, AMBOS PERTENECIENTES AL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORIA DEL D. C. ERNESTO GARCÍA PINEDA Y LA COASESORÍA DEL D. C. MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
2.1 El cultivo de frijol en México.....	2
2.1.1 Desarrollo de la planta de frijol.....	3
2.1.1.1 Factores que afectan el desarrollo de la planta de frijol.....	6
2.1.1.1.1 Sequía.....	7
2.1.1.1.2 Obscuridad.....	9
2.2 Características de la enzima ascorbato oxidasa.....	11
2.2.1 Estructura.....	12
2.2.2 Mecanismo de acción.....	13
2.2.2.1 Inhibición enzimática.....	13
2.2.3 Localización.....	14
2.2.4 El gen de la ascorbato oxidasa.....	15
2.2.5 Regulación de la actividad de la ascorbato oxidasa.....	16
2.3 Función biológica de la ascorbato oxidasa.....	17
2.3.1 Participación de la ascorbato oxidasa en la expansión celular.....	17
2.3.2 Participación de la ascorbato oxidasa en la división celular.....	20
2.3.3 Participación de la ascorbato oxidasa en la diferenciación celular.....	23
2.3.4 Control del estado redox en el apoplasto por la ascorbato oxidasa.....	24
2.3.4.1 El estado redox del ascorbato en el simplasto.....	24
2.3.4.2 Funciones del ascorbato en la célula vegetal.....	26
2.3.4.3 El estado redox del ascorbato en el apoplasto.....	27
2.3.5 Otras posibles funciones.....	32
III. JUSTIFICACIÓN.....	33
IV. HIPÓTESIS.....	35
V. OBJETIVOS.....	35

5.1 Objetivo general.....	35
5.2 Objetivos específicos.....	35
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
6.1 Materiales.....	36
6.1.1 Material biológico.....	36
6.1.2 Substancias y reactivos.....	36
6.1.3 Equipo.....	36
6.2 Metodología.....	37
6.2.1 Cultivo de las plantas.....	37
6.2.2 Determinación del crecimiento de las plantas.....	37
6.2.3 Tratamiento de estrés por sequía.....	38
6.2.4 Tratamiento de obscuridad.....	39
6.2.5 Extracción de la ascorbato oxidasa.....	39
6.2.6 Medición de la actividad de la ascorbato oxidasa.....	40
6.2.6.1 Inhibición de la actividad de la ascorbato oxidasa.....	41
6.2.7 Determinación de la concentración de proteína.....	41
6.2.7.1 Curva estándar de proteína.....	41
VII. RESULTADOS.....	42
7.1 Inhibición de la ascorbato oxidasa en raíz de frijol.....	42
7.2 La ascorbato oxidasa en el desarrollo de los órganos del frijol.....	44
7.2.1 Actividad de la ascorbato oxidasa durante el crecimiento.....	44
7.2.2 Actividad de la ascorbato oxidasa en la diferenciación.....	49
7.3 Actividad de la ascorbato oxidasa de plantas crecidas en obscuridad.....	50
7.4 Efecto del estrés por sequía en la actividad de la ascorbato oxidasa.....	52
VIII. DISCUSIÓN.....	56
IX. RESUMEN DE RESULTADOS.....	65
X. CONCLUSIÓN.....	65
XI. APÉNDICE.....	66
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	67

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del frijol.....	2
Cuadro 2. Tipos de frijol según el crecimiento de la yema apical.....	5
Cuadro 3. Comparación de las propiedades de las plantas de tabaco transformadas en el gen de la ascorbato oxidasa.....	28
Cuadro 4. Inhibición de la ascorbato oxidasa.....	43
Cuadro 5. Actividad de la ascorbato oxidasa durante el crecimiento de las hojas primarias, hipocotilo y raíz.....	45
Cuadro 6. Actividad de la ascorbato oxidasa en órganos presentes en alguna etapa fenológica.....	48
Cuadro 7. Actividad de la ascorbato oxidasa en zonas del mismo órgano con diferente grado de desarrollo.....	49
Cuadro 8. Peso seco y contenido de agua (CA) de las plantas etioladas.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción del frijol en México en comparación con otros granos de consumo humano.....	3
Figura 2. Etapas de desarrollo de la planta de frijol.....	4
Figura 3. Reacción catalizada por la ascorbato oxidasa.....	11
Figura 4. Estructura tridimensional de la ascorbato oxidasa de calabacita.....	12
Figura 5. Esquema de la estructura del sitio activo de la ascorbato oxidasa de calabacita.....	13
Figura 6. Vacuolización celular.....	19
Figura 7. Comportamiento de la ascorbato oxidasa de acuerdo a las fases del ciclo celular.....	22
Figura 8. Control del estado redox del ascorbato en citosol y apoplasto.....	31
Figura 9. Curva estándar de proteína.....	66
Figura 10. Auto oxidación del L-ascorbato.....	44
Figura 11. Actividad de la ascorbato oxidasa durante el crecimiento en longitud del hipocotilo y la raíz.....	46
Figura 12. Actividad de la ascorbato oxidasa durante los primeros días de crecimiento de las hojas primarias, hipocotilo y raíz.	47
Figura 13. Fenotipo de las plantas que crecieron en presencia de luz (fotomorfogénesis) o en obscuridad (sktomorfogénesis) hasta los siete días de edad.....	50
Figura 14. Actividad de la ascorbato oxidasa en hipocotilo de plantas etioladas de siete días de edad.....	51
Figura 15. Crecimiento de las plantas sometidas a sequía denotada por la aridez de la agrolita.	53
Figura 16. Contenido de agua en la agrolita y en la planta completa a lo largo del tratamiento de estrés por sequía.....	53
Figura 17. Actividad de la ascorbato oxidasa durante el crecimiento en condiciones de sequía.....	55

RESUMEN

En México, el frijol tiene una gran importancia económica y nutricional, siendo la leguminosa más consumida en el país (SAGARPA), de ahí lo fundamental del estudio de su desarrollo, el cual se divide en cinco etapas fenológicas: germinación, crecimiento vegetativo, floración y llenado de grano. Este desarrollo se ve afectado por los factores ambientales, como por ejemplo, la falta de agua.

En el desarrollo de plantas tales como cebolla, tabaco y chícharo, se ha visto que la enzima Ascorbato Oxidasa (AO) juega un papel importante en la expansión y diferenciación celular, en el control del estado redox del apoplasto e inclusive, en la regulación de la disponibilidad de oxígeno en las células dependiendo de su alta o baja tasa respiratoria. Esto debido a que la AO lleva a cabo la reducción con cuatro electrones del oxígeno molecular a agua con la concomitante oxidación de un electrón del L-ascorbato o vitamina C, en el apoplasto de las células vegetales (González-Reyes *et al.*, 1994; de Pinto y De Gara, 2004; Pignocchi y Foyer, 2003).

Hasta ahora se había estudiado la participación de la AO en el crecimiento de las raíces de frijol de 4 días de edad, tanto en condiciones estimulantes del crecimiento con auxina, como en condiciones inhibitorias del crecimiento por efecto del elicitador OGA₁₀. Estos resultados sugieren que la actividad de AO puede ser importante para el crecimiento (Hernández-Mata y Soriano-Bello, 2003).

Para continuar con el estudio de la función biológica de AO en el desarrollo del frijol, se midió la actividad específica de la enzima en diferentes partes de la planta durante todas las etapas fenológicas. Así mismo, se determinó el peso seco de cada órgano y se midió la longitud de la raíz y tallo, como parámetros de crecimiento. También se estudió la participación de la AO en el desarrollo de las plantas sometidas a sequía.

Durante el crecimiento post-embionario se encontró que la actividad de AO correlaciona con el crecimiento de las hojas primarias, el hipocotilo y la raíz. Esta correlación se pierde a medida que los tejidos avanzan en el desarrollo. La mayor actividad de AO en los diferentes órganos, queda de la siguiente manera: vaina > primer segmento del tallo > raíz > hoja primaria > flor > hoja trifoliada madura > cotiledón > último segmento del tallo > retoño de hoja trifoliada. Es decir, que existe una mayor actividad de AO en las zonas de los órganos que están más maduras, tal vez, por la participación de AO en el metabolismo de la pared celular secundaria. La correlación positiva que existe entre la actividad de AO y el crecimiento por expansión celular, se confirmó en hipocotilos etiolados de frijol, que presentaron el doble de actividad de la enzima.

El tratamiento de estrés por sequía ocasionó un déficit de agua paulatino y severo en hojas y raíz, y menos drástico en tallo. La actividad de AO en las hojas disminuyó a partir de los 5 días de falta de riego, mientras que en el tallo no se observó variación alguna en estas condiciones. El peso seco de la raíz aumentó a los 10 días de falta de riego, hecho que coincidió con la caída súbita de la actividad de AO. Este resultado sugiere que la AO inhibe el crecimiento de la raíz al principio de la sequía, pero que al continuar la pérdida de agua, la actividad de AO se abate para permitir el crecimiento de la raíz como mecanismo de sobrevivencia.

I. INTRODUCCIÓN

El estudio de las plantas ha sido muy importante, ya sea para descubrir nuevas sustancias farmacéuticas, propiedades culinarias y sobre todo nutricionales, por lo que las investigaciones utilizando cultivos comerciales han tenido un gran impulso en los últimos años.

El frijol, siendo por tradición indispensable para la dieta de los mexicanos y para su economía, es uno de los cultivos cuyo conocimiento es de vital importancia, incluyendo los aspectos fisiológicos, genéticos, moleculares y del desarrollo.

La enzima ascorbato oxidasa (AO) que en otras especies vegetales se ha visto que tiene funciones importantes en el desarrollo de las plantas, ha sido estudiada en el crecimiento de las raíces del frijol, en las cuales se midió su actividad; sin embargo, no se ha analizado su participación en el crecimiento de otros órganos de la planta. Por lo que en este trabajo se profundiza en el estudio del papel fisiológico de la enzima durante el desarrollo del frijol.

II. ANTECEDENTES

2.1 El cultivo de frijol en México

El nombre científico del frijol es *Phaseolus vulgaris* L., y tiene la siguiente clasificación taxonómica según Allen y Allen, en 1981:

CATEGORÍA	GRUPO TAXONÓMICO
Súper reino	Eucariota
Reino	Plantae
División	Magnoliofitas
Subdivisión	-----
Clase	Dicotiledóneas
Subclase	Rósidas
Orden	Fabales
Familia	Leguminosae
Género	<i>Phaseolus</i>
Especie	<i>vulgaris</i>

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del frijol.

En México, el frijol tiene una gran importancia económica y nutricional, siendo la leguminosa más consumida en el país. Según el Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), perteneciente a la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGARPA), el frijol se encuentra entre los primeros diez cultivos más sembrados en el país.

El frijol ocupa el cuarto lugar de producción neta nacional obtenida en los últimos años, sin embargo, su importancia económica es igual a la del producto que ocupa el segundo lugar, el sorgo (**Figura 1**).

La variedad de frijol más producida a nivel nacional es el frijol azufrado, seguido por mayacoba, negro jamapa, flor de junio, flor de mayo, pinto nacional, bayo y canario. En el caso del frijol flor de mayo, este es uno de los más sembrados en la zona centro.

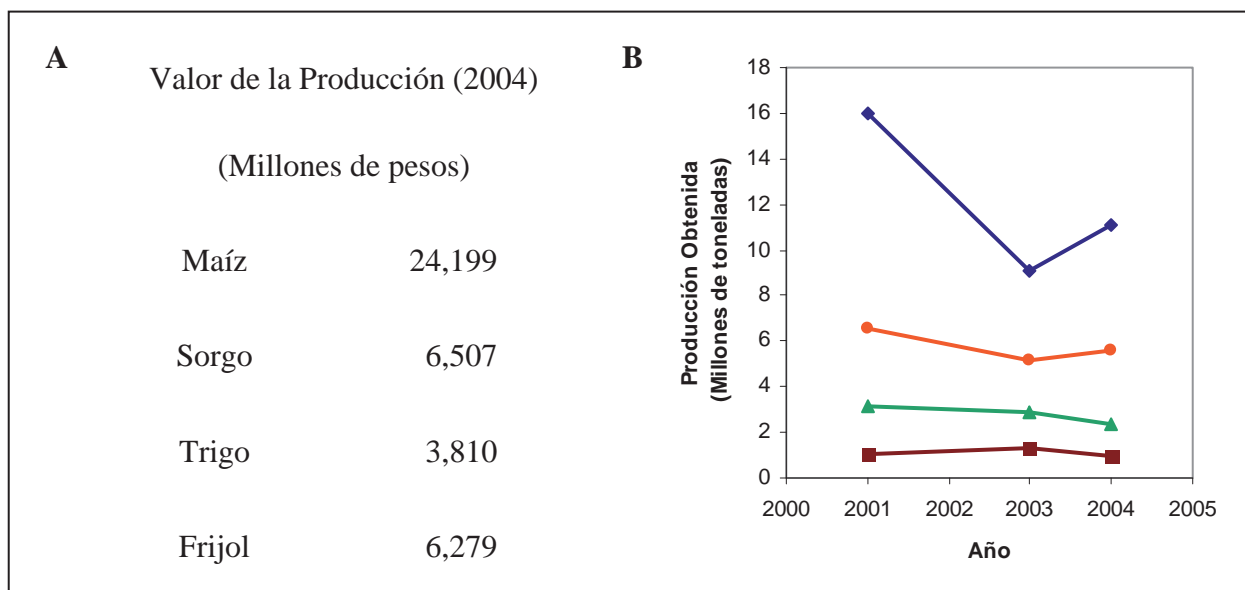


Figura 1. Producción del frijol en México en comparación con otros granos de consumo humano. Panel A) Valor de la producción en el 2004; Panel B) —◆— Producción total anual de maíz, —●— sorgo, —▲— trigo, y —■— frijol.

2.1.1 Desarrollo de la planta de frijol

El desarrollo de la planta de frijol se divide en dos fases y cada una en cinco etapas fenológicas. La fase vegetativa comienza con la germinación, continua con la emergencia de la radícula, el alargamiento del tallo, la formación de las hojas cotiledonares y las primeras hojas trifoliadas y finalmente la formación de guías, que es la continuación del proceso de formación de hojas trifoliadas alternadas. La fase reproductiva abarca desde la prefloración o comienzo de la formación de yemas florales axiales en los internodos que darán lugar a los capullos, seguido por la floración, la polinización, la formación de fruto (vaina) y por último la maduración de las semillas -**Figura 2-** (Rodríguez Narciso, 1999).

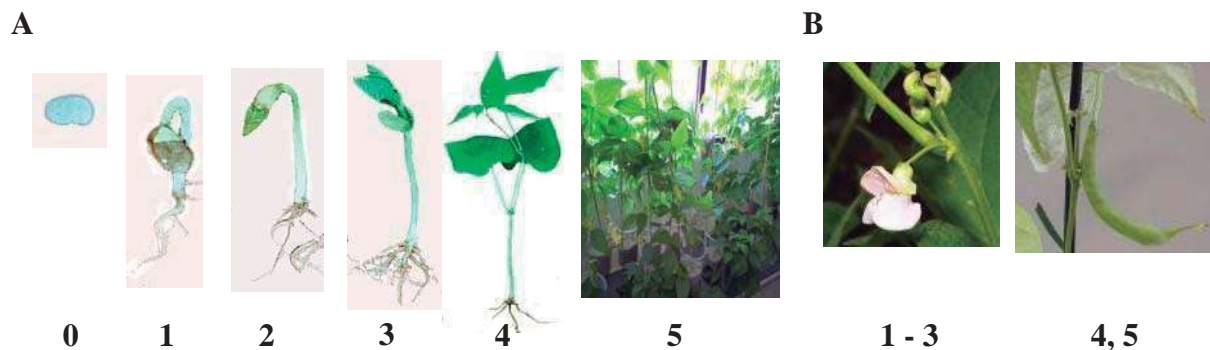


Figura 2. Etapas de desarrollo de la planta de frijol. A) Dentro de la fase vegetativa se encuentran las siguientes etapas. 0. Semilla en dormancia; 1. Germinación; 2. Emergencia; 3. Alargamiento del tallo; 4. Formación de hojas y 5. Formación de guías. B) La fase reproductiva también se divide en cinco etapas: 1. Prefloración; 2. Floración; 3. Polinización; 4. Formación de fruto (vainas) y 5. Maduración de semilla (Rodríguez Narciso, 1999).

Entre las características distintivas de la planta de frijol se pueden señalar las siguientes:

La planta de frijol es del tipo C-3, puede presentar nódulos en las raíces para fijar N_2 en simbiosis con microorganismos, es autógama con cierto porcentaje de polinización cruzada, su hábito de crecimiento está dado por la información genética y el medio ambiente ya que goza de plasticidad fenotípica. La floración y formación de fruto son continuas a lo largo de dos a cuatro semanas, produce vainas, presenta abscisión o caída controlada de flores, botones y vainas e inclusive aborto de óvulos y semillas (Kohashi-Shibata, 1996).

La semilla de frijol es ex-albuminosa es decir, que carece de endospermo. Está formada por la testa (9 % peso seco) y el embrión, éste a su vez consta de dos cotiledones (90 % peso seco) y el eje embrional que se divide en plúmula o vástago y en la radícula.

La germinación inicia cuando hay humedad, buena aireación y ambiente templado. Debido a que los cotiledones emergen del suelo, la planta de frijol se dice que es epigea. Las raíces son fibrosas, pivotantes, la primera en emerger es la raíz primaria, luego se van desarrollando las raíces laterales, puede presentar nódulos según las características del suelo, cuando es colonizada por bacterias del género *Rhizobium* (Kohashi-Shibata, 1996).

Lo primero que emerge después de la germinación es el vástago o porción aérea del tallo, que se divide en nodos, el primer nodo va desde el comienzo de la raíz hasta los cotiledones que están opuestos, de ahí comienza el segundo nodo que llega hasta las hojas primarias que también crecen de manera opuesta, el tercer nodo parte de ahí hasta la primera de las hojas compuestas o trifoliadas que crecen de manera alterna. Y así sucesivamente, la guía continúa con los nodos hasta llegar a la plúmula. Un entrenodo es la porción de tallo comprendida entre dos nodos, en cada nodo puede nacer una rama secundaria o una inflorescencia. Un fitómero es un módulo que consta de un entrenodo, una hoja y una yema axilar.

Si a lo largo del desarrollo de la planta de frijol, la yema apical sigue creciendo, permaneciendo en estado vegetativo, la planta de frijol se dice que es de crecimiento indeterminado. En cambio, si la yema apical se convierte en una yema floral en la época reproductiva, la planta de frijol es de hábito determinado.

En el **Cuadro 2** se presentan los tipos de frijol que existen en base al crecimiento de la yema apical (Kohashi-Shibata, 1996).

Crecimiento	Tipo de Frijol
Determinado	Frijol mateado tipo I
Indeterminado	Frijol mateado tipo II, III y IV Frijol de guía larga y de media guía (trepadoras)

Cuadro 2. Tipos de frijol según el crecimiento de la yema apical.

El frijol de hábito determinado tiene poca plasticidad fenotípica por haber sido domesticado, no así el frijol de hábito indeterminado que es altamente plástico y cuyas características morfológicas o fisiológicas varían ante cualquier cambio en el medio ambiente.

Phaseolus vulgaris es una especie diploide verdadera, con 11 cromosomas y 450-650 Mpb por genoma haploide (Phaseomics, www.phaseolus.net).

La planta de frijol crece de manera óptima a 50-3000 m de altitud sobre el nivel del mar, entre los 14 y 26 °C, con una precipitación pluvial de 400 a 1600 mm/año. Su ciclo de crecimiento va de 70 a 330 días y se obtiene un rendimiento de 400-5000 Kg/ha.

La fuente de los fotosintatos son las hojas primarias y trifoliadas maduras, también las raíces y tallos almacenadores. La demanda fisiológica de esos fotosintatos la ejercen las raíces jóvenes, primordios, vainas y semillas (Kohashi-Shibata, 1996).

Las flores ocurren en inflorescencias en racimo, se van desarrollando de la base hacia el ápice. El fruto es la vaina con semillas o pericarpio envolvente de las semillas. Existen variedades de frijol con un alto potencial de abscisión (96 %) y las hay de bajo potencial de abscisión (31 %). Las primeras flores se convierten en vainas maduras pero la probabilidad disminuye conforme avanza el periodo de floración, por tanto, la abscisión de vainas y de flores ocurre en las puntas de las guías no en la base.

El rendimiento de una planta se puede expresar en términos biológicos y en términos agronómicos. Por ejemplo, la materia seca de toda la planta es una manera de cuantificar el rendimiento biológico. En cambio, la materia seca de las semillas –únicamente-, cuantifica un rendimiento económico. El peso seco se obtiene secando en una estufa a 70 u 80 °C hasta alcanzar un peso constante, la muestra puede quedar con el 4 a 6 % de agua (Kohashi-Shibata, 1996).

2.1.1.1 Factores que afectan el desarrollo de la planta de frijol

Los factores que causan un detrimento en el desarrollo de las plantas de frijol son de dos tipos: bióticos y abióticos. Los factores bióticos abarcan a los microorganismos fitopatógenos -como el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* que causa la enfermedad del frijol llamada antracnosis-, también incluyen a los insectos y herbívoros. Los factores abióticos son los factores ambientales que inciden en las plantas en exceso o deficiencia, ya sea de luz, sales en el suelo, agua, altas y bajas temperaturas e inclusive la falta de espacio.

En el caso particular del frijol indeterminado el espaciado entre las plantas es sumamente importante. Cuando hay una alta densidad de población disminuye el número de ramas y por tanto de vainas y semillas, por lo que a pesar de la tradición, no es recomendable cultivarlo junto con el maíz, para que haya mayor magnitud de área foliar y mayor rendimiento (Kohashi-Shibata, 1996).

Se reporta de 10 a 15 % de pérdidas normales por aborto de óvulos y semillas de frijol pero el porcentaje de abscisión de órganos reproductivos y hojas aumenta cuando la planta ha sido sometida a algún tipo de agobio (Kohashi-Shibata, 1996).

2.1.1.1.1 Sequía

La mayor parte de la producción de frijol en México se concentra en regiones de clima seco y sub-húmedo, lo que disminuye su productividad hasta en un 70 % en condiciones de sequía. Existen variedades resistentes como el frijol Pinto Villa que a diferencia de las variedades susceptibles mantiene un alto contenido relativo de agua ($CRA = 100 * (\text{Peso hidratado} - P. \text{ fresco} / P. \text{ fresco} - P. \text{ seco})$) en las hojas, un alto índice de cosecha ($IC^2 = 100 * (P. \text{ semillas} \cdot m^{-2} / P. \text{ seco})$) que muestra que la biomasa se distribuye favoreciendo el llenado de los granos, además de presentar sólo un 32 % de pérdida de rendimiento, un valor bajo en comparación al 45 % de pérdida de rendimiento de una variedad susceptible a la sequía, el frijol Pinto Sierra (Rosales-Serna *et al.*, 2000).

La sequía causa una disminución en el área foliar, peso seco de la parte vegetativa, contenido de proteína, agmatina y putrecina de manera altamente significativa, por el contrario aumenta al doble la concentración de prolina en el interior de las células ya que participa en el ajuste osmótico al disminuir el potencial de solutos en respuesta al déficit de agua. (Lazcano-Ferrat y Lovatt, 1999).

El déficit de agua severo inhibe completamente la fotosíntesis, reduce la cantidad de clorofila a y b, β -caroteno, violaxantina, ascorbato, glutatión, NADPH, a la vez que aumenta las cantidades de anteraxantina, zeaxantina y hierro catalítico, además se presenta lipoperoxidación y oxidación de proteínas (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 1998).

La disminución en el contenido de proteína se debe al aumento de la actividad endoproteolítica, siendo mayor en variedades de frijol susceptibles a la sequía. La expresión constitutiva de una Aspartil Proteasa resultó ser un buen indicador de resistencia a sequía, mientras que la inducción de la transcripción de su gen sólo ante la falta de agua ocurre en las variedades susceptibles al estrés por sequía (Cruz de Carvalho *et al.*, 2001).

Otras moléculas inducidas durante el estrés por sequía son las proteínas tardías de la embriogénesis, que en frijol se denominan Pvlea. Estas proteínas se acumulan en el citosol y núcleo de las células meristemáticas, vasculares y provasculares. Se cree que pueden proteger estructuras celulares específicas o disminuir los efectos del estrés por sequía manteniendo un requerimiento de agua mínimo, otros papeles hipotéticos son el secuestro de iones, actividad de chaperonas moleculares y transporte de proteínas hacia el núcleo (Colmenero-Flores *et al.*, 1999).

A diferencia de la parte vegetativa, las raíces continúan creciendo a bajos potenciales hídricos como medida de adaptación que permite a las plantas alcanzar el agua en las profundidades del suelo. El crecimiento se lleva a cabo en los ápices de las raíces, en cuyas células ocurren los procesos de división y expansión celular, que dependen del ablandamiento de la pared celular y su extensión mediante el corte o rearrreglo de las cadenas de polímeros que dan lugar al relajamiento de la tensión de la pared. Las expansinas son proteínas de la pared celular que rompen los enlaces no covalentes entre las microfibrillas de celulosa y la matriz de hemicelulosa. Existen varias isoformas de expansinas cuya actividad se presenta de manera constitutiva en el ápice de las raíces, pero la actividad de algunas aumenta sólo durante el estrés hídrico, como es el caso de las alfa expansinas Exp1 y Exp5 y la beta expansina Exp8 (Wu *et al.*, 1996 y 2001).

Las raíces de frijol que presentan nódulos en los que se aloja a *Rhizobium*, acumulan trealosa, un carbohidrato que puede traslocarse a la parte vegetativa y al que se le atribuye la resistencia a sequía de las plantas de frijol que establecen la simbiosis (Farías Rodríguez *et al.*, 1998).

Se ha visto que para que se mantenga el alargamiento de la raíz durante la sequía se requiere de la acumulación de ácido abscísico o ABA que inhibe la acción del etileno (Spollen *et al.*, 2000). En las hojas el ABA desencadena la producción de H_2O_2 y O_2^- , induce la expresión de genes que codifican enzimas antioxidantes y aumenta la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR) (Jiang y Zhang, 2002).

Sin embargo, el ABA disminuye la poza de ascorbato y promueve su estado oxidado para que se desencadene el cierre de los estomas. Al aumentar la actividad de la dehidroascorbato reductasa (DHAR) aumenta el estado redox del ascorbato en el citoplasma y el apoplasto, lo que impide el cierre de los estomas y genera una pérdida cuantiosa de agua a través de ellos. Por el contrario, la disminución en el estado redox del ascorbato reduce la transpiración y la asimilación de CO_2 , por lo que se ha propuesto que el estado redox del ascorbato de las células guarda controla el movimiento de los estomas modulando la señalización dada por H_2O_2 (Chen y Gallie, 2004).

2.1.1.1.2 Oscuridad

La cantidad y calidad de la luz genera cambios dramáticos en la morfogénesis de las plantas. La luz como señal es percibida por dos tipos de fotorreceptores: fitocromo y criptocromo. Los procesos de desarrollo bajo el control del fitocromo incluye el alargamiento del tallo, desdoblamiento del asa del tallo, el despliegue de las hojas, la germinación de las semillas y el inicio de la floración. Los receptores de luz azul están involucrados en el fototropismo, regulación del alargamiento del tallo, apertura de los estomas y la iniciación del desarrollo de los cloroplastos (Jensen *et al.*, 1998).

El crecimiento del tallo de *Arabidopsis thaliana* expuesto a la luz es menor que el que permanece en oscuridad, también la orientación es diferente. Los hipocotilos expuestos a la luz blanca crecen menos que los que están bajo luz azul, roja o rojo lejano, en estos tres casos los hipocotilos crecen lo mismo. Por su parte, el crecimiento de las raíces no es afectado por la presencia o ausencia de luz por siete días (Jensen *et al.*, 1998).

Brouquisse y colaboradores, en 1998, detectaron una disminución drástica en la cantidad de carbohidratos solubles tales como glucosa, fructosa y sacarosa en las raíces, tallo y hojas de plantas de maíz sometidas a 48 horas de oscuridad continua. De igual manera, la cantidad de proteína total disminuye en todos los órganos, a la par que aumenta la concentración de asparagina y NH_4^+ , formas en las que se reserva el nitrógeno liberado durante la proteólisis. La actividad de endopeptidasa aumenta en hojas y raíces, sobre todo en las hojas jóvenes y las puntas radicales. El 80 % de esta actividad se atribuye a RSIP, una serina endopeptidasa vacuolar. La velocidad de alargamiento de las raíces primarias y secundarias cae abruptamente a lo largo del periodo de oscuridad hasta cesar por completo. Se concluye que la oscuridad continua ocasiona un déficit de carbohidratos y la falta de carbohidratos metabolizables causa autofagia y un cese en el crecimiento de las plantas.

Se ha observado una disminución simultánea del crecimiento y de las velocidades de respiración en los frutos de chícharo y jitomate, así como en las hojas de alfalfa, trigo, espinaca y pastos. A nivel celular, se ha reportado la proteólisis en varios órganos de la planta de maíz, y β -oxidación de los ácidos grasos en las puntas de sus raíces. Las células desarrollan un mecanismo de sobrevivencia que incluye la autofagia y la reutilización de los residuos de mitocondrias lisadas (Gary *et al.*, 2003).

Después de pocas horas de obscuridad, el crecimiento de jitomate dado como la producción de nuevas estructuras cesa y la actividad respiratoria remanente sólo sostiene los costos energéticos de funciones tales como el recambio de las proteínas y manutención de los gradientes iónicos. Luego, el metabolismo contribuye en la sobrevivencia y no más al sostén de las estructuras celulares, momento en el cual se presenta el valor mínimo de la poza de carbohidratos (Gary *et al.*, 2003).

En jitomate también se ha comprobado que la cantidad de CO₂ asimilado antes de aplicar el tratamiento de obscuridad es determinante en la intensidad del estrés, pues de ello depende la disminución de la fotosíntesis, la cantidad de carbohidratos en raíces, número de flores, frutos en expansión y hojas; así como el tiempo en que se presenta el cese de la expansión del diámetro de fruto y tallo, esto ocurre a las 50 horas de obscuridad en plantas con baja asimilación de CO₂ y a las 70 horas de obscuridad en plantas con alta asimilación (Gary *et al.*, 2003).

De manera que ha quedado establecido que en obscuridad prolongada el tejido vegetal experimenta una secuencia de estadios de estrés. Primero disminuye la concentración de carbohidratos, así como las velocidades de respiración y de crecimiento. Entonces otros compuestos son utilizados como sustrato para la mermada actividad respiratoria. Finalmente, ocurren procesos irreversibles tales como la degradación de las membranas, llevando a la muerte celular (Gary *et al.*, 2003).

El fenotipo etiolado incluye un hipocotilo alargado que presenta la inhabilidad de enderezar el asa y de expandir los cotiledones, falta de desarrollo de los cloroplastos y de actividad meristemática, más aun, presenta la represión de genes que normalmente son regulados por la luz. Cuando la luz dispara el desarrollo fotomorfogénico, el crecimiento del hipocotilo y epicotilo se reduce, los cotiledones y/o las hojas primarias se abren y expanden, los etioplastos se desarrollan hasta convertirse en cloroplastos funcionales, esto gracias a que comienza la expresión de genes regulados por la luz. Existen varias mutantes que mantienen un fenotipo de fotomorfogénesis en vez de eskotomorfogénesis durante periodos prolongados de obscuridad (Cheng *et al.*, 2000).

Se ha comprobado que la luz altera los niveles de las fitohormonas. La auxina participa en el alargamiento del tallo de *Arabidopsis thaliana* expuesto a la luz, no así cuando crece en obscuridad (Jensen *et al.*, 1998). Los brasinoesteroides reprimen la fotomorfogénesis en la obscuridad y son importantes en el establecimiento de la skotomorfogénesis. Las giberelinas en *Arabidopsis* y en chícharo también reprimen la fotomorfogénesis en la obscuridad (Alabadí *et al.*, 2004).

En las plantas de frijol noduladas, la obscuridad continua induce la senescencia de los nódulos. Luego de un periodo de 24 horas de obscuridad, la respiración de la raíz disminuye hasta en un 76 %, la actividad de la nitrogenasa en un 95 %, la concentración de sacarosa y fructosa en un 97%, glucosa y almidón en un 50 %. A los 4 días se colapsa por completo el metabolismo del nódulo, disminuye en un 75 % la cantidad de leghemoglobina, disminuyen por debajo de la mitad las actividades de APX, GR, SOD, CAT, dehidroascorbato reductasa (DHAR) y monodehidroascorbato reductasa (MDAR), así como las cantidades de los antioxidantes ASC, GSH, GSSG, y de NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH, a la par aumenta la cantidad de proteínas oxidadas, esto debido al aumento de hierro catalítico y oxígeno (Gogorcena *et al.*, 1997).

2.2 Características de la enzima ascorbato oxidasa

La enzima ascorbato oxidasa (AO) o ácido ascórbico oxidasa (AAO), tiene el nombre sistemático L-ascorbato:oxígeno oxidoreductasa y código de la comisión enzimática E. C. 1.10.3.3. Lleva a cabo la reducción con cuatro electrones del oxígeno molecular a agua con la concomitante oxidación de un electrón del L-ascorbato o vitamina C (**Figura 3**).

El ácido ascórbico (AA) tiene dos formas oxidadas, el monodehidroascorbato (MDA), primer producto de oxidación generado por la AO y el dehidroascorbato (DHA) formado por la desproporción del MDA, un radical poco reactivo pero inestable.

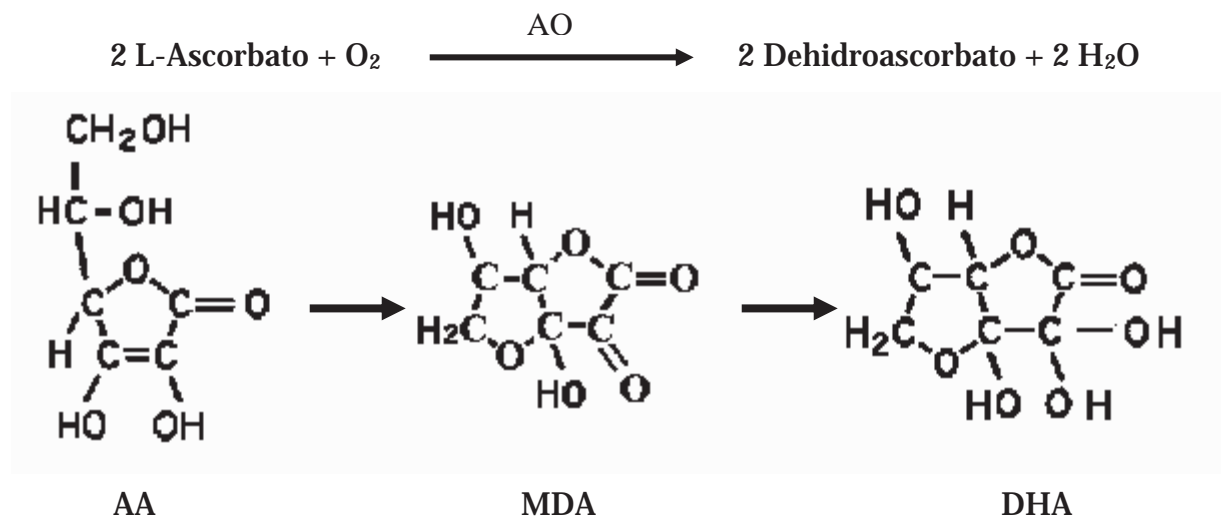


Figura 3. Reacción catalizada por la ascorbato oxidasa.

AA, ácido ascórbico; MDA, monodehidroascorbato; DHA, dehidroascorbato; AO, ascorbato oxidasa.

2.2.1 Estructura

La AO es una glicoproteína que contiene manosa, xilosa y N-acetilglucosamina, tiene una masa molecular de 140 kDa, contiene 8 átomos de cobre, además de ser homodimérica. Cada subunidad cuenta con 554 aminoácidos, forma globular y tres dominios que se pliegan en barril β . El sitio activo de cada subunidad contiene un cobre tipo 1 que le confiere a la macromolécula la propiedad de absorber luz a 610 nm y formar una banda azul en el espectro óptico producido por Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR), también contiene un cobre tipo 2 que no absorbe luz y un par de átomos de cobre tipo 3 unidos por un puente hidroxilo que absorben luz a 330 nm pero que no forman banda porque el puente hidroxilo crea antiferromagnetismo. Entre el cobre tipo 2 y los dos átomos de cobre tipo 3 se forma el centro trinuclear de cobre. Este centro de cobre no azul es planar, con el Cu^{2+} coordinado con el nitrógeno imidazol de histidinas y con grupos hidroxilo (**Figura 4**).

Por estas características estructurales, la AO está clasificada dentro de la familia de enzimas oxidazas azul multicobre, en la que también se incluye a la lacasa y ceruloplasmina. (Messerschmidt y Huber, 1990; D'Andrea *et al.*, 1989; y Marchesini *et al.*, 1979).



Figura 4. Estructura tridimensional de la ascorbato oxidasa de calabacita, publicada en www.ncbi.org por Messerschmidt *et al.*, 1989. Flechas amarillas, hojas β ; flechas verdes, α hélices; líneas celestes, asas; Cu, átomos de cobre; círculos rojos y azules, átomos de las moléculas de carbohidratos.

2.2.2 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción comienza con la unión de una molécula de AA cerca del cobre tipo 1, al que le dona un electrón que en seguida se transfiere al par de átomos de cobre tipo 3, el MDA generado es liberado. La enzima queda completamente reducida después de oxidar cuatro moléculas de AA, en ese momento se rompe el enlace hidroxilo entre los átomos de cobre tipo 3 y se fija la molécula de oxígeno cerca del centro trinuclear donde se reduce completamente a agua (Gaspard *et al.*, 1997; Casella *et al.*, 1999).

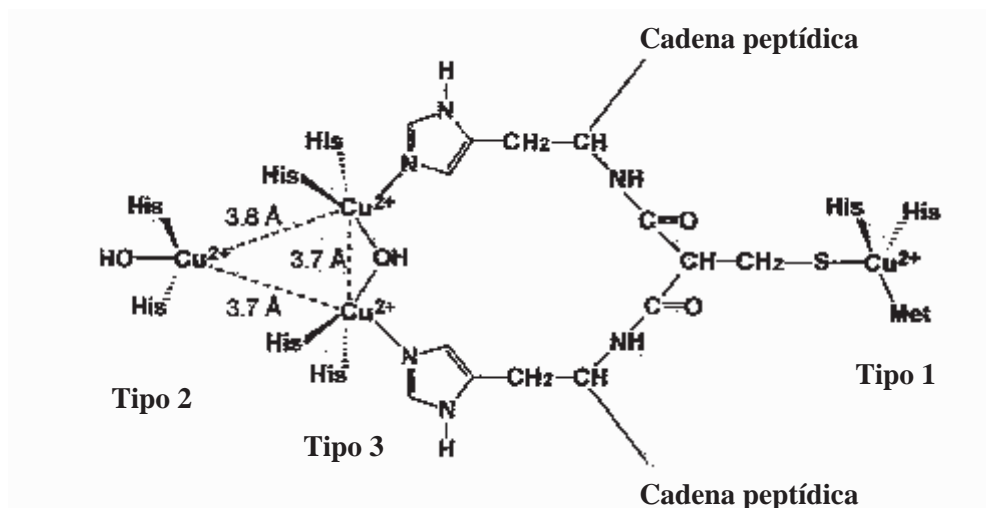


Figura 5. Esquema de la estructura del sitio activo de la ascorbato oxidasa de calabacita (Casella *et al.*, 1999).

2.2.2.1 Inhibición enzimática

Aniones pequeños como el fluor y la azida son capaces de unirse a los centros de cobre de la AO de calabacita, al igual que el tiocianato, a pH 5.6; dando lugar a una inhibición mixta, ya que existen varios sitios de unión en la enzima: rompen el puente endógeno entre el par de átomos de cobre tipo 3, y posiblemente tengan un sitio de unión cercano al cobre tipo 1 (Casella *et al.*, 1999).

El cobre de la AO también es el blanco de otro inhibidor, el Dietilditiocarbamato, el cual a una concentración de 0.1 μM inhibe en un 50 % a la AO purificada de *Cucurbita pepo* condensa (Stark y Dawson, 1963). A su vez, Hallaway *et al.*, en 1970, con 1 mM DETC, obtuvieron una inhibición del 60 % de la actividad de AO en una preparación de pared celular de hoja de *Brassica oleracea* y un 75 % de inhibición en la fracción soluble.

Stark y Dawson, en 1963, también reportan que el H₂O₂ inhibe a la AO de *Cucurbita pepo* con una Ki de 0.56 mM.

Compuestos orgánicos con una estructura similar al L-ascorbato pueden inhibir de manera competitiva a la AO purificada de *Cucurbita pepo*, entre ellos se encuentran los compuestos fenólicos *p*-clorofenol, *p*-cianofenol, *p*-nitrofenol y el mismo fenol, a pH neutro, con *Ki* = 1, 2, 3 y 6 mM, respectivamente. Si se disminuye el pH aumentan las constantes de inhibición (Gaspard *et al.*, 1997).

2.2.3 Localización

La AO se encuentra en las plantas de manera ubicua, se pueden encontrar enzimas con la misma función catalítica pero con estructura proteica diferente en otros organismos, tal es el caso de las AO de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Myrothecium verrucaria*, que no contienen átomos de cobre sino grupos hemo (Kim *et al.* 1996).

Se ha detectado el gen, estudiado la estructura y la actividad de AO en protoplastos, células en suspensión, y hojas de tabaco (Kato y Esaka, 1996, 1999, 2000; Pignocchi *et al.*, 2003; Sanmartin *et al.*, 2003); durante el desarrollo del fruto de melón (Diallinas *et al.*, 1997); fruto y tallo de pepino (Ohkawa *et al.*, 1994); fruto y hojas de calabacita (Chichiricco *et al.*, 1989; Lin y Varner, 1991); callo, tallo, hoja y fruto de calabaza (Esaka *et al.*, 1988, 1989, 1992; Kisu *et al.*, 1997,1998); planta y fruto de chile poblano (García-Pineda *et al.*, 2004); centro quiescente del meristemo apical de la raíz de maíz (Kerk y Feldman, 1995); en cotiledones de mostaza (Leaper y Newbury, 1989; Hayashi y Morohashi, 1993); plántulas de chícharo (Suzuki y Ogiso, 1973; de Pinto y De Gara, 2004); epicotilos de *Vigna angularis* (Takahama y Oniki, 1994); panícula del arroz (Reddy *et al.*, 1986); frutos de jitomate y pimiento morrón (Yahia *et al.*, 2001); así como en radículas de frijol “Flor de Mayo” (Hernández-Mata y Soriano-Bello, 2003).

Se le puede detectar con inmunohistoquímica en todos los tejidos vegetales, pero es en el colénquima, -un tejido de sostén de hojas y tallos en crecimiento o ya maduros de plantas herbáceas dicotiledóneas-, donde abunda (Chichiricco *et al.*, 1989).

En varios estudios se ha detectado a la enzima en apoplasto y citoplasma, sin embargo, se cree que la actividad de AO presente en citosol es debida a la contaminación de las vesículas de Golgi que contienen AO activa en ruta hacia la pared celular, por lo que cada vez queda más clara su abundancia en el apoplasto, fijada por fuerzas iónicas a la pared celular, (Chichirico *et al.*, 1989; Lin y Varner, 1991; Takahama y Oniki, 1994; de Pinto y De Gara, 2004).

2.2.4 El gen de la ascorbato oxidasa

En pepino, el cDNA de AO reveló un marco de lectura abierto de 2200 nucleótidos que codifica para 587 aminoácidos, 33 de los cuales se remueven de la región amino terminal antes de que madure la enzima, siendo posiblemente un péptido señal que se elimina al ser exportada la proteína al apoplasto, (Ohkawa *et al.*, 1989). Cuando se detectó el nivel de expresión del gen en los diferentes órganos de la planta de pepino se encontró que el gen de AO se expresaba más en tallo que en hoja y raíz, y que el elemento responsable para conferir la expresión tejido específica se unía en *cis* en la región de nucleótidos que va de -736 a -494, (Yoshida *et al.*, 1994).

En el genoma de pepino parece estar presente más de una isoenzima y pseudogenes de AO. La caja TATA y la caja CAAT se encontraron en 124 pb y 218 pb río arriba del codón de iniciación, respectivamente. En las plantas de tabaco se observó una expresión órgano específica similar a pepino, requiriéndose una región en la zona promotora en la que actúa un elemento en *cis*, que confiere la especificidad de expresión mayor en fruto y tallo y menor en raíz y hoja (Ohkawa *et al.*, 1994). En el genoma de tabaco sólo se detectó una copia del gen de AO, el cDNA contenía 1.7 Kpb en su marco de lectura abierto, el pI predecido para la enzima de tabaco fue de 9.17, muy diferente en comparación con el pI de pepino, 6.95, y el de calabaza, 6.09 (Kato y Esaka, 1996).

Al igual que en el tabaco, en el chile poblano (*Capsicum annuum* L., variedad Ancho San Luis) se encuentra una sola copia del gen de AO, el cDNA tiene 1007 pb, con un marco de lectura abierto de 797 pb, su transcripción también es órgano específica, es mayor en la raíz, luego en el tallo, yemas florales y casi no se expresa en las hojas (García-Pineda *et al.*, 2004).

El cDNA de AO de calabaza consta de cuatro exones y tres intrones, la región de -703 a +68 funciona como promotor, la caja TATA y la caja CAAT se encontraron en 83 pb y 193 pb río arriba del codón de iniciación, respectivamente. En la región que va de -493 a -703 existe una secuencia de regulación en *cis* involucrada en la respuesta a auxina. A la vez, existe en la región comprendida entre los nucleótidos -300 a -358 un elemento en *cis* que actúa como silenciador, es aquí donde se une AOBP (proteína de unión a la ascorbato oxidasa), una proteína dedos de zinc que actúa como represora de la transcripción (Kisu *et al.*, 1997).

En el melón existe una familia multigénica con al menos cuatro miembros. La comparación de la secuencia de tres de estos genes mostró que tienen un grado de similitud con los genes de AO de tabaco, calabaza y pepino entre el 68 y 82 %. Los cuatro genes codifican para 14 isoformas de AO con un rango de pI de 7.7 a 8.3 (Diallinas *et al.*, 1997; Al-Madhoun, 2003).

2.2.5 Regulación de la actividad de la ascorbato oxidasa

En 1992, Esaka y colaboradores reportaron un aumento en la actividad de AO en células de calabaza en suspensión tratadas con auxina. Los estudios posteriores en la zona promotora del gen de AO revelaron una región en la que se encuentra un elemento en *cis* que activa la transcripción en respuesta a la fitohormona (Kisu *et al.*, 1997). El gen de AO también es regulado por el factor de transcripción AOBP que inhibe su transcripción en órganos maduros de calabaza (Kisu *et al.*, 1998).

Los carbohidratos presentes en AO, xilosa, manosa y N-acetilglucosamina, regulan la actividad de la enzima; al ser eliminados de la estructura, aumenta la afinidad por el L-ascorbato ya que se detecta una disminución en la K_m y aumenta la habilidad catalítica al disminuir la $K_{m\acute{a}x}$ (D'Andrea *et al.*, 1989).

El aumento de iones calcio en el apoplasto aumenta la secreción de proteína de la AO hacia ese compartimento en células en suspensión de calabaza (Esaka *et al.*, 1989). Los iones de cobre aumentan la actividad de AO al estabilizar el ensamblaje de la holoenzima (Esaka *et al.*, 1988; Esaka *et al.*, 1992).

La exposición de cotiledones de mostaza a luz en el intervalo de rojo lejano continuo (CFR), aumenta la síntesis *de novo* de AO controlada por el fitocromo (Leaper y Newbury, 1989; Hayashi y Morohashi, 1993). Recientemente, se detectó una disminución en el ARNm de AO en hojas de tabaco sometidas a obscuridad por 16 horas, hasta en un 80 % en comparación al nivel de transcrito en hojas expuestas a luz natural el mismo lapso de tiempo (Pignocchi *et al.*, 2003).

Moser y Kanellis, en 1994, detectaron un aumento en el ARNm de AO durante la etapa climatérica del fruto de melón. Por el contrario, Diallinas y colaboradores reportan en 1997, una disminución del transcrito en la parte externa del fruto de melón al comienzo de la etapa climatérica, así como una disminución del ARNm después de 6 horas de provocar una herida en el tejido del fruto. En fruto de melón transformado para que no sintetice etileno, la expresión del gen de AO no se reprimió luego de la herida, sugiriendo que el etileno producido por la herida es el represor de la transcripción del gen de AO en frutos climatéricos (Diallinas *et al.*, 1997).

La incubación de los frutos de chile poblano en 1 mM ácido araquidónico, fomenta un incremento transitorio del transcrito de AO a la hora. Se observa lo mismo pero a las 2 horas cuando los chiles se exponen a 8 mg de celulasa, en cambio el metil jasmonato (MeJa) no tiene ningún efecto en el nivel de transcrito de AO. Al igual que el ácido araquidónico y la celulasa, la herida también causa un aumento temporal del transcrito después de 1 hora de infligirse en el fruto. La adición de ácido ascórbico también aumenta el nivel de transcrito de AO significativamente (García-Pineda *et al.*, 2004).

El nivel de transcrito de AO disminuye a la mitad en 1 hora y permanece así por 24 horas luego de asperjar las hojas de tabaco con 1 mM ácido salicílico (SA, fitohormona que se acumula al haber ataque de patógenos), mientras que el nivel de transcrito de PR1a, proteína relacionada a la patogénesis, aumenta hasta 5 veces a la hora y hasta 6 veces a las 24 horas; contrario a lo que ocurre al asperjar las hojas con ácido naftalén acético (NAA). Esto apoya la idea de que la AO participa en el crecimiento inducido por auxina, fenómeno que ocurre cuando no hay estrés que desencadena, entre otros eventos, una señalización dada por SA (Pignocchi *et al.*, 2003).

2.3 Función biológica de la ascorbato oxidasa

2.3.1 Participación de la ascorbato oxidasa en la expansión celular

Existe una posible correlación positiva entre la velocidad de crecimiento y la actividad de AO. Analizando el crecimiento del fruto de calabacita y la actividad de AO, se detectó una fase de crecimiento exponencial en longitud y grosor hasta el día 10 después de la anthesis, dentro de esa fase la AO presentó la más alta actividad -entre los días 5 y 8-. En un mismo fruto, la actividad y el RNAm de AO fueron bajos en la región central y mayores en la epidermis, donde hay más expansión. Al igual que en el fruto, analizando diferentes regiones de las hojas se detectó una mayor actividad en la zona de rápido crecimiento, sobre todo en las hojas jóvenes de 4 días (Lin y Varner, 1991).

Lin y Varner, en 1991, fueron los primeros en proponer que la AO estaba involucrada en reorganizar la pared celular para permitir la expansión de la célula gracias a la propiedad que posee el DHA de interactuar con los componentes de la pared, “ablandándola” debido al desacoplamiento de las proteínas estructurales con la hemicelulosa y pectina además del rompimiento de los puentes de calcio. Sin embargo, no analizaron los cambios que hubo en la cantidad de DHA en la pared celular. Algo que posteriormente harían Takahama y Oniki en 1994.

El monodehidroascorbato, primer producto de oxidación de la AO, participa en la expansión celular fomentada por la vacuolización, que es el aumento relativo del volumen ocupado por la vacuola en la célula vegetal. El MDA, más no el AA o el DHA, causa una hiperpolarización continua del plasmalema que facilita los procesos de transporte a través de la membrana. Esto concluyen González Reyes y colaboradores en 1994, tras varios estudios en raíces de cebolla, en los que se detecta una coincidencia en el tiempo de los fenómenos de crecimiento de la raíz, elongación de las células, aumento del volumen de la vacuola y superficie del tonoplasto, así como la toma de los nutrientes nitrato, sacarosa, fucosa y glucosa en raíces de cebolla incubadas con MDA.

El nitrato es transportado al interior de la vacuola en respuesta a un potencial de membrana interior positivo dado por la acción de la H^+ -ATPasa del tonoplasto, que se activa luego de incubar las raíces de cebolla con MDA por 48 horas. El MDA estimula la extrusión de protones e hiperpolariza el plasmalema, lo que la energiza y activa los canales y bombas (González-Reyes *et al.*, 1994).

En hipocotilos etiolados de *Phaseolus vulgaris* L. Var. Limburgse Vroege, se determinó que el MDA del apoplasto es el aceptor de electrones del citocromo *b₅₆₁* localizado en el plasmalema, que tiene como función translocar electrones proporcionados por el AA intracelular hacia el apoplasto. De manera natural, el MDA se puede generar en los procesos de crecimiento de la pared celular, las reacciones de oxidorreducción del AA en el apoplasto y la acción de AO (Horemans *et al.*, 1994 y 1997).

En la parte interna del plasmalema de la hoja de espinaca, se encuentra unida una monodehidroascorbato reductasa, que utiliza como agente reductor el NADH, la cual podría recuperar la poza de AA en la vecindad del citocromo tipo b (Bérczi y Møller, 1998).

En el medio de cultivo de células de tabaco en expansión -adicionado con ANA y BA-, el ARNm y la actividad de AO aumentaron a través del tiempo al igual que la concentración de DHA (Kato y Esaka, 1999). Células de tabaco transformadas con el gen de AO de calabaza presentaron un aumento del doble de actividad de AO y se expandieron 2.5 veces más que las células de tabaco silvestres (Kato y Esaka, 2000).

Todo lo anterior se puede resumir en la **Figura 6**, en la cual se representa el papel que ejerce el MDA como activador de los procesos de transporte al aceptar electrones provenientes del AA citoplásmico a través del citocromo tipo *b₅₆₁*.

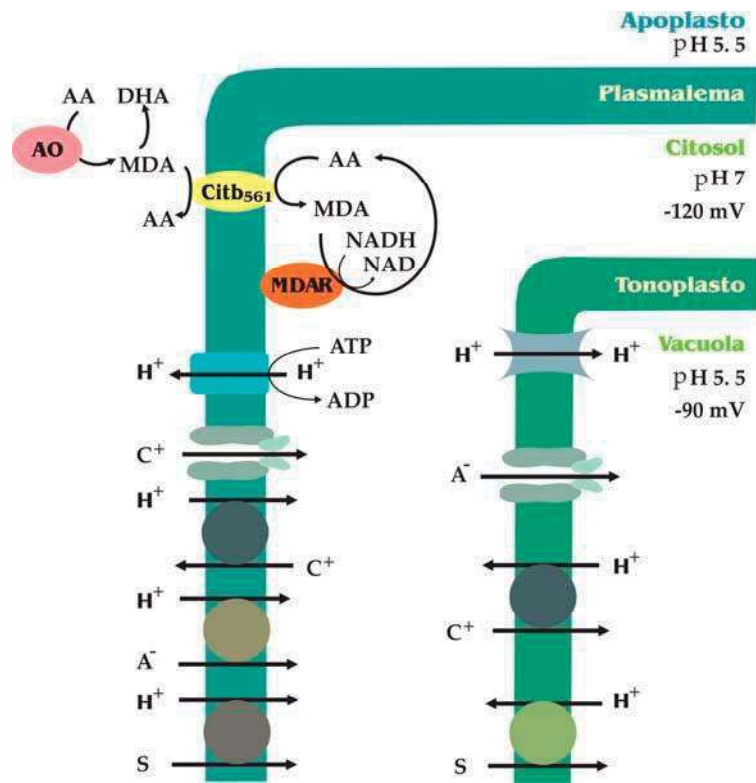


Figura 6. Vacuolización celular. AO, ascorbato oxidasa; Citb₅₆₁, citocromo-*b₅₆₁*; MDAR, monodehidrosorbato reductasa; H⁺, protón; C⁺, catión; A⁻, anión y S, azúcar. (González-Reyes *et al.*, 1994; Horemans *et al.*, 1994; Bérczi y Møller, 1998). La extrusión de protones a través del plasmalema despolariza la membrana y activa canales -por ejemplo de los cationes de calcio-, transportadores antiporte y simporte de nutrientes como el nitrato y el Fe³⁺ que al introducirse a la célula de la raíz o de la hoja se reduce a Fe²⁺, también la sacarosa y otros azúcares. Algunos de estos nutrientes se guardan en la vacuola introduciéndose más agua, lo que causa su ensanchamiento. Ambas superficies del plasmalema tienen un pI abajo de pH 4.0, lo que significa que la carga neta es negativa a pH neutro, dando lugar a un potencial de membrana interno negativo.

2.3.2 Participación de la ascorbato oxidasa en la división celular

El ápice del tallo de arroz se convierte en un conjunto de florecillas llamado panícula. De manera artificial, Reddy y colaboradores, en 1986, aceleraron la aparición de la panícula al someter a las plantas de arroz a fotoperiodos cortos de 8 horas luz seguidas de 8 horas obscuridad por 28 veces. En las plantas tratadas con el fotoperiodo corto la panícula apareció a los 56 días después de la siembra mientras que en las plantas control ocurrió hasta los 81 días. El mismo efecto se logró al aplicar directamente AA al ápice del tallo. En los ápices de las plantas sometidas al fotoperiodo corto y en las plantas control, se detecta una disminución dramática de la actividad de AO conforme se acerca la fecha de aparición de la panícula, permaneciendo asintótica de ahí en adelante. Se determinó una correlación negativa entre la disminución de la actividad de AO y el aumento en la cantidad de AA en el ápice. Al parecer, para que el meristemo apical comience la división celular para formar el órgano reproductor, se requiere del aumento de AA en el apoplasto (Reddy *et al.*, 1986).

El meristemo es un tejido vegetal formado por células indiferenciadas en las que se producen divisiones rápidas y numerosas, está situado en las regiones de crecimiento de la planta. El meristemo apical de la raíz de maíz consta de tres zonas: el meristemo distal que rodea al meristemo proximal y este a su vez al centro quiescente. La división celular se produce entre 10 y 16 horas en la zona distal, entre 18 y 25 horas en la zona proximal y a las 170 horas en el centro quiescente. En el centro quiescente existe una concentración de auxina mayor a la habida en otras zonas de la raíz, así como una alta actividad de AO que mantiene los niveles de AA indetectables. Como el AA es indispensable para que se lleve a cabo la transición de G1 a S en el ciclo celular, la completa oxidación del AA por la AO explica la permanencia de las células que forman el centro quiescente en una continua fase G1 (Kerk y Feldman, 1995).

En un estudio posterior, se reportó que la AO descarboxilaba oxidativamente a la auxina *in vivo* en las puntas de las raíces de maíz, este catabolismo de la auxina podría ser un modo de regulación de los niveles de la hormona en la raíz. Para que se llevara a cabo la descarboxilación de la auxina se requirió que la cofia de la punta de la raíz estuviera intacta porque si no era así, si se eliminaba la punta, surgían nuevas raíces laterales, probablemente porque se removía el centro quiescente donde abunda la AO responsable del catabolismo de la auxina (Kerk *et al.*, 2000).

El estudio pionero sobre el avance del ciclo celular y el comportamiento de la expresión del ARNm y de la actividad de AO reveló que el ARNm de AO de tabaco se expresaba en gran manera en la fase M y disminuía su expresión al 50 % en la fase G1 para luego desaparecer, a menos de que el medio de cultivo se adecuara para la expansión celular, entonces el ARNm de AO se sobreexpresaba al comienzo de la fase G1 justo cuando iniciaba el proceso de expansión celular. También se determinó que el DHA aumenta transitoriamente en la fase M y luego disminuye drásticamente en la fase G1 en células en división, por el contrario, en células en expansión, el DHA aumentó significativamente en la fase G1. Se concluyó que la expresión de AO y la producción de DHA están bajo el control del ciclo celular (Kato y Esaka, 1999).

Cuando se añadió DHA a células de tabaco en la fase G1, se detectó un retardo de 4 horas para alcanzar el índice mitótico de las células control (Potters *et al.*, 2000). Por otro lado, el transportador de DHA en el plasmalema de células de tabaco incrementa su actividad durante la fase M y la transición de M a G1 (Horemans *et al.*, 2003).

La incubación por 24 horas de las raíces de *Lupinus albus* y *Allium cepa* con DHA, afecta el crecimiento de las raíces inhibiendo la proliferación celular, ya que el índice mitótico bajó de 9.18 en las células control a 4.38 en las células tratadas con DHA, en las que además se detectó una disminución progresiva de la incorporación de timidina. La incubación con L-galactono- γ -lactona -el último precursor de la biosíntesis de AA-, induce el efecto contrario (Paciolla *et al.*, 2001). En la **Figura 7** se ilustra el comportamiento de la AO a lo largo del ciclo celular. Dependiendo del tipo de célula la AO se comporta de una manera característica.

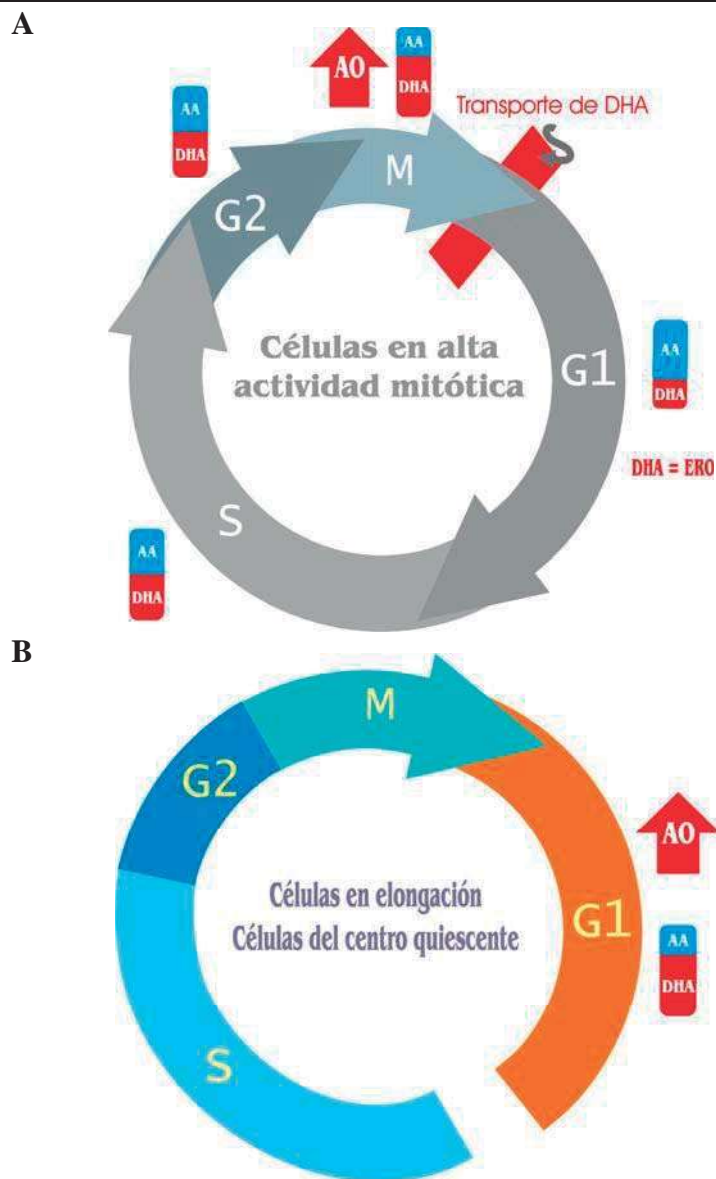


Figura 7. Comportamiento de la ascorbato oxidasa de acuerdo a las fases del ciclo celular. M, fase mitótica o meiótica; G1, primer interfase o periodo de crecimiento; S, fase de síntesis de DNA; G2, segunda fase de intervalo. Panel A) En células en alta actividad mitótica existe mayor expresión del ARNm de AO en la fase M así como una mayor concentración de DHA en apoplasto, el cual es mayormente transportado durante la transición de M/G1 hacia el citosol donde es reducido, por lo que su concentración disminuye significativamente durante la fase G1, siendo un requisito para la progresión del ciclo, como lo es la disminución de especies reactivas de oxígeno. Panel B) En células quiescentes o en expansión, el ARNm y la actividad de AO presentan la mayor alza en el punto de salida de la fase M hacia una continua fase G1, en la que también aumenta la concentración de DHA en el apoplasto. (Kerk y Feldman, 1995; Kato y Esaka, 1999; Horemans *et al.*, 2003; Paciolla *et al.*, 2001)

2.3.3 Participación de la ascorbato oxidasa en la diferenciación celular

En un estudio reciente sobre el metabolismo del ascorbato durante la diferenciación celular se detectó una alta actividad de AO durante esta etapa de crecimiento, correlacionada con una disminución en los niveles de AA y un aumento en la actividad de peroxidasas apoplásticas (de Pinto y De Gara, 2004).

Los experimentos se realizaron en epicotilos de chícharo, los cuales se dividieron en 4 segmentos: ápice, asa, primer centímetro del segundo internodo y segundo centímetro del segundo internodo. Los valores del índice mitótico fueron 13, 4, 0 y 0, respectivamente, las células del ápice estaban en alta división celular, en el asa sólo las células del procambio aún estaban en división y en los segmentos 3 y 4 ya no ocurría división celular. Las dimensiones de las células fueron de 21 μm en el ápice, 39 en el asa, 78 en el segmento tres y 116 en el segmento cuatro. Lo cual indicó que las células de las zonas más alejadas del ápice iban expandiéndose hasta alcanzar la máxima dimensión y completa diferenciación.

Fueron en los segmentos 3 y 4 donde se registró una alta actividad de AO y un aumento en el DHA del apoplasto. En este compartimiento además se determinó que la ascorbato peroxidasa tipo 1, encargada de detoxificar a la célula de especies reactivas de oxígeno, tuvo un comportamiento opuesto al de AO, esto es, su mayor actividad ocurrió en los segmentos 1 y 2.

Otro tipo de peroxidasas, las de clase III, encargadas de oxidar los precursores fenólicos de la lignina para producir los radicales fenilo que se polimerizan formando el entrecruzamiento de la pared secundaria; presentaron un aumento en su actividad en los segmentos 3 y 4 como ocurrió con la AO. Al parecer, la diferenciación es un proceso paulatino que en su comienzo no se desliga de la expansión celular, esto es, ocurren al mismo tiempo.

La posible función que tiene la AO en el proceso de diferenciación celular es la de disminuir los niveles de AA del apoplasto, lo que fomenta la lignificación, ya que el AA elimina los radicales fenoxi al reducirlos directamente (de Pinto y De Gara, 2004).

Las células del colénquima -tejido en el que abunda la AO-, presentan paredes primarias engrosadas, generalmente el engrosamiento está distribuido desigualmente. El modo de crecimiento de esta pared primaria gruesa no es claro pero se produce mientras la célula se alarga, es decir, que la pared aumenta simultáneamente en superficie y en espesor. El fenómeno es muy complejo porque los engrosamientos son muy grandes (Setterfield, 1958).

2.3.4 Control del estado redox en el apoplasto por la ascorbato oxidasa

2.3.4.1 El estado redox del ascorbato en el simplasto

En las plantas el ascorbato se encuentra en el citosol, cloroplastos, vacuolas, mitocondria y pared celular. Las propiedades ácidas de la molécula las proporciona el grupo hidroxilo del C3 ($pK_a=4.7$). El DHA es inestable arriba de pH 7, se deslactoniza de manera irreversible a ácido 2,3-diceto-L-gulónico; por lo que es necesario mantener la poza total de ascorbato en su estado reducido para prevenir una rápida pérdida. La poza de ascorbato en el simplasto es superior al 90% en su forma reducida (Smirnoff, 1996).

En las semillas de *Pinus pinea* L., sólo se detecta DHA, ya en el primer día de germinación hay una proporción de 50 % AA y 50 % DHA tanto en el embrión como en el endospermo, es al segundo día de germinación cuando se alcanza la proporción final del 90 % AA y 10 % DHA, esto debido a que se incrementa la actividad de las enzimas que sintetizan el AA y de las enzimas que mantienen la poza, esto es, las enzimas que participan en el ciclo del ascorbato-glutación (Tommasi *et al.*, 2001).

El ciclo del ascorbato-glutación o ciclo de Halliwell-Asada sirve para detoxificar a los cloroplastos y el citosol de especies reactivas de oxígeno (ERO) utilizando como antioxidante al AA, el cual es regenerado a la par para evitar cambios drásticos en su estado redox. El estado redox del ascorbato se calcula como $AA*100/(DHA+AA)$ y en condiciones normales tiene un valor entre el 90 y el 95 % (Pignocchi *et al.*, 2003; Sanmartin *et al.*, 2003; Pignocchi y Foyer, 2003).

El ciclo del ascorbato-glutatión (**Figura 8**), comienza con la dismutación del O_2^- a H_2O_2 mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD). Luego el H_2O_2 se reduce a agua por la ascorbato peroxidasa (APX) utilizando como donador de electrones al AA, el cual es oxidado a MDA que se desproporciona a DHA o es utilizado como sustrato por la monodehidroascorbato reductasa (MDAR) para regenerar el AA. La MDAR utiliza como agente reductor al NADPH en cloroplastos y citosol aunque también al NADH cuando está unida en la parte interna del plasmalema. El DHA se reduce a AA mediante la enzima dehidroascorbato reductasa (DHAR), que requiere del glutatión reducido (GSH) como donador de electrones. El glutatión reducido lo regenera la enzima glutatión reductasa (GR) que utiliza como sustrato al glutatión oxidado (GSSG) y al NADPH como agente reductor (Asada, 1992; Halliwell y Foyer, 1976).

El GSH es un tripéptido (Glu-Cys-Gly) cuya función es facilitada por el grupo sulfhidrilo de la cisteína. En la oxidación, el grupo sulfhidrilo forma un radical tioilo que reacciona con el sulfhidrilo de otro glutatión formando un puente disulfuro y rindiendo un GSSG. Algunas leguminosas contienen homoglutatión que es un tripéptido homólogo de Glu-Cys-Ala. El glutatión se encuentra en el simplasto y su estado redox es del 95 % (Sanmartin *et al.*, 2003). El NADPH es el agente reductor último del que depende todo el ciclo, es sintetizado en la vía de las pentosas fosfato en el citosol y en el fotosistema I (PS1) del cloroplasto (Halliwell y Foyer, 1976).

Las actividades de las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión se incrementan por la sequía en cebada, *Eragrostis tef* y las especies de jitomate *Lycopersicon esculentum* y *L. chiliense*, sugiriendo el requerimiento del incremento de la actividad del ciclo bajo estas condiciones. Pero en la muerte celular programada (PCD) inducida por el aumento simultáneo de NO y H_2O_2 en células de tabaco se abate la actividad de APX aunque no del resto de las enzimas del ciclo, además de que disminuye el estado redox del ascorbato y el glutatión (Smirnoff, 1996; de Pinto *et al.*, 2002).

La cantidad de AA en las células controla su síntesis, si se añade AA de manera exógena a las células de chícharo y tabaco, se detecta una inhibición de la síntesis de AA, además de una disminución en su concentración, así como una disminución en el ARNm de AO (Pallanca y Smirnoff, 2000; Tabata *et al.*, 2002).

En alfalfa, *arabidopsis* y valeriana, se detectó el transporte del ascorbato desde las hojas maduras -los órganos que realizan la mayor parte de la fotosíntesis-, hacia todas las partes de las plantas a través del floema, que tiene un pH ligeramente alcalino, por lo que el ascorbato viajaría en forma de ión. Las hojas maduras tienen de 3 a 10 veces mayor capacidad biosintética de ascorbato que el resto de los órganos, los cuales son demandantes de ascorbato (Franceschi y Tarlyn, 2002).

La mutante de *Arabidopsis thaliana* llamada *vtc1* contiene sólo el 30 % de AA en comparación con la planta silvestre. La mutación se hizo en el gen que codifica para la enzima GDP-manosa pirofosforilasa, una enzima que forma parte de la vía de biosíntesis de AA. En *vtc1* se detectaron 171 genes regulados de manera diferente a la silvestre, entre ellos abundaron genes inducidos por ABA, hormona presente en un 60 % más que en la silvestre. Las plantas *vtc1* tienen niveles altos de triptófano, deshidrinas, proteínas de choque térmico de respuesta a sequía, represión de una acuaporina intrínseca en el tonoplasto involucrada en la expansión celular, y otras características bioquímicas típicas de plantas sometidas a sequía. La señalización de ABA es responsable en parte del fenotipo de *vtc1*: plantas pequeñas de floración tardía. En cuanto al genotipo de *vtc1*, este es revertido al genotipo silvestre incubando en vitamina C el tejido de las hojas (Pastori *et al.*, 2003).

2.3.4.2 Funciones del ascorbato en la célula vegetal

El ascorbato cumple con varias funciones:

Antioxidante, el AA reacciona directamente con las ERO y el ozono – el 50 % de O₃ entrante al apoplasto se detoxifica por el AA de la pared celular de frijol (Moldau *et al.*, 1997)-, además reduce los radicales α -cromanoxilo a α -tocoferol. También es sustrato de la enzima antioxidante ascorbato peroxidasa (Smirnoff, 1996).

El DHA estimula las defensas antioxidantes de las células. Mientras que 200-800 μ M AA causó la apoptosis de los linfocitos humanos Jurkat y H9, el tratamiento con 200-1000 μ M DHA estimuló la actividad de las enzimas de la vía de las pentosas fosfato: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa y transaldolasa, lo que elevó los niveles internos de GHS 3.3 veces e inhibió los cambios en el potencial transmembranal de la mitocondria inducidos por H₂O₂ y la muerte celular. Por si mismo, el DHA no afectó los niveles de especies reactivas de oxígeno citosólicas o mitocondriales (Puskas *et al.*, 2000).

Un aumento en el GSH y en su estado redox se detectó de igual manera en plantas de tabaco que sobre expresan la AO (Sanmartin *et al.*, 2003).

La administración de 1 mM DHA a raíces de *Lupinus albus* y *Allium cepa* resultó en un incremento rápido en el AA celular. En las primeras horas de incubación, la reducción del DHA a AA estuvo aparentemente correlacionada con la disminución del GSH y una mayor actividad de DHAR. El DHA también indujo la síntesis *de novo* de GSH. Por otro lado, el tratamiento con DHA indujo un cambio hacia el estado oxidado de los grupos tiol/disulfuro de las proteínas, lo que apoya la hipótesis de que el DHA es reducido por proteínas que contienen el motivo dicisteinilo peculiar de proteín disulfuro isomerasa y tiorredoxinas (Paciolla *et al.*, 2001).

Modulador del ciclo celular y/o la división celular (Kato y Esaka, 1999).

Coenzima para las prolil y lisil hidroxilasas participantes en la síntesis de hidroxiprolina e hidroxilisina; así como de Violaxantin De-Epoxidasa que forma la zeaxantina, una molécula fotoprotectora (Müller-Moulé *et al.*, 2002).

Donador y aceptor de electrones en el transporte de electrones transmembranal. El MDA puede aceptar directamente electrones del PS1 en cloroplastos, así como del Cit-*b*₅₆₁ en el plasmalema (Horemans *et al.*, 1994; Horemans *et al.*, 2000).

Sustrato para la síntesis de oxalato y tartrato. El AA es escindido entre el C2 y C3 para formar el ácido oxálico en los idioblastos de cristales, células especializadas tanto en capturar el calcio excesivo del tejido circundante como en almacenarlo en forma de oxalato de calcio dentro de sus vacuolas (Kostman *et al.*, 2001).

2.3.4.3 El estado redox del ascorbato en el apoplasto

El apoplasto es el compartimiento que abarca desde la superficie externa del plasmalema hasta la pared celular. Aquí se llevan a cabo una serie de procesos sumamente importantes, como la síntesis de la pared, la defensa contra patógenos, la detoxificación de ozono, la nutrición mineral y la transducción de señales; para lo cual, contiene una gran cantidad de enzimas necesarias para la síntesis y degradación de la pared, enzimas que producen ERO, enzimas detoxificantes de ERO, así como receptores (Pignocchi y Foyer, 2003).

		PAO	TAO	CAO
Número de veces el valor de la planta silvestre				
AE de AO	T1	10	0.3	20
	T2	38	0.4	200
AA apoplasto		0.2	3.32	0
DHA apoplasto		3.89	1.06	1.5
AA*100/(AA+DHA) Silvestre = 30 a 40		3.4	66.8	0
Crecimiento	30 % más peso fresco		Ninguno	Ninguno
	25 % más altura del tallo			
Efectos pleiotrópicos	14 % menos peso seco en semillas		Ninguno	Mayor sensibilidad al ozono

Cuadro 3. Comparación de las propiedades de las plantas de tabaco transformadas en el gen de la ascorbato oxidasa. T1 y T2 son la primer y segunda generación de las plantas transformadas. PAO es la planta transformada con el gen de AO de calabaza (pumpkin). TAO es la planta transformada con el gen antisentido del mismo gen de AO de tabaco que es único. CAO es la planta transformada con el gen de AO de calabacita. (Sanmartin *et al.*, 2003; Pignocchi *et al.*, 2003).

Entre las enzimas activas en el apoplasto se encuentra la AO, que es la única que controla el estado redox del ascorbato en este compartimiento, esto se ha comprobado cuando la cantidad de AA y de DHA cambia drásticamente al ser sobre-expresada o suprimida la enzima por transformación genética, lo cual no ocurre con ninguna otra enzima que utilice al AA como sustrato en el apoplasto -**Cuadro 3**- (Sanmartin *et al.*, 2003; Pignocchi *et al.*, 2003).

La cantidad de ascorbato en el apoplasto es aproximadamente 20 veces menor que en el simplasto. El estado redox también es diferente, mientras que en el simplasto el estado redox está arriba del 90 % en el apoplasto es del 30-40 %, es decir, la mayor parte está en la forma oxidada DHA (Sanmartin *et al.*, 2003; Pignocchi *et al.*, 2003).

Del estado redox del ascorbato en el apoplasto dependen varios procesos:

Un control estricto del estado redox del ascorbato en el apoplasto es esencial para la célula de haba y de tabaco ya que es el único buffer antioxidante en este compartimiento pues el GSH se encuentra presente en ínfimas cantidades. (Turcsányi *et al.*, 2000; Pignocchi *et al.*, 2003; Sanmartin *et al.*, 2003; Pignocchi y Foyer, 2003).

Como único antioxidante en el apoplasto el AA elimina las ERO causadas por una explosión oxidativa. La NADPH oxidasa del plasmalema se activa durante el ataque de un patógeno, herida, choque térmico y herbicidas produciendo O_2^- que sirve de sustrato a la SOD que dismuta el O_2^- a H_2O_2 , estas ERO pueden defender del patógeno, servir de señal intra e intercelular, así como reforzar la pared celular que requiere del H_2O_2 . En la raíz, la NADPH oxidasa reduce el Fe^{3+} a Fe^{2+} convirtiéndolo a una forma que puede ser transportada, la disfunción de esta enzima en la raíz produce el O_2^- . Una NADPH oxidasa activada por auxina ha sido asociada con la acidificación de la pared celular y la estimulación de la elongación celular por auxina (Pignocchi y Foyer, 2003). **Figura 8.**

La lignificación de la pared celular depende de la cantidad de H_2O_2 . Utilizando una manganeso peroxidasa (MP), se demostró que el compacto entramado de la lignina -en el que no cabe ni queda atrapada ninguna proteína-, se puede polimerizar mediante la acción de Mn^{3+} cedido por la MP. La MP reduce el H_2O_2 a agua utilizando como donador de electrones el Mn^{2+} que resulta oxidado como Mn^{3+} , este ión es capaz de oxidar los monolignoles sinapil, coniferil y p-coumaril alcohol, lo que los convierte en radicales capaces de reaccionar con las cadenas presentes de lignina, reforzando y engrosando la pared secundaria. Al reaccionar con los monolignoles, el Mn^{3+} se reduce a Mn^{2+} y es nuevamente aprovechado como sustrato por la MP (Önnerud *et al.*, 2002).

El control del estado redox del apoplasto por la AO regula la síntesis de la pared, ya que al oxidar el AA contribuye a la proliferación de radicales fenilo que refuerzan la pared secundaria. El DHA generado por la AO puede ablandar la pared celular al romper las interacciones entre las macromoléculas que la constituyen, este ablandamiento es necesario para que se lleve a cabo la expansión celular. El primer producto de oxidación, el MDA, fomenta a su vez la hiperpolarización del plasmalema, lo cual contribuye a la toma de iones y nutrientes que causan la vacuolización y por tanto, la expansión celular (Pignocchi y Foyer, 2003).

El pH del apoplasto que usualmente fluctúa entre 4.5 y 5.5 varía dependiendo de los estímulos externos e internos. Por ejemplo, se acidifica en la luz debido a la extrusión de protones estimulada por la fotosíntesis. La acidificación también ocurre durante el crecimiento y expansión celular mediados por auxina (crecimiento ácido). La alcalinización ocurre luego de la exposición a estreses como la sequía y el ataque de patógenos en algodón (Pignocchi y Foyer, 2003).

Aparte de la señalización para la defensa existe la señalización para el crecimiento. En ambos casos la transducción de señales comienza con el reconocimiento de dos moléculas: Un receptor específico y una hormona o un receptor/fotoreceptor y luz de la longitud de onda apropiada, o finalmente, una molécula producida por un patógeno o también podría ser un simbionte y un receptor específico. La actividad de los receptores depende del estado redox del apoplasto, ya que como cualquier proteína, sus estructuras terciarias cambian al romperse o establecerse puentes disulfuro e interacciones débiles que dependen de la carga electromagnética del medio que les rodea.

Diferentes tipos de estrés activan las mismas respuestas de defensa utilizando un entrecruzamiento en la transducción de señales. Como ejemplo están los tratamientos con ozono que activan elementos de señalización involucrados en la respuesta ante patógenos, induciendo proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Sanmartin *et al.*, 2003).

Otro caso puede ser el entrecruzamiento de las señales redox y las señales de fosforilación. Los cambios en el estado redox repercuten en intercambios de los grupos tiol a disulfuro y viceversa, ocurridos en los receptores de señales extracelulares (ESR), en las cinasas y en las fosfatasas, que participan en la modulación de la transducción de señales al cambiar el funcionamiento de los poros, canales y bombas que regulan el flujo del calcio y otros iones. Este control sobre el paso de iones también puede ocurrir por la acción directa del H_2O_2 en la estructura de dichos canales. A su vez, existen proteínas efectoras reguladas por calcio -también llamadas sensores de calcio-, que incluyen a la calmodulina, cinasas dependientes de calcio (CDPKs) y fosfatasas reguladas por calcio, como las serín/treonín fosfatasas (Pignocchi y Foyer, 2003). **Figura 8.**

El apoplasto necesita estar en un estado reducido o activo para transmitir las señales dadas por los cambios ambientales de manera efectiva. Las plantas transformadas de tabaco PAO, que sobreexpresan a la AO y que tienen el 97 % del AA del apoplasto oxidado, no responden a la señal de auxina que fomenta el crecimiento, esta des-sensibilización de las células a auxina es causada tal vez por la inactivación del receptor de auxina ABP1. De igual manera ocurre con la estimulación de la actividad enzimática y la expresión del ARNm de AO. En las plantas silvestres esta estimulación ocurre ante la presencia de luz, pero en las plantas PAO ya no existe esa regulación, sino que de manera constitutiva es alta la cantidad de transcrito y la actividad de AO (Pignocchi y Foyer, 2003).

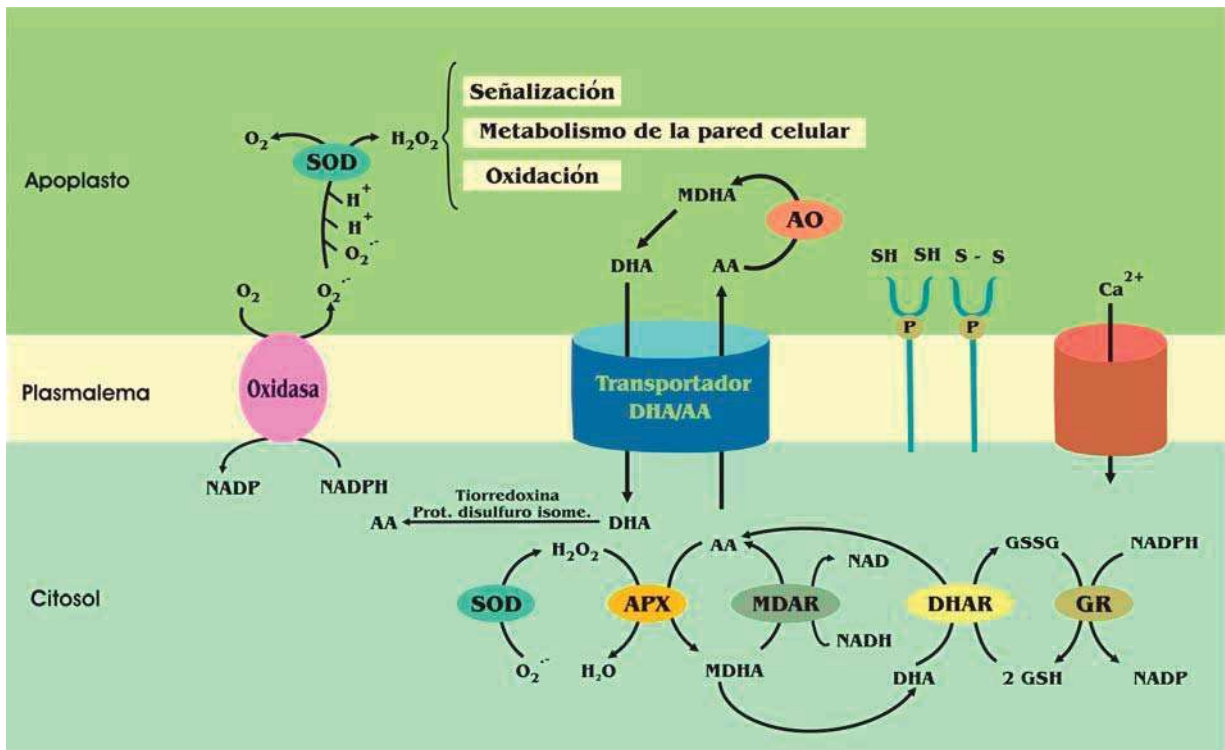


Figura 8. Control del estado redox del ascorbato en citosol y apoplasto. Modificado de Pignocchi y Foyer, 2003. AO, ascorbato oxidasa; AA, ácido ascórbico; MDHA, monodehidroascorbato; DHA, dehidroascorbato; GSSG, glutatión oxidado; GSH, glutatión reducido; SOD, superóxido dismutasa; APX, ascorbato peroxidasa; MDAR, monodehidroascorbato reductasa; DHAR, dehidroascorbato reductasa; GR, glutatión reductasa; P, grupo fosfato; SH, grupo sulfhidrilo; S-S, cistina.

El estado redox del ascorbato en el apoplasto es regulado por la AO, a su vez la AO es regulada por la luz y hormonas tales como la auxina y el ácido salicílico (SA) que modulan los procesos de crecimiento y de defensa, respectivamente. La inducción de la transcripción y por tanto de la actividad de AO puede generar un estado inactivo u oxidado en el apoplasto, atenuando los procesos de transducción de señales para el crecimiento y activando procesos de defensa y viceversa (Pignocchi y Foyer, 2003; García Pineda *et al.*, 2004). **Figura 8.**

2.3.5 Otras posibles funciones

Moser y Kanellis, en 1994, detectaron un aumento en el ARNm de AO durante la etapa climatérica del fruto de melón concomitante con el incremento en la producción de etileno. En la posibilidad de que jugase un papel en la maduración y senescencia de los frutos, Yahia y colaboradores, en el 2001, estudiaron el comportamiento de la actividad de AO y de su sustrato el AA durante la maduración y senescencia de frutos de jitomate y de pimiento morrón. Se detectó un aumento de AA en ambos frutos hasta la plena maduración, al igual que un aumento en las poliaminas putrescina, espermina y espermidina –que se consideran como estimuladores del crecimiento-, de ahí en adelante disminuyen drásticamente a la par que aumenta la actividad de AO.

En brócoli se detectó un aumento del ARNm de AO, así como una disminución en la concentración de AA en el florete durante la senescencia postcosecha, algo que no ocurrió en los tallos, en los que el ARNm de AO disminuyó ligeramente y se mantuvo estable el contenido de AA (Nishikawa *et al.*, 2003).

Estos datos sugieren que la AO genera moléculas necesarias para que se lleve a cabo la senescencia de la célula vegetal. Posiblemente el DHA generado por AO sirva para ablandar la pared celular, algo característico de los tejidos vegetales senescentes. Otra posibilidad es que la AO elimina el AA del apoplasto a fin de que no haya más antioxidante que pueda evitar la explosión oxidativa que activa la cascada de señalización que promueve este tipo de muerte celular programada.

III. JUSTIFICACIÓN

Se ha investigado la participación de la AO en el desarrollo de los tallos de chícharo (de Pinto y De Gara, 2004) y de *Vigna angularis* (Takahama, 1994; Takahama y Oniki, 1994), así como en las raíces de frijol variedad “Flor de Mayo” (Hernández-Mata y Soriano-Bello, 2003). En las tres leguminosas se determinó una función importante de la AO en la expansión celular y en el caso del chícharo, en la diferenciación celular.

En el tallo de *V. angularis* se determinó el efecto que tuvieron diversos factores reguladores del crecimiento vegetal, tanto intrínsecos como extrínsecos, en la actividad de AO. Siendo de sumo interés los resultados que tuvieron la obscuridad y la hormona ABA (que se acumula durante el estrés por sequía), y que se detallan a continuación.

Takahama y Oniki, en 1994, detectaron el aumento de la actividad de AO y el subsecuente aumento de DHA en la pared celular de segmentos de epicotilo de 14 mm de longitud inicial de *V. angularis* incubados por 20 horas en 0.1 mM IAA. Los segmentos control (incubados en agua) presentaron un aumento de 1.12 mm, en cambio, los incubados en IAA alcanzaron una longitud de 18.06 mm, es decir 20 % más longitud que los segmentos control, además de presentar el doble de peso fresco. La actividad de AO aumentó de 0.54 a 0.76 U/mg prot., un 20 % más de actividad, además de un aumento de 23 % en la cantidad de MDA, molécula que estimula la expansión celular. El aumento de DHA se debió a un incremento de tres veces en el volumen de fluido apoplástico y a una disminución del estado redox del ascorbato en ese compartimiento, calculado como: $AA/(AA+DHA)^{-1}$ que fue de 0.13 en los epicotilos control y de 0.07 en los tratados con IAA (Takahama y Oniki, 1994).

La hormona ABA causó un efecto contrario al IAA en los epicotilos de *V. angularis* pues inhibió al 100 % su crecimiento. ABA no afectó el volumen de fluido apoplástico pero si la cantidad total de AA + DHA que se redujo a la mitad, además de que el estado redox del ascorbato se oxidó por completo. Así como no se detectó AA tampoco se detectó MDA (Takahama, 1994). El ácido abscísico, ABA, es una fitohormona que tiene una participación importante en la resistencia a sequía, ya que promueve el crecimiento de las raíces a bajos potenciales hídricos (Spollen *et al.*, 2000), y a la vez inhibe el crecimiento de la parte aérea de la planta.

Es por ello, que los segmentos de epicotilo de *V. angularis*, de 14 mm de longitud, incubados por 20 horas en 0.1 mM ABA, prácticamente no hayan crecido, pues su longitud final fue de 14.6 mm mientras que los segmentos control si crecieron hasta 15.12 mm, casi el doble de longitud que los tratados con ABA. En estos epicotilos no se detectó AA en el apoplasto, ni MDA, sólo la forma más oxidada (Takahama, 1994). Posiblemente, el AA se oxidó a DHA por acción del H_2O_2 y del O_2^- , que son producidos cuantiosamente como parte del efecto de ABA (Jiang y Zhang, 2002).

La obscuridad provocó en los epicotilos de *V. angularis*, un aumento en la longitud, peso fresco y volumen de fluido apoplástico al doble de lo que presentaron los epicotilos expuestos a la luz, así como un aumento de 4 veces de AA + DHA. Los segmentos de 19.5 mm de longitud inicial, al exponerse por 24 horas a la luz, crecieron hasta alcanzar 28.7 mm pero al dejarse en obscuridad ese mismo lapso de tiempo, lograron una longitud de 56.4 mm, es decir, casi el doble de longitud. En cuanto al estado redox del ascorbato, disminuyó un 30 % en los epicotilos en obscuridad, los cuales tuvieron a la par un aumento de 64 % en la concentración de MDA (Takahama, 1994).

Hernández-Mata y Soriano-Bello reportaron los efectos de la auxina ácido naftalén acético, ANA, y del elicitor ácido oligogalacturónico con una polimerización de grado diez, OGA₁₀, sobre el crecimiento de raíces de frijol de cuatro días de edad y sobre la actividad de AO. Al incubar las raíces por 24 horas en 0.01mM ANA se estimuló el crecimiento y la actividad de AO de manera significativa, creciendo las raíces 17 % más que las raíces control, y determinándose una actividad de AO de 4 mM/min/mg prot., que fue mayor en un 14.5 % a la que presentaron las raíces control. En cambio, 0.1 µg/ml OGA₁₀ desencadenó la producción de fitoalexinas, inhibió el crecimiento de la raíz -el 33 % de la longitud- y disminuyó la actividad de la enzima 14.3 %. La combinación de ANA y OGA₁₀ creó un efecto potenciado de lo que ejerció OGA₁₀ por si solo (Hernández-Mata y Soriano-Bello, 2003).

Por lo anteriormente expuesto, tanto en *V. angularis* como en frijol, se observa una correlación positiva entre el crecimiento celular -ya sea ocasionado por auxinas o por obscuridad-, y la actividad de AO. Igualmente se observa que ese crecimiento y esa actividad de AO se abaten ante los tratamientos de estrés con ABA y OGA₁₀. Hasta ahora no se ha estudiado la actividad de la enzima en el crecimiento de los demás órganos de la planta de frijol aparte de la raíz, tampoco se ha estudiado la posible participación de la AO en el proceso de diferenciación de los órganos de la planta, y por último, no se ha visto el efecto que tienen los estreses abióticos en la actividad de AO durante el desarrollo de los órganos del frijol.

IV. HIPÓTESIS

La actividad de la enzima ascorbato oxidasa aumenta durante el crecimiento y diferenciación de los órganos de la planta de frijol.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Analizar la actividad de la enzima ascorbato oxidasa durante el crecimiento y diferenciación de los órganos de la planta de frijol.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar la actividad de la ascorbato oxidasa (AO) durante el crecimiento de hoja, tallo y raíz.
- Determinar la actividad de AO en los distintos órganos diferenciados (hoja, vaina, flor, tallo, cotiledones, raíz).
- Determinar el crecimiento de los órganos utilizando como parámetros el peso seco y la longitud.
- Determinar la actividad de AO en órganos de la planta de frijol sometida a estrés por obscuridad y por sequía.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

6.1.1 Material biológico

Se utilizaron semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) cv. “Flor de Mayo”.

6.1.2 Substancias y reactivos

Acetato de sodio, fluoruro de fenilmetilsulfonilo o PMSF, polivinilpolipirrolidona o PVPP, etanol, citrato de sodio, fosfato de potasio dibásico (J. T. Baker, México), ácido etilén-diamín-tetra-acético o EDTA, ácido ascórbico (Sigma, México), seroalbúmina bovina o BSA, reactivo de Bradford (BIO RAD), peróxido de hidrógeno al 30 %, dietilditiocarbamato o DETC (Sigma, México), fenol, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, nitrato de potasio, sulfato de calcio (J. T. Baker, México), hipoclorito de sodio (Cloralex).

6.1.3 Equipo

Estufa u horno marca Lúmina IHC-36, espectrofotómetro marca BECKMAN DU 530, cámara de incubación marca CRAFT, modelo W1-316.

6.2 Metodología

6.2.1 Cultivo de las plantas

Se seleccionaron las semillas de frijol, se lavaron con detergente Hyclin Plus neutro por 15 min, se desinfectaron con cloro al 6 % durante 15 minutos, se enjuagaron con agua estéril y trabajando entre mecheros, se colocaron en camas de algodón estériles y húmedas. Las camas de algodón consistieron en charolas de plástico de 20 x 30 cm, sobre las cuales se colocó una capa de algodón y sobre ésta una hoja de papel filtro, en medio de la cual se acomodaron hasta 30 semillas por charola, se envolvieron en bolsas de polipapel nuevas y se dejaron germinar a temperatura ambiente por 3 días, al final de los cuales se traspasaron las plántulas más grandes y sanas a vasos de plástico transparente de 1 L de capacidad que fungieron como macetas, conteniendo 100 g de agrolita estéril humedecida con solución nutritiva.

La solución nutritiva se preparó en base a la solución de Hoagland y Snyder modificada por Soriano Richards (Soriano-Richards y Núñez-Palenius, 1986). En un litro de agua destilada estéril se disolvieron 0.118 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.35 g KH_2PO_4 , 1.024 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g KNO_3 , 0.2 g CaSO_4 .

Para mantener la capacidad de campo de las macetas –el volumen de agua que pueden retener en contra de la gravedad-, se mantuvo un contenido constante de 125 ± 25 mL de solución nutritiva en cada maceta durante los dos meses que crecieron las plantas de frijol dentro de la cámara de incubación a 28 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

6.2.2 Determinación del crecimiento de las plantas

Los parámetros de crecimiento que se analizaron fueron el peso seco y la altura de la planta. Estos se determinaron cada cinco días durante los dos meses de crecimiento, excepto durante la primera semana en la que se determinaron a los 2, 3, 5, y 7 días después de la siembra.

A esas edades, se determinó con una cinta métrica la longitud de la raíz, el hipocotilo y la altura total de tres plantas escogidas al azar. Posteriormente, cada órgano por separado –raíz, primer internodo, tallo completo y hojas primarias-, se pesaron en cuanto se cortaron, obteniéndose el peso fresco, se secaron en el horno a 68 ± 3 °C por 24 horas, luego de las cuales se volvieron a pesar las muestras para obtenerse el peso seco. Esto se hizo 3 veces con 3 repeticiones.

6.2.3 Tratamiento de estrés por sequía

Las semillas de frijol se germinaron por tres días en camas de algodón, se traspasaron las plántulas a las macetas con agrolita húmeda, se mantuvieron en la cámara de crecimiento a 28 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. A los diez días después de la siembra se sortearon las plantas que pertenecerían al lote de plantas estresadas, las cuales se dejaron de regar desde los diez hasta los veinte días. Durante ese lapso, se fueron cosechando plantas control y plantas en sequía los días 12, 15 y 20 para analizar la actividad de la enzima. Se cosecharon plantas los días 10, 15 y 20 para determinar el crecimiento en base a peso seco y altura, además de determinar el contenido de agua en raíz, tallo y hojas primarias, así como de la agrolita, utilizando la fórmula dada por Cárdenas-Navarro *et al.*, 1998 y 1999:

$$CA = (PF - PS)/PS$$

En donde:

CA = Contenido de agua

PF = Peso Fresco

PS = Peso Seco

Este tratamiento se realizó dos veces con cuatro repeticiones.

6.2.4 Tratamiento de oscuridad

Se germinaron semillas de frijol “Flor de Mayo” en camas de algodón por tres días, las plántulas que pertenecieron al lote sometido a oscuridad se traspasaron a las macetas con agrolita en oscuridad y se colocaron bajo una mesa cubierta con plástico negro en la que se verificó que no se infiltrara ningún rayo de luz, las plantas control se traspasaron a la agrolita y se colocaron sobre la mesa en presencia de luz, con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, a temperatura ambiente de 28 ± 3 °C. La cantidad de solución nutritiva que se añadió a ambos lotes desde un principio fue la suficiente para que crecieran por siete días, luego de los cuales se cosecharon las plantas.

Por un lado se cortaron los hipocotilos de cuatro plantas, de cada hipocotilo se pesaron y congelaron en nitrógeno líquido 0.5 g que se envolvieron en papel aluminio a fin de que no les diera la luz hasta que se determinara la actividad de AO.

Por otro lado, se determinó el crecimiento de los hipocotilos de las plantas de ambos lotes tomando los parámetros de peso seco y altura, además de que se fotografiaron las plantas para constatar las diferencias entre las plantas estresadas y las control. Este tratamiento se efectuó dos veces con cuatro repeticiones para la determinación de la actividad específica de la enzima y con tres repeticiones para la determinación del peso seco.

6.2.5 Extracción de la ascorbato oxidasa

Las técnicas de extracción de la enzima AO y de la medición de su actividad se basaron en las utilizadas por Diallinas *et al.*, 1997, y modificadas por García-Pineda *et al.*, 2004, consistiendo en los siguientes procedimientos:

De cada órgano se pesaron 0.5 g, que inmediatamente se molieron en un mortero frío con un buffer de extracción que contenía 600 μ L acetato de sodio 0.1 M a pH 5.6, 300 μ L PMSF 0.5 mM, y 1.5 % PVPP (w/v). Una vez que se homogenizaron los tejidos, se vaciaron a tubos eppendorf fríos de 1.5 mL, se centrifugaron a 15,000 g x 15 minutos a temperatura ambiente. La

enzima AO quedó suspendida en el sobrenadante. La AO se extrajo de todos los órganos en 3 ocasiones por separado con 3 repeticiones cada una a lo largo del desarrollo de las plantas.

6.2.6 Medición de la actividad de la ascorbato oxidasa

La medición de la actividad se hizo espectrofotométricamente, basada en el hecho de que el ascorbato absorbe a 265 nm, mientras que no lo hace el dehidroascorbato; de manera que se obtiene una cinética de extinción del sustrato a lo largo del tiempo de reacción.

Luego de que se centrifugaron los tubos eppendorf que contenían los extractos de cada órgano, se tomaron 20 µL de sobrenadante y se adicionaron a la mezcla de reacción preparada previamente en una celda de cuarzo de 1 mL, que constaba de 30 µL solución de ácido ascórbico, 15 µL solución de BSA y 930 µL solución amortiguadora.

La solución de ácido ascórbico constaba de EDTA al 1 % y ácido ascórbico al 0.05 % a pH 7.0, la solución de BSA era al 1 % y la solución amortiguadora contenía fosfato de potasio 0.05 M y citrato de sodio 0.025 M con un pH 5.6. Bajo esas condiciones de reacción, se dejó actuar la enzima durante 3 minutos, registrándose la disminución en la absorbencia a cada minuto.

La fórmula empleada para obtener la actividad específica de la enzima AO fue la siguiente:

$$AE = \Delta A(V/v) / \epsilon l \Delta t [\text{proteína}]$$

Donde:

AE = Actividad Específica, en moles de ascorbato/(minuto . mg proteína).

ΔA = Absorbencia al tiempo cero minutos menos absorbencia a los tres minutos.

V/v = Volumen de reacción/volumen extracto celular = 50.

ϵ = Coeficiente de extinción del ascorbato = $9,246 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

l = Longitud de la celda, 1 cm.

Δt = Tiempo máximo menos tiempo mínimo, tres minutos.

[proteína] = Concentración de proteína, µg proteína/mL.

La actividad específica de AO se expresa en U/mg proteína, siendo U una unidad de trabajo equivalente a $\mu\text{moles L-ascorbato}(\text{min})^{-1}$.

6.2.6.1 Inhibición de la actividad de la ascorbato oxidasa

La mezcla de reacción para determinar la actividad de la enzima AO fue modificada en su cantidad de amortiguador a fin de que pudiese ser adicionada con diferentes cantidades de inhibidores. Además, la concentración de AA empleada en la mezcla de reacción era muy pequeña, 100 μM , óptima para la actividad de AO.

Se probaron concentraciones de H_2O_2 de 0.056, 0.56 y 5.6 mM (Stark y Dawson, 1963). Fenol 0.6, 6, 12, y 60 mM (Gaspard *et al.*, 1997). DETC 0.1, 1, 2, y 10 mM (Hallaway *et al.*, 1970). Se añadieron 20 μL de extracto de raíz de 3 días de edad y se leyó en el espectrofotómetro la extinción del sustrato a 265 nm, por tres minutos. Esto se hizo por triplicado.

6.2.7 Determinación de la concentración de proteína

De los sobrenadantes se tomaron 10 μL y se adicionaron a tubos eppendorf teniendo 790 μL agua, se agitaron en vórtex, se les adicionaron 200 μL del reactivo de Bradford, se agitaron nuevamente y se vaciaron en celdas de plástico, se leyó la absorbencia en el espectrofotómetro a 595 nm. El blanco consistió en 800 μL agua y 200 μL reactivo de Bradford, (Bradford, 1976)

6.2.7.1 Curva estándar de proteína

Se graficó una curva estándar de proteína que permite traducir los valores de absorbencia a 595 nm a valores de concentración de proteína en $\mu\text{g/mL}$. Para ello se hicieron diluciones de una solución stock de seroalbúmina bovina de 1 mg/mL a 2, 5, 10 y 15 $\mu\text{g BSA/mL}$. Se hicieron cuatro repeticiones. La figura correspondiente, **Figura 9**, aparece en el apéndice.

VII. RESULTADOS

7.1 Inhibición de la ascorbato oxidasa en raíz de frijol

Se probaron tres inhibidores específicos de AO: el Fenol que es un inhibidor competitivo del AA, el Dietilditiocarbamato (DETC) que es un agente quelante de cobre en las enzimas que lo poseen, y el H_2O_2 . Diferentes concentraciones de estos inhibidores se añadieron a la mezcla de reacción, la cual por último era adicionada con el sobrenadante del extracto crudo de raíz de frijol de 4 días de edad.

En base a la referencia de Gaspard *et al.*, 1997, se probaron las concentraciones de Fenol de 0.6, 6, 12 y 60 mM, pero a partir de 12 mM las lecturas en el espectrofotómetro ya no eran confiables pues, como se comprobó en la mezcla de reacción sin sobrenadante, el Fenol absorbía luz a los 265 nm. A la concentración de 6 mM de Fenol se obtuvo una inhibición de 63 %. **Cuadro 4.**

El DETC, entre 0.1 y 2 mM, inhibió en un 50 % a la AO de frijol, y logró inhibir en un 88 % a la enzima a la concentración de 10 mM, sin embargo, a esta última concentración no era confiable la lectura pues el DETC comenzaba a absorber luz.

Por último, el H_2O_2 logró inhibir a la AO entre un 60 y 70 % a las concentraciones de 0.056 mM y 5.6 mM, como se puede ver en el **Cuadro 4.**

Estos resultados sugieren que los extractos crudos de frijol, contienen una enzima que utiliza el AA como sustrato, posee cobre en su estructura y se inhibe ante la oxidación del H_2O_2 . Todas estas características se han descrito en la AO.

Inhibidor	AE (U/mg proteína)	Porcentaje de Inhibición
Fenol		
0	23.16 ± 2.7	
0.6 mM	15.27 ± 6.3	34 %
6 mM	8.60 ± 1.0	63 %
DETC		
0	27.38 ± 2.17	
0.1 mM	13.71 ± 3.14	46 %
1 mM	14.91 ± 0.4	46 %
2 mM	12.83 ± 2.64	53 %
H₂O₂		
0	41.6 ± 7.7	
0.056 mM	14.5 ± 4.8	59 %
0.56 mM	15.9 ± 2.5	61 %
5.6 mM	10 ± 2.2	76 %

Cuadro 4. Inhibición de la ascorbato oxidasa. AE, Actividad específica; U, 1 μ mol L-ascorbato/min; DETC, Dietilditiocarbamato.

Durante la lectura en el espectrofotómetro, que fue de 3 minutos, no ocurrió una auto oxidación del AA, ya que, como se puede observar en la **Figura 10**, la absorbencia que tuvo esta molécula a 265 nm permaneció constante.

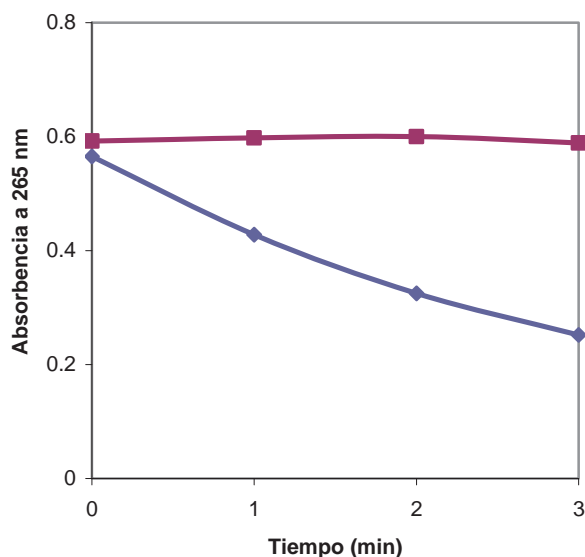


Figura 10. Auto oxidación del L-ascorbato.

Mezcla de reacción, línea roja; mezcla de reacción adicionada con 1 U AO comercial purificada de calabacita, línea azul.

Luego de probar que la actividad de la enzima AO estaba presente de manera mayoritaria en los extractos crudos de raíz de frijol de 4 días de edad, se prosiguió a medir su actividad específica en todos los órganos del frijol a lo largo de su desarrollo.

7.2 La ascorbato oxidasa en el desarrollo de los órganos del frijol

7.2.1 Actividad de la ascorbato oxidasa durante el crecimiento

Durante los dos meses de desarrollo de la planta de frijol se fueron manifestando diferentes etapas fenológicas. Con la finalidad de analizar el comportamiento de la actividad de AO durante el desarrollo de la planta de frijol, se determinó la actividad específica de AO en las hojas primarias, en el primer internodo del tallo y en la raíz. En el **Cuadro 5** se muestra el promedio de actividad que hubo durante cada etapa fenológica, así como el promedio que hubo en aumento de biomasa como parámetro de crecimiento. Se observa que durante el desarrollo, la actividad de la enzima permaneció constante en los tres órganos.

Órgano	Germinación		Crecimiento		Floración		Llenado de	
	3 - 7 Días		Vegetativo		40 - 45		Grano	
	AE	PS	AE	PS	AE	PS	AE	PS
Hoja	29.51	22.74±	32.76	86.31	47.31	102.96	36.10	120.72
Primaria	± 6.22	24.17	± 6.1	± 11.0	± 6.5	± 15.5	± 9.1	± 23.7
Hipocotilo	43.45±	39.62±	41.44	57.86	39.90	75.83	37.18	77.93 ±
	10.95	18.31	± 4.8	± 8.1	± 7.7	± 7.3	± 9.2	23.7
Raíz	37.22	35.46±	39.68	180.20	37.71	347.36	24.61	296.22
	± 7.30	27.41	± 6.9	± 78.7	± 5.5	± 57.8	± 8.2	± 64.5

Cuadro 5. Actividad de la ascorbato oxidasa durante el crecimiento de las hojas primarias, hipocotilo y raíz. Actividad específica de AO, AE (U/mg prot.); Peso seco, PS (mg).

El crecimiento también fue medido en términos de aumento en longitud para el primer internodo del tallo y la raíz. En la **Figura 11, paneles A y B**, se puede observar que el hipocotilo deja de alargarse a los 7 días de edad, sin embargo, continua aumentando su biomasa a los 35 días de edad, es decir, el crecimiento se está dando en el grosor de ese internodo. La actividad de AO tuvo un aumento altamente significativo justo a los 7 días de edad, lo que coincide con la etapa en la que culmina el alargamiento del tallo.

En la **Figura 11, paneles C y D**, se observa que la raíz presenta un crecimiento continuo hasta los 40 días después de la siembra, luego de los cuales la longitud permanece constante y el peso seco se va perdiendo. Esto debido, tal vez, a la colonización de todo el volumen de la maceta y a una mayor movilización de la biomasa almacenada.

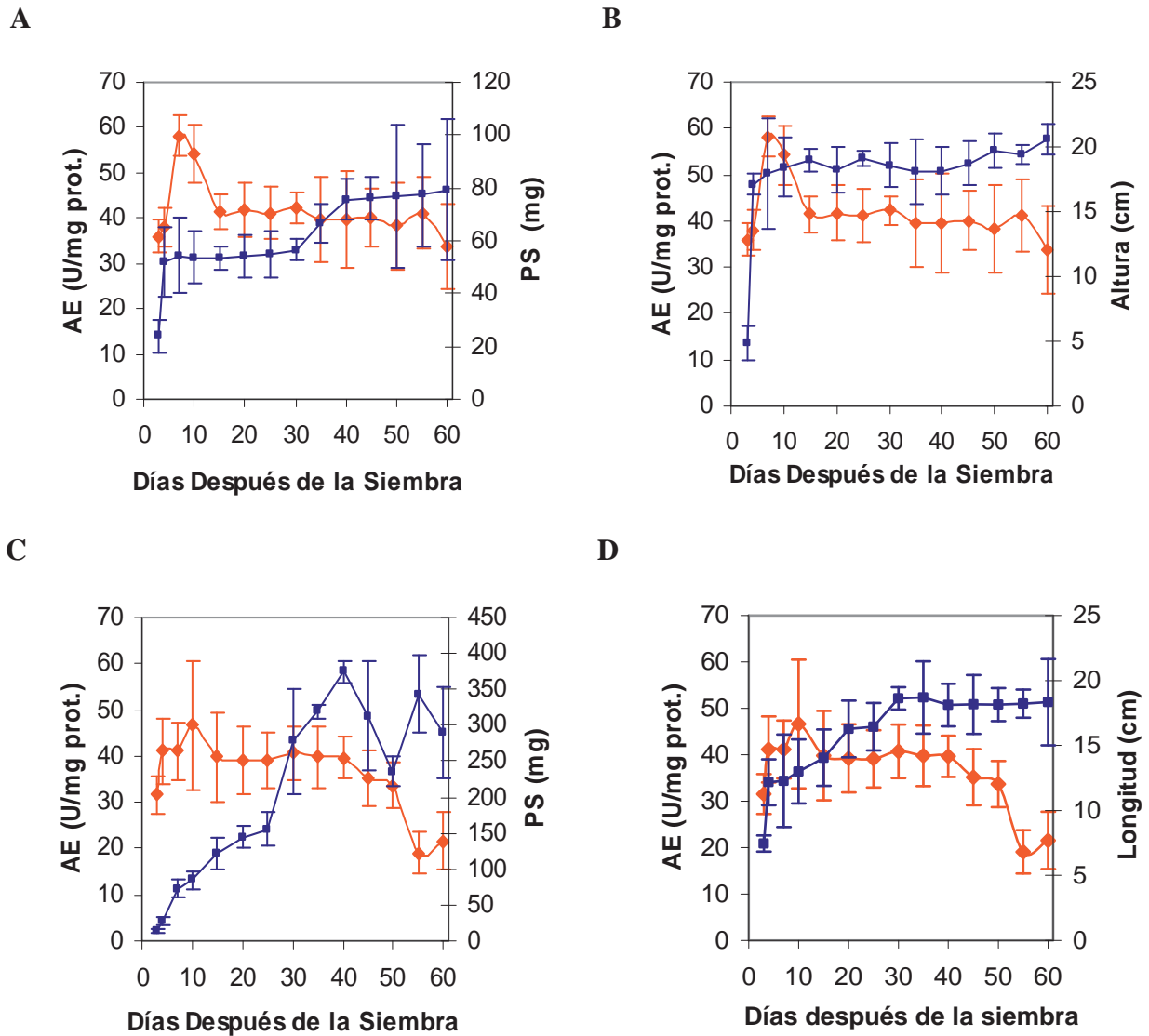


Figura 11. Actividad de la ascorbato oxidasa durante el crecimiento en longitud del hipocotilo y la raíz. Paneles A y B, hipocotilo. Paneles C y D, raíz. Líneas anaranjadas representan la Actividad Específica de AO, AE. Líneas azules representan el crecimiento en longitud, o en peso seco, PS. AE, actividad específica de AO.

Tomando en cuenta sólo los primeros 10 días de desarrollo de las hojas primarias, el primer internodo del tallo y la raíz, se puede apreciar en la **Figura 12**, que existe una correlación positiva entre el crecimiento y la actividad de AO hasta los 7 días después de la siembra, para luego perderse debido a que se mantiene constante la actividad de AO como se mostró en las figuras anteriores.

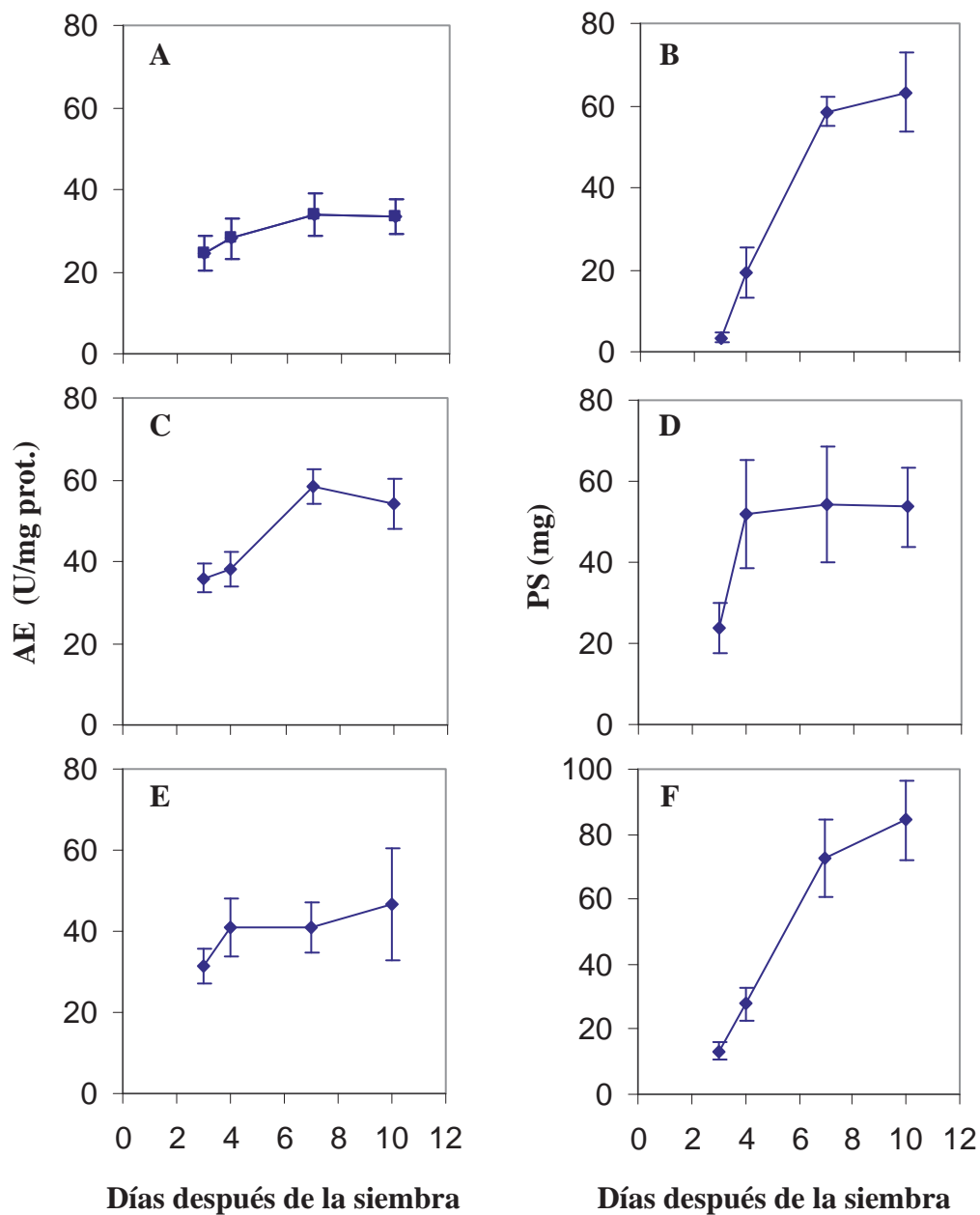


Figura 12. Actividad de la ascorbato oxidasa durante los primeros días de crecimiento de las hojas primarias, hipocotilo y raíz. Paneles A, C, E: AE, actividad específica de AO (μ moles L-ascorbato/min/mg proteína); Paneles B, D, F: PS, peso seco (mg). Paneles A y B corresponden a las hojas primarias; Paneles C y D al hipocotilo; Paneles E y F a la raíz.

En el **Cuadro 6** se muestra la actividad de AO en otros órganos de la planta de frijol, que únicamente aparecen en alguna etapa fenológica. Por ejemplo, la actividad de AO en los cotiledones se midió a los 3 días después de la siembra (dds), momento en que eran de vital importancia para el crecimiento de las plántulas. Las primeras hojas trifoliadas emergieron aproximadamente a los 9 dds, pero la actividad que se muestra es de las hojas trifoliadas maduras a los 35 dds. De los 40 a los 60 dds, los órganos reproductivos presentaron una alta actividad de AO.

Órgano	AE (U/mg proteína)
Hoja Trifoliada	18.15 ± 3.93
Cotiledón	17.61 ± 1.79
Flor	32.47 ± 7.03
Vaina	52.83 ± 9.80

Cuadro 6. Actividad de la ascorbato oxidasa en órganos presentes en alguna etapa fenológica.

Se tomaron las primeras hojas trifoliadas, las cuales ya estaban completamente expandidas a los 35 días después de la siembra (dds), los cotiledones se tomaron a los 3 dds, las flores se fueron cosechando de los 40 a los 60 dds, siempre se cortaron a los dos días de brotar y las vainas -a su vez- cuando tenían un peso aproximado de 0.5 g.

De estos resultados se concluye que la AO es ubicua en la planta de frijol, pero que existen órganos y etapas en los cuales es mayor su actividad: en la elongación del hipocotilo y raíz al final de la germinación, así como en la expansión de los frutos.

7.2.2 Actividad de la ascorbato oxidasa en la diferenciación

Haciendo una comparación de la actividad de AO presente en zonas de un mismo órgano pero con diferente grado de desarrollo, se muestra en el **Cuadro 7**, que la actividad es mayor en los órganos ya maduros que cuando están en las primeras fases de desarrollo.

Órgano	AE (U/mg proteína)
Retoño de Hoja Trifoliada	5.08 ± 1.17
Hoja Trifoliada Madura	18.15 ± 3.93
Último segmento del tallo	21.01 ± 3.27
Primer segmento del tallo	41.04 ± 7.82

Cuadro 7. Actividad de la ascorbato oxidasa en zonas del mismo órgano con diferente grado de desarrollo. Los órganos se tomaron de plantas de 35 días de edad.

A los 35 dds, el primer segmento del tallo presentó un aumento en su peso seco (**Panel A, Figura 11**), a la vez que su longitud no cambió (**Panel B, Figura 11**), es decir, el tallo se engrosó, implicando posiblemente un reforzamiento de las paredes celulares, una lignificación. En el extremo opuesto, el último segmento del tallo abarcó el meristemo apical del brote, en donde ocurre una alta actividad mitótica.

De entre estas dos zonas del tallo, la actividad de AO es mayor en la parte más diferenciada (**Cuadro 7**), que se caracterizó por el proceso diferenciativo de la pared celular, esto es, la lignificación de las células.

Los resultados anteriores sugieren que la AO desempeña un papel importante en el proceso diferenciativo, como lo demostraron de Pinto y De Gara, en el 2004.

7.3 Actividad de la ascorbato oxidasa de plantas crecidas en obscuridad

Para corroborar la participación de la AO en la expansión celular, se obtuvieron plantas etioladas de 7 días de edad, esto con la finalidad de provocar un crecimiento activo del hipocotilo dado únicamente por expansión celular (Takahama, 1994). La expansión siempre ocurre en un solo eje de la célula, por lo que también podría llamarse elongación celular, y de ella depende la elongación del órgano. En la **Figura 13** se aprecia la mayor longitud del tallo etiolado en comparación con el tallo de plantas crecidas en luz.



Figura 13. Fenotipo de las plantas que crecieron en presencia de luz (fotomorfogénesis) o en obscuridad (skotomorfogénesis) hasta los siete días de edad.

La diferencia en longitudes, se presenta en la **Figura 14**. Estos datos de crecimiento se complementan con los mostrados en el **Cuadro 8**, en el que se puede observar que hubo un aumento del 40 % en biomasa y un 20 % en el contenido de agua de los hipocotilos etiolados comparados con los hipocotilos control.

En la **Figura 14** también se muestra la actividad de AO en ambos hipocotilos, se ve que existen diferencias entre la actividad de AO de tallos en obscuridad en relación a la actividad de los tallos en luz, pues fue mayor del 60 % en los tallos etiolados.

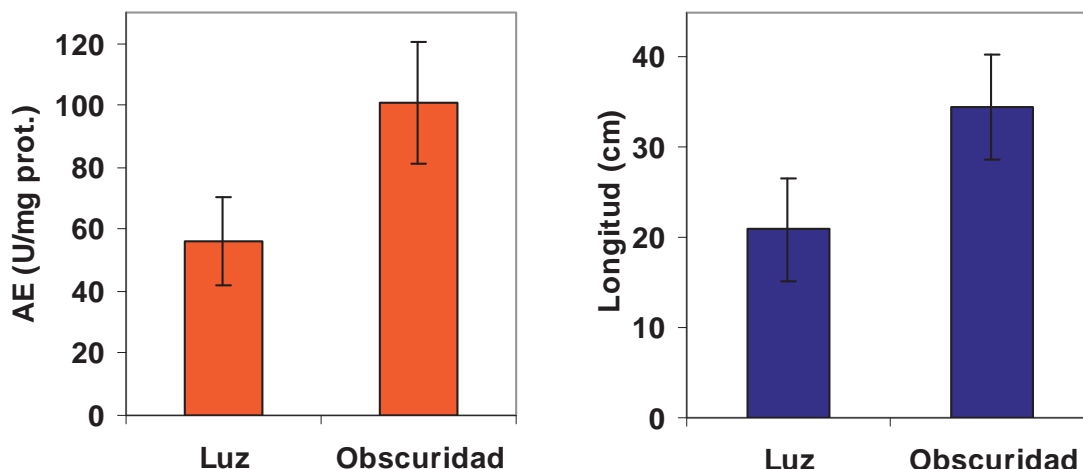


Figura 14. Actividad de la ascorbato oxidasa en hipocotilo de plantas etioladas de 7 días de edad.

Desde su germinación hasta los 7 días después de la siembra (dds), las plantas de frijol se sometieron a un crecimiento continuo en luz o en oscuridad, entonces, se midió la longitud de sus hipocotilos, se determinó su peso seco y contenido de agua, además de medir la actividad específica de AO de la manera como se menciona en Materiales y Métodos.

Hipocotilo	Peso Seco (mg)	CA (g agua/g PS)
En luz	63.16 ± 9.45	14.68 ± 1.70
En oscuridad	107.18 ± 23.00	18.61 ± 1.67

Cuadro 8. Peso seco y contenido de agua (CA) de las plantas etioladas.

De estos resultados se concluye que la AO juega un papel sumamente importante en la expansión celular, ya que existe una correlación positiva entre el crecimiento de los hipocotilos y el aumento de la actividad de AO.

7.4 Efecto del estrés por sequía en la actividad de la ascorbato oxidasa

Debido a que los cultivos del frijol presentan cuantiosas pérdidas cada año ocasionadas por la sequía (Rosales-Serna *et al.*, 2000), se procedió a conocer la participación de AO en el crecimiento de las plantas sometidas a esta condición estresante.

Para ello, se dejaron de regar las plantas de los 10 a los 20 días después de la siembra (dds), lo que ocurrió durante el crecimiento vegetativo. Al inicio del tratamiento de estrés por sequía, todas las plantas ya contaban con la primer hoja trifoliada, pero sólo las plantas control continuaron formando más módulos o fitómeros, como se puede ver en la **Figura 15**.

El primer módulo alcanzó la misma longitud tanto en las plantas control como en las plantas en sequía, 24.88 ± 2.10 y 23.43 ± 1.39 cm, respectivamente. En cambio, la altura total a los 20 dds reveló el detrimento que sufrió el crecimiento acontecido durante la sequía, siendo de 82.00 ± 6.80 y de 74.17 ± 7.6 cm, en las plantas control y en las plantas en sequía, respectivamente.

En las plantas control se mantuvo constante el contenido de agua (CA) en la agrolita, mientras que en las plantas en sequía, el CA disminuyó drásticamente, como se puede ver en la **Figura 16, panel A**. En las plantas también se determinó el CA, el cual disminuyó conforme fue aumentando la biomasa en las plantas control, aunque el cambio no fue significativo como fue el caso de las plantas en sequía, según se aprecia en la **Figura 16, panel B**.

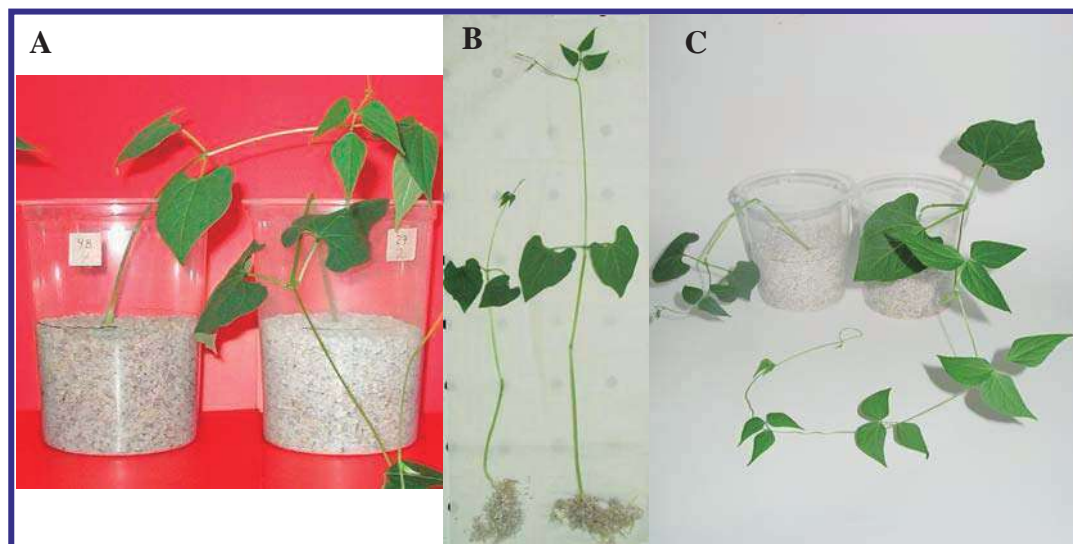


Figura 15. Crecimiento de las plantas sometidas a sequía denotada por la aridez de la agrolita. A) Agrolita de las plantas control a la izquierda y de las plantas en sequía a la derecha. B) Crecimiento de las plantas en sequía y plantas control a los 15 días después de la siembra (dds). C) Aspecto de las plantas en sequía y plantas control a los 25 dds, luego de sufrir 15 días de falta de riego.

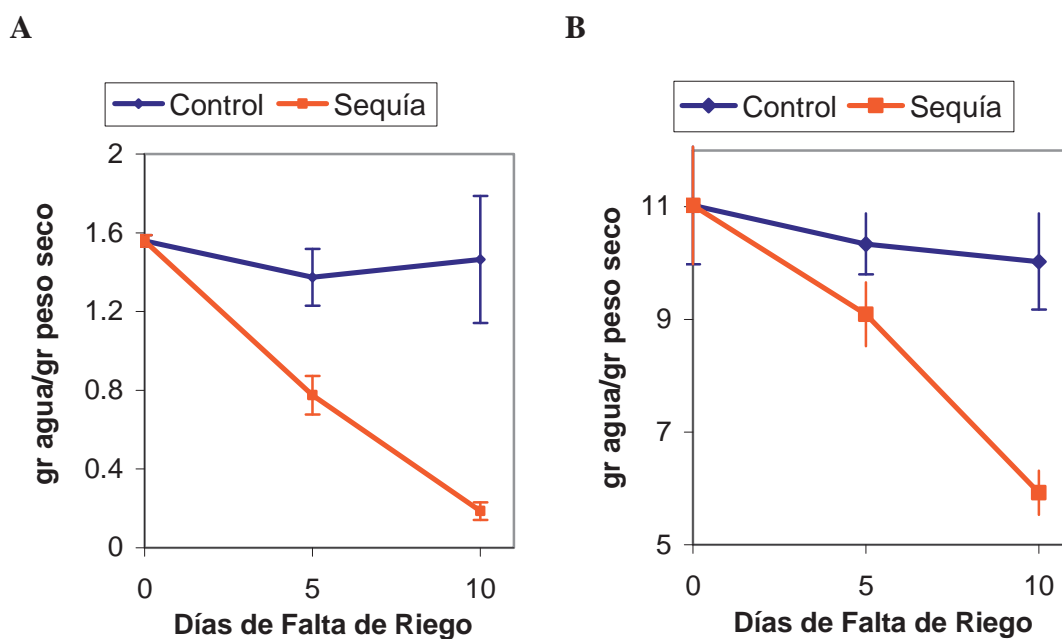


Figura 16. Contenido de agua en A) la agrolita y en B) la planta completa a lo largo del tratamiento de estrés por sequía. El CA es un indicador del estado hídrico, por lo que es útil para determinar el déficit de agua, para calcularlo empleando la fórmula dada en Materiales y Métodos, se determinó el peso fresco y el peso seco de la agrolita y de la planta, al comienzo (10 dds, 0 días de falta de riego o dfr), a la mitad (15 dds, 5 dfr) y al final del periodo (20 dds, 10 dfr) en el que se sometieron las plantas a falta de riego con solución nutritiva.

Un indicador utilizado para determinar el cambio de la biomasa durante el crecimiento en sequía, es el índice raíz/parte aérea (RPA), que sirve para cuantificar la repartición de peso seco entre la parte verde de la planta y la raíz (Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2003). En las plantas de 15 días de edad, el RPA fue de 0.72 ± 0.05 en las plantas control y de 0.70 ± 0.11 en las plantas en sequía. Es decir, a los 5 días de falta de riego (dfr), el RPA fue el mismo. En cambio, a los 20 dds y 10 dfr, el RPA cambió por completo. En las plantas control fue de 0.55 ± 0.11 y en las plantas en sequía fue de 0.85 ± 0.10 , lo cual significa que la biomasa se acumuló de manera altamente significativa en las raíces de las plantas sometidas a sequía, esto es, crecieron más las raíces en vez de la parte aérea.

Del resultado anterior se concluye que el crecimiento de cada órgano se ve afectado de manera diferente por un factor estresante, en este caso por la sequía. Para ver la participación de AO en el crecimiento de los órganos del frijol en sequía, en la **Figura 17** se presentan los tres aspectos involucrados: la actividad de AO (AE), el déficit de agua (CA) y el crecimiento dado en peso seco (PS) de las hojas primarias, primer internodo del tallo y la raíz.

La AE se determinó a partir de los 2 dfr, aunque el CA y el PS se midieron desde el comienzo del tratamiento de estrés por sequía. A los 2 dfr se encontró que la AE en hojas primarias era la misma, pero luego disminuyó drásticamente en las hojas de plantas en sequía. En el caso del primer internodo del tallo, la AE no se vio afectada a lo largo de la falta de riego. Lo cual, no fue el caso de la raíz, que a los 2 y 5 dfr presentaba un aumento altamente significativo en la AE de las raíces de plantas en sequía, para luego caer por debajo del control.

El CA tendió a subir en las hojas control y a decaer en las hojas en sequía a partir de los 5 dfr. En el tallo control el CA tendió a disminuir y en el tallo en sequía a los 10 dfr esta disminución se acentuó. La raíz control mantuvo su CA constante, en cambio, la raíz en sequía perdió agua significativamente desde los 5 dfr.

El PS fue el mismo en hojas y tallo debido a que estos órganos dejan de crecer desde los 7 dds. Por el contrario, la raíz continúa colonizando la agrolita como se muestra en la **Figura 17**. Las raíces en sequía crecieron inclusive más que las raíces control a los 10 dfr.

Integrando los datos, resulta que la actividad de AO en hojas primarias disminuye al haber un déficit de agua. El primer internodo del tallo no es afectado en su CA por lo que la actividad de AO permanece constante. Contrario a lo que ocurre con la parte aérea, el crecimiento de la raíz responde al revés, pues incluso crece más. Y es en este órgano donde se presenta un comportamiento completamente anormal en la actividad de AO durante la sequía, siendo mayor al inicio del tratamiento de estrés por sequía y abatiéndose al final del tratamiento.

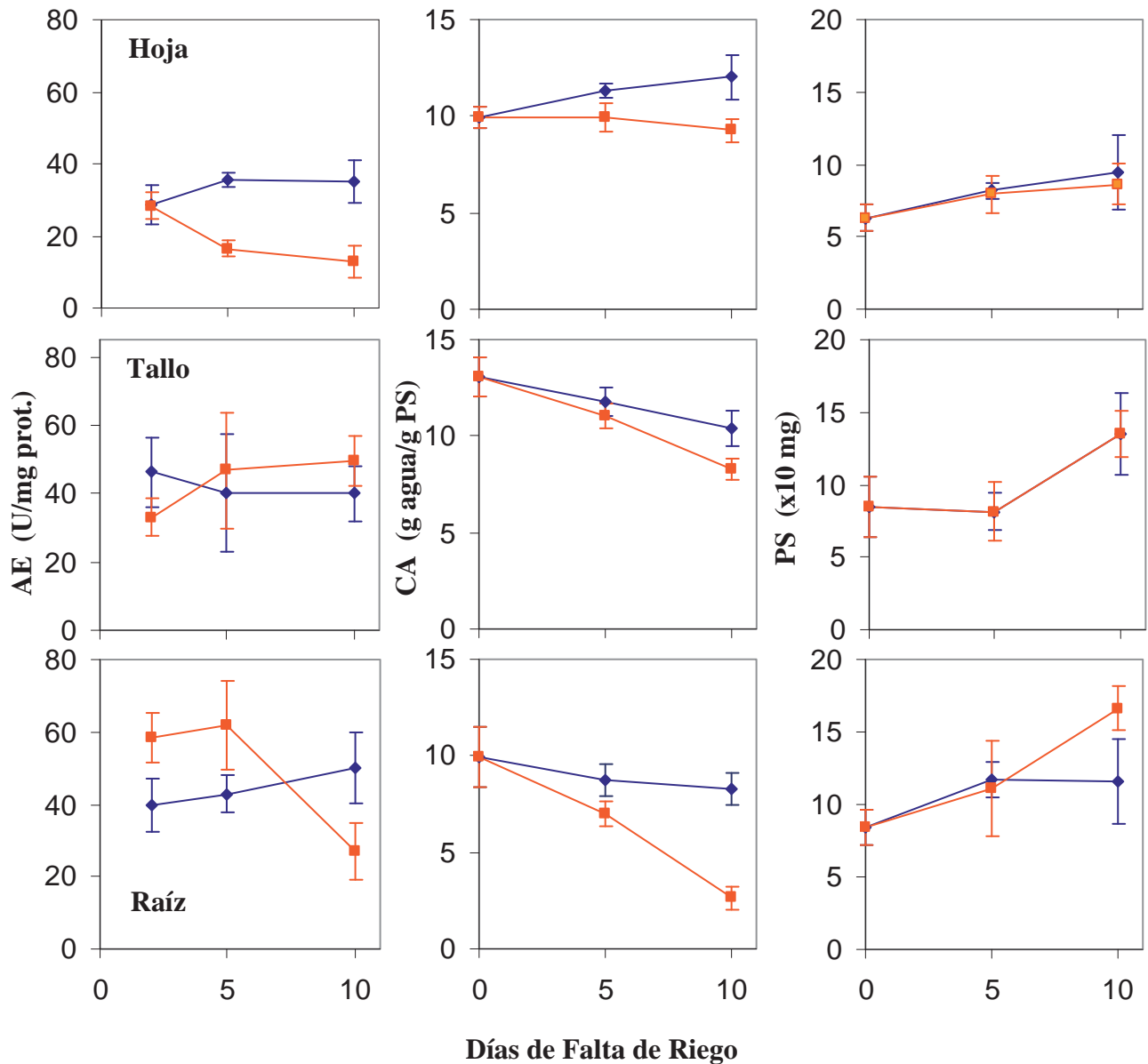


Figura 17. Actividad de la ascorbato oxidasa durante el crecimiento en condiciones de sequía. Las hojas son las primarias, del tallo se tomó en cuenta sólo el primer internodo. AE, actividad específica (μ moles L-Ascorbato/min/mg proteína); CA, contenido de agua (g agua/g peso seco); PS, peso seco (x10 mg). Las líneas azules denotan el comportamiento de los parámetros en las plantas control y las líneas anaranjadas de las plantas en sequía.

VIII. DISCUSIÓN

La AO es una enzima a la que se le han atribuido diversas funciones en base a evidencias experimentales, desde la regulación del estado redox en el apoplasto (Pignocchi y Foyer, 2003), la expansión celular ocasionada por la vacuolización (González-Reyes *et al.*, 1994), el metabolismo de la pared secundaria en la diferenciación celular (de Pinto y De Gara, 2004), y la manutención de la quiescencia de las células del centro quiescente en el meristemo apical de la raíz (Kerk y Feldman, 1995). Todo lo cual indica que la AO modula procesos fisiológicos sumamente variados, como son: la regulación de la señalización redox en el apoplasto -que desencadena respuestas de defensa o de crecimiento-, el alargamiento de los tallos y la expansión de los frutos, la maduración de las hojas y tallos, así como la organización de los tejidos de la raíz.

Posiblemente esta versatilidad en su papel fisiológico se deba a la localización estratégica de AO en las células (de Pinto y De Gara, 2004), y a mayor escala, en los tejidos (Chichiricco *et al.*, 1989); a que utiliza el AA como sustrato -una molécula antioxidante cuyo estado redox sirve de señal y que es un metabolito indispensable como sustrato y coenzima-. Además de que AO es regulada por diversas fitohormonas tales como la auxina y el ácido salicílico (Pignocchi y Foyer, 2003).

Siendo tan notoria su importancia en el desarrollo de las plantas, en el frijol -un cultivo de importancia agronómica-, se estudió la participación de AO en su desarrollo, tanto en condiciones normales como en estrés, utilizando las raíces de plántulas de frijol de 4 días de edad (Hernández-Mata y Soriano Bello, 2003). La AO presenta diferentes niveles de actividad en los diferentes órganos (Lin y Varner, 1991; García-Pineda *et al.*, 2004), por lo que en este trabajo se realizó un análisis de la actividad espacio temporal a lo largo del desarrollo de los órganos de la planta de frijol, tanto en condiciones normales como en estrés. Para cumplir con este objetivo, se empleó el método espectrofotométrico reportado por García-Pineda *et al.* (2004) modificado de Diallinas *et al.* (1997).

Lo primero que se hizo al establecer este método, fue asegurarse de que la disminución en la absorbencia a 265 nm ocurriese debido a la oxidación del AA por parte de AO y que no ocurriera por auto oxidación en el tiempo de lectura (**Figura 10**). Luego se obtuvieron macerados de raíces de 4 días después de la siembra (dds), y se probaron tres inhibidores específicos de AO en los extractos crudos, pues el método implicaba la molienda de todo el tejido vegetal, en el que se encuentran varias enzimas que utilizan el AA como sustrato (**Cuadro 4**). El fenol, para el cual se reporta una K_i de 6 mM (Gaspard *et al.*, 1997), inhibió la oxidación del AA en un 63 %, lo cual significaba que la mayor parte de la actividad era de la AO. Esto se puede asegurar porque la AO oxida otros compuestos poco relacionados con el AA, entre ellos está un pequeño grupo de hidroquinonas sustituidas, algunos compuestos catecol y N,N,-dimetil-*p*-diaminobenceno, lo cual llevó a la propuesta de que la AO podría estar involucrada en el proceso de maduración de los frutos (Gaspard *et al.*, 1997; Casella *et al.*, 1999). También se ha determinado que la AO descarboxila oxidativamente al ácido indol-3-acético (IAA) en el centro quiescente de raíz de maíz (Kerk y Feldman, 2000).

El fenol tiene dos modos de unión a la AO. En el primero de ellos, el fenol se une al canal de acceso del cobre tipo 1, previniendo que el sustrato se aproxime a su sitio de unión. En el segundo, el fenol interactúa con residuos proteicos responsables del reconocimiento del sustrato y su interacción en el sitio activo. En particular, el fenol se une mediante puentes de hidrógeno al ligando del cobre tipo 1, el grupo N_3-H de la His-512, tal como lo hace el AA (Casella *et al.*, 1999).

El DETC es un quelante de cobre en enzimas que lo poseen, inhibiendo su actividad en un 50 % comúnmente. Por ejemplo, la amina oxidasa de suero de bovino se inhibió en un 50 % con la presencia de 1 mM DETC (Morpurgo *et al.*, 1987), la guanilato ciclasa de pulmón de rata se inhibió en un 42 % con la adición de 0.1 mM DETC (White *et al.*, 1976). Stark y Dawson, en 1963, reportan que la AO purificada de *Cucurbita pepo* condensata se inhibió en un 50 % con 0.1 μ M DETC. En preparación de pared celular de hoja de *Brassica oleracea*, se obtuvo una inhibición del 60 % con 1 mM DETC. En el extracto crudo de raíces de frijol de 4 dds (**Cuadro 4**), se obtuvo un 46 % de inhibición a esa misma concentración de DETC, esto debido a que no se separaron los componentes de la célula, pero este porcentaje es suficiente para indicar que la enzima que realiza la oxidación del AA contiene cobre en su estructura.

En la base de datos *brenda.uni-koeln.de* y en *expasy.org*, aparece el H_2O_2 como inhibidor específico de la AO del hongo *Myrothecium verrucaria*, a una concentración de 5.6 mM, y como estimulador a una concentración de 0.056 mM. En el caso de las plantas, no existe esta estimulación y en cambio al rededor de esa concentración comienza a inhibir a la AO de *Cucurbita pepo* condensa (Stark y Dawson, 1963), más aún, se puede proteger de la inactivación a la AO con la adición de peroxidasa y catalasa. El hecho de que tanto la AO de hongo –que contiene un grupo hemo-, como de planta –que tiene un centro trinuclear de cobre-, se inhiban con el H_2O_2 , se debe a que esta molécula no sólo reacciona con los grupos heteroproteicos, sino con los aminoácidos que responden a los cambios redox, e incluso, elimina en parte el sustrato, el AA. En el extracto crudo de raíz de frijol (**Cuadro 4**), el H_2O_2 logró inhibir en un 60-70 % a la AO presente, que sin duda lo era pues todo indicaba que la enzima tenía cobre en su estructura y utilizaba el AA y compuestos fenólicos como sustratos.

Luego de constatar que los métodos de extracción y medición de AO funcionaban eficazmente en los extractos de raíz de frijol, se procedió a medir la actividad específica de AO en los extractos de todos los órganos a lo largo del desarrollo de la planta de frijol.

Durante la primer etapa fenológica, la germinación, existe una correlación positiva entre el crecimiento y la actividad de AO en hojas primarias, hipocotilo y raíz (**Figura 12**), luego la actividad permanece constante hasta el final (**Cuadro 5; Figura 11**), existiendo periodos en los que ocurren cambios notorios específicos, como es el caso de la hoja primaria en la etapa de floración y de la raíz los últimos cinco días. Durante la germinación ocurre un crecimiento dado casi en su totalidad por expansión celular, en el caso de las hojas primarias de frijol, la división celular se completa cuando la hoja ha alcanzado un poco menos de la 1/5 parte de su área final, de manera que el 80 % restante de la expansión de la hoja es ocasionado únicamente por el crecimiento de las células preformadas. Este crecimiento ocurre en toda el área de la hoja, pero no uniformemente. Lo mismo es cierto para otras muchas dicotiledóneas. Las células en la hoja joven están relativamente compactas. Mientras ocurre la expansión de la hoja, las células del mesófilo paran de crecer antes de que lo hagan las células epidérmicas, así que la epidermis en expansión entonces jala y separa las células del mesófilo, causando la formación de un sistema aéreo intercelular extensivo en el mesófilo (Salisbury y Ross, 1992). En el caso del hipocotilo, este se alarga debido a que las células se expanden en sentido vertical, en este proceso se ve implicado el IAA (Jensen *et al.*, 1998) y la participación de AO (Takahama y Oniki, 1994). De igual manera, la mayor parte de la raíz crece gracias al proceso de vacuolización, ya que la división celular sólo ocurre en el meristemo apical (González Reyes *et al.*, 1994).

De los 3 a los 7 dds, las hojas primarias, el hipocotilo y las raíces de la plántula de frijol, crecen principalmente por expansión celular, en la cual es importante la actividad de AO. Inclusive, si la expansión celular se afecta también se afecta la actividad de AO. Esto se demuestra en la **Figura 14**, en la que se observa que al estimular la elongación del hipocotilo por obscuridad continua hasta los 7 dds, en la misma proporción aumenta la actividad de AO. Lo que sugiere una correlación positiva entre la expansión celular y la actividad de AO. Esto concuerda con los resultados de Hernández-Mata y Soriano-Bello, 2003 y los de Takahama y Oniki, 1994; en los que se concluye que existe una correlación positiva entre la actividad de AO y la expansión celular estimulada por la auxina.

La actividad de AO es órgano específica en el frijol, como se muestra en el **Cuadro 6**. Comparando la actividad de AO en hojas primarias en la etapa de crecimiento vegetativo (32.76 ± 6.1 U/mg prot.) con la de las hojas trifoliadas maduras (18.15 ± 3.93 U/mg prot.), se aprecia que incluso entre hojas existe diferencia. Sin embargo, estas diferencias no son tan considerables como en el caso del chile poblano (*Capsicum annuum* L., variedad Ancho San Luis), cuya raíz presenta 1532 ± 179 , el botón de flor 668 ± 128 y el fruto 110 ± 20 U/mg prot. (García-Pineda *et al.*, 2004).

Al igual que en el chile poblano, en el que la hoja apical presenta menor actividad (48 ± 4 U/mg prot.) en comparación con la hoja basal (113 ± 3 U/mg prot.); en los retoños de hojas trifoliadas de frijol se presenta una actividad menor a la de las hojas trifoliadas maduras (**Cuadro 7**). En el tallo apical del chile poblano se presenta una actividad de 448 ± 156 U/mg prot., en el tallo basal 383 ± 179 y en tallo medio 184 ± 45 U/mg prot. Esto es, no existe diferencia entre la actividad de AO en el tallo apical y el basal pero si con el tallo medio (García-Pineda *et al.*, 2004). En el caso del chícharo (de Pinto y De Gara, 2004) y del frijol, la diferencia se encuentra entre el tallo apical y el basal (**Cuadro 7**), siendo mayor en la zonas de expansión y diferenciación y menor en la zona apical donde ocurre una alta actividad mitótica. Estos resultados sugieren que en las leguminosas, la actividad de AO varía de acuerdo con el grado de desarrollo de los órganos, siendo mayor en las zonas maduras.

El chícharo y el frijol se caracterizan por ser plantas dicotiledóneas de guía; al igual que las cucurbitáceas melón, calabacita, pepino y calabaza. En estas plantas abunda el colénquima y en este tejido, la proteína AO (Chichiricco *et al.*, 1989). El colénquima es un tejido de sostén de hojas y tallos, en raíces aparece muy raramente, pero de igual forma se le encuentra en pecíolos, en las venas foliares mayores y a lo largo del borde, puede aparecer en partes florales o frutos. Tal vez en el colénquima, la AO sea importante en el metabolismo de la pared celular, pues este tejido incluso se clasifica en diferentes tipos en base a la distribución del espesamiento de la pared celular: angular, laminar, lagunar, anular y radial. En la periferia del floema o xilema de los haces vasculares de tallos o pecíolos se le denomina colénquima perivascular (Metcalf, 1979), también puede formar una capa continua alrededor de la circunferencia, ubicándose debajo de la epidermis (Mansilla *et al.*, 1999). A pesar de tener paredes celulares gruesas, las células de este tejido están vivas, con protoplasto vacuolado, muy rico en agua, que puede presentar cloroplastos y taninos, y son capaces de desdiferenciarse para originar el felógeno o cámbium suberógeno, meristemo lateral que da lugar a la peridermis y que se desdiferencia para cicatrizar lesiones. A nivel celular, AO se detectó por inmunohistoquímica en la vacuola, en el tonoplasto, en el aparato de Golgi y como se había visto antes, en la parte interna de la pared celular (Liso *et al.*, 2004).

Si en los epicótilos de *V. angularis* incubados en ABA, se observaba una disminución en la cantidad total de ascorbato y su completa oxidación a DHA en el apoplasto, cabía esperar que la actividad de AO en el frijol sometido a sequía no aumentara debido a las condiciones oxidantes del apoplasto, que ocasionan la merma del sustrato de AO y la inhibición de su actividad. Algo que resultó de esa manera, como se puede ver en la **Figura 17**, pues la actividad de AO en tallo permanece constante y similar al control durante la sequía. Tal vez, no disminuye la actividad en este órgano porque es el menos afectado en su contenido de agua, contrario a lo que ocurre en las hojas primarias, en las que cae bruscamente la actividad a los 5 dfr.

En hojas de melón silvestre sometido a sequía y alta intensidad luminosa, aumenta la expresión del gen y la cantidad de proteína del cyt *b₅₆₁* a partir de 2 dfr. Esto no ocurre a baja luminosidad y tampoco en el melón doméstico, el cual, a diferencia del silvestre, es susceptible a la sequía. La inducción del cyt *b₅₆₁* sugiere una mayor regeneración del AA a partir del MDA en el apoplasto del melón silvestre sometido a sequía y exceso de luz, y también una mayor actividad de AO en estas circunstancias, pues la enzima es regulada positivamente por la intensidad luminosa (lo cual se probó en el melón silvestre), sugiere también que AO podría interactuar con el cyt *b₅₆₁* para disipar la energía luminosa excesiva de los cloroplastos.

Sin embargo, la actividad de AO disminuye en las hojas de ambos tipos de melón luego de 3 dfr y alta intensidad luminosa, sólo un 20 % en el melón silvestre y un 43 % en el melón doméstico a comparación de sus respectivos controles (Nanasato *et al.*, 2005).

En el caso de las hojas de frijol sometido a sequía (**Figura 17**), la actividad de AO disminuye un 50 % luego de 5 dfr, esto es similar a lo que ocurre con las hojas de melón doméstico. Sería interesante saber si en el frijol resistente a sequía se observa una disminución menos severa de la actividad de AO, variedad en la que tal vez el *cyt b₅₆₁* también trabajara más, reduciendo el MDA a AA no tanto para disipar la energía sino para mantener estable el estado redox del apoplasto bajo el estrés hídrico.

La sequía causa una disminución de la actividad de AO en las hojas de frijol, órgano que se ve sumamente afectado en su contenido de agua (**Figura 17**), pero otro tipo de estrés abiótico, el salino, aumenta la actividad de AO o no la afecta, dependiendo de la especie. Yamamoto *et al.*, en el 2005, transformaron plantas de tabaco en el gen de AO. Las plantas silvestres y las transformadas se hicieron crecer en 0.4 M NaCl por 14 días, se midió la actividad de AO en sus hojas jóvenes y se encontró que permaneció igual que la de las plantas control. Es decir, el estrés salino no afecta la actividad de AO en las hojas de tabaco. Este no fue el caso de las plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* sometidas a 0.1 M NaCl, pues en esta especie aumenta la actividad de 442 ± 80 a 618 ± 60 U/mg prot., mientras que en plantas mutadas en uno de los tres genes de AO (presentando 90 % menos actividad de la enzima), no ocurre ningún cambio en la actividad de AO bajo condiciones de estrés salino (Yamamoto *et al.*, 2005).

Las raíces de *A. thaliana* silvestre y la mutante T-DNA en un gen de AO, logran una longitud de 1.8 ± 0.3 cm a los 7 dds y de 3.7 ± 0.5 cm a los 14 dds, pero si crecen en 0.1 M NaCl, las raíces silvestres sólo alcanzan una longitud de 0.8 ± 0.1 cm a los 7 dds y de 1.43 ± 0.6 cm a los 14 dds, mientras que las raíces de la mutante crecen más: 1.4 cm a los 7 dds y 2.14 cm a los 14 dds en salinidad. Algo similar ocurre en las raíces de tabaco que no expresan AO, pues al crecer expuestas a 0.1 M NaCl por 15 días, crecen el doble de lo que lo hacen las raíces de tabaco que sobre expresan AO (Yamamoto *et al.*, 2005). Es decir, el estrés salino inhibe el crecimiento de las raíces, tal vez por el efecto citotóxico que ocasiona una alta concentración de sal, y se agudiza esta inhibición cuando hay mayor actividad de AO.

La sequía, en cambio, fomenta el crecimiento de las raíces de frijol luego de 10 dfr (**Figura 17**), lo que coincide con la súbita disminución de la actividad de AO. Antes de eso, de los 2 a los 5 dfr, la actividad de AO fue mayor en la sequía a comparación del control mientras que el peso seco permaneció igual.

Kerk *et al.*, en el 2000, propusieron en base a sus resultados, una forma de crecimiento de las raíces modulada por la cantidad de auxina y la actividad de AO, funcionando de la siguiente manera: al aumentar la concentración de IAA, aumenta el número de raíces laterales y disminuye la longitud de la raíz principal, a su vez, la AO, al descarboxilar oxidativamente al IAA, regula su concentración y favorece el crecimiento inverso, esto es, el alargamiento de la raíz principal y la disminución de las raíces laterales.

En el caso del frijol en sequía, esto se traduce en que posiblemente los primeros 5 dfr, al haber una alta actividad de AO no haya habido crecimiento de un mayor número de raíces laterales, por lo que el peso seco permanece semejante al control, no obstante, al empeorar el déficit de agua, se inhibe la actividad de AO y aumenta el número de raíces laterales que se traduce en un aumento del peso seco (**Figura 17**). Esto concuerda con un estudio realizado en la raíz de melón, en el que se concluye que la distribución de la AO y su actividad, determinan la arquitectura de la raíz, como se detalla enseguida.

En raíces de *Cucurbita maxima* L., el AA se localiza en todas las zonas de la raíz a excepción del centro quiescente. A nivel celular, el AA se encuentra en el apoplasto, en la membrana nuclear y en el nucleolo de las células meristemáticas, en cambio, en las células en diferenciación no se encuentra AA en su desarrollado sistema vacuolar, sistema que no presentan las pequeñas células meristemáticas. En la vacuola no se detecta AA pero si la AO, lo que sugiere que AO consume el AA que pudiera llegar a ese compartimiento. Aparte de la vacuola, la AO se encuentra en el tonoplasto, aparato de Golgi y la pared celular. Los anticuerpos para la AO indican a nivel tisular que la enzima se localiza en el centro quiescente, y a lo largo de las paredes celulares de los elementos vasculares en diferenciación, pero que está ausente de los primordios laterales de la raíz. Si se añade DHA a la raíz, éste se reduce por el GSH y el AA formado se acumula en la periferia de la raíz, en el córtex. Algo contrario a lo que ocurre en raíces incubadas en L-galactono- γ -lactona, molécula precursora del AA, pues se sintetiza el AA y se distribuye de manera uniforme en toda la raíz. Además, las raíces incubadas en 1 mM DHA por 48 horas, presentan una severa inhibición en su crecimiento, más aún, las células del meristemo apical y de la cofia se diferencian, luciendo alargadas, vacuoladas y ricas en amiloplastos, incluso la punta de la raíz cambia, pues se hace estrecha (Liso *et al.*, 2004).

Por otro lado, en el apoplasto aumenta un 60 % la concentración de H_2O_2 en la planta silvestre de tabaco estresada por salinidad, la planta transformada que sobre expresa AO contiene más H_2O_2 incluso en condiciones normales de crecimiento, por el contrario, la transformada que no expresa AO contiene la mitad de H_2O_2 que la silvestre en condiciones normales y no aumenta la concentración ante el estrés salino, lo cual favorece su germinación, su fotosíntesis y rendimiento de grano bajo la condición estresante. Esto comprueba que la AO regula el estado redox del ascorbato en el apoplasto, lo cual repercute en varios procesos fisiológicos. La transformada que no expresa el gen de AO, tiene constitutivamente el estado redox del apoplasto reducido, esto no sólo le confiere resistencia a la salinidad, sino que su tiempo de floración se retarda, y crecen menos sus internodos a comparación de la silvestre (Yamamoto *et al.*, 2005).

Las plantas silvestres nunca llegaron a experimentar cambios tan dramáticos en el estado redox de su apoplasto, porque siempre tenderá al equilibrio. Lo que si llega a ocurrir es que ante un mismo estrés, en una variedad o una especie aumente la actividad de AO mientras que en otra disminuya. Al haber condiciones estresantes, si disminuye la actividad de AO se propicia un estado reducido en el apoplasto, pudiéndose eliminar las especies reactivas de oxígeno por acción de peroxidasas o por acción directa del AA, esto podría ocurrir en el frijol ante OGA₁₀ (Hernández-Mata y Soriano-Bello, 2003) y sequía (**Figura 17**), en melón ante la sequía (Nanasato *et al.*, 2005) y la herida (Diallinas *et al.*, 1997), y en el tabaco ante el SA (Pignocchi *et al.*, 2003); en estas plantas se desencadenan respuestas de defensa (PR1a, fitoalexinas), a la par que se inhibe su crecimiento en algunos órganos. En cambio, si aumenta la actividad de AO, como se ha visto en el chile poblano ante celulasa, ácido araquidónico y herida (García-Pineda *et al.*, 2004), o en *A. thaliana* ante la salinidad (Yamamoto *et al.*, 2005), se abate el sistema antioxidante del apoplasto y se favorece la explosión oxidativa que desencadena respuestas de defensa. Una tercera opción también se cumple, como en el caso del tabaco en estrés salino, en cuyas hojas no hay cambios en la actividad de AO (Yamamoto *et al.*, 2005).

Como se puede ver, la función de AO depende del contexto de estudio. Si se relacionan la AO y el *cyt b₅₆₁*, la AO se ve implicada en la expansión celular (González-Reyes *et al.*, 1994) o en la disipación de la energía luminosa excesiva (Nanasato *et al.*, 2005). En cambio, si se estudia la AO en combinación con la actividad de las peroxidasas encargadas del reforzamiento de la pared celular, se tiene que la AO fomenta ese reforzamiento gracias a que elimina el AA, molécula que impide la polimerización de los componentes de la pared celular (de Pinto y De Gara, 2004). Si la AO se estudia en relación al estado redox del ascorbato en el apoplasto, resulta que la enzima regula los procesos de señalización que dan lugar a respuestas de defensa o de crecimiento (Pignocchi *et al.*, 2003).

En el frijol hace falta un estudio exhaustivo de AO, no se sabe cuántos genes de AO hay presentes en su genoma, cuántas isoenzimas codifican y si hay una expresión órgano específica, inclusive tisular y temporal de esas isoenzimas. No se ha estudiado la regulación de su gen, de su actividad por fitohormonas, por factores ambientales. Tal vez se podrían obtener plantas transformadas que sobre expresaran AO o que no lo hicieran en absoluto, como se ha hecho en tabaco, y estudiar su comportamiento ante sequía, salinidad, irradiación excesiva, enfermedades; factores que los cultivos comerciales de frijol afrontan en la realidad. Esto con el fin de comprender la función fisiológica de AO, así como obtener beneficios económicos si se logran plantas resistentes a diversos tipos de estrés.

IX. RESUMEN DE RESULTADOS

- La actividad de AO correlaciona de manera positiva con el crecimiento de hoja, tallo y raíz hasta los 7 dds, periodo en el que existe una mayor velocidad de crecimiento por expansión celular.
- La AO es ubicua en todos los órganos, su actividad se presenta de la siguiente manera: vaina > primer segmento del tallo > raíz > hoja primaria > flor > hoja trifoliada madura > cotiledón > último segmento del tallo > retoño de hoja trifoliada.
- La actividad de AO es mayor en los órganos maduros que cuando están en las primeras fases de desarrollo.
- La obscuridad ocasiona un aumento en el crecimiento del hipocotilo etiolado y un aumento en la actividad de AO, lo que confirma la correlación positiva que existe entre la expansión celular y la actividad de AO.
- Los órganos más afectados por el déficit de agua -hoja primaria y raíz-, presentaron una disminución de la actividad de AO. En cambio, la actividad de AO se mantuvo constante en el órgano menos afectado, el tallo.

X. CONCLUSIÓN

En la planta de frijol, la actividad de AO varía dependiendo de la etapa de desarrollo de los órganos. La obscuridad y la sequía modifican el crecimiento de la planta y la actividad de la enzima.

XI. APÉNDICE

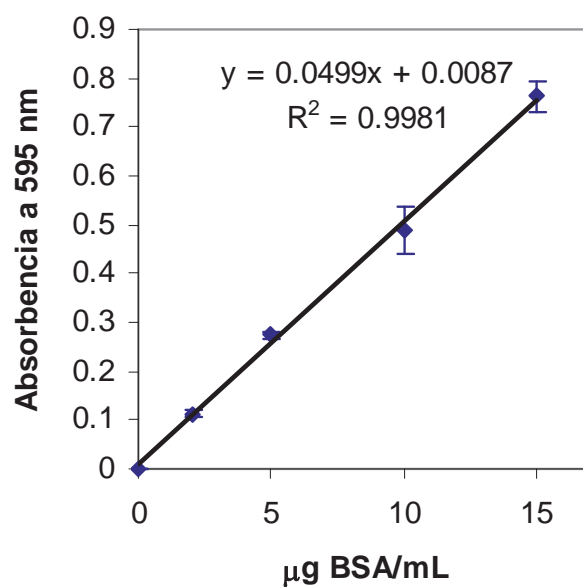


Figura 9. Curva estándar de proteína.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Alabadí, D., Gil, J., Blázquez, M. A., García-Martínez, J. L.** 2004. Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol.* 134: 1050-1057.
- Allen, O. y Allen, E.**, 1981. *The leguminosae, a source book of characteristics, uses and nodulation.* University of Wisconsin Press; Madison, Wisconsin, USA. pp. 812.
- Al-Madhoun, A. S., Sanmartín, M., Kanellis, A. K.** 2003. Expression of ascorbate oxidase isoenzymes in cucurbits and during development and ripening of melon fruit. *Postharvest Biology and Technology.* 2:137-146.
- Asada, K.** 1992. Ascorbate peroxidase, hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85: 235-241.
- Bayuelo Jiménez, J. S., Debouck, D. G., Lynch, J. P.** 2003. Growth, gas exchange, water relations, and ion composition of *Phaseolus* species grown under saline conditions. *Field Crops Research.* 80: 207-222.
- Bérczi, A., Møller, I. M.** 1998. NADH-monodehydroascorbate oxidoreductase is one of the redox enzymes in spinach leaf plasma membranes. *Plant Physiol.* 116: 1029-1036.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brouquisse, R., Gaudillère, J. P., Raymond, P.** 1998. Induction of a carbon starvation related proteolysis in whole maize plants submitted to light/dark cycles and to extended darkness. *Plant Physiol.* 117 : 1281-1291.
- Cárdenas-Navarro, R., Adamowicz, S., Robin, P.** 1998. Diurnal nitrate uptake in young tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants: test of a feedback-based model. *J. Exp. Bot.* 49(321): 721-730.
- Cárdenas-Navarro, R., Adamowicz, S., Robin, P.** 1999. Nitrate accumulation in plants: a role for water. *J. Exp. Bot.* 50(334): 613-624.
- Casella, L., Monzani, E., Santagostini, L., Gioia, L., Gullotti, M., Fantucci, P., Beringhelli, T., Marchesini, A.** 1999. Inhibitor binding studies on ascorbate oxidase. *Coordination Chemistry Reviews.* 185-186: 619-628.

- Chen, Z., Gallie, D. R.** 2004. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *The Plant Cell*. 16: 1143-1162.
- Cheng, J. C., Lertpiriyapong, K., Wang, S., Sung, Z. R.** 2000. The role of the Arabidopsis *ELDI* gene in cell development and photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol*. 123: 509-520.
- Chichiricco, G., Ceru, M. P., D'Alessandro, A., Oratore, A., Avigliano, L.** 1989. Immunohistochemical localization of ascorbate oxidase in *Cucurbita pepo medullosa*. *Plant Sci*. 64: 61-66.
- Colmenero-Flores, J. M., Moreno, L. P., Smith, C. E., Covarrubias, A. A.** 1999. Pvlea-18, a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. *Plant Physiol*. 120: 93-103.
- Cruz de Carvalho, M. H., d'Arcy-Lameta, A., Roy-Mcauley, H., Gareil, M., El Maarouf, H., Pham-Tahi, A. T., Zuily-Fodil, Y.** 2001. Aspartic protease in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp): enzymatic activity, gene expression and relation to drought susceptibility. *FEBS Letters*. 492: 242-246.
- D'Andrea, G., Maccarrone, M., Oratore, A., Avigliano, L., Messerschmidt, A.** 1989. Kinetic features of ascorbic acid oxidase after partial deglycation. *Biochem. J*. 264: 601-604.
- De Pinto, M. C., De Gara, L.** 2004. Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *J. Exp. Bot*. 55(408): 2559-2569.
- De Pinto, M. C., Tommasi, F., y De Gara, L.** 2002. Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco bright-yellow 2 cells. *Plant Physiol*. 130: 698-708.
- Diallinas, G., Pateraki, I., Sanmartin, M., Scossa, A., Stilianou, E., Panopoulos, N. J., y Kanellis, A. K.** 1997. Melon ascorbate oxidase: cloning of a multigene family, induction during fruit development and repression by wounding. *Plant Molecular Biology*. 34: 759-770.
- Esaka, M., Fujisawa, K., Goto, M., Kisu, Y.** 1992. Regulation of ascorbate oxidase expression in pumpkin by auxin and copper. *Plant Physiol*. 100: 231-237.
- Esaka, M., Nishitani, I., Fukui, H., Suzuki, K., Kubota, K.** 1989. Stimulation of ascorbate oxidase secretion from cultured pumpkin cells by divalent cations. *Phytochemistry*. 28(10): 2655-2658.
- Esaka, M., Uchida, M., Fukui, H., Kuboia, K., Suzuki, K.** 1988. Marked increase in ascorbate oxidase protein in pumpkin callus by adding copper. *Plant Physiol*. 88: 656-660.

- Fariás Rodríguez, F., Mellor, R. B., Arias, C., Peña Cabriales, J. J.** 1998. The accumulation of trehalose in nodules of several cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its correlation with resistance to drought stress. *Physiologia Plantarum*. 102: 353-359.
- Franceschi, V. R., Tarlyn, N. M.** 2002. L-ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiol*. 130: 649-656.
- García-Pineda, E., Castro-Mercado, E., Lozoya-Gloria, E.** 2004. Gene expression and enzyme activity of pepper (*Capsicum annuum* L.) ascorbate oxidase during elicitor and wounding stress. *Plant Sci*. 166: 237-243.
- Gary, C., Baldet, P., Bertin, N., Devaux, C., Tchamitchian, M., Raymond, P.** 2003. Time-course of tomato whole-plant respiration and fruit and stem growth during prolonged darkness in relation to carbohydrate reserves. *Annals of Botany*. 91: 429-438.
- Gaspard, S., Monzani, E., Casella, L., Gullotti, M., Maritano, S., y Marchesini, A.** 1997. Inhibition of ascorbate oxidase by phenolic compounds. Enzymatic and spectroscopic studies. *Biochemistry*. 36: 4852-4859.
- Gogorcena, Y., Gordon, A. J., Escuredo, P. R., Minchin, F. R., Witty, J. F., Moran, J. F., Becana, M.** 1997. N₂ fixation, carbon metabolism, and oxidative damage in nodules of dark-stressed common bean plants. *Plant Physiol*. 113: 1193-1201.
- González Reyes, J. A., Hidalgo, A., Caler, J. A., Palos, R., Navas, P.** 1994. Nutrient uptake changes in ascorbate free radical stimulated onion roots. *Plant Physiol*. 104: 271-276.
- Hallaway, M., Phethean, P. D., Taggart, J.** 1970. A critical study of the intracellular distribution of ascorbate oxidase and a comparison of the kinetics of the soluble and cell wall enzyme. *Phytochemistry*. 9: 935-944.
- Halliwell, B., Foyer, C. H.** 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*. 133: 21-25.
- Hayashi, R., Morohashi, Y.** 1993. Phytochrome control of the development of ascorbate oxidase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons. *Plant Physiol*. 102: 1237-1241.
- Hernández Mata, G y Soriano Bello, E.** 2003. Efecto del estimulador de defensas (OGA₁₀) en la actividad de la ácido ascórbico oxidasa (AAO) de raíces de frijol. Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México.
- Horemans, N., Asard, H., Caubergs, R. J.** 1994. The role of ascorbate free radical as an electron acceptor to cytochrome *b*-mediated trans-plasma membrane electron transport in higher plants. *Plant Physiol*. 104: 1455-1458.

Horemans, N., Asard, H., y Caubergs, R. J. 1997. The ascorbate carrier of higher plant plasma membranes preferentially translocates the fully oxidized (dehydroascorbate) molecule. *Plant Physiol.* 114: 1247-1253.

Horemans, N., Foyer, C. H., Asard, H. 2000. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends in Plant Science.* 5(6): 263-267.

Horemans, N., Potters, G., De Wilde, L., y Caubergs R. J. 2003. Dehydroascorbate uptake activity correlates with cell growth and cell division of tobacco bright yellow-2 cell cultures. *Plant Physiol.* 133: 361-367.

Iturbe-Ormaetxe, I., Escuredo, P. R., Arrese-Igor, C., Becana, M. 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiol.* 116: 173-181.

Jensen, P. J., Hangarter, R. P., Estelle, M. 1998. Auxin transport is required for hypocotyl elongation in light-grown but not dark-grown *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 116: 455-462.

Jiang, M., y Zhang, J. 2002. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *J. Exp Bot.* 53(379): 2401-2410.

Kato, N., Esaka, M. 1996. cDNA cloning and gene expression of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Molecular Biology.* 30: 833-837.

Kato, N., Esaka, M. 1999. Changes in ascorbate oxidase gene expression and ascorbate levels in cell division and cell elongation in tobacco cells. *Physiologia Plantarum.* 105: 321-329.

Kato, N., Esaka, M. 2000. Expansion of transgenic tobacco protoplasts expressing pumpkin ascorbate oxidase is more rapid than that of wild type protoplasts. *Planta.* 210: 1018-1022.

Kerk, N. M., Feldman, L. J. 1995. A biochemical model for the initiation and maintenance of the quiescent center: implications for organization of root meristems. *Development.* 121: 2825-2833.

Kerk, N. M., Jiang, J., Feldman, L. J. 2000. Auxin metabolism in the root apical meristem. *Plant Physiol.* 122: 925-932.

Kim, Y. R., Yu, S. W., Lee, S. R., Hwang, Y. Y., Kang, S. O. 1996. A heme containing ascorbate oxidase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry.* 271(6): 3105-3111.

Kisu, Y., Harada, Y., Goto, M., Esaka, M. 1997. Cloning of the pumpkin ascorbate oxidase gene and analysis of a *cis*-acting region involved in induction by auxin. *Plant Cell Physiol.* 38(5): 631-637.

Kisu, Y., Ono, T., Shimofurutani, N., Suzuki, M., Esaka, M. 1998. Characterization and expression of a new class of zinc finger protein that binds to silencer region of ascorbate oxidase gene. *Plant Cell Physiol.* 39(10): 1054-1064.

Kohashi-Shibata, J. 1996. Aspectos de la morfología y fisiología del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y su relación con el rendimiento. Colegio de Postgraduados. Chapingo. México.

Kostman, T. A., Tarlyn, N. M., Loewus, F. A., Franceschi, V. R. 2001. Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbons 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts. *Plant Physiol.* 125: 634-640.

Lazcano-Ferrat, I., Lovatt, C. J. 1999. Relationship between relative water content, nitrogen pools, and growth of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. Gray during water deficit. *Crop. Sci.* 39: 467-475.

Leeper, L., Newbury, H. J. 1989. Phytochrome control of the accumulation and rate of synthesis of ascorbate oxidase in mustard cotyledons. *Plant Sci.* 64: 79-90.

Lin, L. S., Varner, J. E., 1991. Expression of ascorbic acid oxidase in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Physiol.* 96: 159-165.

Liso, R., De Tullio, M. C., Ciraci, S., Balestrini, R., La Rocca, N., Bruno, L., Chiappetta, A., Bitonti, M. B., Bonfante, P., Arrigoni, O. 2004. Localization of ascorbic acid, ascorbic acid oxidase, and glutathione in roots of *Cucurbita maxima* L. *J. Exp. Bot.* 55(408): 2589-2597.

Mansilla, M. S., Cosa, M. T y Dottori, N. 1999. Estudio morfoanatómico de órganos vegetativos en representantes de los géneros *Solanum* sect. *Cyphomandropsis* y *Cyphomandra*. *Kurtziana* 27(2): 271-284.

Marchesini, A., Kroneck, P. M. 1979. Ascorbate oxidase from *Cucurbita pepo* medullosa. New method of purification and reinvestigation of properties. *Eur. J. Biochem.* 101(1):65-76.

Messerschmidt, A., Huber, R. 1990. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. *FEBS.* 1: 341-352

Metcalfe, C. R. 1979. *Anatomy of the Dicotyledons. Vol. I: Systematic anatomy of the leaf and stem, with a brief history of the subject.* 2nd. ed. Oxford University Press.

Moldeau, H., Padu, E., Bichele, I. 1997. Quantification of ozone decay and requirement for ascorbate in *Phaseolus vulgaris* L. mesophyll cell walls. *Phyton.* 37: 175-180.

Morpurgo, L., Agostinelli, E., Befani, O., Mondovi, B. 1987. Reactions of bovine serum amine oxidase with N,N-diethyldithiocarbamate. Selective removal of one copper ion. *Biochem. J.* 248: 865-870.

- Moser, O., Kanellis, A. K.** 1994. Ascorbate oxidase of *Cucumis melo* L. Var. *Reticulatus*: purification, characterization and antibody production. *J. Exp. Bot.* 45:717-724.
- Müller-Moulé, P., Conklin, P. L., Niyogi, K. K.** 2002. Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity *in vivo*. *Plant Physiol.* 128:970-977.
- Nanasato, Y., Akashi, K., Yokota, A.** 2005. Co-expression of cytochrome *b₅₆₁* and ascorbate oxidase in leaves of wild watermelon under drought and high light conditions. *Plant Cell Physiol.* 46(9): 1515-1524.
- Nishikawa, F., Kato, M., Hyodo, H., Ikoma, Y., Sugiura, M., y Yano, M.** 2003. Ascorbate metabolism in harvested broccoli. *J. Exp. Bot.* 54(392): 2439-2448.
- Ohkawa, J., Ohya, T., Ito, T., Nozawa, H., Nishi, Y., Okada, N., Yoshida, K., Takano, M., Shinmyo, A.** 1994. Structure of the genomic DNA encoding cucumber ascorbate oxidase and its expression in transgenic plants. *Plant Cell Reports.* 13: 481-488.
- Ohkawa, J., Okada, N., Shinmyo, A., Takano, M.** 1989. Primary structure of cucumber (*Cucumis sativus*) ascorbate oxidase deduced from cDNA sequence: Homology with blue copper proteins and tissue-specific expression. *Proc. Natl. Sci. USA.* 86: 1239-1243.
- Önnerud, H., Zhang, L., Gellerstedt, G., Henriksson, G.** 2002. Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation: a new model in lignin biosynthesis I. *The Plant Cell.* 14: 1953-1962.
- Paciolla, C., De Tullio, M. C., Chiappetta, A., Innocenti, A. M., Bitonti, M. B., Liso, R., y Arrigoni, O.** 2001. Short and long term effects of dehydroascorbate in *Lupinus albus* and *Allium cepa* roots. *Plant Cell Physiol.* 42(8): 857-863.
- Pallanca, J. E., Smirnoff, N.** 2000. The control of ascorbic acid synthesis and turnover in pea seedlings. *J. Exp. Bot.* 51(345):669-674.
- Pastori, G. M., Kiddle, G., Antoniw, J., Bernard, S., Veljovic-Jovanovic, S., Verrier, P. J., Noctor, G., Foyer, C. H.** 2003. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell.* 15: 939-951.
- Pignocchi, C., Fletcher, J. M., Wilkinson, J. E., Barnes, J. D., Foyer, C. H.** 2003. The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiol.* 132: 1631-1641.
- Pignocchi, C., y Foyer, C. H.** 2003. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Current Opinion in Plant Biology.* 6: 379-389.
- Potters, G., Horemans, N., Caubergs, R. J., Asard, H.** 2000. Ascorbate and dehydroascorbate influence cell cycle progression in a tobacco cell suspension. *Plant Physiol.* 124: 17-20.

- Puskas, F., Gergely Jr., P., Banki, K., y Perl, A.** 2000. Stimulation of the pentose phosphate pathway and glutathione levels by dehydroascorbate, the oxidized form of vitamin C. *FASEB J.* 14: 1352-1361.
- Reddy, K. P., Khan, P. A., Patnaik, S., Mohanty, G. B., Kumar, K. B.** 1986. Ascorbate oxidase activity in rice shoot apices during panicle initiation. *Plant Cell Physiol.* 27(4): 725-728.
- Rodríguez-Narciso, C.** 1999. Optimización del crecimiento de plántulas *in vitro* y aclimatación de tres cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) c.v. Flor de Mayo, Americano y Peruano. Tesis de Licenciatura en Biología. UMSNH.
- Rosales-Serna, R., Ramírez-Vallejo, P., Acosta-Gallegos, J., Castillo-González, F., Kelly, J. D.** 2000. Rendimiento del grano y tolerancia a la sequía del frijol común en condiciones de campo. *Agrociencia.* 34: 153-165.
- Salisbury, F. B., Ross, C. W.** 1992. *Plant Physiology.* 4a ed., Wadsworth Publishing Company. E. U. A.
- Sanmartin, M., Drogoudi, P. D., Lyons T., Pateraki, I., Barnes, J., Kanellis, A. K.** 2003. Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta.* 216: 918-928.
- Setterfield, G.** 1958. Fine structure of the walls of collenchyma cell. *Amer. J. Bot.* 45(7): 571-580.
- Smirnoff, N.** 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany.* 78:661-669.
- Soriano Richards, E. y Núñez Palenius, H. G.** 1986. Determinación de fitoalexinas isoflavonoides presentes en frijol (*Phaseolus vulgaris*) sometido a la luz UV. *Revista de la Sociedad Química de México.* 30(4): 160-163.
- Spollen, W. G., Le Noble, M. E., Samuels, T. D., Bernstein, N., Sharp, R. E.** 2000. Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiol.* 122: 967-976.
- Stark, G. R., Dawson, C. R.** 1963. Ascorbic acid oxidase. "The Enzymes" (P. D. Boyer, H. Lardy, y K. Myrbäck, eds.). 2ª ed. 8: 297-311. Academic Press, New York.
- Suzuki, Y., Ogiso, K.** 1973. Development of ascorbate oxidase activity and its isoenzyme pattern in the roots of pea seedlings. *Physiologia Plantarum.* 29: 169-172.
- Tabata, K., Takaoka, T., Esaka, M.** 2002. Gene expression of ascorbic acid related enzymes in tobacco. *Phytochemistry.* 61: 631-635.

- Takahama, U.** 1994. Changes induced by abscisic acid and light in the redox state of ascorbate in the apoplast of epicotyls of *Vigna angularis*. *Plant Cell Physiol.* 35(6): 975-978.
- Takahama, U., Oniki, T.** 1994. The association of ascorbate and ascorbate oxidase in the apoplast with IAA enhanced elongation of epicotyls from *Vigna angularis*. *Plant Cell Physiol.* 35(2): 257-266.
- Tommasi, F., Paciolla, C., de Pinto, M. C., De Gara, L.** 2001. A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. *J. Exp. Bot.* 52(361):1647-1654.
- Turcsányi, E., Lyons, T., Plöchl M., Barnes, J.** 2000. Does ascorbate in the mesophyll cell walls form the first line of defence against ozone? Testing the concept using broad bean (*Vicia faba* L.). *J. Exp. Bot.* 51(346): 901-910.
- White, A. A., Crawford, K. M., Patt, C. S., Lad, P. J.** 1976. Activation of soluble guanylate cyclase from rat lung by incubation or by hydrogen peroxide. *The Journal of Biological Chemistry.* 251(23): 7304-7312.
- Wu, Y., Sharp, R. E., Durachko, D. M., Cosgrove, D. J.** 1996. Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell wall extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins. *Plant Physiol.* 111: 765-772.
- Wu, Y., Thorne, E. T., Sharp, R. E., Cosgrove, D. J.** 2001. Modification of expansin transcript levels in the maize primary root at low water potentials. *Plant Physiol.* 126: 1471-1479.
- Yahia, E. M., Contreras Padilla, M., González Aguilar, G.** 2001. Ascorbic acid content in relation to ascorbic acid oxidase activity and polyamine content in tomato and bell pepper fruits during development, maturation and senescence. *Food Science Technology.* 34: 452-457.
- Yamamoto, A., Bhuiyan, M. N. H., Waditee, R., Tanaka, Y., Esaka, M., Oba K., Jagendorf, A. T., Takabe, T.** 2005. Suppressed expression of the apoplastic ascorbate oxidase gene increases salt tolerance in tobacco and *Arabidopsis* plants. *J. Exp. Bot.* 56(417): 1785-1796.
- Yoshida, K., Ito, T., Nozawa, H., Ohkawa, J., Shinmyo, A.** 1994. Sequence requirement of 5'-upstream region of the ascorbate oxidase gene for organ-specific expression in cucumber. *Ann. NY Acad. Sci. USA.*