



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Efecto del estrés lumínico sobre la actividad
y expresión de isoenzimas de peroxidasas
en *Neobuxbaumia tetetzo* en Zapotitlán de las
Salinas, Puebla.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOLOGO

PRESENTA

MARTHA ANGELICA SANTIAGO SANTIAGO

DIRECTORA DE TESIS: M. en C. JOSEFINA VÁZQUEZ MEDRANO



LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO FEBRERO 2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

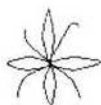
A VECES ME PARECE OIR ALGO EXTRAÑO EN EL SILENCIO DE LA NOCHE. ¿SERA LA VOZ DE LA NATURALEZA REPROCHANDONOS EL OLVIDO?

TAL VEZ ESE SONIDO, TAN LLENO DE INCERTIDUMBRE SEA EL LLAMADO DE MI CONCIENCIA, UN LLAMADO A MI ESENCIA, TAL VEZ SEA UN SONIDO QUE YA NO ESCUCHAREMOS PERO QUE TENEMOS DERECHO A CONOCER.



DEDICADA A:

A mis padres Pedro y Ecliseria ustedes que me dieron todo y han formado mi persona con todos los defectos y virtudes y que son el ejemplo de personas luchadoras, nobles, y con un gran espíritu humano, simplemente no tendría palabras para expresar todo lo que siento hacia ustedes además de un profundo amor respeto y agradecimiento.



A mis hermanos que hacen placentera mi estancia en este planeta, que fueron y serán mi guía y mi ejemplo: Evelio, Cristina, Lourdes, Juan, Tomas, Enrique, Marco, Catalina, David y Julio.



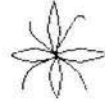
A Carlos, Susana, Hugo, Ricardo, Cesar, Ramón, Alfredo, Isabel, Fátima, Gabriel, Mario, Brenda, Edgar, Fabián, Antonio, Brandon, Gisela, Tamara, Monserrat, Diego, Luz, Vicky, Vicky, Mari, Norma, Mario, Galindo, Blanca, Gabriela, Mauricio, Cesar y Bety por formar parte de mi familia.

GRACIAS.





AGRADECIMIENTOS



Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN210101 por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

A la M en C. Josefina Vázquez Medrano por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, por darme su amistad, por compartir conmigo sus conocimientos y porque es un ejemplo de un ser muy inteligente y capaz de realizar cualquier tipo de actividad y de guiar a sus alumnos en el camino hacia la investigación con gran paciencia, sabiduría y bondad, por marcar tanto el inicio como el fin de una etapa en la carrera de Biología mis más sinceras admiraciones.

Al Biol. Rafael Quintanar Zuñiga por las revisiones realizadas a este trabajo y despejar las dudas que en su momento tuve, por brindarme su amistad, por hacer amena mi estancia en el laboratorio con sus pláticas y consejos, por que es un Profesor preocupado por sus alumnos a quienes ayuda y por esforzarse cada día en mejorar sus métodos de enseñanza.

Al M. en C. Manuel Mandujano Piña por sus revisiones, por brindarme su amistad y ayuda en cualquier tipo de asunto, por ser una persona accesible con los alumnos y que marco mi inicio en la Biología con sus clases de Metodología Científica I.

Al Dr. Ignacio Peñaloza Castro por ayudarme a mejorar este trabajo y ser una persona accesible y amable con sus alumnos.

Al M. en C. Gerardo Ortiz por sus muy acertadas correcciones a este trabajo, y su accesibilidad para hablar con él.

Al M. en C. Cesar Mateo Flores Ortiz por permitirme ser parte del equipo de trabajo del Laboratorio, por prestarme atención y ayudarme en los momentos en los que necesite se ayuda y por que hace que la gente del laboratorio realmente integre un "EQUIPO" unido permitiendo la participación de todos, que sea accesible para todos los que se acercan para pedir cualquier tipo de ayuda, simplemente por formar una segunda familia con todos los del laboratorio.

Al Biol. Luis Barbo Portilla por ayudarme en cada momento que necesite de su ayuda dejando sus actividades a un lado.

A todos los integrantes del Laboratorio de Fisiología Vegetal y Biogeoquímica que en algún momento convivio conmigo, hicieron amena mi estancia en el laboratorio y me ayudaron para la realización de este trabajo, tanto en el laboratorio como en esas bohemias y padres salidas al campo: Margarita, Martha U., Josefina, Rafael, Luis, Cesar O., Cesar M., Maritza, Fredd, Claudia, Carlos, Oswaldo.

A la M. en C. Nora Medina Jaritz por brindarme su amistad, por sus consejos aun cuando ya no formaba parte de su equipo de trabajo, por todo lo que me enseñó y dió. Por ser una Profesora que constantemente se supera en todos los niveles.





A todos los Maestros que en alguna parte de mi formación como bióloga me dieron ayuda y parte de sus conocimientos Bio. Martha Fregoso, M. en C. Martín Martínez, M. en C. Teresa García Castañeda, M en C. Angelica, M. en C. Antonia Trujillo, M. en C. Marcela Ibarra, M. en C. Sergio Stanford,a todos.

A la Biol. Patricia Alejos, Biol. Leticia, Biol. Alejandro y al Laboratorio de Bioquímica Molecular por la ayuda brindada para realizar este trabajo.

A Tomas, Mary, Cata por su apoyo, ayuda, aliento, consejos y por todo lo que me han soportado durante mi carrera.

A Bety y Carlos por su ayuda en todo momento que los he necesitado. Por su amistad durante todos estos largos años y todas las aventuras que hemos pasado juntos y su aliento para empezar, seguir, y acabar la carrera.

A Angélica por su amistad incondicional en cualquier momento que hemos pasado juntas durante estos años, ya sabes que te estimo verdaderamente.

A Cilia por tu amistad, por hacerme compañía en mi estancia en la UBIPRO, por todo lo que hemos vivido durante la carrera.

A Consuelo, Sandra, Marío, Alberto por su amistad y todos los padres momentos que pasamos en cada una de las fiestas y reuniones a las que hemos asistido.

A Nelly por su amistad, sus comentarios, su atención, por todo....

A Nallely y Rosy por todos los momentos que pasamos y disfrutamos juntas.

A toda la pandilla de zoología Ruth, Saharai, Memo, Jesús.

A todos los compañeros y amigos que han convivido en algún momento conmigo, hacen e hicieron amena la vida en la universidad Fabiola, Pedro, Alejandro, Josefina, Felipe, Verónica, Alfredo, Edith, Sabas, Fernando, Normand, Beto, Angeles, Sofia, Alvaro, Maritza, Iliana, Tere, Ivon Edaena, Míriam, Oswaldo, Martín M., Luz, Teresa V. Sandra.



ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	I
1.0 RESUMEN	1
2.0 INTRODUCCIÓN	
2.1 NODRICISMO	2
2.2 FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES	3
2.3 PEROXIDASAS IMPLICADAS EN LA DEGRADACIÓN DE RADICALES LIBRES.	
2.3.1 CATALASAS (CAT)	7
2.3.2 GLUTATIÓN PEROXIDASAS	8
2.3.3 PEROXIDASAS NO ESPECIFICAS (POX)	8
2.3.4 ASCORBATO PEROXIDASAS (APX)	10
2.3.5 SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)	11
2.1.5.1 SUPERÓXIDO DISMUTASA MANGANESO (MnSOD)	11
2.1.5.2 SUPERÓXIDO DISMUTASA ZINC (ZnSOD)	12
3.0 ANTECEDENTES	14
4.0 HIPÓTESIS	17
5.1 OBJETIVOS GENERALES	17
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	17
6.0 METODOLOGÍA	
6.1 COLECTA DE MUESTRAS	18
6.2 AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS	18
6.3 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE PEROXIDASAS	18
6.4 ELECTROFORESIS DE GELES DE POLIACRILAMIDA	19
7.0 RESULTADOS Y ANÁLISIS	
7.1 EVALUACIÓN DE RADIACIÓN FOTOSINTÉTICAMENTE ACTIVA	20
7.2 PARAMETROS CINÉTICOS	20
7.3 EXPRESIÓN E INTENSIDAD DE ISOENZIMAS DE PEROXIDASAS	23
7.4 GRÁFICAS DE INTENSIDAD PEROXIDASA	25
7.5 ANÁLISIS DE INTENSIDAD	28
7.6 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DESNATURALIZANTES	29
7.7 ANÁLISIS DE SIMILITUD DE LAS PROTEÍNAS EXPRESADAS	30
8.0 DISCUSIÓN	32
9.0 CONCLUSIONES	38
10.0 LITERATURA CITADA	39
APÉNDICE	II



ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AAL	Porción de <i>N. tetetzo</i> aislado apical luz
AAS	Porción de <i>N. tetetzo</i> aislado apical sombra
ABL	Porción de <i>N. tetetzo</i> aislado basal luz
ABS	Porción de <i>N. tetetzo</i> aislado basal sombra
ADP	Adenín difosfato
AIA	Ácido Indol Acético
AML	Porción de <i>N. tetetzo</i> aislado media luz
AMS	Porción de <i>N. tetetzo</i> aislado media sombra
APX	Enzima Ascorbato peroxidasa
ATP	Adenín trifosfato
An	Isoenzima de peroxidasa aniónica
CAT	Enzima Catalasa
Cn	Isoenzima de peroxidasa catiónica
DHA	Deshidroascorbato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
e ⁻	Electrones
Fe (IV)	Ion ferril
Fe ²⁺	Ion ferroso
Fe ³⁺	Ion férrico
Fed _{ox}	Ferredoxina oxidada.
Fed _{red}	Ferredoxina reducida
GSH	Glutati6n reducido
GSSG	Glutati6n oxidado
H ⁺	Protones
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Per6xido de hidr6geno
ISJ	Índice de Similitud de Jackard
KDa	Kilodaltons
MDH	Monodeshidroascorbato
$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Micromoles por metro cuadrado por segundo
NADH	Dinucle6tido de nicotinamida y adenina reducido
NADPH	Fosfato de dinucle6tido de nicotinamida y adenina reducido
NAL	Porci6n de <i>N. tetetzo</i> bajo nodrizaje apical luz
NAS	Porci6n de <i>N. tetetzo</i> bajo nodrizaje apical sombra
NBL	Porci6n de <i>N. tetetzo</i> bajo nodrizaje basal luz
NBS	Porci6n de <i>N. tetetzo</i> bajo nodrizaje basal sombra
NML	Porci6n de <i>N. tetetzo</i> bajo nodrizaje media luz
NMS	Porci6n de <i>N. tetetzo</i> bajo nodrizaje media sombra
o	orto
O ₂	Oxigeno molecular
O ₂ ⁻	Radicales super6xido
OH ⁻	Radicales hidr6xilo

-ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS -

PAR	Photosynthetically Active Radiation (Radiación Fotosintéticamente activa)
POX	Enzima Peroxidasa no específica
PSII	Fotosistema II
PSI	Fotosistema I
RC	Centro de reacción del fotosistema II
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
SOD	Enzima Superóxido dismutasa



1.0 RESUMEN.

Neobuxbaumia tetetzo es una especie de zonas áridas, donde la elevada radiación luminosa promueve que se generen especies reactivas de oxígeno, las cuales dañan biomoléculas y favorecen procesos de oxidación y peroxidación. Como un mecanismo de protección, las células presentan enzimas como las peroxidasas que eliminan radicales libres. Así se puede suponer que la mayor expresión de peroxidasas se asocia con el estrés oxidativo en la planta por lo que podría ser un indicador bioquímico de fotoprotección en la zona de Zapotitlán Salinas Puebla. El objetivo del presente trabajo fue la evaluación del efecto de los niveles de radiación sobre la actividad aparente y expresión de las peroxidasas en *N. tetetzo* de individuos aislados y asociados a *Prosopis laevigata*. Para lo cual se colectaron por triplicado muestras de la porción apical, media y basal, del lado iluminado y sombreado de cada individuo. La actividad de peroxidasa se registró con σ -dianisidina y la expresión de isoenzimas por electroforesis no desnaturizante y desnaturizante. Los resultados muestran que la mayor actividad se registró en la parte iluminada de los individuos aislados, presentándose 2 isoformas catiónicas y 8 aniónicas, siendo el ápice el que muestra la mayor actividad aparente, asimismo, reveló dos isoformas A10 y A12 que no se expresan en la planta bajo nodrizaje. Por otro lado, en los individuos que crecen bajo nodrizaje donde se expresan 3 isoenzimas catiónicas y 7 aniónicas la mayor actividad se registró en la parte media, expresando las isoenzimas C4 y A9 que no se expresan en los individuos aislados, no existen diferencias en actividad aparente entre las orientaciones sombreada e iluminada en estos individuos. Las isoenzimas que se expresan en mayor proporción en las partes sometidas a una mayor radiación son la C4, A5, A10, A11 y A12. Se observa un patrón proteico diferencial entre los individuos aislados y bajo nodrizaje. De acuerdo a la matriz de similitud se presentan diferencias entre los individuos aislados y los organismos bajo nodrizaje con un ISJ=0.25, además de una mayor similitud entre las porciones más expuestas a la radiación. Los resultados obtenidos sugieren una posible participación de las peroxidasas en la fotoprotección por elevada irradiación, lo cual se observa en los individuos aislados que presentaron la mayor actividad.



2.0 INTRODUCCIÓN.

2.1 NODRICISMO.

México presenta diversos tipos de vegetación, pero casi dos terceras partes de su territorio corresponden a zonas áridas o semiáridas, de la denominada región xerofítica mexicana, que se caracteriza por presentar hasta 12 meses de sequía al año, con temperaturas extremas, y precipitaciones cercanas a los 400 mm de lluvia al año, con características ecológicas, productivas y fisiológicas muy diferentes a las demás zonas del país (Contreras, 1955).

Esta región se extiende en una gran altiplanicie que abarca los estados de Durango, Chihuahua, Sonora y otras entidades del norte del país, presentándose también en la zona centro-sur, en forma de manchones aislados en Querétaro, Hidalgo, Oaxaca y Puebla; en el extremo sureste de este último estado y la porción noreste del estado de Oaxaca se localiza el Valle de Tehuacán y es en este valle donde se encuentra la localidad de Zapotitlán de las Salinas. Este valle contiene una flora muy diversa constituida por 189 familias, 922 géneros y cerca de 3000 especies de plantas vasculares (Dávila, 1993), una proporción considerable de esta flora es endémica y dominante en la zona, tal es el caso de las cactáceas columnares representantes de la tribu Pachycerae, de la especie *Neobuxbaumia tetetzo* conocidas como tetechos, tetetzo, y tzetzetzo. (Valiente-Banuet, *et al.* 1997; Bravo, 1955).

Esta especie está conformada por plantas que llegan a medir más de 12 m de alto, sin ramificaciones o generalmente poco ramificadas, con un eje principal que mide de 30 a 40 cm de diámetro, sus ramas de color verde grisáceo crecen en un sentido ascendente vertical, y tienen de 13 a 17 costillas poco prominentes; con areólas ovadas y distales entre sí en la parte superior; las extremidades de las ramas están provistas de un abundante fieltro café claro, mientras que en las demás areólas es de color grisáceo en menor cantidad, desapareciendo en las areólas de las partes viejas. Presentan espinas radiales y centrales las primeras son aciculares de color verde grisáceo o amarillento claro van en números de 8 a 15 en las areólas jóvenes, a veces se encuentran hacia la parte inferior de la areóla y dirigidas hacia abajo; mientras que las espinas centrales son de color café casi negro de 1 a 3, las dos superiores más cortas en comparación con la inferior. Con flores nocturnas de color blanco verdoso que nacen sobre el ápice de las ramas, el tubo de la flor tiene escamas largas y angostas, sin lana, ni espinas, en las puntas presenta un coloración rojiza, los estambres tienen un filamento blanco y las anteras son de color crema claro, con estilo blanco; los frutos ovoides de color verde claro adquieren con el tiempo coloración rojiza, con pulpa fibrosa blanca, dulce y comestible, formada por los funiculos de las semillas éstas últimas son pequeñas, de color café oscuro con testa brillante (Bravo-Hollis, 1955, 1978).

Las condiciones extremas que se presentan a lo largo del año en el Valle de Tehuacán, y el deterioro ambiental que ésta sufre, afectan de manera directa las respuestas fisiológicas de las plantas, modificando sus procesos bioquímicos. La radiación es el factor físico más importante que influye en las asociaciones interespecíficas e intraespecíficas (Zavala, *et al.* 1990; Valiente-Banuet y Exequiel-Ezcurra, 1991; Nolasco, *et al.* 1997). En la zona de estudio, existe una diferencia significativa en el establecimiento y la densidad global de estas especies, en las diferentes pendientes norte-sur del valle; debida a la orientación de la pendiente, haciéndose patente una jerarquización entre las cactáceas distribuidas en la zona; al mismo tiempo, la estructura por edades, el tamaño y el crecimiento son consecuencia de esta orientación, todo esto es provocado por los diferentes niveles de radiación para cada pendiente, así como por los patrones de lluvias y evapotranspiración (Zavala, *et al.* 1990).

El fenómeno de nodricismo en las comunidades áridas y semiáridas dominado por las cactáceas, como el presente en el Valle de Zapotitlán entre *Prosopis laevigata* y *N. tetetzo* puede ser considerado esencial para el desarrollo de estas comunidades, ya que este nodricismo principalmente es el resultado de la mayor supervivencia de las plántulas por las ventajas ambientales conferidas sobre la planta bajo nodrizaje como: disminución en la radiación solar, micrositios sombreados, menor temperatura durante el día y evaporación del suelo, además de incrementar los niveles de nitrógeno bajo su dosel, lo cual le confiere ventajas a toda planta que viva bajo la nodriza, sobre las plantas localizadas en áreas abiertas (Chavéz, 2000; Godínez-Alvarez y Valiente-Banuet 1998; Valiente-Banuet y Ezequiel-Ezcurra, 1991).

2.2 FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES.

El estrés ambiental al que están sometidas estas plantas, cambios de temperatura, déficit hídrico y un exceso de radiación electromagnética, promueven que se generen especies de oxígeno reactivas: radicales superóxido ($O_2 \cdot^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidróxilo ($\cdot OH$), originados por la transferencia de uno, dos y tres electrones (Ruci ska, *et al.* 1999; Hendry, 1993; Schopfer, *et al.* 2001).

Estos radicales libres se generan en el proceso de transferencia de electrones como la respiración y la fotosíntesis, por los procesos de reducción del oxígeno, en particular las reacciones que producen el H_2O_2 intracelular se localizan en la mitocondria, los peroxisomas, el citoplasma y el cloroplasto, y en algunos casos pueden contribuir a la liberación de las especies reactivas de oxígeno, puesto que el H_2O_2 fácilmente permea a través de la membrana celular (Schopfer *et al.* 2001), todas estas especies dañan a muchos componentes celulares, incluyendo proteínas, lípidos de membrana, ácidos nucleicos y polisacáridos, teniendo efecto directo en la vías de transporte electrónico en la mitocondria y el cloroplasto, así como en otros procesos de oxidación y peroxidación (Ruci ska, *et al.* 1999; Hendry, 1993; Schopfer, *et al.* 2001).

Los radicales libres, al combinarse con los lípidos, comienzan la peroxidación lipídica o la incrementan, e inactivan algunas enzimas, incluyendo aquellas que están directamente involucradas en el procesamiento del oxígeno en sus diversas formas. También deterioran la membrana plasmática de la célula, este deterioro de la membrana se refleja en la pérdida de lípidos, y/o cambios en la saturación de los mismos, teniendo como consecuencia la disminución en la fluidez de la membrana, la inactivación de las proteínas unidas a ésta, incluyendo proteínas de transporte y receptores, y cambios en su permeabilidad. Se cree también que los hidroxiperóxidos formados por la peroxidación lipídica, se descomponen con ayuda de metales de transición, a etano y varios aldehídos insaturados volviéndose citotóxicos (Hendry, 1993).

En lo que se refiere a la interacción de un radical libre con el DNA, se sabe que los radicales hidróxilo, pueden reaccionar con las purinas y las pirimidinas y causar lesiones mutagénicas en el DNA o detener su duplicación, además de intervenir en algunos otros procesos (Zentella y Saldaña, 1996).

Por otra parte el daño hacia las proteínas es a nivel de su síntesis, ya sea inhibiéndola, o formando compuestos que, además de ser altamente reactivos con las proteínas, generan productos tóxicos, por ejemplo: el $O_2 \cdot^-$ al reaccionar con el radical

libre del óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) forma el peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$); a pH fisiológico este compuesto reacciona con proteínas y se descompone en productos tóxicos como el ión nitronio (NO^{2+}), el bióxido de nitrógeno (NO_2) y el $\cdot\text{OH}$ (Zentella y Saldaña, 1991).

La formación de radicales libres en el cloroplasto se lleva a cabo cuando se absorbe más luz que la que puede ser usada para las reacciones de fijación de CO_2 sobre todo en el rango de saturación de luz fotosintética. Esto lleva a una transferencia de energía a las moléculas de O_2 (Asada, 1992).

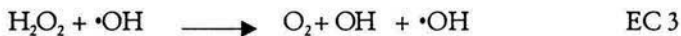
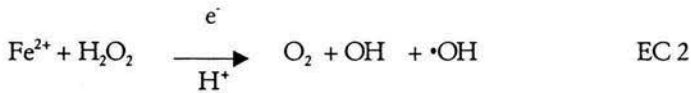
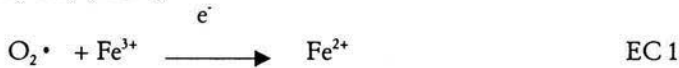
Los mayores procesos que consumen oxígeno asociados con la fotosíntesis y que pueden estar envueltos en la formación de radicales libres son: A) la reacción oxigenasa de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (RUBISCO) que inicia las reacciones de la vía fotorespiratoria, B) la reacción directa del O_2 por el PSI de la cadena de transporte electrónico, ciertos componentes del PSII que son capaces de reducir el O_2 , C) el O_2 también puede ser reducido por una vía respiratoria insensible al cianuro en el cloroplasto que compite por electrones con el transporte electrónico fotosintético, D) en la respiración mitocondrial (Foyer, *et al.* 1994).

Dos tipos de reacciones son importantes para la formación del $\text{O}_2\cdot$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, en el caso de los dos primeros radicales la reacción se denomina Reacción de Melher o Flujo Electrónico Pseudocíclico, mientras que el $\cdot\text{OH}$ se produce a partir de la Reacción de Haber-Weiss o la Reacción de Fenton (Foyer, *et al.* 1994; Asada 1992).

La Reacción de Melher consume equivalentes reducidos de los acarreadores de electrones del transporte electrónico fotosintético (el PSI, la ferredoxina reducida (Fed_{red}) y el centro X y/o B del PSII), los cuales tienen el suficiente potencial electroquímico para donar e⁻ al O_2 formando el $\text{O}_2\cdot$. Posteriormente la enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la formación del H_2O_2 y estas moléculas pueden reaccionar con el ascorbato vía el ciclo de la glutatión-ascorbato peroxidasa (APX) o una proteína hemo (peroxidasa (PXS), catalasa (CAT), etc.) para formar H_2O y O_2 . Este cambio es vital para proteger a las células contra el daño oxidativo provocado por la formación del $\cdot\text{OH}$, ya que su formación es muy tóxica y peligrosa porque son radicales altamente reactivos, interactúan prácticamente con la estructura molecular más cercana, y no se conoce un mecanismo especial de ruptura para ellos y eliminando los $\text{O}_2\cdot$ y H_2O_2 se inhibe la formación de estos radicales (Asada 1999; Foyer *et al.* 1994). El ascorbato utilizado por la APX puede ser regenerado por la oxidación en dos pasos; primero a un radical monodeshidroascorbato (MDH), el cual es reducido directamente por el NADPH (vía la enzima monodeshidroascorbato reductasa) y secundariamente a deshidroascorbato (DHA), éste es reducido (vía la deshidroascorbato reductasa) por la glutatión reductasa, utilizando glutatión reducido (GSF), éste a su vez se regenera utilizando NADPH (FIG. 1). El ascorbato no sólo sirve para reducir el H_2O_2 , sino también para reducir los pigmentos violaxantina y anteraxantina a zeaxantina, que posiblemente son los responsables de otro tipo de fotoprotección por medio de la disipación de energía de excitación, ya que es posible que la Reacción de Peroxidasas de Melher induzca el desarrollo de un gradiente de protones en el tilacoide que puede dar la energía para la fosforilación de ADP (puesto que soporta un flujo electrónico lineal sin consumo de ATP) y en el que se promueve la formación de zeaxantina (Demming-Adams y Adams III, 1992; Foyer *et al.*, 1994; Asada, 1992).

De acuerdo a Zapata *et al.* (1998) otra de las peroxidasas que está implicada en la degradación de H_2O_2 es la peroxidasa hidroquinona, la cual actúa como un acarreador de quinonas reducido del tilacoide, teniendo un doble efecto contra el estrés fotooxidativo (al disminuir la concentración de H_2O_2) y el nivel de formas reducidas de acarreadores electrónicos.

Por otra parte los radicales $\bullet OH$ se producen por la reacción de Fenton, la cual es catalizada por el Fe^{3+} . En esta reacción, cantidades traza de Fe^{3+} se reducen por el $O_2 \bullet$ para producir Fe^{2+} este reacciona con el H_2O_2 para la formación del $\bullet OH$ (Foyer *et al.* 1994) (EC 1 y 2). También se forma por la reacción de $O_2 \bullet$ con el H_2O_2 por la reacción de Haber-Weiss (EC 3) (FIG. 1)



La formación de los radicales libres en el PS II es por una acumulación excesiva de la energía luminosa en los pigmentos y proteínas del centro de reacción (RC) de este fotosistema (mayormente en la proteína D1, conocida como QB, con 32 KDa, y que es el acarreador de los componentes primarios de la secuencia de reacciones fotoquímicas de este complejo), formando un singulete de oxígeno, por la oxidación del fitocromo P_{680} por que este se excita llegando a un estado triplete P_{680}^* y dona sus electrones a el O_2 ya que el PSII no puede mantener a esta proteína en ese estado (Horton, *et al.* 1996).

Los productos de la reacción de Melher son especies potencialmente dañinas, por lo que la protección para el cloroplasto se lleva a cabo por la eliminación del oxígeno activo. Estos mecanismos pueden prevenir el daño a este organelo, manteniendo en equilibrio la producción de radicales libres, y cuando por alguna razón se excede la producción de radicales libres en los organismos y la capacidad de defensa antioxidante es ineficiente, se establece el estado denominado estrés oxidativo, en el se produce daño celular, que llega a ser muy severo y puede conducir a la muerte de la planta (Zentella y Saldaña, 1996, Schopfer, *et al.* 2001).

El estrés oxidativo luminoso es producto no solamente de la alta irradiación, sino de un incremento de la Radiación fotosintéticamente Activa (RFA o PAR) proveniente de la mayor absorción de luz, superior a la que se utiliza en la fotosíntesis. También se puede deber a un descenso de la fotosíntesis a una RFA constante. Si aunado a este estrés lumínico se le adicionan otros factores ambientales estresantes como el hídrico o térmico se puede dar una constante reducción en la fotosíntesis, dañando el cloroplasto, tiendo que ser reparado. Sin embargo, si a pesar de la utilización y disipación de energía por medio de la fotosíntesis, en combinación con el proceso fotoprotectivo, existiera insuficiencia para distribuir la luz absorbida, el aparato fotosintético puede ser dañado, llevándolo posteriormente a fotooxidarse y fotoinhibirse, aún si el factor estresante es suprimido (Demming-Addams y Adams III, 1992; Horton, *et al.* 1996).

Las plantas muestran un amplio rango de respuestas de protección ante el incremento de la PAR tales como: disminución en la absorción de radiación, incremento en la fijación fotosintética de CO_2 , disipación de la energía térmica a través del Ciclo de las Xantofilas, o eliminando las especies de oxígeno activo formadas por medio de un sistema enzimático detoxificador.

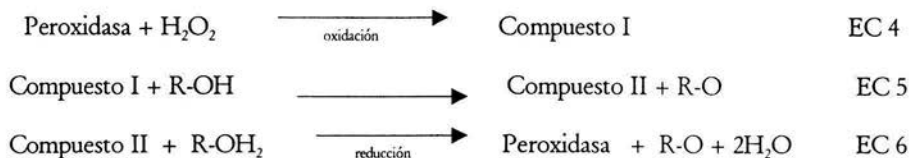
En suma, muchas de las enzimas catalizan procesos que llevan directamente a la reducción del oxígeno, que de cualquier forma son procesos de transferencia de electrones, como los de la respiración o la fotosíntesis, en los cuales una o dos reducciones de electrones del oxígeno ocurren por error y se desata un proceso destructivo. (Hendry, 1993).

Tales defectos de la transferencia de la cadena de electrones pueden ser detectados en tejidos senescentes, enfermos o sometidos a estrés. Se puede asegurar que pocos radicales de $\text{O}_2 \cdot$ son generadas en tejidos sanos. Sin embargo, los términos de salud pueden también implicar que cualquier forma activa de oxígeno sea rápidamente destruida, antes de que el daño ocurra. Es más razonable suponer que en toda transferencia de la cadena de electrones exista la posibilidad de que se desvien electrones hacia el oxígeno, y que esta posibilidad es mayor bajo estados de estrés o enfermedad, porque el mecanismo de respuesta no actúa normalmente, generándose un daño (Hendry, 1993).

El proceso de generación de radicales, en especial el H_2O_2 promueve que se incremente la generación de enzimas antioxidantes como las peroxidasas; antes que se presente algún daño en los tejidos y órganos de la planta, ya que el H_2O_2 puede ser utilizado como sustrato por estas enzimas y otro tipo de isoenzimas antes de que estas moléculas den origen a $\cdot\text{OH}$ (Ruci ska, *et al* 1999; Schopfer, *et al.* 2001; Pichorner, *et al.* 1992).

De acuerdo a lo antes expuesto se puede tener idea de que tan importante es la actividad de las peroxidasas, ya que controlan el nivel de peróxidos en la célula por la reducción del H_2O_2 a agua, aunque bajo ciertas condiciones el producto inicial puede ser el $\text{O}_2 \cdot$ (Pichorner *et al.*, 1992).

El paso inicial para la reacción catalizada por las peroxidasas involucra la unión del H_2O_2 con el grupo hemoférrico de la peroxidasa en su estado de valencia Fe(III) (ión férrico), seguido de su oxidación y el rompimiento de la unión O-O y la formación de un radical catiónico ferril (Fe [IV]=O) porfirina δ (Compuesto I), acompañado de la liberación de agua EC 4, seguido de la primera reducción de dos sustratos unidos (R - OH de la EC 4), que dona un electrón al compuesto I, reduciendo el catión porfirina, dando como resultado un compuesto ferril ((Fe [IV]=O) - enzima (Compuesto II). El sustrato reducido es liberado como un radical (R-OH de la EC 5). En el último paso del ciclo un segundo sustrato reducido se une, y dona un electrón al Fe (Fe [IV]=O) (ión ferril), dando como resultado la reducción del hemo a Fe (III), y con la adición de dos protones para liberar agua un segundo radical se genera en este proceso EC 6. La estequiometría de la reacción involucra 2 moléculas de sustrato oxidado por cada molécula de H_2O_2 reducido, con diferentes afinidades de unión del sustrato para los compuestos I y II (Bernards *et al.* 1999, Rodriguez y van Huystee, 1994).



Estas enzimas se distribuyen en diversas plantas, algunas bacterias y hongos, localizadas en el citoplasma, la membrana plasmática, espacios intercelulares, en organelos celulares (cloroplastos, mitocondrias), y asociados a paredes celulares de hojas tallos y raíz (Hamed, *et al.* 1998, Schopfer *et al.*, 2001, Kevers, *et al.* 1984, van Hustee 1987). Tienen un amplio uso en la industria, en medicina y en biología (Kwak *et al.*, 1995).

De acuerdo a lo anterior, la medición de los cambios en la actividad de peroxidadas, nos puede dar de una manera indirecta, una visión de los procesos de generación de radicales libres (Hendry, 1993, Asada, 1992) y de manera particular en cactáceas como *Neobuxbaumia tetetzo*.

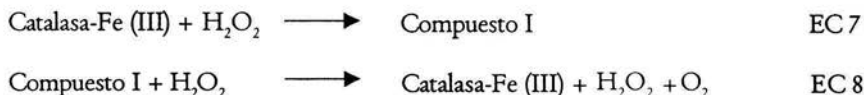
El estudio del metabolismo ayudara a establecer los mecanismos de adaptación de estas plantas a su ambiente, para lo cual el análisis de enzimas es indispensable. Se eligió a las peroxidadas como modelo, dado que como ya se ha descrito en las líneas anteriores, tienen un importante papel en la detoxificación de radicales libres especialmente en zonas de alta irradiación, además de participar en diversos eventos, dentro de los cuales están: la oxidación de moléculas, la biosíntesis de lignina y etileno, generación de hormonas, la degradación de lignina (Zentella y Zaldaña, 1996) la hidroxilación de prolina, además de intervenir en el desarrollo y organogénesis de las plantas vía la degradación de AIA (Pressey, 1990., Cabañas, 1999, Amako *et al.*, 1994).

Catalizando oxidaciones aeróbicas, hidroxilación de moléculas aromáticas, halogenaciones y por supuesto la oxidación peroxidativa de moléculas donadoras de electrones (Gaspar *et al.* 1982, Ruci ska, *et al.* 1999, Schopfer, *et al.* 2001), destoxificación de H_2O_2 (Lee y Kim, 1994), formando tres tipos de compuestos: denominados I, II y III (Bernards *et al.* 1999).

2.3 PEROXIDASAS IMPLICADAS EN LA DEGRADACIÓN DE RADICALES LIBRES.

2.3.1 CATALASAS (CAT).

Enzima que se encarga de eliminar el H_2O_2 dentro de la célula catalizando la reacción de la ecuación 7 y 8:



Muchas de las catalasas están constituidas de cuatro subunidades que contienen un grupo (Fe (III)-porfirina) unido a su sitio activo. Cada subunidad usualmente contiene una

molécula de NADPH unida a ella para estabilizar a la enzima (Halliwell y Gutteridge, 1995).

Es difícil saturar a la catalasa con H_2O_2 porque su K_m para la destrucción de esta molécula es enorme. La EC 7 y 8 muestra que se necesitan dos moléculas de H_2O_2 para la eliminación de este sobre el sitio activo de la enzima, este proceso disminuye cuando la concentración del sustrato disminuye. La descomposición del H_2O_2 puede registrarse por la absorbancia a 240 nm, o por mediciones polarográficas. La catalasa puede ser inhibida por la azida de sodio, cianuro, ácido salicílico, y por el aminotriazol. Al separar en subunidades a la catalasa se obtiene una baja actividad, esta enzima tiene actividad peroxidasa con un amplio rango de sustratos, incluyendo el NADH (Halliwell y Gutteridge, 1995).

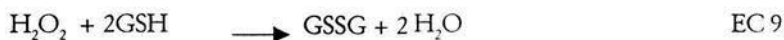
Solo se localiza en el peroxisoma unida a membranas sencillas. La mitocondria, el retículo endoplásmico y el cloroplasto tienen poca actividad catalasa, así que cualquier H_2O_2 generado *in vivo* en estas partes no puede ser eliminado (Halliwell y Gutteridge, 1995).

La CAT es susceptible de fotoinactivación y degradación, su efectividad para eliminar el H_2O_2 es limitada por su localización sólo en el peroxisoma (Halliwell y Gutteridge, 1995).

2.3.2 GLUTATIÓN PEROXIDASAS

Su sustrato es el glutatión, presente en concentraciones en el rango milimolar (aproximadamente 10^{-3}). El glutatión libre generalmente se presenta en la forma de glutatión reducido (GSH) en lugar de oxidado (GSSG), pero tercera parte del glutatión celular puede estar unido como disulfuros a otros compuestos que contienen grupos -SH (Halliwell y Gutteridge, 1995).

La glutatión peroxidasa cataliza la oxidación de glutatión reducido (GSH) a oxidado (GSSG) a expensas de H_2O_2 (EC 9) y se localiza en el cloroplasto, citoplasma, y la mitocondria (Bowler *et al.* 1992).



La enzima es específica para GSH como donador de hidrógenos, pero puede aceptar otros peróxidos como también del H_2O_2 . Esta formada de cuatro subunidades proteínicas, cada una de las cuales contiene un átomo de selenio en su sitio activo, como selenocisteína (la cisteína tiene reemplazado un átomo de sulfuro por un átomo de selenio). El GSH aparentemente reduce el selenio y luego la forma reducida de la enzima con el H_2O_2 a una velocidad de $5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$. La concentración entre GSH/GSSG se mantiene elevada en la célula. (Halliwell y Gutteridge, 1995).

2.3.3 PEROXIDASAS NO ESPECÍFICAS (POX).

Las plantas contienen peroxididasas con un grupo hemo, capaces de actuar sobre un rango de sustratos amplio, son enzimas bifuncionales que pueden catalizar la reducción del H_2O_2 a H_2O y O_2 por usar una molécula del H_2O_2 como reductor (actividad catalasa), o una molécula orgánica reducida como pirogalol (actividad peroxidasa) (Miller *et al.* 2000).

Las peroxidasas de la clase III (POX) (TABLA 1) son relativamente estables a altas temperaturas, y su actividad es muy fácil de medir usando reacciones cromogénicas, con extractos celulares se usan sustratos artificiales a los que estas enzimas oxidan, en la presencia de H_2O_2 para dar productos coloridos, estos sustratos artificiales incluyen guaiacol, bencidina, y σ -dinizidina. Se han usado como modelo enzimático en estudios de la estructura de las proteínas, en reacciones y función enzimática y para diversas aplicaciones prácticas. Generalmente carecen de estricta especificidad hacia los reductantes, y algunas peroxidasas catalizan la oxidoreducción independiente del H_2O_2 .

Es difícil definir las funciones específicas de las peroxidasas individuales a causa de su baja especificidad *in vitro* y la presencia de muchas isoenzimas, frecuentemente los sustratos utilizados *in vivo* por estas peroxidasas no han sido identificados (Halliwell y Gutteridge, 1995).

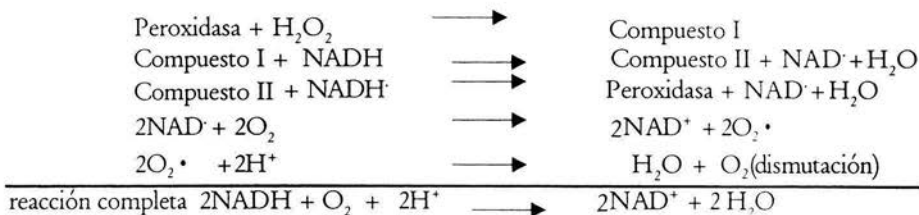
Las enzimas de la clase III se localizan en la pared celular y citósol o son transportadas dentro de la vacuola, pero no en organelos como el cloroplasto donde no se detecta actividad de estas enzimas (TABLA 1) (Bernads et al. 1999).

Las peroxidasas oxidan varios sustratos desde pequeñas moléculas hasta macromoléculas. Cinco aminoácidos separados posicionalmente son altamente conservados entre las tres clases de peroxidasas I, II y III, aunque con una baja homología en las secuencia, y son importantes para la catálisis y estructura, así como el plegamiento del polipéptido entero (Halliwell y Gutteridge, 1995).

Quizá la peroxidasa no específica más estudiada ha sido la peroxidasa de rábano obtenida de la raíz de esta planta (*Ammoracia lappathifolia*). Existen varias formas de la enzima, cada una de ellas contiene unidas iones de calcio y carbohidratos (glicoproteínas) combinadas a una ferriporfirina roja parda, pueden oxidar guaiacol, pirogalol, iones CN-NADH, compuestos tiol, fenoles, y el promotor de crecimiento AIA (ácido indol acético).

La oxidación por peroxidasas de rábano, y probablemente muchas otras peroxidasas, casi en todos los casos puede representarse por la reacción descrita anteriormente para las peroxidasas EC 4, 5 y 6 (Halliwell y Gutteridge, 1995).

La oxidación de NADH es un ejemplo de la reacción oxidada de la peroxidasa de rábano en la cual iguales cantidades de SH_2 y H_2O_2 se pueden formar y el O_2 no se consume, la reacción oxidada ocurre cuando el radical $SH\cdot$ puede reducir el O_2 directamente y no se produce con la adición de H_2O_2 , puesto que cantidades trazas de este siempre están presentes en las soluciones de NADH. La oxidación del NADH produce un radical $NAD\cdot$ el cual reduce el O_2 a $O_2\cdot$.



Los radicales NAD^\cdot se unen para dar un dímero NAD :



Esta reacción es más lenta ($K_2, 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) que la reacción del NAD con el O_2 , el radical superóxido generado en esta reacción puede combinarse con la peroxidasa de rábano para generar una forma de enzima conocida como *oxiperoxidasa* o *compuesto III* (Halliwell y Gutteridge, 1995).

$$\text{Enzima-Fe}^{3+} + \text{O}_2^\cdot \longrightarrow \text{enzima Fe}^{2+} - \text{O}_2^\cdot$$

Las oxiperoxidasas oxidan NADH muy lentamente, y esta acumulación durante la reacción, baja el grado de oxidación completa del NADH .

La lignificación de las paredes celulares de plantas involucra la polimerización de un número de fenoles derivados del aminoácido aromático fenilalanina. Las peroxidasa unidas a la pared celular funcionan para oxidar esos fenoles a *radicales fenoxi* los cuales se polimerizan para formar lignina. Una fuente para el H_2O_2 requerido para esta oxidación puede ser la oxidación simultánea por las peroxidasa del NADH generado por la enzima malato deshidrogenasa.

Como ya se menciona las peroxidasa están involucradas en la degradación de un regulador de crecimiento auxínico AIA y de esta manera en el crecimiento. Esta reacción es mucho más complicada que la reacción normal de la peroxidasa. La oxidación de la auxina puede dar lugar a la formación de un intermediario dioxetano-1 el cual se descompone a un compuesto carbonil en el estado excitado. Cuando este compuesto decae a un estado basal, emite luz y puede dar lugar a la formación de un singulete de oxígeno en su decaimiento, al indol-3-aldehído y al 3-metilenoxindol (Halliwell y Gutteridge, 1995).

2.3.4 ASCORBATO PEROXIDASAS (APX).

La ascorbato peroxidasa (APX) elimina el H_2O_2 y se localiza en el estroma, la membrana del tilacoide, el cloroplasto, el citósol de la mitocondria, el peroxisoma, y como una isoenzima soluble del citósol de la célula (cAPX) (Halliwell y Gutteridge, 1995).

Esta última isoenzima de 28 KDa responde ante el estrés lumínico y tratamientos con metil viológeno, no tan específica a el ascorbato como donador de electrones y puede aceptar otros sustratos como el pirogalol, en el periodo de estrés o en el restablecimiento no se detecta incremento de proteína de la cAPX, pero su actividad aumenta 1.7 veces cuando la planta se estresa, el nivel del H_2O_2 disminuye al cabo de 5 horas de actividad de cAPX (Yoshimura *et al.* 2000).

La enzima de la membrana peroxisomal (pAPX) en comparación a la cAPX tiene 31 Kda, y se ha localizado sobre estructuras membranosas en la calabaza, espinaca y pepino, caracterizándose bioquímica y enzimáticamente. Los estudios sobre la APX han sugerido que el H_2O_2 producido en los peroxisomas puede ser eliminado por la acción conjunta de la APX y la CAT, a causa de que la K_m para la APX por el H_2O_2 (30-80 μM) es mucho más baja que para la CAT, lo cual indica que la APX esta mejor adaptada para eliminar bajas concentraciones de H_2O_2 . La APX elimina el H_2O_2 que escapa fuera del citósol, de la destrucción por la catalasa. (Nito, *et al.* 2001).

En cloroplasto que no tiene actividad CAT, glutatión peroxidasa ó POX pero contiene la actividad de la enzima APX glicosilada, se lleva a cabo la reacción de la ecuación 10: $\text{Ascorbato} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{dehidroascorbato}$ EC 10

Por lo que la disminución del ascorbato causa una rápida inactivación de la forma cloroplástica no así de la citosólica, ya que la pAPX necesita como donador de electrones el ascorbato y tiene una vida muy corta en un medio carente de este sustrato.

Esta enzima puede ser inhibida por cianuro, azida de sodio, hidroxíurea, aminotriazol, p-aminofenol y el inhibidor específico hidroxilamina. La función de destrucción del H_2O_2 por esta enzima es probablemente una razón por la cual el cloroplasto contiene una concentración elevada de ácido ascórbico (Halliwell y Gutteridge, 1995). La APX expresa 2 isoenzimas en hojas de té (Asada, 1992).

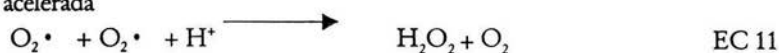
2.3.5 SUPERÓXIDO DISMUTASAS (SOD).

Presente en la matriz del cloroplasto y la membrana tilacoidal, también existe en diferentes formas en otros organelos como las mitocondrias y peroxisomas.

2.3.5.1 SUPERÓXIDO DISMUTASA COBRE-ZINC (CuZnSOD)

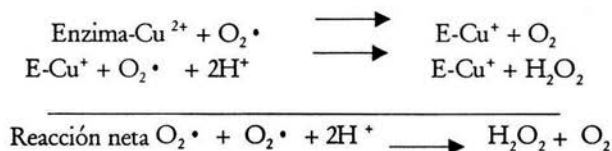
Esta enzima del estroma del cloroplasto (Bowler *et al.*, 1992) elimina catalíticamente los $\text{O}_2 \cdot^-$, no se ha podido encontrar otro sustrato sobre el cual actué esta enzima por lo que se considera específica para estos radicales. Las SOD son altamente estables y fáciles de aislar. Soportan la extracción con solventes como la acetona, son completamente resistentes al calor, al ataque por proteasas y a la desnaturalización por reactivos como cloruro de guanidina, dodecil sulfato de sodio (SDS), o urea. Se localizan en todas las células eucarióticas, pero no en las bacterias.

Tienen una masa molecular relativa de ± 32000 , formada de dos subunidades proteínicas cada una de las cuales con un sitio activo que contiene un ión cobre y un ión zinc (Halliwell y Gutteridge, 1995). La reacción que cataliza es la dismutación del $\text{O}_2 \cdot^-$ y es muy acelerada



La constante para la reacción depende fuertemente del pH de la solución y se da una velocidad de $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH fisiológico, esta enzima es inhibida por el cianuro, o por incubación prolongada con dietilditiocarbamato el cual elimina el cobre de la enzima.

Los iones cobre parecen que funcionan en la reacción por sufrir una alternación de reducción y oxidación por ejemplo:



Pero existe otro mecanismo factible de acción en el cual el primer radical

superóxido no reduce el ión cobre sino que forma un complejo con él. Mientras que el ión Zn^{2+} parece que no funciona en el ciclo catalítico solo estabiliza a la enzima, y este ión es reemplazable por otros iones como cobalto, mercurio o cadmio. La purificación y análisis de enzimas de las CuZnSOD ha demostrado la presencia de 2 isoenzimas con ligeras diferencias en semillas de trigo (Halliwell y Gutteridge, 1995). Con varias isoformas citosólicas pero una sola cloroplástica, las citosolicas se localizan en compartimientos celulares en el núcleo, tonoplasto, peroxisomas, en compartimientos apoplásticos y participan en la biosíntesis de lignina.

2.3.5.2 SUPEROXIDO DISMUTASA MANGANESO (MnSOD).

Estas enzimas de la matriz mitocondrial contienen manganeso en su sitio activo como Mn(III), no es inhibida por el cianuro o el dietilditiocarbamato, tiene una masa molecular relativa de 40000, es destruida por tratamiento con cloroformo y etanol, cataliza exactamente la misma reacción que las CuZn SOD. A pH 7 la constante para las dos enzimas es similar, pero la MnSOD disminuye a pH alcalino. Un pH elevado utilizado para medir la actividad en extractos, sobreestiman la cantidad de MnSOD en relación a la CuZnSOD, es mucho más labil a desnaturalización por calor, o químicos como detergentes, esta formada por 4 subunidades proteínicas (Halliwell y Gutteridge, 1995).

SUPERFAMILIA	CLASES
Catalasa	Catalasa
Peroxidasas de plantas	I Peroxidasas de la Mitocondria de la levadura CcP Peroxidasas del cloroplasto Peroxidasa bacterial con genes duplicados Ascorbato peroxidasas (APOX) Catalasa peroxidasa Citocromo c peroxidasa
	II Peroxidasas fúngicas secretoras A)Peroxidasa de lignina ó lignasa B) Peroxidasa dependiente de manganeso
	III Peroxidasa (POX) HRP peroxidasa de rábano Peroxidasa catiónica de cacahuete (CPRX) Peroxidasa aniónica de cacahuete (APRX). Peroxidasa aniónica de papa

TABLA 1. Las peroxidasas de plantas se han dividido en superfamilias en base a sus propiedades catalíticas y estructurales. Las enzimas de la clase I son intracelulares y prefieren el ascorbato como sustrato, las de la clase II son extracelulares, mientras que las de la clase III se localizan en la pared celular, el citósol, dentro de la vacuola, pero no están en el cloroplasto y prefieren el guaicol como sustrato (según Hiraga *et al.* 2001; Rodríguez y van Huystee, 1994; Bernads *et al.* 1999).

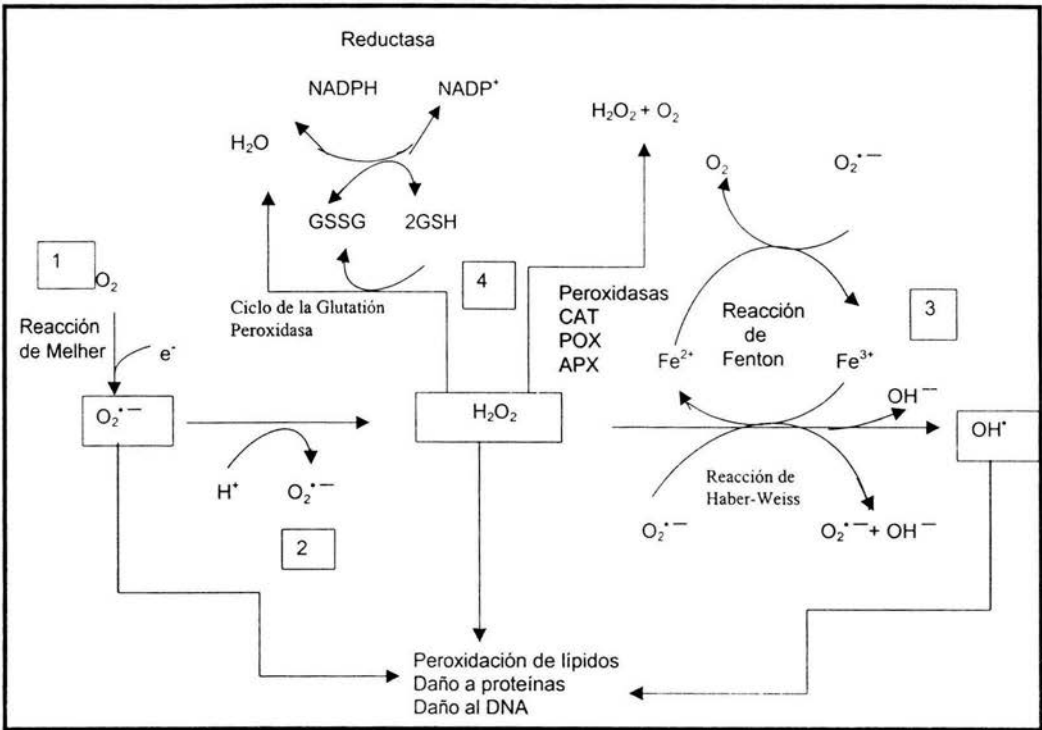


FIGURA 1. Muestra la interacción de las diferentes enzimas implicadas en el sistema detoxificador de radicales libres así como su formación. 1) Producción del radical superóxido por reducción de un electrón del oxígeno molecular por medio de la Reacción de Melher. 2) La SOD cataliza la formación del H_2O_2 . 3) Los dos mecanismos por los cuales se producen radicales hidroxilo a partir de la Reacción de Fenton y de Haber-Weiss. 4) El H_2O_2 puede destruirse por la reacción con el glutatión, o puede ser convertido a oxígeno y agua en la reacción mediada por la CAT u otra Peroxidasa (Modificación de Roskoski 1998; Bowler *et al* 1992).



3.0 ANTECEDENTES.

Se han utilizado varios métodos para la separación y medición de la actividad de peroxidadas de plantas.

Mitler y Zalinskas (1991) aislaron y caracterizaron la APX citosólica del ajo (*Pisum sativum* L.) reportando una isoforma con un peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante de 29.5 KDa y una *Km* para H_2O_2 de 20 μ M. Esta enzima tenía una estabilidad muy alta en un medio carente de ascorbato y un potencial para utilizar donadores de electrones alternativos como el pirogalol o guaiacol

Lee y Kim (1994) obtuvieron isoperoxidasas de raíz de rábano coreano, 2 catiónicas (C_1 , C_3) y cuatro aniónicas (A_1 , A_2 , A_{3n} , A_3). Purificaron y estudiaron las propiedades fisicoquímicas, cinéticas y catalíticas de estas enzimas, encontrándose con 4 isoperoxidasas mayores A_1 , A_2 , A_3 , C_3 , y cuatro menores C_1 , C_2 , C_{3n} , A_{3n} , la masa molecular relativa (*Mr*) para las peroxidadas aniónicas A_{3n} y A_3 fueron de 31000 y 50000 respectivamente y para C_1 , C_3 , A_1 y A_2 fue de 43500. El pH óptimo para la oxidación de la θ -dianizidina de C_3 y de A_3 fue de 5, mientras que para las isoperoxidasas C_1 , A_2 y A_{3n} fue de 4.5. La *Km* para C_1 , C_3 , A_1 , A_2 , A_{3n} , A_3 fue de 0.81, 1.2, 0.6, 0.63, 0.7, 0.6 mM respectivamente. Las dos peroxidadas catiónicas C_1 y C_3 tienen mayores valores de *Km* contra θ -dianizidina cuando se comparan con las peroxidadas aniónicas A_1 , A_2 , A_{3n} y A_3 .

Kwak, et. al. (1995) purificaron y caracterizaron las peroxidadas de cultivos celulares en suspensión de camote (*Ipomoea batatas*), obteniendo 3 peroxidadas aniónicas A-1, A-2, A-3, el peso molecular presentó valores para las 3 peroxidadas en el rango de los 40000 a 43000, el pH óptimo fue de 7.1 para A-2 y A-3, y de 7.5 para A-1, los valores de *Km* (nM) para H_2O_2 de las isoenzimas A-1, A-2 y A-3 fue de 2.65, 5.75, 2.78 respectivamente.

Padiglia et. al. (1995) estudiaron y purificaron las propiedades enzimáticas, físicas y químicas de la peroxidada de *Oportia*, obteniendo una sola isoforma con actividad enzimática en un rango de pH=5-8, y un peso molecular de 58000 \pm 2000.

Hamed et. al. (1998) estandarizaron técnicas para obtener procedimientos simples y reproducibles para la purificación de peroxidadas de la raíz de nabo y rábano picante a gran escala, dos formas de peroxidadas fueron extraídas, la soluble (S) y la iónicamente unida (IB), siete se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida, tres aniónicas y cuatro catiónicas de los extractos de la raíz de rábano picante y de nabo. Observaron que las partes con mayor actividad eran las SP_2 y la IBP_4 pero ésta última en menor porcentaje, la fracción SP_2 tenía un pH óptimo de 5.5, y la IBP_4 de 6 con una *Km* para H_2O_2 de 2×10^4 M, mientras que para la fracción IBP_4 fue de 2.5×10^{-5} M, se observó que la fracción SP_2 tenía mayor actividad.

Por otro lado los estudios referentes a formación de radicales libres y degradación de éstos por las isoenzimas peroxidadas y el comportamiento originado por la influencia de otro tipo de estrés:

Ruciuska et. al. (1999) examinaron la influencia del plomo a diferentes concentraciones, en la formación de radicales libres en raíces de *Lupinus luteus* siguiendo la

respuesta de las células de la raíz a las diferentes concentraciones de plomo por medio de patrones isoenzimáticos y por la actividad de las enzimas antioxidantes, encontrando que, a una concentración baja de plomo el nivel de radicales libres se mantiene baja, mientras que a niveles altos éstos se incrementan, también se observó que hay un incremento dependiente del tiempo de exposición al plomo en las actividades de enzimas tales como superóxido dismutasa, peroxidasa y ascorbato peroxidasa, mientras que las actividades de las enzimas catalasa y ascorbato peroxidasa bajan a altos niveles de plomo, además de que la expresión de isoenzimas de peroxidasa fue la única dependiente de la dosis, y que la exposición a éste estrés causa cambios en el patrón isoenzimático. Este estudio sugiere que si se sobrepasa el sistema antioxidativo sobrevienen efectos tales como la reducción del crecimiento radicular.

Existen además reportes referentes a estrés luminoso, formación de radicales libres originados por éste y sistemas enzimáticos degradadores de radicales libres de tipo peroxidasa como los realizados por:

Streb *et al.* (1997) analizaron los pigmentos relacionados con el sistema disipador de del exceso de energía (ciclo de las xantofilas) y el enzimático detoxificador realizaron ensayos con enzimas de la SOD, CAT, glutatión reductasa, guaiacol peroxidasa, glicolato oxidasa y APX en dos plantas del desierto *Raetama raetam* y *Atriplex halimus* como procesos fotoprotectores ante el estrés lumínico, comparándolas con organismos de la misma especie sometidos a condiciones favorables que no son silvestres, sus resultados sugieren que los organismos silvestres de *Raetama raetam* presentan una mayor concentración de pigmentos del ciclo de las xantofilas y actividad de las enzimas SOD y guaiacol peroxidasa, mientras que en *Atriplex halimus* silvestres la actividad de la SOD, APX y guaiacol es tres veces más alta y la concentración de pigmentos no cambia en relación a los sometidos a condiciones más favorables. Además sugieren que cada planta utiliza una estrategia diferente de protección ante el daño por estrés lumínico.

Zapata *et al.* (1998) investigaron la oxidación de la hidroxiquinona por dos peroxidadas de fracciones obtenidas de hojas de cebada soluble y tilacoidal, estudiando sus propiedades cinéticas y patrones zimográficos, observaron una oxidación de la hidroxiquinona dependiente del H_2O_2 adicionado al medio; en la fracción soluble se observaron 4 isoenzimas de peroxidadas mientras que en la tilacoidal solo 1, la Km_{app} aparente para la fracción tilacoidal y soluble fue de 50 y 60 μM respectivamente, mientras que la $Vmax$ (μmol de Q min^{-1} mg proteína $^{-1}$) fue de 0.3 para la fracción tilacoidal y de 1.8 para la fracción soluble. De acuerdo con estos investigadores la peroxidasa de hidroxiquinona del tilacoide tuvo mayor actividad cuando los segmentos de la hoja se incubaron a 22 °C bajo 46 Wm^{-2} de luz blanca que bajo 22 Wm^{-2} de luz blanca por 20 hrs. Sus resultados sugieren que la peroxidasa hidroxiquinona puede disminuir el aumento en la concentración de H_2O_2 bajo estrés oxidativo de la cadena de transporte electrónico al nivel de transportadores de quinonas, de esta manera la peroxidasa hidroxiquinona y la APX, pueden actuar como un mecanismo de defensa contra el estrés fotooxidativo y disminuir el nivel de formas transportadoras de electrones por medio de la eliminación del H_2O_2 del cloroplasto, que carece de catalasa.

Casano *et al.* (1999) evaluaron el papel del cloroplasto ante al estrés fotooxidativo en hojas de cebada de diferentes edades, investigando los efectos de las diferentes concentraciones del secuestrador de electrones metil viológeno en combinación con alta y

bajo intensidad de luz, en hojas en desarrollo y senescentes, para analizar los cambios en la actividad de las peroxidasas y los niveles de proteína de la SOD, la glutatión reductasa (GR) y la NADH deshidrogenasa de un complejo que incluye proteínas codificadas por los genes *ndh* del cloroplasto. La GR fue la más sensible a la inactivación ante el incremento del estrés fotooxidativo. La SOD se indujo preferentemente en hojas en desarrollo jóvenes, mientras que la NADH deshidrogenasa y la peroxidasa se indujeron en hojas adultas senescentes. Los resultados sugieren un papel limitado de la GR en la protección ante el estrés fotooxidativo y una cercana acción entre el complejo *ndh* y la peroxidasa. Se observó un aumento en la actividad de la peroxidasa en respuesta al estrés fotooxidativo el cual fue más pronunciado en hojas senescentes que en hojas en desarrollo, la mayor actividad de la peroxidasa se observó; al someter a las hojas a una concentración de 100 nM de metil viológeno, inactivándose la peroxidasa a 300 nM de metil viológeno con alta y baja intensidad de luz en hojas senescentes.

Yoshimura *et al.* (2000) analizaron las respuestas de las diferentes isoenzimas de la APX en hojas de espinaca bajo condiciones de estrés impuestas por altas concentraciones de luz, estrés hídrico, salinidad, metil viológeno y ácido abscísico, el nivel de transcripción de la APX aumenta marcadamente en respuesta al alto estrés luminoso y con metil viológeno pero no responde ante ningún otro factor de estrés, mientras que el nivel de la APX no cambió en el tilacoide, el estroma del cloroplasto y el peroxisoma bajo ningún tratamiento, Observaron un aumento en la actividad y transcripción de la APX citosólica durante una alta intensidad luminosa, pero no en el nivel de proteínas, las otras isoenzimas del estroma, membrana tilacoidal del cloroplasto, peroxisoma, citósol, y de la isoenzima citosólica soluble no presentaron cambios en el nivel de transcripción, proteína y en actividad, excepto por un descenso gradual en la actividad isoenzimática del cloroplasto, estas isoenzimas son expresadas constantemente bajo condiciones normales y estresantes, también obtuvieron un ligero estrés en plantas sometidas a alta intensidad luminosa por 5 hrs.

Algunos antecedentes citados anteriormente, hacen referencia a los sistemas enzimáticos de las peroxidasas como medios fotoprotectores que mantienen en equilibrio el nivel de radicales libres como el H_2O_2 , producto del transporte electrónico bajo niveles elevados de radiación para evitar el estrés fotooxidativo, pero hasta el momento no se ha analizado la participación de estos sistemas detoxificadores dentro del metabolismo de las cactáceas, y sobre todo no se conoce la actividad y expresión de estas peroxidasas en *Neobuxbaumia tetetzo*, cactácea endémica y dominante en el Valle de Tehuacán que tiene una alta probabilidad de contar con este tipo de fotoprotección por que a lo largo de toda su vida esta sometida a estrés lumínico, hídrico y térmico.

Es por eso que estas plantas han desarrollado una compleja maquinaria de defensa, por lo que observar el comportamiento de las peroxidasas tanto en su actividad como en su expresión, darán la pauta para poder entender estos procesos fisiológicos, proporcionando una visión de los mecanismos de adaptación de estas plantas a su ambiente por lo que se han planteado los siguientes hipótesis y objetivos:



4.0 HIPÓTESIS.

Los organismo jóvenes de la población de *Neobuxbaumia tetetzo* bajo nodrizaje de *Prosopis laeviagata* estará sometida menor estrés lumínico que los organismos de *N. tetetzo* aislado, lo que ocasionará diferencias en el patrón de expresión y actividad de peroxidadas solubles, dado que la producción de radicales libres será diferente en estas dos condiciones.

5.1 OBJETIVOS GENERALES.

Caracterizar la actividad aparente y patrones isoenzimáticos de peroxidadas solubles en organismos de *Neobuxbaumia tetetzo* jóvenes en diferentes porciones y orientaciones del tallo de la planta.

Establecer la relación entre los niveles de radiación a las 1500 hrs ocasionados por la orientación de la planta con respecto al sol y la actividad aparente, así como los patrones isoenzimáticos de las peroxidadas solubles.

Comparar la actividad de peroxidadas solubles y patrones isoenzimáticos en tetechos aislados y bajo nodrizaje de *Prosopis laeviagata*.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

Determinar que porción y orientación del tallo de *Neobuxbaumia tetetzo* aislada y bajo nodrizaje recibe mayor radiación

Establecer que porción y orientación del tallo de *Neobuxbaumia tetetzo* aislada y bajo nodrizaje presenta mayor actividad aparente de peroxidadas.

Observar las diferencias en el patrón de expresión de la electroforesis en geles de poliacrilamida sin desnaturalizar y desnaturalizantes

Realizar un analisis de similitud para obtener el Indice de Similitud de Jackard y establecer si existen diferencias debido a los niveles de radiación recibidos por cada porción y orientación del tallo de *Neobuxbaumia tetetzo* aislada y bajo nodrizaje.



6.0 METODOLOGÍA.

6.1 COLECTA DE MUESTRAS.

Se utilizaron 6 plantas en total de la población joven de *Neobuxbaumia tetetzo* de Zapotitlán Salinas Puebla, de organismos distribuidos aisladamente de arboles y arbustos, y bajo el nodrizaje de *Prosopis laevigata*, a las 15:00 hrs ya que esta hora corresponde a la de mayor radiación, en los meses de mayo y agosto del 2001.

Colectándose muestras de las costillas del tallo de 20 cm³, se cuidó que cada porción obtenida mantuviera una profundidad de 5 cm. Congelando en nitrógeno líquido, para su transportación fracciones de 3 porciones del tallo de la planta; ápical, media y basal, en dos diferentes orientaciones con respecto a la incidencia de radiación solar, la parte iluminada y la parte sombreada, eligiéndose a los organismos de 1 a 2 metros de altura, estos organismos representan a la población joven de la comunidad, cada muestra se colectó por triplicado.

Además se tomó la cantidad de Radiación Fotosintéticamente Activa (RFA o PAR) que recibe la planta en los meses muestreados, por medio de un radiómetro acoplado a un analizador de CO₂ por infrarrojo (marca LI-COR 3000 A).

6.2 AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS.

Todo el procedimiento de extracción se realizó a una temperatura de 4 a 8 ° C. Para la extracción se descongelaron las muestras y se homogeneizaron 10 gr. de tejido, tomando una porción de clorenucleoma e hidrenucleoma de la planta en un mortero con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.3 conteniendo polivinilpirrolidona (PVP) al 0.1%, el extracto se centrifugó a 18000 x g en una centrifuga refrigerada durante 10 minutos a 4° C, posteriormente se recuperó el sobrenadante (peroxidasa soluble), al cual se le determinó el contenido de proteínas total por el método de Bradford, mediante una curva de albumina de suero bovino de 10 a 50 µg (Bradford, 1976).

A partir de este paso se realizaron dos tipos de ensayos:

- 1) Registro de la actividad colorimétrica con ortodianizidina,
- 2) electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante y no desnaturizante.

6.3 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE PEROXIDASA.

Se tomaron 240 µg de proteína de cada extracto registrando la actividad de la peroxidasa a una absorbancia de 450 nm, utilizando o-dianizidina como sustrato, la mezcla de la solución contenía: 2000 µl de Buffer de Citrato de sodio 50 mM pH 4.8, con variaciones de 8, 16, 32, 64, 128 µM de ortodianizidina, 120 µl de H₂O₂ al 0.1%, el experimento se llevó a cabo en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2S. Se determinaron los parámetros cinéticos V_{max} y K_m (aparente), utilizándose dos replicas para cada ensayo. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y Pruebas de Tukey para saber si existían diferencias significativas entre la actividad de peroxidasa de las diferentes orientaciones y porciones del tallo de las plantas, así como entre individuos aislados y bajo nodrizaje.

6.4 ELECTROFORESIS DE GELES DE POLIACRILAMIDA.

Se llevó a cabo la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) al 12%,

utilizando dodecilsulfato de sodio (SDS) sólo en el caso de los geles desnaturalizantes (Laemli 1970), usando un sistema miniprotean II (Bio-Rad). Los geles se corrieron a 250 V, 50 mA por una hora en TRIS (1X) 2.48 mM, glicina 19.2 mM pH 8.3, adicionandole SDS al 0.1 % para los geles desnaturalizantes.

Se sembraron 15 μ g de proteína en cada poza, en el caso del gel desnaturalizante, se realizó la tinción con azul brillante de Coomassie R, utilizando un patrón de peso molecular (Protein Standards Bio-rad) conteniendo bandas de 10, 15, 25, 37, 50, 75, 100, 150 y 250 KDa, mientras que en el gel no desnaturalizante para obtener el patrón isoenzimático de peroxidasas se realizó la tinción con bencidina (4, 4'-Diaminobifenil) 3.8 mM como sustrato, H₂O₂ 45 mM y en acetato de sodio 100 mM pH 4.8, en cualquier caso se hizo un análisis de las bandas de los geles por medio del registro de la trasmittancia (densitometría) de estos en un transiluminador MultiImager™ LightCabinet Alpha Innotech Corporation, y con la ayuda del programa AlphaImager 2000. Se realizaron tres replicas de cada PAGE para cada caso.

Además se realizó un analisis con el Índice de Similitud de Jackard con las isoenzimas expresadas en cada gel con actividad peroxidasa y de proteínas totales.

IZT.





7.0 RESULTADOS Y ANÁLISIS.

7.1 EVALUACIÓN DE RADIACIÓN FOTOSINTÉTICAMENTE ACTIVA.

Se determinaron los valores de radiación fotosintéticamente activa (RFA) por medio de un radiómetro acoplado a un analizador de CO₂ por infrarrojo marca LICOR 3000 A en cada porción de *N. tetetzo* tanto aislados como bajo nodrizaje, con el fin de determinar si había diferencias en relación a la radiación recibida por cada una de estas.

TEMPERATURA PROMEDIO 33° C. ± 1

PARTE DEL TALLO DE LA PLANTA	TETECHO AISLADO	TETECHOBAJO NODRIZAJE
	PROMEDIO	PROMEDIO
Apical Iluminado	1538 ± 195.16*	537 ± 499.21*
Media Iluminado	1263 ± 663.26	780
Basal Iluminado	1296 ± 436.99	982 ± 472.34
Apical Sombreado	360 ± 244.65	174 ± 79.19
Media Sombreado	175	130
Basal Sombreado	305 ± 230.51	135 ± 3.53

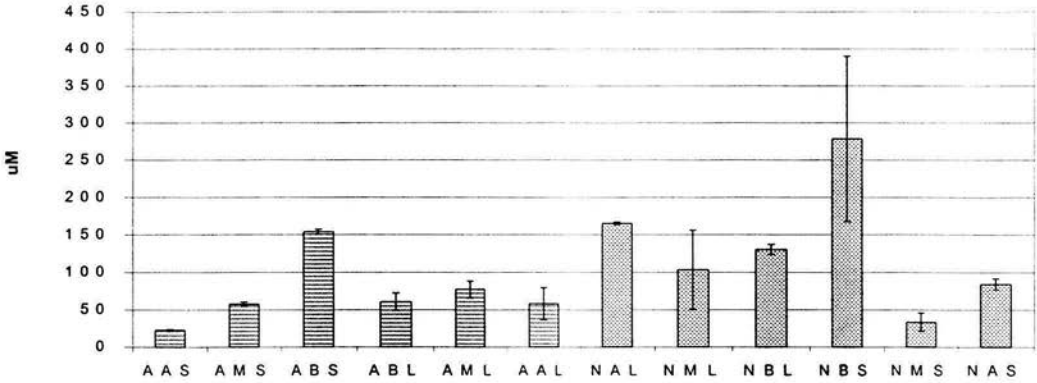
TABLA 2. Radiación en $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de *Neobuxbaumia tetetzo* a 33° C a las 15:00 hrs. Muestra la relación de los valores de radiación fotosintéticamente Activa (RFA). Los datos son promedio de 2 épocas de muestreo ± desviación estándar. *Porciones con diferencias significativas.

Los organismos de *N. tetetzo* aislados presentaron un aumento en los valores de radiación del 50 % con respecto a las plantas de *N. tetetzo* bajo nodrizaje, se observó una gradación en la radiación en las diferentes porciones del tallo, con un 24 % de mayor radiación en las porciones apicales de individuos aislados respecto a las porciones medias y basales; la cara de la planta que se expone al sol (lado iluminado) exhibió un aumento del 79 % de diferencia en relación a la no expuesta (lado sombreado), de igual manera en los individuos bajo nodrizaje la orientación iluminada mostró los más altos valores de radiación respecto a la sombreada con una diferencia del 82%, en contraste a los individuos aislados los individuos bajo nodrizaje reciben mayor radiación en la porción basal con un 36% respecto a la porción media y apical. Esto indicaría que las porciones del tallo sometidos a mayor radiación, correspondientes a las iluminadas y apicales de *Neobuxbaumia tetetzo* aislados, e iluminadas y basales de individuos bajo nodrizaje están sometidos a un mayor estrés lumínico (TABLA 2), esta radiación de zonas áridas es mucho mayor que la recibida por plantas de otras zonas.

7.2 PARAMETROS CINÉTICOS (Km_{app} y $Vmax$).

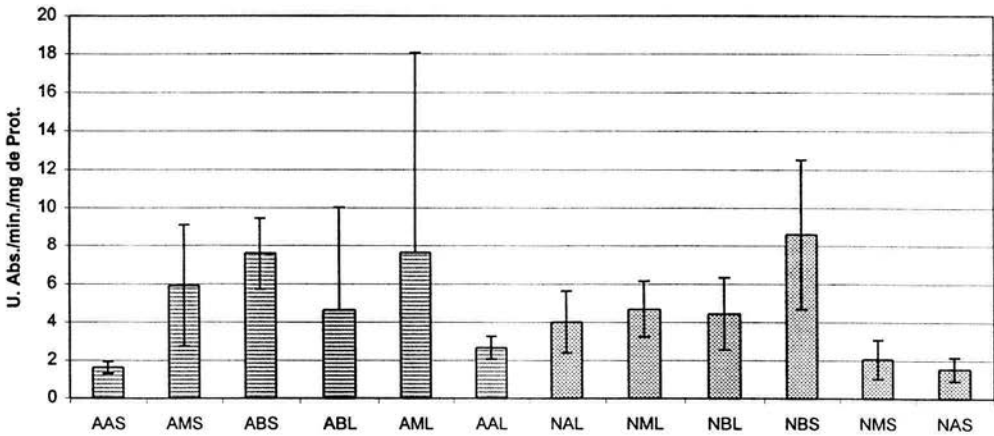
Se registró la actividad enzimática por colorimetría y se determinaron los parámetros cinéticos Km_{app} (aparente) y $Vmax$, para obtener las diferencias en la actividad enzimática de la peroxidasa en las diferentes porciones del tallo de *N. tetetzo* aislados y bajo nodrizaje sometidos a diferentes niveles de radiación, y comprobar si había relación entre la radiación captada y la actividad enzimática de la planta.

K_m app



GRÁFICA 1. Muestra el parámetro cinético K_m app en μM de cada porción analizada de *N. tetetzo* aislados y bajo nodrizaje. Los datos son promedio de 2 replicas realizadas \pm desviación estándar. A, N *Neobuxbaumia tetetzo* aislada ó bajo nodrizaje; A, M, B; porción apical, media ó basal; S, L; orientación sombreada ó iluminada.

V_{max}



GRÁFICA 2. Muestra el parámetro cinético V_{max} en U. Abs./min./mg. Prot. de cada porción analizada de *N. tetetzo* aislados y bajo nodrizaje. Los datos son promedio de 2 replicas realizadas \pm desviación estándar.

La GRÁFICA 1 indica que a pesar de no presentar diferencias significativas en algunos puntos, por las desviaciones tan altas que se registraron, los valores de Km_{app} para individuos aislados fueron menores que las pertenecientes a individuos bajo nodrizaje, mientras que los valores de $Vmax$ en general son mayores en los individuos aislados (GRÁFICA 2) esto indica que el efecto de un 55% de mayor radiación (TABLA 2) en los individuos aislados comparándolos con los individuos bajo nodrizaje, coincide con un aumento en la actividad enzimática para la fotoprotección, ya que se presentó mayor afinidad y velocidad de la enzima por el sustrato en los individuos aislados (GRÁFICA 1 y 2).

La menor Km_{app} en individuos aislados se registró en la porción AAS correspondiente a zonas con mayor radiación $360 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (TABLA 2), del mismo modo la orientación iluminada tuvo valores de Km_{app} menores, mientras que la porción media iluminada presentó mayores valores de $Vmax$ (GRÁFICA 1 y 2).

En cambio la menor Km_{app} en los individuos bajo nodrizaje se localizó en la porción media tanto iluminada como sombreada (TABLA 2), si se toma en cuenta que estas porciones reciben mayor radiación, ya que la porción apical crece bajo la sombra de la nodriza, es congruente que la Km_{app} es menor en la porción media de estos individuos, sin diferencias significativas en Km_{app} entre las orientaciones iluminada y sombreada (GRÁFICA 1).

La mayor Km_{app} se localizó en la porción basal tanto en individuos bajo nodrizaje como aislados, estas porciones recibieron la menor radiación en comparación a los ápices (TABLA 2, GRÁFICA 1). En los individuos aislados y bajo nodrizaje la mayor $Vmax$ se localizó en las bases (GRAFICA 2).

Se observó una mayor actividad de peroxidasa en las zonas más expuestas a la radiación, en los individuos aislados porciones apicales, y orientación iluminada, mientras que en individuos bajo nodrizaje no se presenta tan marcadamente por la sombra dada a *Neobuxbaumia tetetzo* por *Prosopis laevigata*, pero de algún modo la porción media recibió mayor radiación.

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial a los datos obtenidos de Km_{app} y $Vmax$ y prueba de Tukey para saber si existían diferencias significativas entre porciones (apical media y basal), orientaciones (iluminada y sombreada) del tallo de *Neobuxbaumia*, así como entre individuos aislados y bajo nodrizaje.

Se presentan diferencias en Km_{app} (Tukey $P=0.004$) entre individuos aislados y bajo nodrizaje (TABLA 4, APENDICE II b), con un $P\alpha_{0.05}=0.001$ (TABLA 5, APENDICE II b) por ANOVA multifactorial, reflejando el efecto significativo de la radiación sobre la actividad de las enzimas peroxidadas, con mayor actividad en individuos aislados por presentar valores menores de Km_{app} (GRAFICA 1) y valores mayores de radiación (TABLA 2) a diferencia de los *N. tetetzo* bajo nodrizaje.

Con un de $P\alpha_{0.05}=0.005$ se observaron diferencias significativas en Km_{app} entre las diferentes porciones del tallo de *N. tetetzo* y la orientación en la que se localizó esa porción (TABLA 5 y 6 APENDICE II b y c).

Se presentaron diferencias altamente significativas Km_{app} entre las diferentes porciones del tallo de la planta: apical, media y basal con una $P=0.0009$ (TABLA 5 y 6 APENDICE II b y c) en *N. tetetzo* aislados y bajo nodrizaje $P=0.04$ (TABLA 5 y 6 APENDICE II b y c) y por Tukey (TABLA 4, APENDICE II b) lo que indicó que la radiación tuvo efecto sobre las peroxidadas por observarse diferentes valores de Km_{app} en las distintas porciones del tallo de la planta, presentando valores menores de Km_{app} en el ápice de individuos aislados y en la porción media de individuos bajo nodrizaje (GRAFICA 1). Reflejándose el efecto de radiación recibida en estas porciones, ya que las porciones que recibieron mayor radiación fueron las apicales (con 24 % de mayor radiación) de los individuos aislados, y las porciones medias (con 22 % de mayor radiación) de los individuos bajo nodrizaje (TABLA 2).

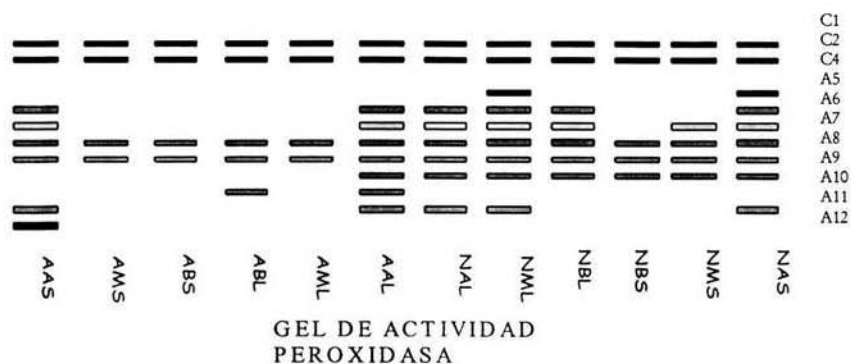
No existen diferencias en Km_{app} al relacionar los tres factores porción, orientación e individuos con una $P=0.30$ (TABLA 5, APENDICE II b) por ANOVA multifactorial y por Tukey (TABLA 6, APENDICE II c).

Con relación a $Vmax$ no se presentaron diferencias significativas entre individuos $P=0.60$, ni entre orientaciones $P=0.94$, ni al comparar las orientaciones entre individuos aislados y bajo nodrizaje $P=0.90$, tampoco entre porciones $P=0.16$, ni en porciones al comparar los dos individuos $P=0.51$, ni en las porciones entre las dos orientaciones $P=0.28$ (TABLAS 7, APENDICE II d).

Si bien no se observan diferencias en el parámetro $Vmax$ del extracto crudo posiblemente el valor específico de algunas o varias enzimas podría variar, ya que se tienen todo un conjunto de isoenzimas de peroxidasa que enmascaran la velocidad real, además de algunos otros compuestos que pueden interferir en la reacción como la concentración de componentes precursores de lignina.

7.3 EXPRESIÓN E INTENSIDAD DE ISOENZIMAS DE PEROXIDASA POR MEDIO DE GELES DE POLIACRILAMIDA NO DESNATURALIZANTES

Se obtuvo el patrón de expresión de isoenzimas con actividad de peroxidasa por electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes, con el fin de determinar si había alguna correlación entre la radiación y la expresión de peroxidadas (ESQUEMA 1), además de las GRAFICAS 3 a la 13 que muestran las diferencias en intensidad de cada isoenzima expresada con actividad peroxidada, en las 6 porciones del tallo de *N. tetetzo* aislados como bajo nodrizaje, obtenida por densitometría con ayuda del programa AlphaImager 2000.



ESQUEMA 1. Muestra las diferentes isoenzimas expresadas con actividad peroxidasa en las 6 porciones obtenidas de *N. tetetzo* aislados y bajo nodrizaje. Cn isoenzima catiónica, An isoenzima aniónica.

En expresión isoenzimática se presentaron diferencias entre individuos aislados y bajo nodrizaje, las isoenzimas A10 y la A12 solo se presentaron en los individuos aislados en las porciones que recibieron mayor radiación y no se expresaron en los individuos bajo nodrizaje, en estos últimos las isoenzimas C4 y la A9 no se expresan en los individuos aislados (ESQUEMA 1).

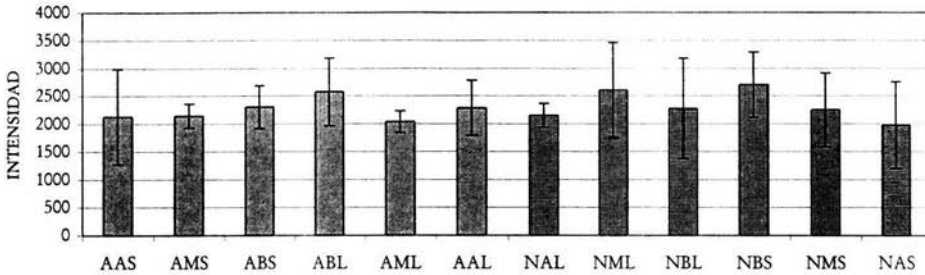
Las isoenzimas constitutivas que se expresaron en todas las porciones de los individuos tanto aislados como bajo nodrizaje fueron la C1, C2, A7 y A8, a diferencia de las isoenzimas C4, A5, A10, A11 y A12 que se expresaron en las porciones que estuvieron sometidas a un mayor estrés por las condiciones de mayor radiación (apicales e iluminadas) tanto en individuos aislados como bajo nodrizaje (ESQUEMA 1).

La isoenzima C4 se expresó en las porciones NML y NAS de *N. tetetzo* bajo nodrizaje, A5 se expresó en AAS y AAL de individuos aislados y en las porciones NAL, NML, NBL y NAS en individuos bajo nodrizaje, A6 se localizó en la mayoría de las porciones de individuos bajo nodrizaje pertenecientes a las porciones NAL, NML, NBL, NAS y NMS, a diferencia de *N. tetetzo* aislados en los cuales esta isoenzima se expresó en las porciones AAS y AAL, A9 se expresó en NAL, NML, NBL, NAS y NMS de individuos bajo nodrizaje, A10 solo se expresó en las porciones ABL y AAL de individuos aislados, mientras que A11 se expresó en la porción AAL como en la AAS de individuos aislados y en las porciones NAL, NML y NAS de individuos bajo nodrizaje, por último A12 solo se expresó en la porción AAS (ESQUEMA 1).

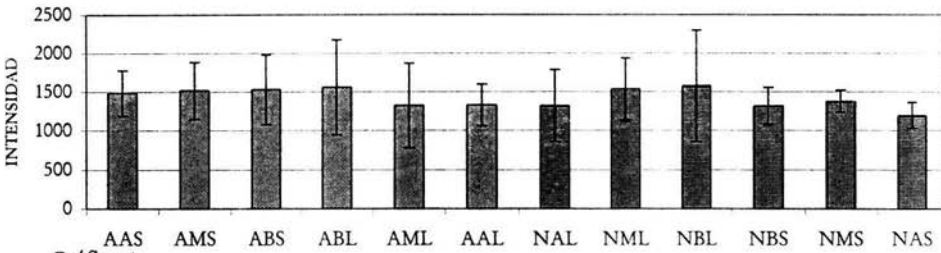
Los ápices y las partes iluminadas presentaron un número mayor de isoenzimas. Varias de las isoenzimas que se expresaron en las diferentes porciones de los individuos bajo nodrizaje no se expresaron en los aislados, los cuales están sometidos a un mayor estrés lumínico por recibir una radiación entre $1538-175 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mayores a los recibidos

por *N. tetetzo* bajo nodrizaje con valores entre 982-130 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (TABLA 2), y un patrón de expresión constante, con mayor número de isoenzimas expresadas en todas las porciones de estos individuos (ESQUEMA 1).

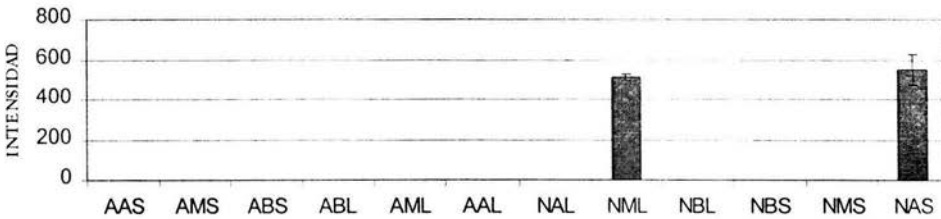
7.4 INTENSIDAD PEROXIDASA DE LAS ISOENZIMAS EXPRESADAS EN CADA PORCIÓN DE *N. tetetzo* TETECHO AISLADO Y BAJO NODRIZAJE.



Gráfica 3

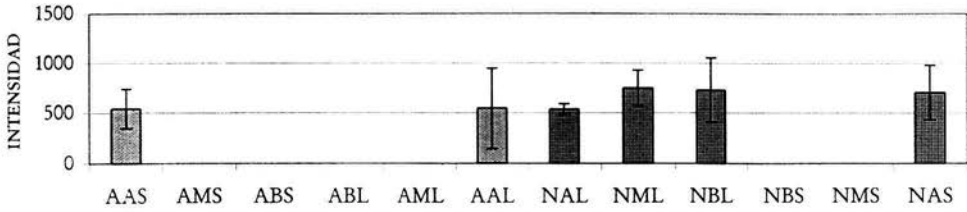


Gráfica 4

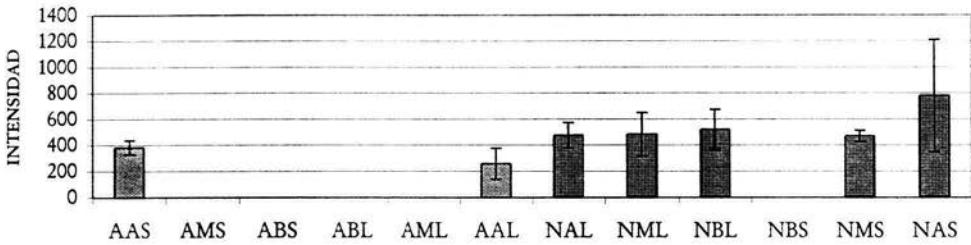


Gráfica 5

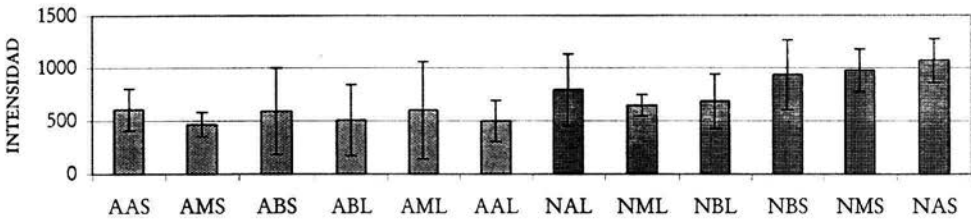
GRÁFICAS 3, 4 y 5 muestran la intensidad de la isoenzima C1, C2 y C4 respectivamente, con actividad peroxidasa expresada en las diferentes porciones analizadas de *N. tetetzo* aislados y bajo nodrizaje. Los datos son promedio de 3 réplicas \pm desviación estándar



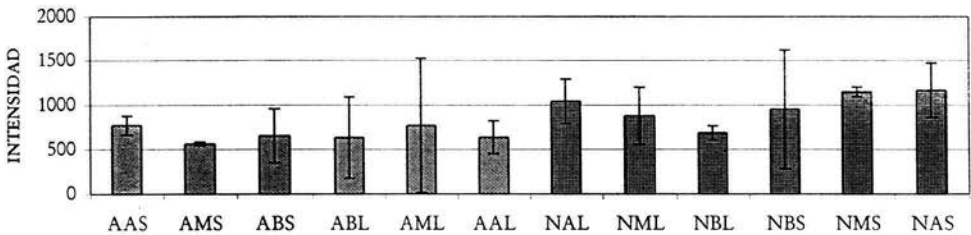
Gráfica 6



Gráfica 7

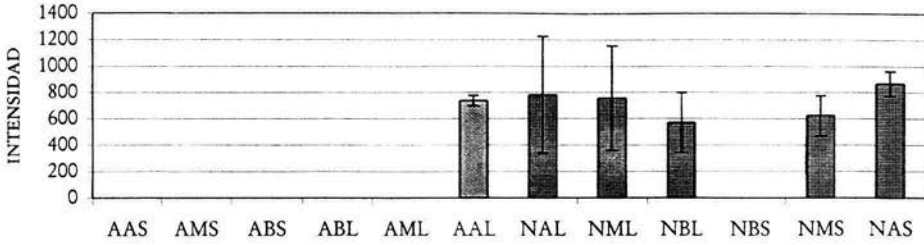


Gráfica 8

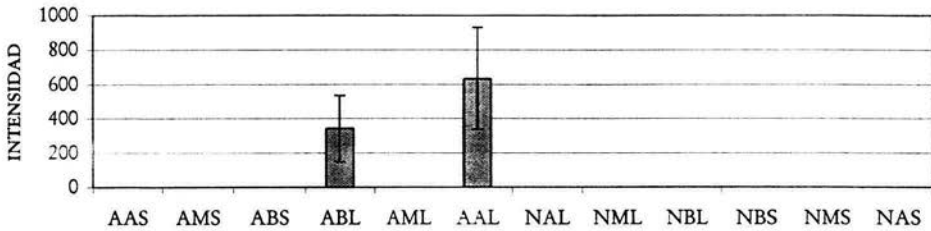


Gráfica 9

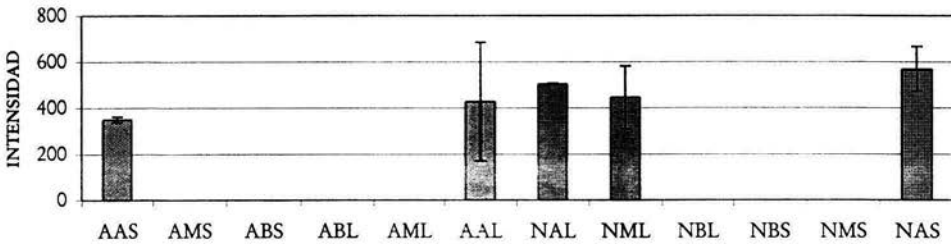
GRÁFICAS 6, 7, 8 y 9 muestran la intensidad de las isoenzima A5, A6, A7 y A8 respectivamente, con actividad peroxidasa expresada en las diferentes porciones analizadas de *N. tetetzo* aislados y bajo nodrizaje. Los datos son promedio de 3 réplicas \pm desviación estándar.



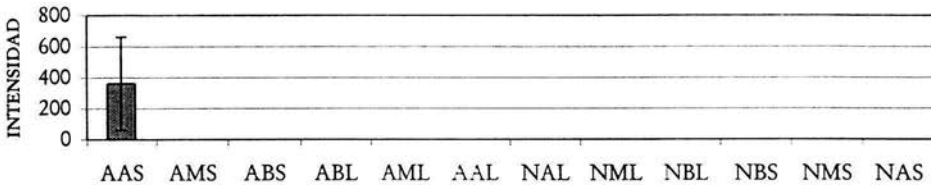
Gráfica 10



Gráfica 11



Gráfica 12



Gráfica 13

GRÁFICAS 10, 11, 12 y 13 muestran la intensidad de las isoenzima A9, A10, A11 y A12 respectivamente, con actividad peroxidasa expresada en las diferentes porciones analizadas de *N. tetetzo* aislados y bajo nodrizaje. Los datos son promedio de 3 réplicas \pm desviación estándar.

7.5 ANÁLISIS DE INTENSIDAD. *N. tetetzo* AISLADOS Y BAJO NODRIZAJE.

Las isoenzimas C1, C2, C4, A5, A10, A11 y A12 no presentaron diferencias en intensidad peroxidasa en ninguna porción expresada tanto de *N. tetetzo* aislados como bajo nodrizaje (Gráficas 3, 4, 5, 6, 11, 12 y 13).

Sólo se observaron diferencias significativas en la intensidad de la actividad peroxidasa las siguientes porciones de individuos aislados como de individuos bajo nodrizaje,

La isoenzima A6 solo presentó mayor intensidad y menor variación en la porción AAS respecto a la AAL (Gráficas 7).

En la isoenzima A7 se presentó mayor intensidad en AAS con respecto a AAL, con igual variación en las dos porciones. En contraste, en los individuos bajo nodrizaje la mayor intensidad y menor variación se expresó en la porción apical sombra respecto a la apical iluminada, entre la bases iluminada y sombreada la segunda porción presentó mayor intensidad, las dos porciones cuentan con la misma variación, en los individuos bajo nodrizaje, al comparar los lados iluminado y sombreado el segundo es el que presentó la mayor intensidad para esta isoenzima (Gráficas 8).

Para la isoenzima A8 entre las porciones AAS y AAL de los individuos aislados se localizó mayor intensidad en la primera porción con menor variación, entre las orientaciones iluminada y sombreada se presentó mayor intensidad en la iluminada con menor variación. En cambio en los individuos bajo nodrizaje al comparar los ápices NAS y NAL se presentó mayor intensidad en NAS con igual variación para las dos porciones, entre NML y NMS en esta última porción se presentó la mayor intensidad y la menor variación (Gráficas 9).

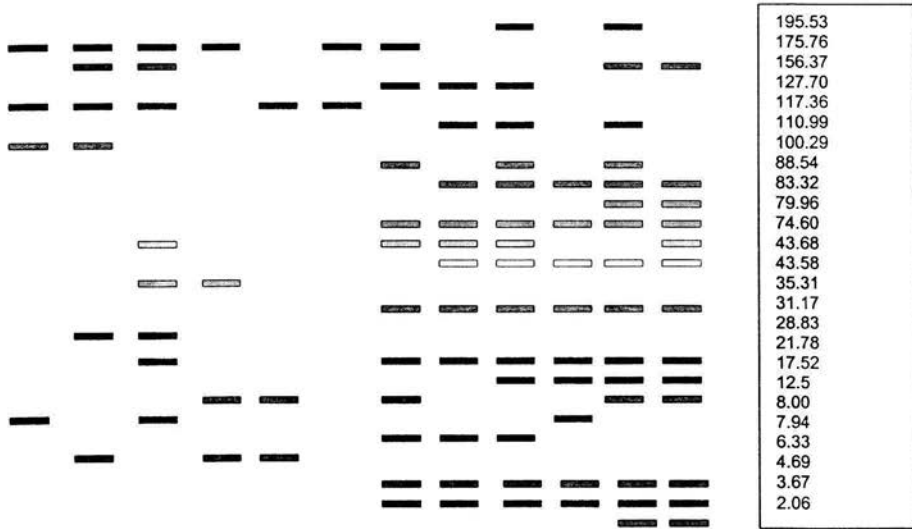
A9 expresada en los individuos bajo nodrizaje tuvo mayor intensidad en NAS y menor variación con respecto a NAL, mientras que la porción NBL tiene menor intensidad y variación que las otras porciones iluminadas de estos individuos (Gráficas 10).

Isoenzimas como la A7, A8 y A9 presentaron mayor intensidad, en porciones correspondientes a mayor radiación, como la apical e iluminada de *N. tetetzo* aislados y basal e iluminada de *N. tetetzo* bajo nodrizaje, en el caso de la A7 en *N. tetetzo* aislados porciones AAS y AML y en nodrizaje en NBS, en A8 en *N. tetetzo* aislados porción AAS, en A9 en *N. tetetzo* bajo nodrizaje porción NBL.

Puede ser que las isoenzimas implicadas en la fotoprotección sean la A8 por presentar mayor intensidad en los *N. tetetzo* aislados sometidos a un mayor radiación, además de otros factores como baja humedad y altas temperaturas.

7.6 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR MEDIO DE GELES DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTES

Se realizaron geles de poliacrilamida desnaturalizantes para determinar el patrón de ausencia o presencia de cada banda de proteína desnaturalizante, con un peso molecular determinado en Kilodaltons (KDa) en las diferentes porciones y orientaciones del tallo de *N. tetetzo* aislados y bajo nodrizaje, por densitometría con ayuda del programa AlphaImager 2000.



AAS AMS ABS ABL AML AAL NAL NML NBL NBS NMS NAS

ESQUEMA 2. Muestra las diferentes bandas de proteína desnaturalizadas y determinadas que se expresaron con su peso molecular, en las 6 porciones de *N. tetetzo* aislados y bajo nodrizaje determinadas.

La siguiente descripción se enfoca solo a las más importantes con respecto a la orientación o a la porción del tallo de *N. tetetzo* aislados y bajo nodrizaje:

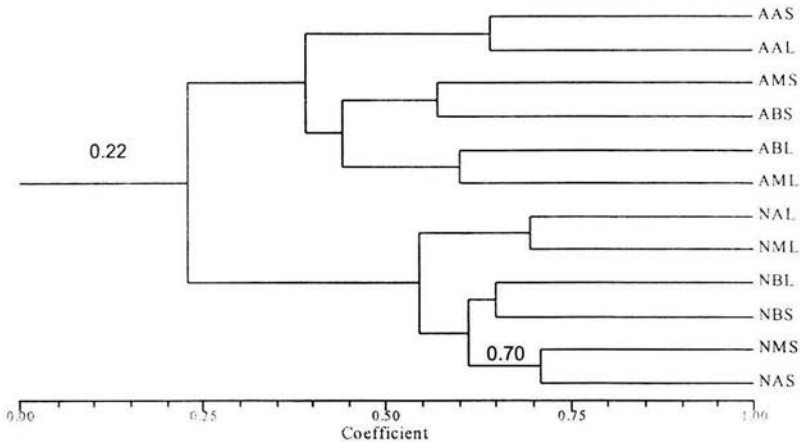
Las bandas correspondientes a pesos moleculares entre 156.37 y 8.00 KDa se localizaron en la porción sombreada tanto de *N. tetetzo* aislados como bajo nodrizaje (ESQUEMA 2). Mientras que en los aislados solo las bandas con pesos correspondientes a 100.29 y 28.83 se localizaron en la porción sombreada (ESQUEMA 2).

Para los individuos bajo nodrizaje las bandas con pesos entre 195.53 y 79.96 se localizaron en la porción sombreada, las de 127.70, 110.99, 7.94 y 2.06 se localizaron en la porción iluminada de estos individuos, las demás bandas se localizaron en diferentes porciones tanto de los individuos aislado como bajo nodrizaje y no siguen un patrón (ESQUEMA 2).

Del mismo modo que en el gel de expresión de actividad peroxidasa en estos geles se observó que el número de bandas de proteínas expresadas para los individuos aislados fue menor que para los individuos bajo nodrizaje.

7.7 ANALISIS DE SIMILITUD DE LAS ISOENZIMAS DE PEROXIDASA Y PROTEÍNAS EXPRESADAS.

Posteriormente se realizó un análisis de presencia y ausencia de cada isoenzima expresada con actividad peroxidasa y de proteínas totales en las diferentes porciones del tallo tanto de *N. tetetzo* aislados y bajo nodrizaje, para determinar la relación de similitud que presentaba cada porción con respecto a otra y entre individuos aislados y bajo nodrizaje, obteniéndose el siguiente árbol de similitud, mediante el programa NTSYSpc 2.02i.



ESQUEMA 3. Árbol de similitud indicando las semejanzas existentes entre las diferentes porciones del tallo de individuos aislados y bajo nodrizaje y entre ambos individuos. Los valores representan el Índice de Similitud de Jackard (ISJ), Coeficiente de correlación $r=0.93$.

De acuerdo a la matriz de similitud se presentaron diferencias entre los individuos aislados y bajo nodrizaje, cada individuo se agrupó por porciones, presentándose menor similitud entre los individuos aislados y bajo nodrizaje y no se relacionaron porciones de los *N. tetetzo* aislados con los individuos bajo nodrizaje, reflejando el efecto de la radiación ya que los individuos aislados que recibieron mayor radiación, tuvieron valores de Km_{app} menores y menor expresión isoenzimática que los individuo bajo nodrizaje estos últimos sometidos a condiciones más favorables por la protección proporcionada por *P. laevigata*, como menor radiación por lo tanto mayores valores de Km_{app} y mayor expresión de peroxidasa, tal vez la cantidad de isoenzimas este determinada por las condiciones microambientales, porque en los individuos aislados no se presentaron las condiciones adecuadas para que se expresaran todas las isoenzimas que se expresaron en los *N. tetetzo* bajo nodrizaje (ESQUEMA 3).

Al realizar una comparación entre individuos, se observó una menor similitud entre las diferentes porciones del tallo de individuos aislados con un ISJ=0.22 en comparación a los individuos bajo nodrizaje, debido a la diferencia de radiación recibida en las diferentes porciones del tallo así como en orientaciones (TABLA 2 y ESQUEMA 3).

En los individuos aislados las porciones apicales (AAS y AAL) que recibieron un 24 % más de radiación con respecto a las porciones media y basal (TABLA 2), son más similares entre si con un ISJ=0.64 además de presentar mayor afinidad enzimática (GRÁFICA 1), en contraste las porciones medias y basales en base a la orientación, la iluminada con un ISJ=0.60 tuvo mayor similitud que la sombreada con un valor ISJ=0.57, esto fue debido a que la porción iluminada recibió un 79 % de mayor de radiación que la sombreada (TABLA 2), marcando una considerable diferencia en radiación, expresada como una mayor similitud, cabe destacar que la porción iluminada tiene actividad enzimática (GRÁFICA 1, ESQUEMA 3).

Por otra parte los individuos bajo nodrizaje presentaron una relación clara de agrupación y similitud por orientación; la unión entre las porciones apical y media con un ISJ=0.69 para la orientación iluminada, y un ISJ=0.70 para la sombreada, la radiación recibida por la planta, que para la porción iluminada fue de un 81 % más que para la sombreada, teniendo en mente que la porción media presentó la mayor actividad enzimática (GRÁFICA 1). A diferencia de las anteriores las porciones basales sombreada e iluminada presentan la menor similitud con un ISJ=0.65, estas recibieron un 36% más de radiación que las porciones medias y apicales (TABLA 2), aun cuando no hay diferencias en la actividad enzimática entre orientaciones en los individuos bajo nodrizaje (GRAFICA 1, TABLA 5 APENDICE II b) el árbol de similitud indica que si se presentan diferencias (ESQUEMA 3).



8.0 DISCUSIÓN.

Los individuos de *N. tetetzo* aislados estuvieron sometidos a un mayor estrés lumínico registrándose mayores valores de radiación hasta en 55 % más en comparación a los *N. tetetzo* bajo nodrizaje de *P. laevigata*, debido a que los individuos aislados no cuentan con las ventajas microclimáticas proporcionada por la planta nodriza, y están expuestos a condiciones ambientales más extremas; como temperaturas del suelo cercanas a los 40 °C o mayores por lo que están sometidos a un mayor estrés (Chavéz 2000, Godínez-Álvarez y Valiente-Banuet, 1998), en contraste los *N. tetetzo* bajo nodrizaje registran valores de radiación menores, confirmando lo reportado por Valiente-Banuet (1991a) (citado por Godínez-Álvarez y Valiente-Banuet, 1998) y Cruz *et al.*, (1997) la radiación electromagnética que reciben los *N. tetetzo* bajo nodrizaje baja hasta en un 94 % con respecto a los *N. tetetzo* que se desarrollan en espacios abiertos, así como ventajas proporcionadas por la asociación: mayor retención en la humedad del suelo, micrositios sombreados, menor radiación solar directa, menor temperatura ambiental durante el día, menor evaporación, temperaturas del suelo menores que en las áreas abiertas, mayor contenido de nutrientes (Godínez-Álvarez y Valiente-Banuet, 1998; Shreve, 1931; Valiente-Banuet y Ezequiel, 1991; Nolasco *et al.*, 1997).

Los valores de radiación obtenidos para esta cactácea en otras especies resultarían fotoinhibitorias, como lo menciona Asada (1992) un valor de RFA de 500 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ produce fotoinhibición en diferentes plantas, mientras que para Cornic *et al.* (2000) 1080 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de RFA en plantas de ajo (*Pisan sativum*) son suficientes para provocar fotoinhibición, pero Nobel y Hartsock (1983) indican que las plantas de zonas áridas como *Opuntia ficus-indica* necesitan sobrepasar los 1150 $\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ por más de 6 horas para que una cactácea sufra fotoinhibición, también hay que tomar en cuenta que las plantas cuentan con diversos sistemas antioxidantes como: el sistema enzimático antioxidante y el disipador de energía (ciclo de las xantofilas) (Demming-Addams y Adams III, 1992), el primero de ellos es importante, ya que de acuerdo a los resultados obtenidos en plantas aisladas se presentó un aumento en la actividad cinética de peroxidasa y en las porciones más sometidas a estrés lumínico (apicales e iluminadas) traducida en una mayor afinidad enzimática, por la formación de radicales libres que se generan por esta alta radiación, a diferencia de los *N. tetetzo* asociados en los que no hay diferencias en orientación, solo en porciones medias donde se localiza la menor K_m app no se observa claramente la mayor actividad por el efecto de sombra producida por la nodriza.

Una evidencia de que los sistemas fotoprotectores están más activos en los organismos aislados sometidos a mayor radiación, se presenta en el trabajo realizado por Ordoñez 2002, que reporta en *N. tetetzo* aislados en la orientación iluminada, más desarrollado el ciclo de las xantofilas que en los *N. tetetzo* bajo nodrizaje, y es en estos últimos donde se presenta la condición opuesta, esto es que la orientación sombreada tiene el ciclo de las xantofilas menos desarrollado, esto es que un aumento de la RFA promoverá un incremento en los pigmentos del sistema disipador de energía en las plantas (sucede lo contrario en los porciones sometidas a una menor RFA donde este sistema se encuentra activo de manera parcial), con estos sistemas la planta es capaz de mantener su capacidad fotosintética elevada y por lo tanto

el flujo de electrones para que el sistema fotosintético no llegue a un estrés oxidativo (Loggini *et al* 1999, Miller *et al.* 2000), apoyando la teoría de un sistema fotoprotector eficiente en *N. tetetzo* aislados. Otra evidencia de que los sistemas fotoprotectores están más desarrollados lo menciona Streb *et al.* (1997) los cuales analizando los pigmentos relacionados con el ciclo de las xantofilas y el enzimático detoxificador en especies de zonas áridas en *Raetana raetan* y *Atriplex halimus* silvestres y domesticados sugieren que los organismos silvestres de *Raetana raetan* presentan una mayor concentración de pigmentos del ciclo de las xantofilas y actividad de las enzimas SOD y guaiacol peroxidasa que en la planta domesticada, mientras que en *Atriplex halimus* silvestres la actividad de la SOD, APX y guaiacol es tres veces más alta y la concentración de pigmentos no cambia en relación a los domesticadas.

Además la fotoinhibición se desarrolla solo si la planta se expone a altos niveles de luz, superiores a los que están sometidas durante su desarrollo y también se presenta en las hojas cuando se exponen a un estrés adicional, como un aumento o disminución de la temperatura y/o deficiencia de agua (estrés hídrico), localizado marcadamente en plantas de zonas áridas. Este estrés adicional disminuye la utilización de energía para la asimilación de carbono fotosintético, generando un aumento en la formación de radicales libres (Loggini *et al* 1999), en *N. tetetzo* los sistemas fotoprotectores están muy desarrollados así que la adaptación de esta planta a su ambiente es mayor y por eso, está libre de la fotoinhibición o tolera una irradiación mayor.

Las porciones AAL, AML, ABL, NAL, NML, NBL presentan valores de radiación mayores a los presentados en otros trabajos como fotoinhibitorios mientras que las porciones AAS, AMS, ABS, NAS, NMS, NBS presentan valores por debajo de este rango por lo que es posible que las porciones con mayor radiación de ambos *N. tetetzo* estén sometidas a un mayor estrés que la que están expuestas a menor radiación, tal vez estos altos valores de radiación para las porciones más expuestas, podrían incrementar el nivel de radicales libres, promoviendo con esto el aumento en la actividad de las enzimas de detoxificación peroxidadas en estas porciones de la planta, antes de que se presente un daño en los organelos celulares (Asada, 1992) o bien impidiendo la actividad de peroxidadas que participan en otros eventos celulares como división o crecimiento.

Aparte de las diferencias en los niveles de radiación para cada porción analizada Rojas-Aréchiga *et al.* (1997) menciona que los organismos de *N. tetetzo* tienen diferencias en temperatura por arriba de 10 ° C entre en el ápice y en la base, esta es mayor en la base, lo cual también puede ser que este repercutiendo en el comportamiento de la actividad y expresión de las isoenzimas de peroxidasa.

En el caso de *N. tetetzo* la radiación afecta tanto la actividad como la expresión de las isoenzimas peroxidadas en las diferentes porciones y orientaciones del tallo de la planta, en otras especies como *Escontria chiotilla* de la misma manera, se habla de un efecto de la radiación sobre la actividad fotosintética, ya que se presentan diferencias en la acidez titulable entre la porción joven (apical) y la porción vieja (basal) siendo mayor la incidencia de luz y actividad fotosintética en las apicales, en cuanto a orientación la porción sur (iluminada) recibe mayor radiación y valores mayores de actividad fotosintética (Mandujano, 2002), lo mismo puede

estar pasando en *N. tetetzo*, esto es una mayor actividad fotosintética por lo tanto un aumento en la generación de radicales libres producto de este aumento en la actividad fotosintética, ya que se obtuvo un mayor número de isoenzimas de peroxidasa expresadas, en las zonas sometidas a mayor radiación apical e iluminado de los individuos aislados y de los individuos bajo nodrizaje, esto indica que existen diferencias en el metabolismo de las plantas en las diferentes porciones del tallo.

La diferencias que se localizan en el individuo aislado a lo largo del tallo indica que los factores de radiación a la que están sometidas, como disminución de humedad y nutrientes por la falta de cobertura dada por una planta nodriza como *P. laevigata* están afectando a este organismo en su expresión, ya que se presentó menor expresión de isoperoxidasas en algunas porciones del tallo de la planta, pero mayor expresión en las zonas más expuestas a mayor radiación y con mayor intensidad como en la isoenzima A8, tal vez esta es la isoenzima implicada en el proceso de fotoprotección, mientras que las ventajas que le confiere la nodriza al individuo bajo nodrizaje permiten que la expresión diferencial de isoenzimas a lo largo del tallo de la planta sean similares.

Se obtuvieron en general 11 isoenzimas de dos clases de peroxidasa: 3 catiónicas (C1, C2, C4) y 8 aniónicas (A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12), algunas presentan diferente intensidad en cada porción de las plantas aisladas y bajo nodrizaje, otros autores han reportado diferente número de isoenzimas expresadas para diversas especies como; Lagrimini y Rothstein (1987) (citado por Hiraga *et al.* 2001) quienes encontraron 35 y 12 isoenzimas en extractos crudos de arroz y tabaco, Evans y Aldridge (1965) (citado por Padiglia *et al.* 1995) reportaron 6 y posteriormente 12 isoenzimas en botones de tomate, mientras que Padiglia *et al.* (1995) encontraron 1 isoforma en *Opuntia* tanto para el gel de actividad como para el gel desnaturante, Baier *et al.* (1993) localizaron en extractos crudos de álamo 8 isoenzimas, Lee y Kim (1994) localizaron en raíces de rábano coreano (*Raphanus sativus* L.) 2 isoenzimas de peroxidasa catiónica (C1 y C3) y 4 aniónicas (A1, A2, A3n, A3), Gubler y Ashford (1983) (citado por Clarkson *et al.* 1992) con buffer básicos encontraron 5 catiónicas en cebada, esto se debe a que cada planta responde de manera diferente ante un suceso determinado, no todas las plantas expresan la misma cantidad de isoenzimas de peroxidasa.

Existen tres maneras por las cuales pueden ocurrir cambios en la población de isoformas de peroxidasa de una especie analizada las cuales son mutuamente exclusivas: 1) expresión diferencial de un multifamilia genética, 2) splicing diferencial de RNAm recién formados, que genera secuencias codificantes que dirigen la síntesis de las diferentes isoenzimas, 3) que ocurra un procesamiento traduccional de las preproteínas como fosforilación, glicosilación, generación de diferentes estados de oxidación, eliminación de residuos terminales o diferentes estados conformacionales de la proteína. (Edwards, *et al.* 1994, van Huystee, 1987, Decedue *et al.* 1984) como ocurre en este estudio u otros.

Anteriormente se ha reportado que las peroxidasa se expresan diferencialmente ante una condición determinada, tal es el caso de las isoenzimas C4, A5, A10, A11 y A12 ya que estas se expresan en las zonas donde la radiación es mayor tanto *N. tetetzo* aislados como en *N. tetetzo* bajo nodrizaje, por ejemplo Lagrimini y Rothstein 1987 (citado por Hiraga *et al.*,

2001) reportan diferencias en la respuesta ante el estrés y la especificidad del órgano de las 12 diferentes isoenzimas del tabaco, el patrón de expresión cambia de acuerdo a su distribución en el órgano analizado, para corteza se expresan 4 isoenzimas, en hojas 5 isoenzimas mientras que en raíz y callos de expresan 8 isoenzimas del mismo modo que en este trabajo, para *N. tetetzo* las partes más expuestas al estrés expresan un mayor número de isoperoxidasas, también en especies de nabo y tabaco se menciona que la expresión diferencial de isoperoxidasas puede ser inducida por la luz (van Huystee y Cairns, 1982, Church y Galston, 1988). Puede ser que estas enzimas que se inducen en las porciones con mayor radiación estén protegidas por proteínas del tipo de chaperoninas que las protegen de la degradación por la luz, temperatura o proteasas y es por eso que soportan estos factores adversos (Miernik, 1999).

Todas las especies de plantas poseen un juego común de peroxidadas con características similares entre especies que se expresan constitutivamente (Hiraga *et al.*, 2001) como las localizadas en *N. tetetzo* aislados y bajo nodrizaje, las cuales son C1, C2, A7 y A8 que se expresan a lo largo de toda la porción del tallo analizado.

Algunas isoperoxidasas presentes en *N. tetetzo* bajo nodrizaje desaparecen en *N. tetetzo* aislados, esta supresión o falta de inducción algunos autores la atribuyen a diferentes factores del medio en las que se hayan presentes: una inadecuada condición para que la enzima funcione, desnaturalización por un aumento de temperatura o radiación (Adamska *et al.*, 1993), ó que no se active por la concentración de substrato presente (diferencias en K_m hacia el substrato, esto ocurre en algunas enzimas del sistema de detoxificación) (Yoshimura *et al.*, 2000), como en el caso de los individuos aislados. Miernik (1999) menciona que existen proteasas que degradan proteínas implicadas en el estrés oxidativo.

Además los factores que afectan la expresión y actividad de un grupo particular de enzimas protectoras contra el estrés oxidativo dependen del organismo, la naturaleza del cambio oxidativo, el tejido analizado, la hora del día. (Halliwell y Gutteridge, 1995), esta desaparición se ha reportado por autores como Golberg *et al.* (1986) quienes analizando tres porciones de frijol mungo apical media y basal de extractos solubles localizaron 4 isoenzimas de peroxidasa en la porción apical, mientras que en la basal y media se presentan 6 isoenzimas, desapareciendo 2 isoenzimas en la primera porción, y Mangolin *et al.* (1997) quienes observaron supresión de isoenzimas en callos de *Cereus peruvianus*.

Es importante destacar que las enzimas de peroxidasa analizadas en este trabajo a diferencia de otras enzimas necesitan menor concentración de H_2O_2 ya que su $K_{m_{app}}$ por este substrato disminuyó, mientras que en otras la $K_{m_{app}}$ para H_2O_2 es del rango entre 7-2500 μM en *N. tetetzo* es de 0.66 μM (Zapata *et al.*, 1998, Mujer *et al.*, 1983, Miller *et al.* 2000, Lee y Kim, 1994, Dean *et al.*, 1994, Talwar *et al.*, 1985, Míder y Zalinskas, 1991), se menciona que las peroxidadas del citoplasma necesitan la adición de H_2O_2 exógeno para tener actividad ya que son dependientes de esta adición, lo han reportado autores como Czaninski, *et al.* (1993) en el álamo, otros autores han utilizado este criterio para saber si es exactamente una peroxidasa la implicada en el proceso como Bernards *et al.* (1999).

En el caso de este trabajo solo se tomaron las peroxididasas solubles por lo cual disminuye la probabilidad de que peroxididasas implicadas en procesos de lignificación asociadas a la pared como las covalentes e iónicamente unidas sean las que este involucradas (Rusi skaet *al.* 1999).

Por ensayos realizados en otros trabajos con *N. tetetzo* se comprobó que estas peroxididasas no están implicadas en la biosíntesis de hormonas por que en estos ensayos en geles de poliácridamida no se obtuvieron actividad de Ácido Indol Acético oxidasa. Además si estas plantas reciben niveles altos de radiación y el AIA es fotolábil, los niveles en las plantas podrían ser bajos por fotodestrucción, más que por oxidación enzimática lo cual explicaría no encontrar actividad de esta enzima. (Gaspar *et al.* 1982).

De las proteínas localizadas de peso molecular entre el rango de 6 a 21 KDa algunas podrían corresponder a las glutatión peroxididasas, las de 28 a 63 KDa a las ascorbato peroxididasas o peroxididasas no específica, las de 79 a 110 KDa a las glutatión peroxididasas, y las de 143 a 195 KDa a las catalasas (TABLA 3, APENDICE II a).

En los individuos aislados y bajo nodrizaje, se expresaron bandas con pesos moleculares muy bajos entre 2 a 8 KDa, estas bandas quizá correspondan a proteínas de choque térmico (heat shock) (TABLA 3, APENDICE II a).

El hecho de que se registren diferentes tipos de peroxididasas posiblemente la APX, glutatión peroxidasa, POX y CAT implica que existe una acción cooperativa entre ellas requeridas para la fotoprotección ya que estas enzimas están ligadas por el sistema enzimático degradador de radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 1995, Bowler *et al.* 1992), la APX se localiza porque generalmente se encuentra en forma soluble (Asada 1992), la CAT porque que existe una diferencia en los requerimientos de sustrato por parte de la CAT y la APX (Nito *et al.* 2001), Puede ser que solo exista poco H_2O_2 en el citoplasma que escape de la eliminación por el ciclo de las xantofilas, o que este no pueda eliminar todas las especies reactivas de oxígeno, también que la catalasa sea sensible a la luz y sufra inactivación y posteriormente degradación, por lo que enzimas como la APX tengan que entrar en el proceso para eliminar el H_2O_2 , y como la glutatión esta unida por el ciclo del ascorbato-glutatión va a entrar en el proceso (Yoshimura *et al.*, 2000).

Diversos autores indican cambios en la distribución intracelular de las isoenzimas y la sensibilidad diferencial ante la fotooxidación es mucho más importante que el aumento en la actividad enzimática total, también indican que cambios en los diferentes tipos de isoenzimas son más importantes ante el estrés que una inducción de los genes o un neto aumento en la síntesis de proteínas (Edwards *et al.*, 1994). Y que las condiciones de estrés resultan en la producción de isoformas con diferente afinidad por el sustrato (Foyer *et al.*, 1994).

En la matriz de similitud de *N. tetetzo* existen diferencias entre las orientaciones porciones e individuos, hay una mayor similitud por orientaciones y en algunos casos por porciones, lo que indica que la radiación sí esta afectando a estas cactáceas, las apicales del individuo aislado

y las medias del individuo bajo nodrizaje son más similares, lo que de alguna manera refleja las diferentes condiciones de radiación que recibe cada organismo, que a su vez afecta la actividad aparente de la enzima peroxidasa y su expresión como posible sistema fotoprotector, investigadores como Hsiao y Lee (1999) atribuyen estas diferencias a la orientación, a la selección en la diversificación que presentan las plantas a su medio ya que los individuos se agrupan dependiendo de las condiciones de luz o sombra en las que se desarrollan como lo que sucede con caña (*Yushania nütakaymensis*)

De acuerdo a diversos autores las plantas han desarrollado un sistema altamente resistente por la variabilidad genética y la alta adaptación que tienen las plantas a su ambiente (especies tolerantes) (Loggini *et al.* 1999), lo que para algunas plantas resulta inhibitorio (especies no tolerantes) para otras no lo es, y sobre todo para especies de zonas áridas el nivel de estrés aumenta y no es comparable a especies de zonas con factores ambientales menos estresantes, hablando de plantas del desierto se necesita mayor temperatura y radiación para sufrir un trastorno como los valores de estrés térmico para *Agave deserti* y *Opuntia ficus-indica* que están en el rango de 61°C que en otras especies esto sería la muerte. (Chetti y Nobel 1987). Se habla también de una aclimatación gradualista para evitar el estrés promoviendo una más alta estabilidad de estas plantas ante condiciones adversas (Oliver, *et al.* 2000)

Las diferencias en la resistencia de las plantas ante el estrés se pueden relacionar a modificaciones en el nivel constitutivo de enzimas antioxidantes y antioxidantes no enzimáticos, estos dependen de la edad de la planta, la especie, o debido a modificaciones en la expresión genética. Las plantas están muy bien adaptadas para minimizar el daño oxidativo las cuales se encuentran bajo muy extremas condiciones o sobre imposición de la combinación del estrés. La adaptación al estrés fotooxidativo es multifactorial, involucra la regulación de la síntesis y reparación de proteínas y un aumento en la protección antioxidativa (Foyer *et al* 1994).

Se observó a través de este análisis de expresión y actividad que la radiación esta afectando tanto la expresión como la actividad de peroxidasas ya que en los organismos aislados, que son los que presentan las condiciones microambientales más extremas son los que tienen mayor afinidad enzimática, una mayor expresión en porciones con mayor radiación (apicales e iluminadas), pero menor expresión en general y la posible presencia de enzimas implicadas en procesos de degradación de radicales y que en *N. tetetzo* aislados el factor radiación afecta más la expresión de peroxidasas mientras que en *N. tetetzo* bajo nodrizaje la afinidad enzimática es menor, tienen una expresión constante de isoenzimas por causas microambientales más benévolas y la expresión de isoenzimas no es afectada por la radiación como en el caso de los individuos aislados. Aun así no se descarta la influencia de otros factores como temperatura ambiental y del suelo, contenido hídrico y humedad.



9.0 CONCLUSIONES.

- * La radiación recibida por los individuos de *N. tetetzo* aislados fue mayor que la recibida por los *N. tetetzo* bajo nodrizaje. En las plantas de *N. tetetzo* aislados la porción apical y orientación iluminada tienen mayor radiación, en contraste en los individuos de *N. tetetzo* bajo nodrizaje los mayores valores de radiación se presentan en la porción basal y orientación iluminada.
- * La actividad aparente de las isoenzimas peroxidadas es significativamente mayor en individuos aislados que en los asociados.
- * La mayor actividad aparente se presentó en las porciones; apical de individuos aislados, y en la porción media de individuos bajo nodrizaje, estas porciones reciben mayor radiación.
- * Los individuos de *Neobuxbaumia tetetzo* expresan 11 isoenzimas con actividad peroxidasa.
- * Las isoenzimas A10 y A12 solo se expresan en individuos aislados con mayores niveles de radiación y actividad aparente y las isoenzimas C4 y A9 exclusivamente en individuos bajo nodrizaje con valores menores de radiación y actividad aparente.
- * Las isoenzimas C1, C2, A7 y A8 son constitutivas y se presentan tanto en individuos aislados como en individuos bajo nodrizaje, mientras que las isoenzimas C4, A5, A10, A11 y A12 se expresan en las porciones expuestas a mayor radiación.
- * Las porciones apicales y orientaciones iluminadas expuestas a mayor radiación expresan mayor número de isoenzimas tanto en individuos aislados como en individuos bajo nodrizaje.
- * Las isoenzimas A7, A8, y A9 se expresan con mayor intensidad en las porciones sometidas a mayor radiación de *N. tetetzo* aislados y bajo nodrizaje.
- * Se observa un patrón protéico diferencial entre los individuos aislados y bajo nodrizaje
- * De acuerdo a la matriz de similitud existen diferencias entre los individuos aislados y los organismos bajo nodrizaje con un ISJ=0.25. Las porciones más expuestas a la radiación presentan mayor similitud.



10.0 LITERATURA CITADA.

Adamska, I., Kloppstech, K., Ohad, I. 1993. Early light-inducible protein in pea is stable during light stress but is degraded during recovery at low intensity. *The Journal of Biological Chemistry* 268(8): 5438-5444.

Alpert, P., Tuba, Z. 2000. The cactus, the sunflower, and the moss. *Plant Ecology* 151: 1-4.

Amako, K.; Cohen, G-X., Asada, K. 1994. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isoenzymes of ascorbate peroxidase in plant. *Plant Cell. Physiol.* 35(3): 497-504.

Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plant.* 85: 235-241.

Baier, M., Goldberg, R., Catesson, A. M., Francesh, C., Roland, C. 1993. Seasonal changes of isoperoxidases from poplar bark tissues. *Phytochemistry* 32(4): 789-793.

Bernards, M. A., Fleming, W. D., Llewellyn, D. B., Priefer, R. Yang, X., Sabatino, A., Plourde, G. L. 1999. Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiol.* 121: 135-146.

Bowler C., Montagu, M. V., Inzé, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 43: 83-116

Bravo, H. H. 1955. *Neobuxbaumia tetetzo*. En: *Iconografía de las cactáceas mexicanas. Cactáceas y suculentas mexicanas* 1(1): 16

Bravo-Hollis, H. 1978. *Las cactáceas de México. Vol 1. Ed. UNAM. México.*

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of micro quantities of protein. *Anal. Biochem.* 72:248.

Casano, M. L.; Martín, M.; Zapata, M. J.; Sabater, B. 1999. Leaf age-and paraquat concentration-dependent effects on the level of enzymes protecting against photooxidative stress. *Plant Sci.* 149:13-22.

Cabañas, C. A. 1999. Niveles endógenos de auxinas y su regulación con la actividad de AIA-ox durante la formación de raíces adventicias en frijol mungo (*Vigna radiata*). Tesis en biología. UNAM. Campus Iztacala. México.

Clarkson, S. P., Large, P. J., Bamforth, C. W. 1992. A two substrate kinetics study of peroxidase cationic isoenzymes in barley malt. *Phytochemistry* 31 (3): 743-749.

IZT.



Contreras, A. 1955. Definición de las zonas áridas y su delimitación en el territorio mexicano. En: Mesas redondas sobre problemas de las zonas áridas de México. Beltrán, Enrique. Ed. Publicaciones IMRNP. México. pp: 3-24.

Cornic, G., Bukhov, N. G., Wiese, C., Bligny, R., Heber, V. 2000. Flexible coupling between light-dependent electron and vectorial proton transport in illuminated leaves of C₃ plants. Role of photosystem I-dependent proton pumping. *Planta* 210: 468-477

Czaninski, Y., Sachot, R. M., Catesson, A. M. 1993. Cytochemical localization of hydrogen peroxide in lignifying cell walls. *Annals of Botany*. 72: 547-550.

Chavéz, S. B. E. 2000. Estudio de la variabilidad genética poblacional del cactus columnar *Neobuxbaumia tetetzo* en el Valle de Zapotitlán de las Salinas Puebla. México. Tesis en biología. UNAM. Campus Iztacala. México.

Chetti, M. B., Nobel, P. S. 1987. High-Temperature sensitivity and its acclimation for photosynthetic electron transport reactions of desert succulents. *Plant Physiol*. 84: 1063-1067.

Church, D. L., Galston, A. W. 1988. 4-Coumarate: Coenzyme A ligase and isoperoxidase expression in *Zinnia* mesophyll cells induced to differentiate into tracheary elements. *Plant Physiol*. 88: 679-684

Cruz, R. J. A., García, M. E., Frías, H. J. F., Montesinos, S. G., Flores, F. L. J. 1997. Influencia de los mezquites en la composición y cobertura de la vegetación herbacea de un agostadero semiárido del norte de Guanajuato. *Bol. Soc. Bot. México* 61: 21-30.

Davila, P. 1993. Información general para el viaje de campo. En International workshop on the evolution ecology and conservation of columnar cacti and their mutualist. Tehuacán Puebla, México. UNAM. México. June 28 - July 03 1996. Recopiladores Valiente B. A.; Fleming H. T. pp: 30-31.

Dean, J. F. D., Karl, R. S., Eriksson, E. L. 1994. Purification and characterization of an anionic peroxidase from syriamore maple (*Acer pseudoplatanus*) cell suspension culture. *Physiol. Plant*. 92: 233-240

Decedue, C. J., Rogers, S. J., Borchert, R. 1984. Molecular weight differences among potato peroxidases. *Phytochemistry* 23(4): 723-727.

Demming-Addams, B.; Adams III, W. W. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 599-626.

Edwards, E. A., Enard, C., Creissen, G. P., Mullineaux, P. M. 1994. Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed peas. *Planta*. 192: 137- 143.

Foyer, C. H., Lelandais, M., Kunert, K. J. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plant*. 92: 696-717.

- Gaspar, T. H.; Penel, C.; Thorpe, T.; Greppin, H. 1982. Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Université de Genève-Centre de Botanique. Geneve 1982. pp: 324.
- Gijzen, M., van Huystee, R., Buzze, H. R. I. 1993. Soybean seed coat peroxidase. A comparison of high-activity and low-activity genotypes. *Plant Physiol.* 103: 1061-1066
- Godínez-Alvarez, H., Valiente-Banuet, A. 1998. Germination and early seedling growth of Tehuacán Valley cacti species: the role of soils and seed ingestion by dispersers on seedling growth. *Journal of Arid Environments* 39: 21-31.
- Golberg, R., Imberly, A., Chu-Ba, J. 1986. Development of isoperoxidases along the growth gradient in the mung bean hypocotyl. *Phytochemistry* 25(6): 1271-1274.
- Hamed, R. R.; Maharem, T. M.; Fatah, M. M. A.; Ataya, F. S. 1998. Purification of peroxidase isoenzymes from turnip roots. *Phytochemistry* 48(8):1291-1294.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 1995. Free radicals in biology and medicine. 2º Edición Ed. Clarendon Press Oxford.
- Hendry, G. A. F. 1993. Oxygen, free radical processes and seed longevity. *Seed Science Research.* 3: 141-153.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H. 2001. A large family of Class III plant peroxidases. Mini review. *Plant Cell Physiol* 42(5): 462-468.
- Hsiao, J. L., Lee, S. M. 1999. Genetic diversity and microgeographic differentiation of Yushan cane (*Yushania nütakayamensis*; Poaceae) in Taiwan. *Molecular Ecology* 8: 263-270.
- Horton, P.; Ruban, A. V., Walters, R. G. 1996. Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 47: 655-84.
- Kevers, C., Coumans-Guillés, M-F., Gaspar, Th. 1984. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro. *Physiol. Plant.* 61: 69-74.
- Kim, S. H.; Kim, S. S. 1996. Carbohydrate moieties of three radish peroxidases. *Phytochemistry* 42(2): 287-290.
- Kwak, S.-S., Kim, S.-K., Lee, M.-S., Jung, K.-H., Park, I.-H., Liu, J.-R. 1995. Acidic peroxidases from suspension-cultures of sweet potato. *Phytochemistry.* 39(59): 981-984.
- Laemli, U. K. 1970. *Nature.* 227: 680.

- Lee, M., Kim, S. S. 1994. Characteristics of six isoperoxidases from korean radish root. *Phytochemistry* 35(2): 287-290
- Loggini, B., Scartazza, A., Brugnoli, E., Navari-Izzo, F. 1999. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiol.* 119(3): 1091-1100.
- Mandujano, P. M. 2002. Evaluación del metabolismo ácido de las crasuláceas en ramas jóvenes y maduras de *Escontria chiotilla* (Weber) Rose, con orientación norte y sur en el municipio de Coxcatlán, Puebla. Tesis de Maestría. FES Iztacala. UNAM.
- Mangolin, C. A., Priolo, A. J., Machado, M. F. P. S. 1997. Isoenzyme variability in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochemical Genetics* 35(5/6): 189-203.
- Miernik, J. A. 1999. Update in biochemistry protein folding in the plant cell. *Plant physiol.* 121: 695-703.
- Mitler, R., Merquiol, E., Hallakterr, E., Rachmilevitch, S., Kaplan, A., Cohen, M. 2001. Living under a "dormant" canopy: a molecular acclimation mechanism of desert plant *Retama raetam*. *Plant. J.* 25: 407-416
- Miller, A. G., Hunter, K. H., O'Leary, J. B., Hart, L. J. 2000. The photoreduction of H₂O₂ by *Synechococcus* sp. PCC 7942 and UTEX 625. *Plant Physiol.* 123: 625-636.
- Mujer, C. V. Mendoza, E. M. T. Ramírez, A. D. 1983. Coconut peroxidase isoenzymes: isolation, partial purification and physicochemical properties. *phytochemistry* 22(6): 1335-1340.
- Nito, K., Yamaguchi, K., Kondo, M., Hayashi, M., Nishimura, M. 2001. Pumpkin peroxisomal ascorbate peroxidase is localized on peroxisomal membranes and unknown membranous structures. *Plant Cell Physiol.* 42(1): 20-27.
- Nobel, P. S., Hartsock, T. L. 1983. Relationships between photosynthetically active radiation, nocturnal acid accumulation, and CO₂ uptake for a crassulacean acid metabolism plant, *Opuntia ficus-indica*. *Plant Physiol.* 71: 71-75.
- Nolasco, H., Vega-Villasante, F., Díaz-Rondero, A. 1997. Seed germination of *Stenocereus thurberi* (Cactacea) under different solar irradiation levels. *Journal of the Arid Environments* 36: 123-132.
- Oliver, M. J., Tuba, Z., Mishler, B., D. 2000. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecology* 151: 85-100.
- Ordoñez, S. C. A. 2002. Caracterización de pigmentos fotosintéticos y accesorios presentes en la asociación *Neobuxbaumia tetetzo* y *Prosopis laevigata*. Tesis en biología. UNAM. Campus Iztacala. México.

- Padiglia, A.; Cruciani, E.; Pazzaglia, G.; Medda, R.; Floris, G. 1995. Purification and characterization of *Opiuntia* peroxidase. *Phytochemistry* 38(2): 295-297.
- Papadakis, A. K., Roubelakis-Angelakis, K. A. 1999. The generation of active oxygen species differs in tobacco and grapevine mesophyll protoplast. *Plant Physiol.* 121: 197-206.
- Pichorner, H.; Couperus, A.; Korori, A. A.; Eberman, R. 1992. Plant peroxidase has a thiol oxidase function. *Phytochemistry* 31(10): 3371-3376.
- Pressey, R. 1990. Oxidation of AIA by peroxidases. *Plant Physiol.* 93:799-804.
- Rojas-Aréchiga, M., Orozco-Segovia, A., Vazquez-Yanes, C. 1997. Effect of light on germination of seven species of cacti from the Zapotitlán Valley in Puebla, México. *Journal of Arid Environment* 36: 571-578.
- Rodriguez, M. M. J.; van Huystee, R. B. 1994. Plant peroxidases: interaction between their prosthetic groups. *Phytochemistry* 37(5):1217-1225.
- Roskoski, R. 1998. *Bioquímica*. Ed. Macgraw-Hill. pp 560.
- Ruci ska, R.; Waplak, S.; Gwózdź, E., A. 1999. Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in Lupin roots exposed to lead. *Plant Physiol. Biochem.* 37(3): 187-194.
- Schopfer, P.; Plachy, C.; Frahry, G. 2001. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiol.* 125: 1591-1602.
- Sergeeva, L.; Arsenova, N.; Konstantinova, T. 1985. In vivo and in vitro studies of peroxidase and AIA-oxidase activity in relation to floral morphogenesis in "trapezond" tobacco. *Biologia Plantarum (PRAHA)* 24(4-5): 330-333.
- Shreve, F. 1931. Physical conditions in sun and shade. *Ecology* 12(1): 96-104.
- Streb, P., Tel-Or, E., Feierabend, J. 1997. Light stress effects and antioxidative protection in two desert plants. *Func. Ecol.* 11: 416-424.
- Talwar, G.; Dendsay, J. P. S.; Gupta, V. K. 1985. Kinetic properties of AIA oxidase from mung bean cotyledons. *Phytochemistry.* 24(4): 673-676.
- Valiente-Banuet, A., Exequiel-Ezcurra. 1991. Shade as a cause of the association between the cactus *Neobuxbaumia tetetzo* and the nurse plant *Mimosa luisiana* in the Tehuacán Valley México. *Journal of Ecology* 79: 961-971.
- Valiente-Banuet, A., Rojas-Martínez, A., Del Coro, A. M., Dávila, P. 1997. Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalaensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in Tehuacán

Valley central Mexico. Amer. Journal of Botany 84 (4): 452-455.

van Huystee, R. B., Cairns, W. L. 1982. Progress and prospects in the use of peroxidase to study cell development. *Phytochemistry*. 21(8): 1843-1847.

van Huystee, R. B. 1987. Some molecular aspect of plant peroxidase biosynthetic studies. *Plant Physiol.* 57: 509-538.

Yoshimura, K., Yabuta, Y., Ishikawa, T. 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol.* 123: 223-234.

Young, L. M.; Soo, K. S. 1994. Characteristics of six isoperoxidases from korean radish root. *Phytochemistry* 35(2): 287-290.

Zapata, M. J.; Sabater, B., Martín, M. 1998. Identification of thylakoid peroxidase of barley which oxidizes hydroquinone. *Phytochemistry* 48(7): 1119-1123.

Zavala, H. J. A., Vite, G. F., Armella, V. M. A. 1990. Memorias de la reunión sobre líneas de investigación ecológica en zonas áridas. Jardín Botánico y vivero de cactáceas de Zapotitlán de las Salinas Puebla "Helia Bravo". Noviembre 9-11 de 1989. Ed. UAM Iztapalapa. México. pp:18, 50-52.

Zentella, M.; Saldaña, B. Y. 1996. Papel fisiológico de los radicales libres. *Bol. Educ. Bioq.* 15(4): 152-161.

APÉNDICE.

AUTORES	SUPERFAMILIA	CLASE	PESO MOLECULAR (KDA)
Hiraga <i>et al.</i> 2001	Peroxidasas Animales	Glutación Peroxidasa (Ec. 1.11.1.9)	6-22 75-112
	Catalasas	Catalasa (Ec. 1.11.1.6)	140-153
	Peroxidasas Plantas I	Catalasa (Ec. 1.11.1.6) Ascorbato Peroxidasa (Ec. 1.11.1.11)	150-240 30-58
	Peroxidasas Plantas II	Peroxidasa (Ec.1.11.17.POX)	28-60
Nito <i>et al.</i> 2001		Catalasa Ascorbato Peroxidasa Peroxidasa de raíz de rábano Catalasa	250 31 40 25.50
Dean <i>et al.</i> 1994		Peroxidasa aniónica de arce	42
Lee y Kim 1994		Peroxidasas de raíz de rábano coreano C1 C3 A1 A2 A3n A3	45 44 43 43 31 50
Gijzen <i>et al.</i> 1993		Peroxidasas	30-60
Mujer <i>et al.</i> 1983		peroxidadas de endospermo de coco Px5 subunidad de px5 px3 px4	196 55 36.3 46.8
Decedue, <i>et al.</i> 1984		peroxidadas (AIA) oxidasas de papa A5 C3 C4, C5 C6	105 94 65.5 48.5
Rodriguez y van Huystee, 1994		Peroxidasa catiónica de cacahuete (cPRX)	40
Halliwell y Gutteridge, 1995	Proteínas de choque térmico pequeñas (small heat shock)		15-42
Bernards <i>et al.</i> 1999		Peroxidasa aniónica de papa	45.8

TABLA 3. Muestra el peso molecular de diferentes peroxidadas reportadas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Resultados del análisis estadístico realizado para comprobar las diferencias de Km_{app} entre organismos de *N. tetetzo* aislados y bajo nodrizaje; así como entre orientaciones (iluminado y sombreado), y porciones del tallo de las plantas (apical media y basal), con un valor de $P < 0.05$

ORIGEN DE LAS VARIACIONES	AISLADO	NODRIZAJE
PROMEDIO	71.51	132.54
Aislado	1	0.042
Bajo nodrizaje	0.042	1

TABLA 4. Muestra los resultados de la prueba de Tukey para comparar diferencias entre individuos.

ORIGEN DE LAS VARIACIONES	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	PROMEDIO DE LA SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	$P_{\alpha_{0.05}=0.005}$
Individuos	22348.57	12	1346.15	16.60	0.0015
Orientaciones	216.90	12	1346.15	0.16	0.69
Porciones del tallo	17794.56	12	1346.15	13.21	0.0009
Individuos y Orientaciones	297.58	12	1346.15	0.22	0.64
Individuos y Porciones	5449.47	12	1346.15	4.04	0.04
Orientación y Porción del tallo	19855.17	12	1346.15	14.74	0.0005
Individuos, Orientaciones y Porciones del tallo	1762.52	12	1346.15	1.30	0.30

TABLA 5. Muestra los resultados de la ANOVA multifactorial para la comparación de Km_{app} entre los diferentes factores analizados en este estudio: porciones, orientación del tallo de *Neobuxbaumia tetetzo* aislados y bajo nodrizaje, así como entre individuos.

ORIGEN DE LAS VARIACIONES	AAL	AML	ABL	AAS	AMS	ABS	NAL	NML	NBL	NAS	NMS	NBS
PROMEDIO	57.86	76.80	60.28	22.71	57.53	153.86	165.29	103.31	130.56	84.01	33.50	278.57
AAL	1	0.99	1	0.96	1	0.36	0.24	0.97	0.69	0.99	0.99	0.0022
AML		1	0.99	0.92	0.99	0.63	0.46	0.99	0.92	1	0.98	0.0046
ABL			1	0.99	1	0.39	0.26	0.98	0.73	0.99	0.99	0.0024
AAS				1	0.99	0.92	0.05	0.57	0.23	0.85	0.99	0.00067
AMS					1	0.35	0.23	0.97	0.69	0.99	0.99	0.0021
ABS						1	0.99	0.94	0.99	0.73	0.14	0.12
NAL							1	0.84	0.99	0.56	0.09	0.19
NML								1	0.99	0.99	0.74	0.014
NBL									1	0.96	0.34	0.045
NAS										1	0.94	0.0062
NMS											1	0.0009
NBS												1

TABLA 6. Muestra los resultados de la Prueba de Tukey para la comparación entre los diferentes factores analizados en este estudio: porciones, orientación del tallo de *Neobuxbaumia tetetzo* aislados y bajo nodrizaje, así como entre individuos.

Resultados del análisis estadístico de varianza (ANOVA) realizado para comprobar las diferencias de V_{max} entre organismos de *N. tetetzo* aislados y bajo nodrizaje; así como entre orientaciones (iluminado y sombreado), y porciones del tallo de las plantas (apical media y basal).

ORIGEN DE LAS VARIACIONES	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	PROMEDIO DE LA SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	$P_{\alpha_{0.05}=0.005}$
Individuos	3.7525	12	14.7811	0.2538	0.62
Orientaciones	0.0852	12	14.7811	0.0057	0.94
Porciones del tallo	31.0826	12	14.7811	2.1028	0.16
Individuos y Orientaciones	0.2340	12	14.7811	0.0158	0.90
Porciones en los individuos	10.3766	12	14.7811	0.7020	0.51
Orientación y Porción del tallo	20.3385	12	14.7811	1.3759	0.28
Individuos, Orientaciones y Porciones del tallo	0.9954	12	14.7811	0.0673	0.93

TABLA 7. Muestra los resultados de la ANOVA multifactorial para la comparación de V_{max} entre los diferentes factores analizados en este estudio: porciones, orientación del tallo de *Neobuxbaumia tetetzo* aislados y bajo nodrizaje, así como entre individuos.