

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN  
FUNDACION MIGUEL LILLO

LILLOA

TOMO XXXIII:21

M.E.L.DE CANELADA,M.N.R. DE SARMIENTO,A.M.F.DE FERNANDEZ - INFLUEN  
CIA DE LA CONCENTRACION DE FOSFATOS SOBRE LAS PEROXIDASAS EN  
MERISTEMAS DE *ALLIUM CEPA*

(Págs. 351-358; 1 fig.)

TUCUMAN  
REPUBLICA ARGENTINA  
1973

# INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE FOSFATOS SOBRE LAS PEROXIDASAS EN MERISTEMAS DE *ALLIUM CEPA*

por María E.L. de Canelada, Matilde N.R. de Sarmiento, Ana M.F. de Fernández

## SUMMARY

**The influence of phosphates concentration upon the peroxidases in meristems of *Allium cepa*.** The activity of the peroxidase isoenzymes in apical meristems of *Allium cepa* root in relation to different phosphate concentrations is studied in specific media of culture. The electrophoretic studies show that the zymogram pattern in variously treated material presents some changes, as qualitative and quantitative variations.

## INTRODUCCION

Este trabajo forma parte de una serie destinada a valorar la influencia de las diferentes concentraciones de fosfatos en el metabolismo celular, tema éste tratado por autores como: Arnon (1953), Benett y Rees (1969), Beaton y colab. (1964), Hylton (1965), Pierce (1937).

Siguiendo a Pierce, a Benett y Rees, se estudiaron los cambios producidos en el volumen de los cromosomas por acción de diferentes concentraciones de fosfatos (Lozzia, 1971). Estos autores atribuyen la variación a un aumento en las proteínas nucleares, sin cambios en el DNA, lo que constituye un proceso estrechamente relacionado con el metabolismo celular. Las experiencias realizadas en nuestro laboratorio, no coincidieron con los resultados obtenidos por los mismos.

Son múltiples los trabajos en que se valora la actividad metabólica en condiciones diferenciales, utilizando como marcador la separación electroforética de las isoenzimas peroxidasas (Brewbaker y colab., 1968; Ferri y Guzmán, 1970; Gutfreund, 1968; Shannon, 1968).

En los ensayos efectuados, aplicando la técnica mencionada anteriormente, se constató la diferente actividad enzimática, en las distintas concentraciones de fosfatos. A fin de observar la real influencia de las diferentes concentraciones de este metabolito, se llevaron a cabo los ensayos que se dan a conocer a continuación.

## MATERIALES Y METODOS

Se trabajó con meristemas apicales provenientes de bulbos de *Allium cepa*, cuyas raíces se desarrollaron en las siguientes soluciones nutritivas: no fosfatada, hipofosfatada 0,15 mM (mili molar), normal fosfatada 0,6 mM e hiperfosfatada 1,4 mM.

Las soluciones utilizadas fueron similares a las de Benett y Rees:

## a) Soluciones no fosfatadas:

|                |        |       |
|----------------|--------|-------|
| K N03          | 1,7 g  |       |
| K Cl           | 4,5 g  | Sol.A |
| Mg S04 - 7 H2O | 10,0 g |       |
| Agua destilada | 500 ml |       |
| Ca (N03) 2     | 12,0 g |       |
| Agua destilada | 500 ml | Sol.B |

## b) Soluciones hipofosfatadas:

|                |        |       |
|----------------|--------|-------|
| K N03          | 1,7 g  |       |
| KH2 P04        | 2,0 g  | Sol.A |
| Mg S04 - 7 H2O | 10,0 g |       |
| Agua destilada | 500 ml |       |
| Ca (N03) 2     | 12,0 g | Sol.B |
| Agua destilada | 500 ml |       |

## c) Soluciones normalmente fosfatadas:

|                |        |       |
|----------------|--------|-------|
| K N03          | 1,7 g  |       |
| KH2 P04        | 7,0 g  | Sol.A |
| Mg S04 - 7 H2O | 10,0 g |       |
| Agua destilada | 500 ml |       |
| Ca (N03) 2     | 12,0 g | Sol.B |
| Agua destilada | 500 ml |       |

## d) Soluciones hiperfosfatadas:

|                   |        |       |
|-------------------|--------|-------|
| K N03             | 1,7 g  |       |
| KH2 P04           | 7,2 g  | Sol.A |
| Mg S04 - 7 H2O    | 10,0 g |       |
| Agua destilada    | 334 ml |       |
| Na2H P04 - 12 H2O | 17,5 g | Sol.B |
| Agua destilada    | 334 ml |       |

|                   |        |       |
|-------------------|--------|-------|
| Ca H4 (P04) 2 H2O | 7,0 g  |       |
| Ca (N03) 2        | 12,0 g | Sol.C |
| Agua destilada    | 334 ml |       |

El pH de las soluciones osciló entre 5,8 y 6,6, no observándose, ni al comienzo ni al final de la experiencia, grandes variaciones con respecto a la media.

Para realizar los extractos se cortaron los meristemas apicales de raíz a los 12 días de iniciado el ensayo. Se pesó y maceró con buffer fosfato 0,1 M pH 7 en una relación peso - volumen 1:2, se centrifugó durante 25 minutos a 5.000 r.p.m. y el sobrenadante se utilizó posteriormente para la corrida electroforética. Todas estas operaciones se hicieron en frío.

La electroforesis vertical se realizó en gel de almidón de acuerdo con la técnica de Smithies (1955, Bodman 1963), usando buffer borato 0,3M pH 8,6, con un voltaje de 0,14 mA durante 5 horas.

El gel fue revelado con agua oxigenada al 0,30%, bencidina 0,01 M en 50% de solución hidroalcohólica y buffer acetato 0,1 M pH 4,5, en una proporción de 1: 2: 2. Una vez lavado, el gel fue fijado en una mezcla de: metano (30cc), ácido acético glacial (15cc) y agua destilada (55cc).

## RESULTADOS Y DISCUSION

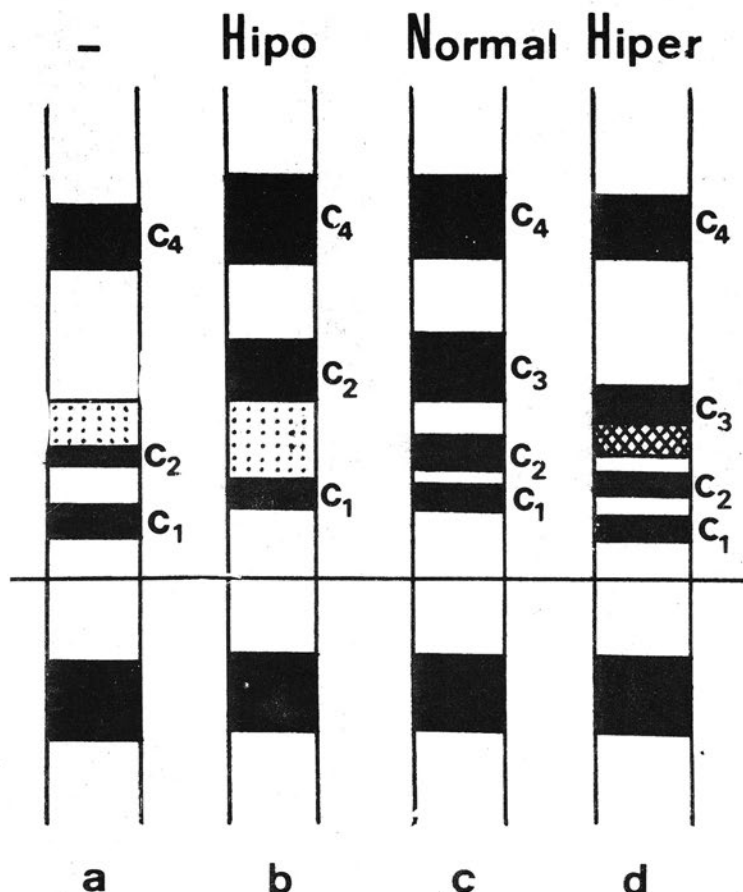
El zimograma correspondiente a los meristemas desarrollados en soluciones normalmente fosfatadas (testigo) presenta cuatro bandas catódicas y una anódica (fig.,c) que se mantiene constante en todos los zimogramas. Los desarrollados en soluciones hipofosfatadas (fig.,b) dan zimogramas con una banda catódica menos, pero la c4 es de similar intensidad a la correspondiente para soluciones normalmente fosfatadas.

Las peroxidasas de meristemas desarrollados en soluciones a las cuales no se les había agregado fosfatos (fig.,a) mostraban también una banda menos que en las normalmente fosfatadas, pero la intensidad de la banda c4 era evidentemente menor.

En cuanto a las peroxidasas provenientes de soluciones hiperfosfatadas (fig.,d) presentan, básicamente, igual perfil que las normalmente fosfatadas; pero las bandas c2, c3 y c4 se encuentran retrasadas con respecto a las normalmente fosfatadas y la c3 se encuentra ligeramente desdoblada.

Los resultados obtenidos nos muestran que el mayor número de bandas y por lo tanto el mayor número de isoenzimas con actividad de peroxidasas

se forma con las soluciones normalmente fosfatadas e hiperfosfatadas, observándose que con las hipofosfatadas y no fosfatadas hay disminución de por lo menos una banda, siendo su intensidad menor a la que se observa en las soluciones no fosfatadas.



Figs. a-d: Esquema de las variaciones electroforéticas de las peroxidasas en meristemas apicales de raíz de *Allium cepa*, según distintas concentraciones de fosfatos (Ver explicación en el texto).

Es evidente que en las condiciones definidas como hipofosfatada y no fosfatada ha desaparecido una banda, lo que interpretamos como inhibición

de la síntesis de una isoenzima peroxidasa. Se observa, además, una reducción en la cantidad absoluta de peroxidasas, como se desprende de la menor intensidad de coloración de las bandas correspondientes a las soluciones no fosfatadas e hipofosfatadas con respecto a las normalmente fosfatadas.

No hemos entrado a considerar el mecanismo metabólico por medio del cual se produce la inhibición de la síntesis de esta isoenzima.

En cuanto a la menor intensidad relativa de las bandas, podemos atribuir la a la menor disponibilidad del metabolito para la síntesis de coenzimas utilizables en el metabolismo intermedio.

### BIBLIOGRAFIA

- ARNON, D.I. 1953. The physiology and biochemistry of phosphorus in green plants.- *Agron. J.* 4: 1-39.
- BEATON, J.D., BRYAN, J.M., RUSSEL, J.C., SPEER, R.C. 1964. Reaction of several clay mineral and gibbsite with monoammonium and monopotassium phosphate.- *Nature* 201: 2: 739-740.
- BENNETT, M.D., REES, H. 1969. Induced and developmental variation in chromosome of meristematic cells.- *Chromosome* 27, 2.
- BODMAN, J. 1963. Agar gel, starch block, starch gel and sponge rubber electrophoresis, en *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*. II. Ed. por I. Smith. W. Heine mann, Interscience. Londres, Nueva York, pp. 91-157.
- BREWBAKER, J.L., UPADHYA, M.D., MAKINEN, Y., MAC DONALD, T. 1968. Isoenzyme polymorphism in flowering plants III. Gel electrophoresis methods and applications.- *Physiologia Pl.* 21: 930-940.
- FERRI, M.V., GUZMAN, A. 1970. The isoperoxidasas from leaves of some species of the genus *Datura*.- *Phyton* 27: 2: 137-140.
- GUTFREUND, H. Ph. 1968. Introducción al estudio de las enzimas. Ed. Omega. Barcelona.
- HYLTON, L.O. Jr. 1965. Phosphorus nutrition of Italian rye grass (*Lolium multiflorum*) relative to grow, moisture and mineral constituents.- *Agron. J.* 57, 5: 505-508.
- LOZZIA, M.E. 1971. Estudios biológicos en *Asparagus officinalis* (Inédito).
- PIERCE, W.P. 1937. The effect of phosphorus on chromosome and nuclear volume in a violet species.- *Bull. Torrey bot. Club* 64, 6: 345-355.
- SHANNON, L.M. 1968. Plant Isoenzymes.- *A. Rev. Pl. Physiol.* 19: 187-210.
- SMITHIES, O. 1955. Zone electrophoresis in starch gel. Group variations in the serum proteins of normal human adults.- *Biochem. J.* 61: 629-641.

Terminóse de imprimir el 7 de diciembre de 1973 en Fundación Miguel Lillo,  
San Miguel de Tucumán (R.A.).