



R. 4057

TD  
628  
          

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA

APORTACIONES AL CONOCIMIENTO DEL  
PROCESO DE ABSCISION DE LA ACEITUNA

Blanca Vioque Cubero

Trabajo presentado para optar al grado de  
Doctor por la Facultad de Biología de Sevilla

Diciembre, 1980

TD  
628

APORTACIONES AL CONOCIMIENTO  
DEL PROCESO DE ABSCISION DE  
LA ACEITUNA

Trabajo presentado para optar al grado de  
Doctor en Ciencias por la Licenciada en  
Ciencias Biológicas, Blanca Vioque Cubero  
Sevilla, Diciembre de 1980

*Blanca Vioque Cubero*

EL DIRECTOR DEL TRABAJO

EL CATEDRATICO PONENTE



Prof. Agustín Vioque Pizarro

Prof. Manuel Losada Villasante

## AGRADECIMIENTO:

Al Instituto de la Grasa y sus Derivados del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, que ha puesto a mi disposición los instrumentos y materiales necesarios para realizar este Trabajo.

A su personal, tanto investigador como auxiliar, con cuya colaboración conté siempre que fue solicitada.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de una Beca de Formación de Personal Investigador durante los años 1976, 1977 y 1978.

A la Fundación Juan March, que me permitió disfrutar de una Beca de Investigación durante el año 1980.

Al Investigador Miguel Angel Albi Romero por su valiosa colaboración y útil discusión de muchos de los resultados.

Al Prof. Agustin Vioque Pizarro, Director de este trabajo.

Así mismo deseo hacer constar mi agradecimiento al Prof. Manuel Losada Villasante, que aceptó amablemente apadrinar esta Tesis.

A Ana

INDICE

	pág.
I. INTRODUCCION.....	1
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	9
II.1. LA ABSCISION EN GENERAL.....	10
II.1.1. <u>Aspectos morfológicos</u> .....	12
II.1.2. <u>Aspectos histoquímicos</u> .....	13
II.1.3. <u>Aspectos fisiológicos</u> .....	17
II.1.3.1. Acido indolacético e indolacético-oxidasa	17
II.1.3.2. Etileno.....	20
II.1.3.3. Etileno y ácido indolacético.....	25
II.1.3.4. Etileno en la maduración y senescencia de los frutos.....	29

	pág.
II.2. LA ABSCISION EN EL OLIVO.....	31
III. MATERIALES Y METODOS.....	34
III.1. OLIVOS.....	35
III.2. REACTIVOS.....	35
III.3. APARATOS.....	36
III.4. DETERMINACION DE HIERRO.....	37
III.5. MEDIDA DE LA FUERZA DE RUPTURA.....	37
III.6. DETECCION HISTOQUIMICA DE PEROXIDASAS.....	37
III.7. OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO CRUDO.....	38
III.8. OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO PARCIALMEN TE PURIFICADO.....	40
III.9. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ACIDO INDOLACETICO--- OXIDASA.....	42
III.10. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA.....	44
III.11. DETERMINACION DE PROTEINAS.....	45
III.12. HIDRATACION DEL PVP.....	46
III.13. ULTRAFILTRACION.....	47
III.14. CROMATOGRAFIA DE FILTRACION POR GEL.....	47
III.14.1. <u>Estudio de las actividades enzimáticas</u> ...	47
III.14.2. <u>Determinación de pesos moleculares</u> .....	48
III.15. ELECTROFORESIS.....	49

	pág.
III.15.1. <u>Isoelectroenfoque</u> .....	49
III.15.2. <u>Electroforesis en gel con gradiente de</u> -	51
<u>concentración de poliacrilamida</u> .....	51
III.16. INCUBACION DEL ACIDO 1-AMINOCICLOPROPANO-1-	
CARBOXILICO CON EXTRACTO ENZIMATICO.....	52
III.17. INCUBACION DEL ACIDO 1-AMINOCICLOPROPANO-1-	
CARBOXILICO CON DISCOS DE HOJAS DE OLIVO...	53
III.18. DETERMINACION DE ETILENO.....	54
IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....	55
IV.1. EVOLUCION DEL CONTENIDO EN HIERRO DE PEDUNCU-	
LOS DE LA ACEITUNA A LO LARGO DEL CICLO VEGE-	
TATIVO.....	56
IV.2. DETECCION HISTOQUIMICA DE PEROXIDASA EN LA ZO-	
NA DE ABSCISION.....	59
IV.3. PREPARACION DEL EXTRACTO ENZIMATICO CRUDO....	62
IV.4. PREPARACION DEL EXTRACTO ENZIMATICO PARCIAL--	
MENTE PURIFICADO.....	68
IV.5. pH OPTIMO DE EXTRACCION.....	71
IV.6. PROPIEDADES DEL SISTEMA ENZIMATICO ACIDO IN--	
DOLACETICO OXIDASA/PEROXIDASA DE HOJAS DE OLI	
VO.....	72

	pág.
IV.6.1. <u>Presencia de ambas actividades enzimáticas.</u>	72
IV.6.2. <u>Efectos de la temperatura.</u> .....	79
IV.6.3. <u>Influencia de la concentración de enzima.</u> ...	82
IV.6.4. <u>Influencia de la concentración de sustrato.</u>	86
IV.6.4.1. Actividad ácido indolacético-oxidasa.....	86
IV.6.4.2. Actividad peroxidasa.....	94
IV.6.5. <u>Influencia del pH sobre las actividades en-</u> <u>zimáticas.</u> .....	98
IV.6.6. <u>Necesidad de cofactores en la actividad in-</u> <u>dolacético-oxidasa.</u> .....	102
IV.6.7. <u>Inhibidores.</u> .....	106
IV.6.7.1. Cianuro.....	106
IV.6.7.2. Azida.....	108
IV.6.7.3. EDTA.....	112
IV.6.7.4. Acriflavina.....	112
IV.6.8. <u>Comportamiento en ultrafiltración.</u> .....	123
IV.6.9. <u>Comportamiento en filtración por gel.</u> .....	124
IV.6.9.1. Estudio de las actividades enzimáticas...	124
IV.6.9.2. Determinación de pesos moleculares.....	128
IV.6.10. <u>Comportamiento electroforético.</u> .....	131
IV.6.10.1. Isoelectroenfoque.....	131
IV.6.10.2. Electroforesis en gel con gradiente de - concentración de poliacrilamida.....	136



	pág.
IV.7. SISTEMA ACIDO INDOLACETICO-OXIDASA/PEROXIDASA Y BIOSINTESIS DEL ETILENO.....	141
IV.7.1. <u>Formación de etileno a partir del ácido 1-a minociclopropano-1-carboxílico por el siste ma enzimático ácido indolacético oxidasa/-- peroxidasa de hojas de olivo.....</u>	142
IV.7.2. <u>Formación de etileno a partir del ácido 1-a minociclopropano-1-carboxílico por tejidos= de olivo.....</u>	151
IV.7.3. <u>Nuestra hipótesis.....</u>	155
V. CONCLUSIONES.....	159
VI. BIBLIOGRAFIA.....	163

ABREVIATURAS

AIA	ácido indolacético
DCP	diclorofenol
PVP	polivinilpirrolidona
EDTA	etilendiaminotetraacético
PAA	poliacrilamida
ACC	ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
SAM	s-adenosil-metionina
Met	metionina
AVG	aminoetoxivinilglicina
KMB	ácido $\alpha$ -ceto- $\gamma$ -metiltiobutírico
HRP	peroxidasa de rábano

## I. INTRODUCCION

La gran importancia económica que el olivar tiene en nuestro país no necesita comentarios. El problema más grave que tiene planteado actualmente, sin duda, es el de la recolección de sus frutos. Los procedimientos clásicos, que hacen uso de una gran cantidad de mano de obra, son cada día más inviables, por antieconómicos. Este problema, presentado también en otros tipos de cosechas, frutos o semillas, ha tenido soluciones en algunos casos, totalmente satisfactorias.

En el momento de iniciar nuestros estudios, en el caso del olivar estaba sin resolver, limitándose los ensayos totalmente empíricos, a tratamientos de los árboles con diversas sustancias con el fin de provocar la caída de los frutos, sin afectar perniciosamente al-

resto del árbol y por ende, a sus posteriores cosechas.

No cabe duda de que poder conseguir controlar la caída o abscisión de los frutos, retardándola o acelerándola según convenga, sería de la mayor importancia para su recolección, tanto manual como mecánica.

En el año 1971, en el Instituto de la Grasa, se inició el estudio de algunas facetas de los procesos bioquímicos implicados en la abscisión de la aceituna. Durante dos campañas, se siguió la evolución de algunos micronutrientes en pedúnculos y aceitunas, a lo largo del ciclo vegetativo. Los resultados obtenidos nos sirvieron de punto de partida para nuestras posteriores experiencias.

En una primera etapa pudimos establecer: 1º) La concentración de hierro en los pedúnculos experimenta un brusco y notable aumento durante el desarrollo de la aceituna, hasta alcanzar un valor máximo cuando se ha desarrollado completamente, permaneciendo estacionario este nivel de hierro durante el período de maduración, y 2º) La fuerza de ruptura, fuerza necesaria para desprender la aceituna de su pedúnculo, comienza a disminuir progresivamente, precisamente desde la época en que la concentración de hierro ha alcanzado su cota más

elevada.

Este aumento de la concentración de hierro, se asoció con un incremento de la concentración del enzima ácido indolacético-oxidasa (AIA-oxidasa), dada la naturaleza hemoproteica de este enzima y el hecho de venir atribuyéndosele la misión de reducir la concentración de ácido indolacético (AIA) hasta niveles apropiados para que se provoque la abscisión. En efecto, posteriormente pudimos detectar histoquímicamente, la presencia y acumulación de este sistema enzimático en la zona de abscisión pedúnculo-aceituna.

Estos dos fenómenos observados: incremento notable de la concentración de hierro en pedúnculos (confirmado en tres ciclos vegetativos consecutivos) y acumulación del enzima AIA-oxidasa en la zona de abscisión, son, digamos, los dos pilares sobre los que se apoyan nuestros posteriores estudios.

Sin duda, uno de los principales protagonistas en el proceso de abscisión se considera hoy al sistema enzimático AIA-oxidasa, y buena prueba de ello es su acumulación en la zona de abscisión. Este sistema está sometido a una gran controversia desde su descubrimiento en jugos vegetales por Larsen en 1936, debido

principalmente a la dualidad de funciones que exhibe, - al presentar simultáneamente las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa. Ello ha hecho que surjan tres hipóte-- sis para explicar tal comportamiento: 1ª) La AIA-oxidasa y la peroxidasa son enzimas diferentes (Sequeira y - Mineo, 1966), 2ª) Las actividades AIA-oxidasa y peroxida sa están asociadas con la misma molécula de proteína, - pero teniendo diferentes centros activos (Siegel y Glas ton, 1967) y 3ª) Sólo algunos de los isoenzimas que - constituyen la peroxidasa, poseen actividad AIA-oxidasa (Macnicol, 1973).

Todas estas circunstancias, justifican el es tudio lo más detenido posible, del sistema AIA-oxidasa/ peroxidasa presente en el olivo, que nos permita cono-- cer su papel en la fisiología de la abscisión y acercar nos a poder controlar, en alguna medida, su función (ac tivación, inhibición, inducción, etc.)

Por otra parte, el papel preponderante que - el etileno, considerado como una hormona vegetal, juega en el desarrollo, maduración y senescencia de los fru-- tos, es sobradamente conocido. Los estudios bioquímicos y fisiológicos sobre su biosíntesis y modo de acción se han incrementado enormemente en los últimos años. La ru

ta biosintética con más visos de realidad, se debe fundamentalmente a los trabajos de Adams y Yang y se resume en la Figura 1. Sobre este esquema, queremos centrar nuestros comentarios en el último paso, descubierto muy recientemente y de forma simultánea, por Adams y Yang (1979) en E.E.U.U. y por Lürssen et al. (1979) en Alemania. Ellos han podido comprobar que la formación del etileno a partir de la S-adenosil-metionina (SAM) tiene como producto intermedio el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), siendo este aminoácido el inmediato precursor del etileno. Este descubrimiento creemos es trascendental y posiblemente tendrá una gran repercusión en el futuro inmediato de la abscisión.

Sobre el mecanismo de conversión del ACC en etileno se tiene aún poca información, excepto que el proceso requiere oxígeno (en un medio anaerobio se acumula ACC en los tejidos vegetales). Adams y Yang (1979) sugieren que el oxígeno es transformado en agua oxigenada (o un hidroperóxido) por acción de una oxidasa y, posteriormente, en presencia de una peroxidasa el agua oxigenada rompe el anillo ciclopropano, paso previo a la liberación del etileno.

Lógicamente, estos últimos descubrimientos -



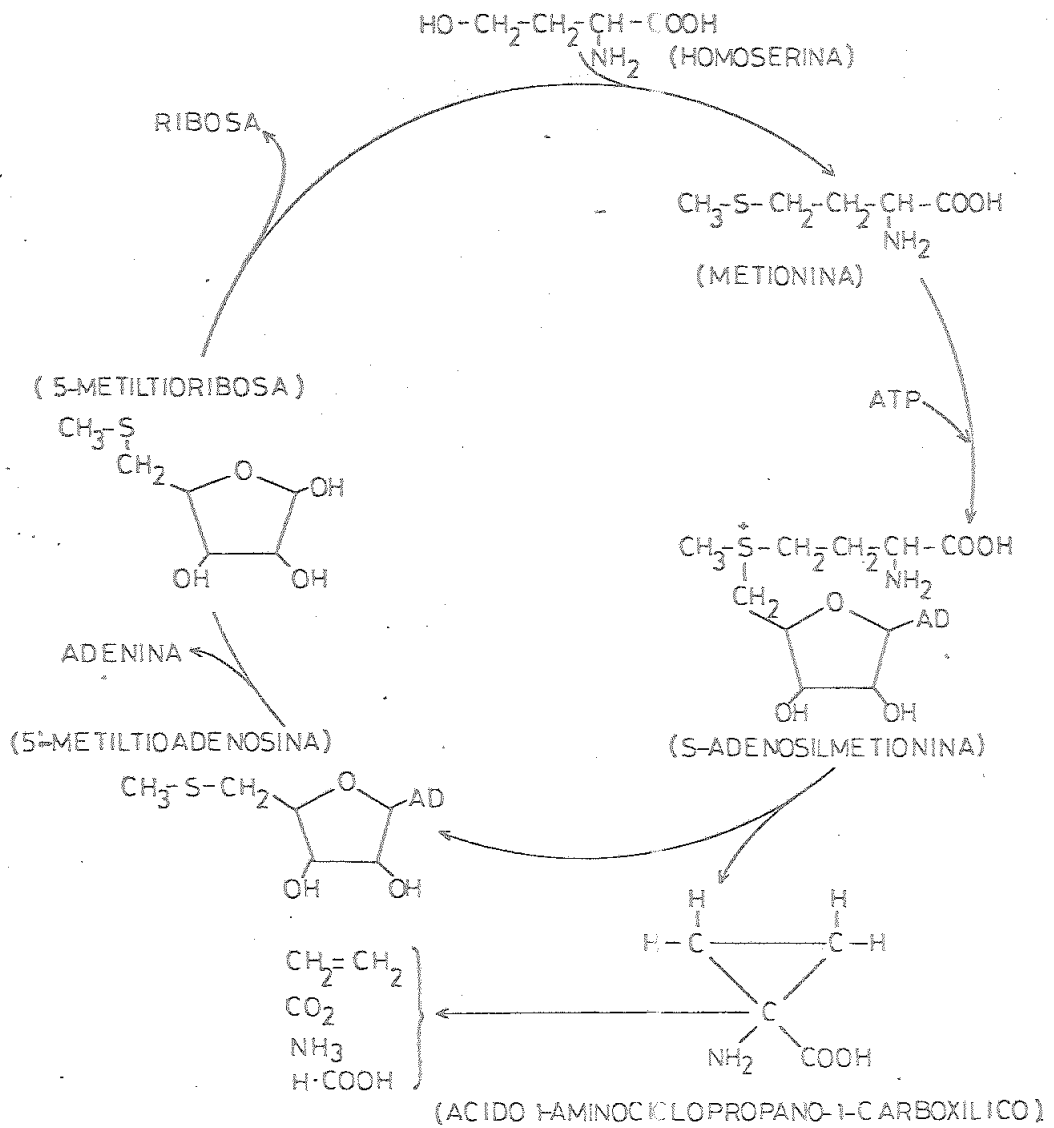


Figura 1: Esquema de la Biosíntesis del etileno a partir de la metionina en vegetales superiores.

nos han llevado a concebir que el sistema AIA-oxidasas/-  
peroxidasas, sea precisamente el que actúe en la biosín-  
tesis del etileno a partir de la metionina, y por su---  
puesto, en el paso ACC → etileno, sobre todo teniendo=  
presente el efecto, reiteradamente mencionado en la bi-  
bliografía, de un incremento en la formación de etileno  
producido por AIA exógeno. Así quedará perfectamente -  
justificada la sorprendente dualidad de funciones del -  
sistema enzimático objeto de nuestra atención.

## II. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

## II.I. LA ABSCISION EN GENERAL

Los antiguos griegos ya reconocieron que la abscisión era uno de los fenómenos botánicos importantes. Theophrastus (285 a.C.) en sus escritos "Investigaciones sobre plantas" incluía la abscisión de las hojas particularmente las diferencias encontradas entre plantas de hoja caduca y perenne, así como los efectos de factores ambientales.

Dentro del ciclo vital de la planta, quizás el significado más obvio del proceso de abscisión sea el considerarlo como una "auto-poda" de la propia planta. La abscisión del fruto, lógicamente, debe mirarse como una etapa dentro del proceso de maduración y senes

cencia.

Sin duda, el núcleo fundamental de la abscisión es la morfogénesis de la capa de separación, la región estrecha en la que tienen lugar los cambios citológicos. Los cambios fisiológicos que acompañan a la senescencia son cambios amplios que afectan al órgano entero. Es sorprendente, sin duda, que uno de los resultados de estos cambios esté tan altamente localizado. El conocimiento de los factores causantes de esta localización es una de las metas importantes de la investigación sobre abscisión.

La bibliografía sobre la abscisión es muy abundante. Algunas recopilaciones importantes deben citarse aquí: Addicott (1961, 1965), Overbeek (1965), Carns (1966), Baird y Webster (1979), Lieberman (1979).

Nosotros nos limitaremos a recoger aquí algunas ideas generales sobre el proceso de abscisión, bien establecidas, y hechos reseñados en la bibliografía, más o menos comprobados, que guardan estrecha relación con nuestros estudios, y cuya interpretación puede ser más correcta a la luz de los resultados de nuestras experiencias.

### II.I.I. Aspectos morfológicos

En el proceso de abscisión se distinguen claramente dos etapas: separación del fruto y protección de la superficie expuesta en la planta después de la caída del fruto. La separación se alcanza por la disolución de uno o más estratos de la pared celular, implicando, al menos una citolisis parcial.

La protección de la herida expuesta se realiza por suberización, lignificación, etc. de los tejidos y frecuentemente por el desarrollo (división celular) de una o más capas protectoras.

La separación se puede alcanzar por acción de factores fisiológicos, factores mecánicos o una combinación de ambos. De forma natural, la separación se produce por cambios fisiológicos que culminan en citólisis. Cuando la citólisis ha debilitado suficientemente las células de la capa de separación, el fruto subtendido cae por su propio peso.

Típicamente, el resultado de la abscisión fisiológica es una cicatriz uniforme de una capa regular de células.

La zona de abscisión está localizada, normal

mente, en la base del órgano que sufre la abscisión, -- que frecuentemente se estrecha y/o palidece en su coloración.

Las características de las células de las zonas de abscisión indican que son regiones de desarrollo paralizado. Ciertamente los cambios conducentes al desarrollo de la capa protectora deben tenerse en cuenta. -- Por otra parte, los cambios que originan la citolisis y la separación se pueden considerar degenerativos, puesto que conducen a la disolución de, al menos, parte de la célula.

#### II.I.2. Aspectos histoquímicos

En la zona de abscisión se ha demostrado una disolución de pectinas (Facey, 1950; Rasmussen, 1965; -- Morré, 1968), conducente a la formación de la capa de -- separación.

Hay pruebas, basadas en estudios histológi--cos, de hidrólisis de otros componentes de la pared celular, particularmente celulosa y hemicelulosa.

Es probable que la degradación de los consti--tuyentes de la pared celular sea causada por acción en-

zimática. Esta idea surge del hecho de que actividades= pectinmetilesterasa, poligalacturonasa y celulasa se - han puesto de manifiesto en diversas plantas (Osborne, = 1958; Rasmussen, 1965; Horton y Osborne, 1967; Morré, - 1968).

Las paredes de las células de la zona de abscisión también pierden calcio y magnesio durante la separación (Stösser et al., 1969). Pasándose en la evidencia de esta pérdida, junto con los datos de la degradación de pectinas en la zona de abscisión, se puede explicitar razonablemente la separación celular, puesto que las pectinas actúan como cemento de unión entre las células y están ligadas entre sí por cationes polivalentes, tales como el calcio. Además las cadenas moleculares de ácidos pécticos están unidas a hemicelulosa y celulosa mediante puentes de calcio y magnesio; así el papel del calcio y del magnesio en mantener la integridad de la pared celular está bien establecido.

Paralelamente a estos estudios se ha investigado el posible papel de las hormonas vegetales en la - abscisión, habiéndose sugerido que la auxina, que está= asociada con los cambios de plasticidad en la pared celular (Bonner, 1960), puede: 1) ejercer su acción a través de enzimas que alteran las características de dicha



pared; 2) servir para separar los iones  $Ca^{++}$ , que entrelazan los carboxilos de los polímeros de unión ó 3) alterar la disposición de las fibrillas de celulosa en la pared celular.

La incorporación de leucina y uridina marca-das a las capas de abscisión en desarrollo de cerezas ácidas y el retraso de la abscisión por inhibidores de -la síntesis de proteínas, sugieren que tiene lugar du--rante la abscisión una síntesis "de novo" de ARN y -proteínas (Stösser et al., 1971). Pruebas en apoyo de -estas observaciones se derivan de investigaciones que -muestran la incorporación preferente de ARN marcado y -precursores de proteínas marcados en la zona de absci--sión de explantes de hojas de judías (Abeles y Holm, -1966; Abeles 1968; Webster, 1968). Además, en flores -de algunas especies vegetales se encuentra un abundante retículo endoplásmico en las células senescentes de la -zona de abscisión, lo que sugiere la síntesis de proteininas y/o de ciertos enzimas asociados con la degradación de paredes celulares primarias (Valdovinos y Jensen, -1968; Valdovinos et al., 1972).

El retraso en el desarrollo de la capa de -abscisión en frutos de cereza ácida tratados con ciclo-

heximida puede indicar una relación causal entre síntesis de proteínas, y abscisión. Basándose en estudios con inhibidores de la síntesis de proteínas, trabajando con explantes de judías, Abeles (1968), concluye que la síntesis de proteínas en la zona de abscisión es un requisito para la síntesis de enzimas de la pared tales como celulasa. Los resultados de Stösser et al. (1971), con cerezas ácidas tratadas con cicloheximida y teñidas con azul de bromofenol mercúrico apoyan la conclusión de Abeles.

Peroxidasas, deshidrogenasas y fosfatasas ácidas, han sido localizadas en la zona de abscisión de frutos de cerezas ácidas y dulces durante la formación de la capa de abscisión (Poovaiah et al., 1973). Aunque no es posible sobre la base de datos histoquímicos establecer la participación de estos enzimas en el proceso de abscisión "per se" en estos frutos, su actividad localizada en regiones en las que ocurre la separación es indicativa de una asociación con la abscisión. Ridge y Osborne (1970 a,b), encuentran actividad peroxidasa en zonas de abscisión del guisante y creen que dicha actividad es moderada por el etileno. Poovaiah et al. (1973), sugieren que las peroxidasas pueden regularlos

niveles endógenos del AIA en la abscisión de los frutos.

La actividad deshidrogenasa localizada en la zona de abscisión de cerezas puede reflejar la actividad respiratoria incrementada durante el período de separación. Por otra parte, las fosfatasas ácidas, que Deleo y Sacher (1970), asocian con la maduración y senescencia, pueden influir en la permeabilidad de las membranas de las células de la zona de abscisión.

### II.I.3. Aspectos fisiológicos

Como hemos indicado anteriormente, limitaremos a nuestros comentarios a aquellas facetas que guardan relación directamente con nuestras experiencias actuales, aún estando convencidos de que el proceso de la abscisión es el resultado de la interacción de muy diversos factores.

#### II.I.3.I. Acido indolacético e indolacético-oxidasa

Los cambios en auxina en una fase de pre-abscisión son ahora bien conocidos. La abscisión va precedida de una disminución en auxina del órgano que sufre

abscisión. El retraso de la abscisión por acción de auxina exógena fue indicado primero por Laibach (1933). Esto ha sido confirmado innumerables veces en una amplia variedad de plantas.

Carns (1966), Jacobs (1962), Addicott (1965) y Rubinstein y Leopold (1964), han presentado revisiones, asignando a la auxina un papel regulador específico en el proceso de abscisión.

Por el contrario, también se ha descrito por Addicott y Lynch (1951), el efecto opuesto: la aceleración de la abscisión por aplicación de auxina en la región próxima de la zona de abscisión, hecho que ha sido confirmado por otros investigadores. La aceleración provocada por aplicación próxima se puede contrarrestar por una aplicación distante simultánea y según Addicott Lynch y Carns (1955), la velocidad de la abscisión se regula por el gradiente de AIA creada a través de la zona de abscisión.

La presencia del sistema enzimático AIA-oxidasa en vegetales superiores está fuera de duda. Concretamente en el olivo ha sido estudiada su presencia en hojas y yemas, a lo largo del ciclo vegetativo, por Catalina et al. (1972), en relación con la floración.

El papel fisiológico de la AIA-oxidasa parece ser el de regular los niveles de AIA endógeno. Consecuentemente con ello, hay bastante evidencia de la intervención de este enzima en aquellos procesos fisiológicos vegetales en los que la concentración de auxina debe disminuir, tales como la maduración y abscisión. Así Vendrell (1969), muestra como la auxina retarda la maduración del plátano, y Hale (1968) y Hale et al. (1970), encuentran el mismo efecto en la uva, comprobando que la auxina endógena disminuye en el momento en que se inicia la maduración, haciéndose los tejidos sensibles al etileno. Frenkel (1972), estudiando los isoenzimas de peroxidasa y AIA-oxidasa de peras, tomates y arándanos encuentra un aumento de la actividad AIA-oxidasa durante la maduración, y apunta que la finalidad sería conseguir la disminución de la concentración de AIA necesaria para hacer los tejidos permeables al etileno.

En consecuencia con este punto de vista, Frenkel y Dick (1973), encuentran que las infiltraciones de auxina retardan la maduración de las peras, y Morgan y Durham (1972), comprueban que inhibidores del transporte de la auxina peciolar originan una más rápida abscisión.

si3n de las hojas del algod3n, al reducir el suministro de AIA a las zonas de abscisi3n. Schwertner y Morgan (1966), confirmando que los fenoles (normalmente monofenoles), que actuan como cofactores "in vitro" de la oxidasa, aceleran la abscisi3n y que los fenoles (normalmente difenoles), que actúan de inhibidores "in vitro" de la oxidasa, retardan la abscisi3n. Concluyen que el mecanismo de regulaci3n de la abscisi3n por compuestos fen3licos implica la destrucci3n de auxina vía AIA-oxidasa. Frenkel y Haard (1973), encuentran que la aplicaci3n de una anti-auxina, el ácido  $\alpha$ -(p-clorofenoxi)-isobutírico acelera la maduraci3n de las peras, comprobando que el mecanismo se basa en estimular la actividad AIA-oxidasa.

#### II.I.3.2. Etileno

Los estudios sobre el papel del etileno en la fisiología vegetal son numerosísimos y la bibliografía, consiguientemente abundante, (Abeles, 1973 ; Yang, 1974; Lieberman, 1979). Procuraremos recoger cual es el estado actual de los conocimientos.

Hoy ya no se duda en considerar al etileno como una hormona vegetal. Es una realidad que el etileno

no es una sustancia natural, poderoso regulador en el metabolismo vegetal, actuando e interaccionando con otras hormonas vegetales reconocidas y sus efectos se observan especialmente en períodos críticos del ciclo vital de las plantas superiores.

Los estudios bioquímicos y fisiológicos sobre la biosíntesis del etileno y modo de acción han aumentado significativamente en los pasados veinte años. Dos conquistas en los últimos años han tenido considerable importancia en la expansión de las investigaciones. Una es el uso generalizado de la cromatografía gaseosa, que permite una determinación rápida, sensible y simple del etileno liberado en tejidos vegetales. Como consecuencia, el etileno es, ahora, la hormona vegetal más fácil de determinar, a causa de ser un gas que se libera de los tejidos y no requiere extracción o purificación previa al análisis. La segunda conquista importante es el re-descubrimiento de las relaciones entre producción de etileno por tejidos vegetales y auxina (Burg y Burg, 1966; Hichener, 1938; Morgan y Hale, 1962; Zimmerman y Wilcoxon, 1935). El re-descubrimiento de esta relación ha conducido a interesantes estudios, que, también, encuentran relación entre etileno y citokininas -

(Fuchs y Lieberman, 1968; Imaseki et al., 1975; Lau y Yang, 1973; Lieberman et al., 1977), etileno y ácido giberélico (GA) (Stewart et al., 1974) y etileno y ácido-abscísico (ABA) (Coombe y Hale, 1973 y Lieberman y Kunishi, 1971).

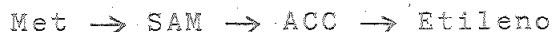
Las investigaciones en el área de la bioquímica y fisiología del etileno tienen sus objetivos en el establecimiento de su ruta biosintética, controles reguladores y mecanismos de acción de esta hormona vegetal. Nosotros limitaremos nuestra atención, fundamentalmente, a su ruta biosintética y sus relaciones con el AIA, por la aportación que significan nuestras experiencias, como veremos más adelante.

La metionina, fué reconocida como el principal, sino el único, precursor del etileno en plantas superiores hace más de una década. Recientemente, se ha presentado evidencia de que la activación de la metionina por el ATP es la primera reacción en la ruta desde la metionina al etileno, (Adams y Yang, 1977; Konze y Kende, 1979), y que el ácido 1-amínociclopropano-1-carboxílico (ACC) es su inmediato precursor (Adams y Yang, 1979; Lürssen et al., 1979).

Adams y Yang (1979), sugieren la siguiente -



secuencia para la conversión de la metionina al etileno en plantas superiores:



En 1979 Lieberman escribía: "La laguna mayor para elucidar la ruta del etileno permanece en el sistema enzimático, aparentemente muy delicado, altamente estructurado, probablemente localizado en la membrana plasmática, quizás sobre su superficie y que no sobrevive a la destrucción celular. Este sistema enzimático puede ser único en cuanto que incluye un mecanismo generador de radicales libres, bien controlado, y su activación puede estar estrechamente regulada por la utilización del etileno y por otras hormonas, particularmente la auxina. La clarificación de la estructura y acción de este sistema enzimático arrojará luz, no sólo sobre un mecanismo de control bioquímico intrincado en la producción y utilización de una hormona vegetal, sino también sobre interacciones hormonales y la importancia de la integridad estructural de la membrana plasmática, que parece ser la localización del sistema formador de etileno".

Uno de los caminos para probar si esta ruta realmente existe durante la biosíntesis del etileno, es

correlacionar la actividad y características de los tres enzimas que pueden catalizar las reacciones individuales desde la metionina al etileno, con la actividad y características del sistema sintetizante del etileno "in vivo".

Estos primeros pasos han sido seguidos en el caso del enzima que transforma Met en SAM, metionina-adenosil-transferasa, de flores senescentes de *Ipomoea tricolor* (Konze y Kende, 1979 b); y para el enzima que actúa en el paso SAM  $\rightarrow$  ACC de frutos de tomate (Boller et al., 1979), cuya actividad es inhibida por los análogos de la rizobitoxina, tales como la aminoetoxivinilglicina (AVG), inhibidor típico de reacciones en que toma parte el fosfato de piridoxal (Boller et al., 1979).

Del tercer sistema enzimático, el cual oxida al ACC para producir etileno, se tiene poca información excepto que el proceso requiere oxígeno (Adams y Yang, 1979; Konze y Kende, 1979 a).

Entre los mecanismos postulados para explicar la biosíntesis del etileno a partir de la metionina, están el de Adams y Yang (1979) y el de Lürssen et al. (1979).

Según la hipótesis de Adams y Yang (Figura - 2), el fosfato de piridoxal se une a la S-adenosilmetionina (SAM) como base de Schiff, liberándose aquel antes de formarse el ACC. Los autores sugieren que el oxígeno es transformado en  $H_2O_2$  (o un hidroperóxido) por acción de una oxidasa y, posteriormente, en presencia de una - peroxidasa el  $H_2O_2$  rompe el anillo ciclopropano paso - previo a la liberación del etileno.

En la hipótesis de Lürssen et al. (Figura 3), el fosfato de piridoxal permanece unido, como base de - Schiff, al ACC hasta su degradación a etileno. Ellos ha cen intervenir también al coenzima A.

#### II.I.3.3. Etileno y ácido indolacético.

Zimmerman y Wilcoxon (1935), descubrieron - que la auxina estimula la liberación de etileno en plantas de tomate y sugirieron un papel hormonal para el etileno en asociación con la auxina. Más recientemente - se ha mostrado por Morgan y Hall (1962, 1964), Abeles - (1966), y Burg y Burg (1966), la influencia de niveles= supra-óptimos de auxina ( $10^{-5}$  -  $10^{-3}M$ ) sobre la producción de etileno. La auxina a niveles altos es necesaria para estimular el "sistema formador de etileno" en gui-

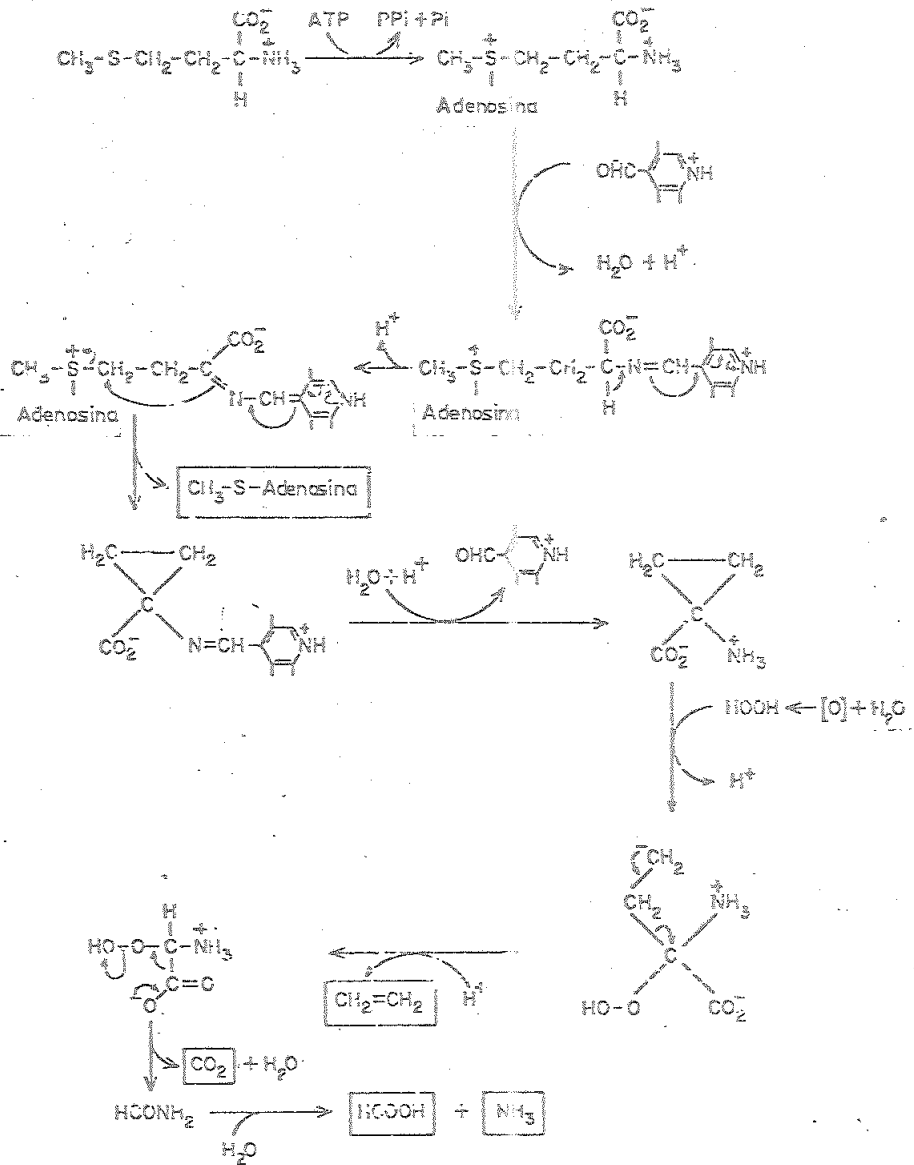


Figura 2: Mecanismo postulado por Adams y Yang (1979), para la biosíntesis del etileno a partir de la metionina.



santes etiolados (Kang et al., 1971) y segmentos de tejidos de judías (Sakai e Imaseki, 1971), y se cree es el resultado de un proceso de inducción, ya que siempre se presenta un período inactivo de 1 a 3 h., y que los inhibidores de la síntesis de ARN y proteínas evitan la producción de etileno inducida por la auxina (Abeles, 1966; Lieberman y Kunishi, 1975; Sakai e Imaseki, 1971). La inactivación del "sistema formador de etileno" en presencia de cicloheximida, en segmentos de hipocotilos de judía (Sakai e Imaseki, 1971) y epicotilos de guisantes (Lieberman y Kunishi, 1975), ocurre muy rápidamente, lo que puede explicar la necesidad de altos niveles de AIA para la producción de etileno continuamente. Estos datos indicarian (Lieberman, 1979), que el "sistema enzimático formador de etileno" está en constante flujo dinámico entre síntesis y degradación. Más recientemente se ha encontrado que el período de inducción en la producción de etileno inducida por la auxina en segmentos de plántulas etioladas es solo de 15 - 20 min. Estos resultados sugieren que el efecto inicial de la auxina sobre la producción de etileno es demasiado rápida para implicar síntesis de un enzima productor de etileno. El argumento más fuerte para pensar en la induc--

ción de un "sistema enzimático formador de etileno" por la auxina es su inhibición por inhibidores clásicos de la síntesis de proteínas y ARN (Abeles, 1966; Lieberman y Kunishi, 1975; Sakai e Imaseki, 1971). Aunque se ha dicho que la cicloheximida puede no ser específica en la inhibición de la síntesis de proteínas (MacDonald y Ellis, 1969), el uso de otros inhibidores de la síntesis de ARN, todos los cuales inhiben la liberación de etileno inducida por auxina (Lieberman y Kunishi, 1975), apoyan la implicación de síntesis de ARN y proteínas en la producción de etileno inducida por auxina. Se han hecho intentos para indentificar nuevas proteínas específicas, extraídas de tejidos de plántulas tratadas con AIA, que pudieran estar asociadas con la producción de etileno, pero sin éxito (Anderson y Lieberman, 1976).

#### II.I.3.4. El etileno en la maduración y senescencia de los frutos.

La maduración y senescencia de los frutos se ha asociado, hace ya muchos años, con la producción y acción del etileno y, en efecto, el etileno fue, y aún es, considerado como el agente "disparador" de la maduración o como hormona de maduración de los frutos (Burg

y Burg, 1962), que pone en movimiento reacciones asociadas con el proceso de maduración (Marei y Crane, 1971). Más recientemente, sin embargo, esta interpretación se ha puesto en duda en el caso de algunos frutos (Coombe, 1976). Estas dudas derivan mayormente de la falta de una correlación entre producción de etileno y reacciones de maduración, (Coombe y Hale, 1973; McGlasson et al., 1975), o de experiencias en que la maduración es retrasada por la auxina, mientras la producción de etileno es incrementada (Frenkel, 1972, 1975 a; Vendrell, 1969). Frenkel et al. (1975) han propuesto que los productos de la degradación oxidativa del AIA son los "disparadores" de la maduración. Sin embargo, se ha demostrado, que los oxiindoles, los productos de oxidación de la auxina, no inducen la producción de etileno y no pueden sustituir al AIA en el "sistema formador de etileno" de hipocotilos de judía (Lau et al., 1978). A pesar de estas interrogantes sobre la función "disparadora", el etileno se sigue considerando como un acelerador de la senescencia (Kende y Hanson, 1977).

El papel iniciador del etileno en la maduración y senescencia es apoyado por hallazgos más recientes, como que el AVG (aminoetoxivinilglicina), inhibi-



dor de la producción de etileno, rociado sobre manzanas antes de la cosecha, demora la maduración, reduce la caída y aumenta la fuerza de ruptura (o de arranque) de los frutos (Bangerth, 1978).

## II.2. LA ABSCISION EN EL OLIVO

Ya hemos indicado anteriormente que, al iniciar nuestros estudios, las únicas experiencias orientadas a resolver el problema de la recolección de la aceituna, consistían en unos ensayos totalmente empíricos, = de tratamientos de los árboles: con un sin número de sustancias, que se esperaba provocasen la caída selectiva = de los frutos, sin afectar perniciosamente al árbol - (caída de hojas, etc.). Estos estudios no merecen un mayor comentario.

Posteriormente, comenzaron a aplicarse al olivar los conocimientos adquiridos en otros árboles frutales, consistentes fundamentalmente en tratamientos - con determinados compuestos que, incorporados al árbol, se descomponen originando etileno, cuyo papel decisivo = en la maduración y senescencia ya se comentó. Entre los

compuestos generadores de etileno utilizados están el ácido 2-cloroetilfosfónico (Ethepon, Ethrel), el 2-cloroetil-tris-(2-metoxietoxi)-silano (CGA-13586, Alsol) y el 2-cloroetilsulfónico (H81). Todos ellos causan abscisión de los frutos, pero simultáneamente ocasionan una excesiva caída de hojas y reducen la floración en la primavera siguiente (Hartmann y Heslop, 1968; Hartmann et al., 1972, 1975, 1976; Lavee et al., 1973; Ben-Tal y Lavee, 1976 a, b; Bialá y Masera, 1973). Estas experiencias han ido acompañadas de estudios histoquímicos y ultraestructurales de la zona de abscisión (Reed y Hartmann, 1976).

También debemos mencionar aquí el desarrollo de una maquinaria apropiada para someter a vibración los árboles, facilitando así la caída de los frutos.

El hecho de haberse propuesto medidas de actividades enzimáticas en extractos vegetales, con el fin de detectar deficiencias en elementos micronutrientes que forman parte de determinadas enzimas (O'Sullivan et al., 1969) y la amplia experiencia en el Instituto de la Grasa sobre la determinación de elementos trazas en productos vegetales, hicieron a Vioque y Albi (1975), concebir la idea de seguir la evolución de los=

micronutrientes en el pedúnculo, desde la formación de la aceituna hasta su maduración y caída, pensando que alguno de ellos estuviera implicado en algún sistema enzimático participante en los procesos de abscisión dando así los primeros pasos en este campo.

Estos autores siguieron la evolución de las concentraciones de hierro, cobre, manganeso y cinc en pedúnculos y aceitunas durante las campañas 1971-1972 y 1972-1973. Ellos no observaron cambios de los cuatro metales en aceitunas, ni de cobre, manganeso y cinc en pedúnculos. El hecho notable, observado, fue el aumento de la concentración de hierro en pedúnculos, alcanzando su máximo valor cuando el fruto se ha desarrollado completamente, conservando aún su color verde.

### III. MATERIALES Y METODOS

### III.1. OLIVOS

Se han utilizado olivos de unos siete años de la variedad Picual.

### III.2. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Todos los productos utilizados fuera de grado analítico y se adquirieron a SIGMA, St. Louis, U.S.A.; SERVA; Heidelberg, Alemania; PHARMACIA, Upsala, Suecia; MERCK, Darmstadt, Alemania; BDH, Poole, Inglaterra y CARLO ERBA, Milán, Italia.

Se ha utilizado agua destilada-deionizada mediante un destilador de vidrio y equipo de resinas intercambiadores de iones, y los gases empleados fueron de alta pureza y suministrados por la Sociedad Española del Oxígeno.

Otros reactivos se recogen al describir las diversas técnicas.

III.3. APARATOS

Dinámómetros: "Pesola".

Triturador: Janke-kunkel, Ultra-Turrax.

Homogeneizador: Omni-Mixer de Sorvall.

Centrífuga refrigerada: Modelo RC2-B de Sorvall.

Espectrofotómetros: Coleman 55, con registrador acoplado y Beckman, Modelo DK-2A.

Equipo de ultrafiltración: UF-52, Amicón.

Sistema cromatográfico: Columnas K 26 y dispositivos auxiliares de Pharmacia, colector de fracciones LKB, Modelo 7.000 Ultrorac, - detector de ultravioleta y registrador Jobling CR 100.

Equipo de electroforesis: Shandon con fuente 500/500 y accesorios de la casa Pharmacia FBE 3.000 para isoelectroenfoque.

pHmetro: Beckman, modelo 3.560 con electrodo standard de vidrio y micro

electrodo Ingold.

Cromatógrafo gaseoso: Perkin-Elmer, modelo F  
17 con FID.

#### III.4. DETERMINACION DE HIERRO

Se sigue el método espectrofotométrico de la ortofenantrolina según Vioque y Villagrán (1956).

#### III.5. MEDIDA DE LA FUERZA DE RUPTURA DE LAS ACEITUNAS

Se utilizan dinamómetros apropiados, que permiten fijar las aceitunas, mientras se aplica una fuerza en la dirección misma del pedúnculo.

#### III.6. DETECCION HISTOQUIMICA DE PEROXIDASAS.\*

Se sigue a Poovaiah y Fasmussen (1973). Cortes frescos longitudinales de la zona de transición entre pedúnculo y fruto se tratan, sobre el porta-objeto, con una gota de  $H_2O_2$  al 1% y una gota de una disolución

0,1 M de benmidina en etanol del 70%. Se incuba 1-2 min., se lava con agua para eliminar burbujas y se toma fotografía en color inmediatamente bajo el microscopio. Un ensayo en blanco se realiza adicionando una gota de CNK 0,1 M junto con los reactivos anteriores.

\* Esta detección ha sido realizada por el Dr. D. Claudio Montero, Jefe de la Sección de Histoquímica del Dpto. de Anatomía Patológica de la Ciudad Sanitaria de la Seguridad Social de Sevilla, al que expresamos nuestro agradecimiento.

### III.7. OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO CRUDO

1.- Se toman del árbol hojas de un año, se pesan 40 g., se lavan con agua deionizada, se secan con papel de filtro y se cortan en trocitos. Se colocan en una botella de policarbonato de 290 ml de capacidad, adaptable al homogeneizador Omni-Mixer y a la centrífuga Sorvall, y se añaden 160 ml de tampón fosfato monopotásico-NaOH pH 6,1, 0,02 M según Clark y Lubs (1937).



- 2.- Se trituran en el Omni-Mixer durante 3 min., con velocidad máxima 10 seg. y 5 seg. de parada. Se continúa agitando durante 20 min. con velocidad mínima. Se lavan el vástago y las cuchillas con 40 ml de tampón, que se recogen en la botella. Volumen total de tampón añadido: 200 ml ( $V_1$ ).
- 3.- Se centrifuga a 27.000 g, de 0 a 5°C. durante 30 min. El sobrenadante se filtra a través de gasa cuádruple, midiéndose el volumen  $V_2$  (aprox. 150 ml). Este extracto, que denominamos crudo, (extracto A), tiene ligera coloración amarilla-marrón. La concentración, referida a material vegetal original, es 0,20 g/ml.
- 4.- Para preparar extractos de pedúnculos se toman 2g de material vegetal y un volumen final de tampón de 10 ml. Se trituran en el Ultra-Turrax en tubos de nylon de 50 ml, adaptables a la centrifuga Sorvall, durante 1,5 min., con velocidad máxima 10 seg. y 5 seg. de parada. Se -

continua agitando 3,5 min. con velocidad mínima.

Todas las operaciones se llevan a cabo en cámara fría entre 4 - 8°C.

### III.8. OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO PARCIALMENTE PURIFICADO

El extracto crudo se purifica parcialmente - por precipitación con acetona fría y tratamiento con polivinilpirrolidona (PVP).

- 1.- Al extracto crudo se añaden, en un vaso de precipitado 5 x V<sub>2</sub> ml. de acetona fría (-10°C). Se deja estar 1 h. a esa temperatura.
- 2.- Se decanta el sobrenadante (que se conserva para estudios posteriores) y ayudándose con 20 ml de acetona-agua (5:1) fría, se pasa el precipitado a una botella de vidrio de 150 ml de capacidad, adaptable a la centrífuga, centrifugándose a 164 g, 15 min., a -10°C. Se hacen -

dos lavados del precipitado con 20 ml de la misma acetona-agua, cada vez, centrifugándose a 365 g y a 1.465 g, respectivamente.

- 3.- A continuación se realizan tres lavados con acetona fría (20 ml cada vez), centrifugándose a 4.080 g, después del primer lavado y 16.000 g después de los últimos lavados, siempre a  $-10^{\circ}\text{C}$  y durante 15 min.
- 4.- Se retira la acetona sobrenadante después del tercer lavado, con ayuda de una jeringa, y el resto se evapora con corriente de nitrógeno.
- 5.- El residuo se disuelve, en la misma botella, en  $40 \times \frac{V_2}{V_1} \times 3$  ml de tampón fosfato pH 6,1 (0,02 M), agitándolo durante 30 min. A este extracto, lo denominamos extracto B.
- 6.- A este extracto B se añaden  $40 \times \frac{V_2}{V_1}$  g. de PVP hidratado y se agita durante 30 min., en un vaso de precipitado.
- 7.- Se filtra a través de un embudo de placa

filtrante G-2, aplicando vacío y presionando la masa de PVP sobre la placa.

8.- El filtrado se centrifuga a 39.100 g, durante 30 min. de 0 a 5°C. El sobrenadante, extracto parcialmente purificado C, es incoloro y puede mantenerse congelado durante 3-4 semanas, conservando toda su actividad. La concentración referida a material vegetal original es 0,33 g/ml.

9.- En extractos de pedúnculos se siguen los mismos pasos anteriores, empleando volúmenes y pesos de reactivos proporcionales a la menor cantidad de muestra.

Todas las operaciones se llevan a cabo en cámara fría entre 4-8°C.

### III.9. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD AIA-OXIDASA

Como medida de la actividad se utiliza la velocidad inicial de destrucción del ácido indolacético (AIA) durante la incubación de una cantidad conocida del mismo y una parte alícuota de extracto enzimático. La determinación del AIA residual se hace con ayuda de

la reacción colorimétrica de Salkowski, modificada por Gordon y Weber (1951).

En un erlenmeyer de 50 ml se colocan 1 ml de diclorofenol (DCP) 3 mM, 1 ml de  $Mn^{++}$  ( $Cl_2Mn$ ) 3 mM, 5,75 ml de tampón fosfato monopotásico-NaOH pH 5,7, 0,02 M según Clark y Lubs (1937), 2 ml de AIA 1 mM y 0,25 ml de extracto enzimático (volumen final de incubación: 10 ml). El erlenmeyer se coloca en un baño termostático a 30°C, sobre una batea soporte sometida a movimiento de vaivén (90-100 vaivenes por minuto). En el tiempo cero y cada 15 min. se toman muestras de 0,5 ml que se mezclan con 2 ml del reactivo Gordon-Weber y 0,5 ml de agua deionizada en un tubo de ensayo. Se agita, se deja en la oscuridad durante 30 min. y se lee la absorbancia a 530 nm en cubeta de 1 cm.

Al iniciarse la reacción (reacción de orden cero respecto al sustrato), existe una relación lineal entre las absorbancias medidas,  $A_t$  (una medida de la cantidad de AIA presente) y los tiempos correspondientes,  $t$ , del tipo

$$A = -kt + A_0$$

siendo  $A_0$  la absorbancia en el tiempo cero. El valor de  $k$  es una medida de la velocidad inicial de reacción.

Si la reacción se deja transcurrir un período de tiempo suficientemente largo, o la actividad enzimática del extracto es muy alta, la concentración de sustrato llega a ser insuficiente para mantener el estado de saturación del enzima, la reacción deviene de primer orden, cumpliéndose entonces la relación.

$$\ln A = -kt + \ln A_0$$

la constante  $k$  (tiempo<sup>-1</sup>) nos permite caracterizar perfectamente la reacción, bien directamente o una vez transformada en velocidad inicial de reacción, multiplicándola por la concentración inicial de sustrato.

Se toma como unidad de actividad enzimática la cantidad de enzima que destruye un  $\mu$ mol de AIA por minuto

### III.10. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA

El método está inspirado en el de Pilet y Lavanchy (1969), en el que se usa guayacol como reactivo. Se miden, en espectrofotómetro provisto de registrador, en cubeta de 1 cm y a lo largo de 5 min., las absorbancias a 420 nm de una mezcla de reacción compuesta de 2=

ml de tampón pH 6,1, 0,002 M, 0,1 ml de extracto enzimático, previamente diluido diez veces, 0,2 ml de guaya-col al 1% (V/V) en agua y 0,2 ml de agua oxigenada 30 mM. Durante este período inicial las absorbancias son lineales respecto al tiempo. Hemos tenido ocasión de observar que esta linealidad no se presenta, si la fuerza iónica del medio es más alta; de ahí el uso del tampón 0,002 M. La actividad:peroxidasa, A/min., viene dada por la pendiente de la recta.

Hemos tomado como unidad de actividad enzimática la cantidad de enzima que origina el aumento de una unidad de absorbancia por minuto.

Observación: El volumen tomado de extracto enzimático así como la dilución previa, deben escogerse de forma que las absorbancias alcanzadas al final del período de medida, 5 min., caigan dentro del margen 0,2-0,7 (60 y 20% de transmisión respectivamente), ajustándose con el tampón el volumen final de reacción a 2,5 ml.

### III.11. DETERMINACION DE PROTEINAS

El contenido proteínico de los extractos enzimáticos se determina siguiendo el método de Lowry y -

col. (1951), utilizando ovoalbúmina como patrón. En el caso de extractos crudos no puede aplicarse directamente el método de Lowry, ya que los fenoles presentes falsen los resultados. Hemos comprobado que una precipitación con ácido tricloroacético o el paso por una columna de Sephadex G-25, previamente, subsana este inconveniente con resultados análogos satisfactorios.

### III.12. HIDRATACION DEL PVP

Se utiliza el segundo de los procedimientos recomendados por Knypl y Chylinska (1974).

A 100 g de PVP se le añaden 1.000 ml de tampón fosfato pH 6,1, 0,1 M y se deja estar durante 1 h, agitando ocasionalmente; se decanta el exceso de tampón, reemplazándolo con tampón nuevo tres veces. El PVP hidratado, así obtenido, se lava con tampón, en un embudo Buchner, bajo succión, conservándolo en refrigerador en frasco cerrado.



### III.13. ULTRAFILTRACION

Se ha utilizado un equipo de ultrafiltración UF-52 de Amicón y membranas XM-100 (retiene moléculas de peso molecular superior a 100.000), XM-50 (retiene moléculas de peso molecular por encima de 50.000), y UM-10 (retiene moléculas de peso molecular por encima de 10.000).

Rutinariamente, un volumen determinado de extracto enzimático, se añade a la célula de ultrafiltración Amicón, sobre la membrana XM-100. La filtración se lleva a cabo bajo presión de nitrógeno de 18 p.s.i. con agitación magnética. La fracción filtrada se concentra sobre la membrana XM-50 a una presión de nitrógeno de 40 p.s.i. El filtrado de esta segunda membrana se concentra sobre la membrana UM-10 a la misma presión.

### III.14. CROMATOGRAFIA DE FILTRACION POR GEL

#### III.14.1. Estudio de las actividades enzimáticas

Se ha usado una columna (33 x 2,6 cm) empa-

quetada con Sephadex G-100 y equilibrada con tampón fosfato pH 6,1, 0,02 M. Las proteínas patrones disueltas en 1 ml del tampón indicado o 1 ml de extracto enzimático se colocaron en la columna, eluyéndose con el mismo tampón con un flujo de 0,3-0,4 ml/min, recogién dose fracciones de 2 ml mediante un colector automático LKB, mod. Ultrorac.

Los volúmenes de elución de las proteínas ( $V_e$ ) se calcularon registrando continuamente las absorbancias a 254 nm, y la elución del sistema enzimático determinando las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa en alícuotas de las fracciones. El volumen vacío de la columna ( $V_0$ ) se midió calculando el volumen de elución de una muestra de 1 ml de Azul Dextrano 2.000 (1 mg) y el volumen total de la columna ( $V_t$ ) se determinó calibrando la columna vacía con agua destilada.

Las proteínas usadas como patrón y sus pesos moleculares fueron: albúmina de suero bovino (67.000), ovoalbúmina (43.000) y citocromo C (12.300).

### III.14.2. Determinación de pesos moleculares

Se ha empleado una columna (91,1 x 2,6 cm) -

empaquetada con Sephadex G-200 superfino y equilibrada con tampón fosfato 0,02 M, pH 6,1. Las proteínas patrones y el Azul Dextrano 2.000 disueltos en 4 ml del tampón indicado o 4 ml de extracto enzimático se colocaron en la columna, eluyéndose con el mismo tampón con un caudal de 1,5 - 1,8 ml/h, recogiendo fracciones de 2 - ml.

Los volúmenes de elución de las proteínas y sistema enzimático, volumen vacío y volumen total de la columna se determinaron como en el apartado anterior.

Las proteínas patrones utilizadas y sus pesos moleculares se recogen a continuación: catalasa (232.000), aldolasa (158.000), albúmina de suero bovino (67.000), ovoalbúmina (43.000), quimotripsina (25.000) y ribonucleasa (13.700). Las demás condiciones como en el apartado anterior.

### III.15. ELECTROFORESIS

#### III.15.1. Isoelectroenfoque

Técnica: Hemos operado con láminas de gel de

poliacrilamida (PAA), técnica horizontal, en accesorio FBE 3000 de PHARMACIA; con platina refrigerada con agua corriente. El gel tiene la composición T = 5%, C = 2,5%, recomendada por Jeppsson et al. (1978), y un gradiente de pH de 3 a 10, conseguido por incorporación de anfólito LKB o PHARMACIA.

Como portamuestras usamos lámina de poliester, apoyada sobre el gel. Para controlar la marcha del proceso y, especialmente, su final llevamos dos muestras de citocromo C a unos 2 cm de cada extremo del gel, en la dirección del paso de la corriente.

Condiciones eléctricas:

Pre-enfoque: 200 V, 1 h.

A continuación se llevan las muestras.

Enfoque: 1ª fase, 200 V, 2 h.

2ª fase, 400 V, 1 h, 30 min. aprox.

(el final se establece cuando ambas bandas de citocromo C coinciden).

Para medir el pH a lo largo de la lámina de gel, hemos utilizado un microelectrodo Ingold, realizando medidas cada cm.

Revelado: El revelado de las bandas enzimáticas se hace por sus actividades peroxidasa y AIA-oxidasa.

La actividad peroxidasa se pone de manifiesto usando el reactivo recomendado por Schrauwen (1966), que contiene una mezcla de bencidina y guayacol.

La actividad AIA-oxidasa, con el recomendado por Hoyle (1977), que utiliza la propiedad del azul sólido BB (Fast Blue BB, FBBB) de reaccionar con los productos de la oxidación del AIA por el enzima, en un medio apropiado, en presencia de  $Mn^{++}$  y DCP.

### III.15.2. Electroforesis en gel con gradiente de concentración de poliacrilamida

Esta técnica electroforética permite determinar pesos moleculares de proteínas enzimáticas identificándolas según sus reacciones específicas, pero tiene la limitación de no poderse determinar pesos moleculares inferiores a 40.000 daltons.

Hemos operado con láminas de geles prefabricadas, de la firma Pharmacia, del tipo 4/30, es decir, que se comienza el proceso en una zona de gel con un

4% de poliacrilamida y se termina con un 30%.

Como proteínas patrones hemos utilizado las colecciones suministradas por PHARMACIA y se opera con tampón Tris-bórico-EDTA, pH = 8,3-8,4. recomendado por PHARMACIA.

Condiciones eléctricas:

Equilibrio (sin muestras): 70 V, 20 min.

Pre-electroforésis: 70 V, 20 min.

Electroforésis: 150 V, 15 h o 32 h.

Revelado de proteínas:

Fijado: ácido sulfosalicílico 10%, 30 min.

Teñido: Coomassie G 250 0,02% en ácido acético 7% (durante la noche).

Desteñido: ácido acético 7%.

Revelado de peroxidasas:

El indicado antes según Schrauwen (1966).

III.16. INCUBACION DEL ACIDO. 1-AMINOCICLOPROPANO-1--  
CARBOXILICO CON EXTRACTO ENZIMATICO.

En un vial de 15 ml se colocan 50  $\mu$ l de ACC= 1 M ó 100 mM, 200  $\mu$ l de fosfato de piridoxal 10 mM y se

completa hasta 1 ml con tampón fosfato 0,02 M, pH 5,7. Se agita durante 10 min. a 30°C. Se añaden 0,5 ml de DCP 3 mM, 0,5 ml de  $Mn^{++}$  3 mM, 1 ml de AIA 1 mM, una alícuota de extracto enzimático, y se completa hasta un volumen final de 5 ml. Se cierra herméticamente y se incuba a 30°C en la oscuridad. Se toman muestras de 1 ml del espacio de cabeza, con jeringa, periódicamente a un tiempo determinado, que se inyectan directamente en el cromatógrafo para determinar etileno. Se desprecia el etileno disuelto en la fase líquida.

### III.17. INCUBACION DEL ACIDO 1-AMINOCICLOPROPANO-1-CARBOXILICO CON DISCOS DE HOJAS DE OLIVO

En un vial de 15 ml se coloca 1 ml de ACC 1-  
11mMujúntoccon 3discos dehojas(10mm) y se cierra herméticamente. Se incuba a 30°C, en la oscuridad y se toman muestras para determinar etileno según se indica en el apartado anterior.

III.18. DETERMINACION DE ETILENO

Cromatógrafo gaseoso con FID, columna vidrio 3m x 3mm Ø interno, Chromosorb 102, temperatura del horno 40°C, gas portador He. Tiempo de retención del etileno, 2 min.

Se construye previamente una curva de calibrado partiendo de la mezcla azetyl (aprox. 5% etileno en nitrógeno) de la Sociedad Española del Oxígeno.



#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1. EVOLUCION DEL CONTENIDO EN HIERRO DE PEDUNCU  
LOS DE LA ACEITUNA A LO LARGO DEL CICLO VEGE  
TATIVO

A la vista de los resultados observados por Vioque y Albi (1975), estudiando la evolución de los micronutrientes en pedúnculos y aceitunas (comentado en el apart. II.2.), dedicamos nuestra atención durante la campaña 1973-1974, a seguir la evolución del hierro solamente, en pedúnculos y aceitunas. Paralelamente, se realizaron medidas para caracterizar el grado de desarrollo de los frutos, tales como peso, longitud del eje mayor y fuerza de ruptura o fuerza necesaria para separar la aceituna de su pedúnculo. Todas estas determinaciones se realizaron, simultáneamente, en tres árboles semejantes.

La figura 4, recoge los resultados medios de estas determinaciones.

Vuelve a reproducirse el aumento de la concentración de hierro en pedúnculos, alcanzando su valor más alto cuando el fruto se ha desarrollado completamente (compárese con la gráfica de los pesos) y, lo que es más interesante, esta situación de máxima concentración

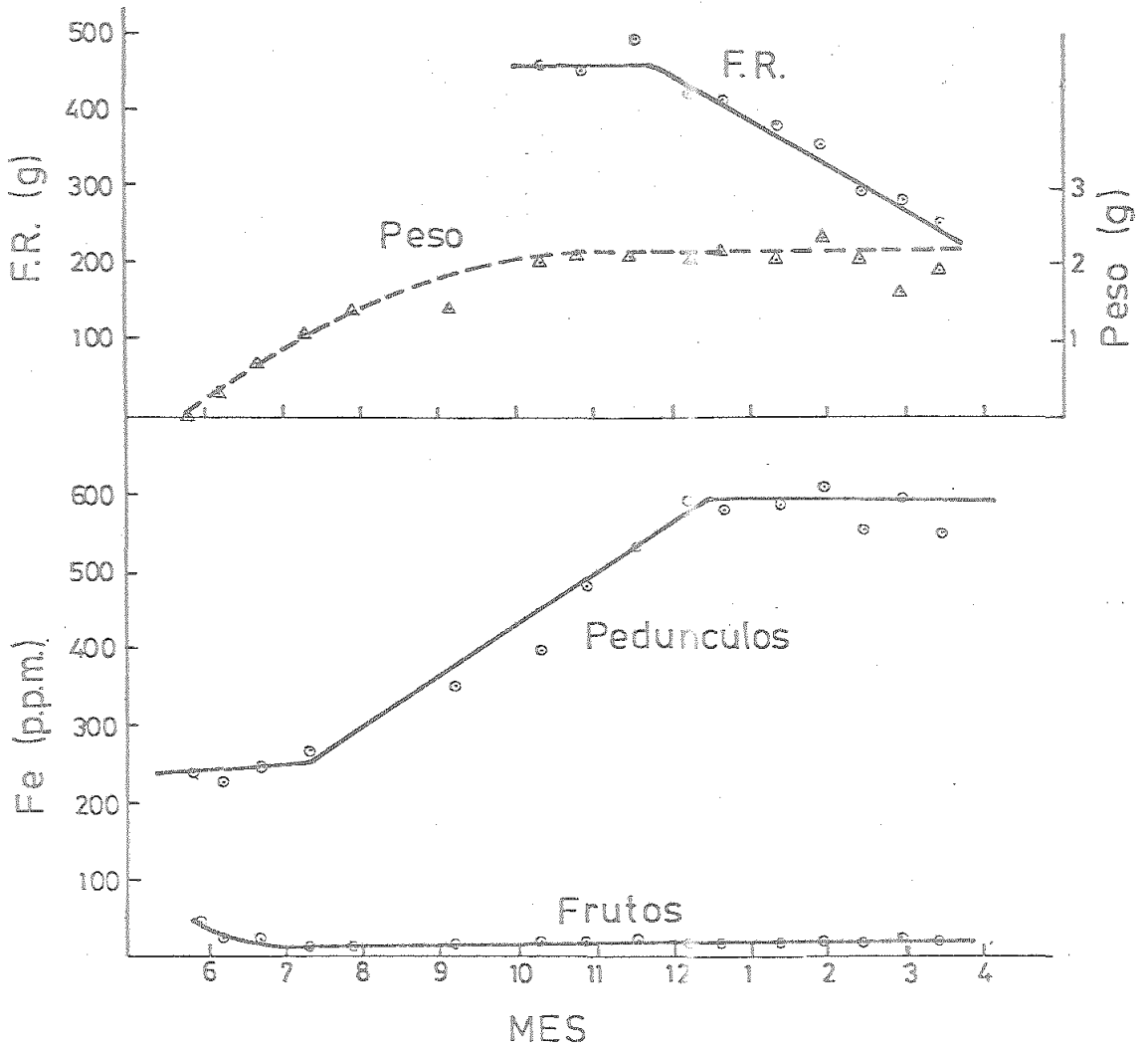


Figura 4: Evolución del contenido en hierro de pedúnculos y frutos, de la fuerza de ruptura (F.R.) y del peso de los frutos.

de hierro en pedúnculos corresponde a la época en que comienza a disminuir progresivamente la fuerza necesaria para desprender las aceitunas. También se reprodujo como en años anteriores, que la concentración de hierro en los frutos permanece prácticamente constante.

El aumento de la concentración de hierro en pedúnculos, confirmado en tres ciclos vegetativos sucesivos, hasta alcanzar un valor máximo, relativamente estacionario durante el resto del ciclo, coincidiendo con el desarrollo completo en tamaño de la aceituna, nos indujo a pensar que esta movilización de dicho metal guardase alguna relación con los procesos de maduración y abscisión.

La mencionada elevación del contenido en hierro en pedúnculos podía atribuirse, al menos en parte, a un incremento de concentración de algún enzima o enzimas, que contengan dicho metal. Entre los enzimas que portan hierro en su molécula debía pensarse, lógicamente, en el sistema enzimático AIA-oxidasa, cuyo papel decisivo en los procesos de maduración y abscisión parecía bastante probado.

Aunque la naturaleza química del sistema AIA-oxidasa no está dilucidada, no se duda hoy que contiene

hierro en forma de una hemo-proteína. La controversia sobre este sistema nace, en gran parte, por presentar simultáneamente, actividades AIA-oxidasa y peroxidasa. Ya hemos comentado anteriormente las diversas hipótesis emitidas para explicar este dualismo de funciones. Se han realizado numerosos trabajos tratando de poner de manifiesto la veracidad de cada hipótesis. En el capítulo de Schneider y Wighman, "Metabolism of auxin in Higher Plants" (1974), se recoge y resume la bibliografía básica sobre el tema. A nosotros en este lugar, y para comentarios posteriores, nos basta con tener presente que el sistema AIA-oxidasa presenta también actividad peroxidasa.

#### IV.2. DETECCION HISTOQUIMICA DE PEROXIDASAS EN LA ZONA DE ABSCISION

Los dos hechos comprobados por nosotros: 1º) aumento brusco de la concentración de hierro en pedúnculos para alcanzar un valor máximo, coincidiendo con el completo desarrollo del fruto y 2º) disminución progresiva, a partir del momento en que se alcanza aquel máxi

mo, de la fuerza necesaria para separar el fruto de su pedúnculo, fueron interpretados, a la luz de la bibliografía comentada anteriormente, como una movilización del sistema enzimático AIA-oxidasa hacia las zonas de maduración y abscisión. Una prueba evidente de ello, está, en la detección histoquímica de peroxidases, que hemos efectuado en la zona de abscisión pedúnculo-aceituna y que ilustra la Figura 5.

Puede observarse una mayor concentración del producto de reacción azul-marrón en las capas celulares próximas a la zona de separación. La presencia de AIA-oxidasa en pedúnculos también hemos podido confirmarla químicamente.

La detección histoquímica de peroxidases en la zona de abscisión había sido hecha por Poovaiah, Rasmussen y Bukovac en cerezas dulces y amargas (1973), y por Poovaiah y Rasmussen (1973), en hojas de judías.

Nuestra hipótesis asociando el aumento observado en la concentración de hierro con un aumento de la concentración de AIA-oxidasa estaría también en la línea de los hallazgos de Agarwala et al. (1965), de que el suministro de hierro a plantas de maíz y rábano, deficientes en este micronutriente, restablece los nive--

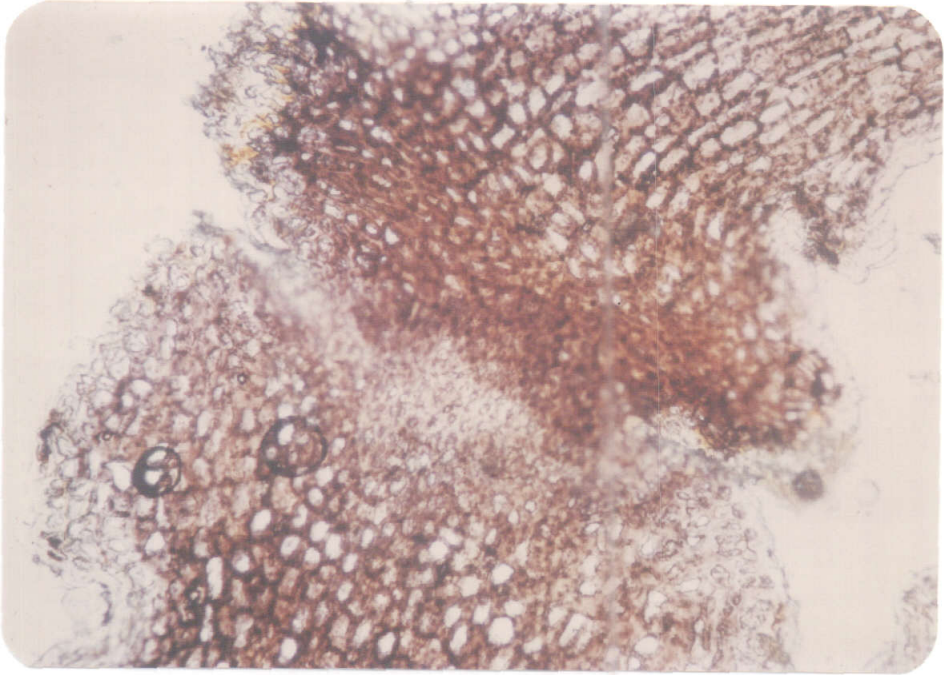


Figura 5: Detección histoquímica de peroxidasas en la zona de abscisión.

les bajos de peroxidasa a los valores normales dentro de las 72-96 horas después del aporte de hierro, así como con las observaciones de Ulmer et al. (1971), quienes encuentran una relación positiva entre hierro suministrado y actividad peroxidasa en plantas de maíz. El efecto observado por Ben-Yehoshua y Biggs (1970), de los iones férricos, aplicados foliarmente a árboles cítricos, facilitando la abscisión de los frutos, también se explicaría vía incremento de la AIA-oxidasa y consiguiente disminución de la auxina endógena.

#### IV.3. PREPARACION DEL EXTRACTO ENZIMATICO CRUDO

3.1.1.1.

La obtención de un extracto enzimático a partir de tejidos orgánicos exige, como primer paso, una ruptura de las estructuras celulares, con liberación de multitud de sustancias, que se encontraban distribuidas en los diferentes compartimentos celulares. Ello puede originar una inactivación de las proteínas enzimáticas o al menos modificarlas mas ó menos en su forma nativa. En el caso de los vegetales superiores, sobre todo si -



se opera con sus partes verdes, junto al hecho de que los restos de las paredes celulares absorben fácilmente las proteínas solubles, ocasiona grandes disturbios su alto contenido en compuestos fenólicos, por su gran capacidad para formar enlaces-H, especialmente con los nitrógenos amídicos sustituidos, o por su oxidación a quinonas altamente reactivas. El sistema enzimático que nos ocupa, AIA-oxidasa, es especialmente afectado por los compuestos fenólicos, al inhibir su capacidad oxidativa del AIA (Sacher, 1963). Los orto-difenoles, en especial el ácido clorogénico, y los flavonoides son los compuestos principales con capacidad inhibidora (Sacher, 1963). En algunos tejidos los niveles de estos compuestos son tan altos que es imposible detectar la actividad enzimática.

Nosotros comenzamos nuestras experiencias aplicando el procedimiento descrito por Catalina et al. (1972). También hemos ensayado otros métodos descritos en la bibliografía para diversos vegetales, algunos de ellos en presencia de DTT (ditiotreitól), (McCown et al., 1968), para proteger los grupos sulfidrilos, otros que hacen uso de incubación previa con célulasa y pectinasa (Gaspar et al., 1975), para facilitar la salida de

los fluidos intracelulares. Finalmente hemos adoptado el procedimiento descrito antes (apart. III.7.).

Siempre hemos obtenido un extracto crudo con análogas características que merecen un comentario especial. El extracto, que presenta coloración amarilla-marrón no muestra actividad AIA-oxidasa, pero sí actividad peroxidasa.

Al intentar determinar la actividad AIA-oxidasa en extractos crudos, siempre hemos observado el mismo fenómeno: desde el tiempo cero se encuentra un marcado descenso en la absorbancia medida tras realizar la reacción de Salkowski, descenso que conserva el mismo valor a lo largo de todo el período de observación. La Figura 6 reproduce el fenómeno comentado, junto con un caso del mismo proceso cuando se opera con el extracto parcialmente purificado y otro ensayo en que falta en la mezcla de incubación todo extracto enzimático.

Este fenómeno ya se les presentó a Tang y Bonner en 1948, al operar con extractos de plántulas verdes de guisantes, si bien no repararon en ello. Así, al incubar 300  $\mu$ g de AIA, en un ensayo con extracto crudo y en otro con extracto purificado por precipitación con acetona, encuentran tras 0,1 y 3 h de incubación: en el

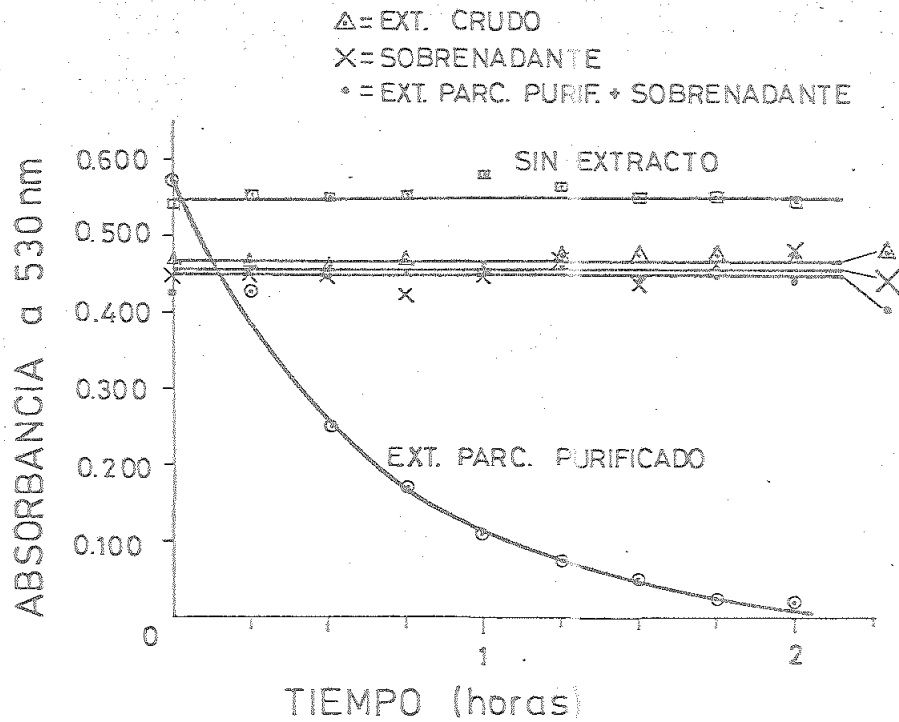


Figura 6: Respuestas al ensayo para determinar la actividad AIA-oxidasa del extracto crudo, del extracto parcialmente purificado y del sobrenadante de la precipitación con acetona.

primer caso siempre la misma cantidad de AIA residual, = 285  $\mu\text{g}$ , y en el segundo caso, 290, 270 y 260  $\mu\text{g}$  de AIA. Ellos concluyen: "el enzima inactivante (de AIA) está esencialmente ausente de los epicotilos verdes de guisante". En nuestra opinión, el ensayo primero transcurrió, realmente, igual que los nuestros con extractos crudos: desde un principio la cantidad de AIA parece disminuir y siempre el mismo valor. En el segundo ensayo no está justificada su conclusión de que la actividad enzimática está ausente; en realidad, muestra actividad, si bien ostensiblemente menor que cuando los autores operan con extracto de plántulas etioladas.

Este comportamiento del extracto crudo ha inducido también a error a otros autores, quienes, investigando la presencia de AIA-oxidasa en extractos crudos de vegetales verdes se han limitado a practicar la reacción de Salkowski solo una vez, cuando ha transcurrido un cierto tiempo de incubación (30 min, por ejemplo) y no han seguido el curso de la reacción periódicamente. De esta forma han creído haber detectado actividad AIA-oxidasa, al encontrar una disminución de la absorbancia respecto al ensayo "blanco", sin enzima. La Figura 6, hace patente nuestro razonamiento.

También hemos podido observar, que el extracto crudo hervido prolongadamente se sigue comportando de igual forma al intentar medir la actividad AIA-oxidasa. Ello explica, también, la postura de los autores que creen encontrar actividad enzimática en extractos crudos y concluyen que el enzima es estable frente al calor. En cambio, encuentran, acertadamente en nuestra opinión que la actividad peroxidasa, detectada en los extractos crudos al igual que nosotros, es termolábil, al desaparecer tras la ebullición. Más adelante veremos como también, la actividad AIA-oxidasa es termolábil.

Al practicar la purificación descrita anteriormente (apart. III.8.4), precipitando las proteínas con acetona fría, el sobrenadante conserva esta propiedad objeto de nuestros comentarios. Asimismo, la adición de dicho sobrenadante, desprovisto de la acetona, a la mezcla de incubación con un extracto parcialmente purificado, enmascara de nuevo la actividad AIA-oxidasa, (ver Figura 6).

Nuestra experiencia nos induce a pensar que la sustancia o sustancias presentes en el extracto crudo, y que quedan en el sobrenadante tras la precipitación con acetona, actúan entorpeciendo la reacción del-

AIA con el reactivo de Salkowski y no, destruyendo el AIA, como cabría pensar.

Merece destacarse que todo este comportamiento anómalo, sin embargo, no se manifiesta sobre la actividad peroxidasa.

Al igual que nosotros, Gaspar, Dubucq y Antoszewski (1975), encuentran también, al estudiar extractos crudos de peciolo de fresa, actividad peroxidasa pero no actividad AIA-oxidasa, la cual sólo se pone de manifiesto tras una purificación:

#### IV.4. PREPARACION DEL EXTRACTO ENZIMATICO PARCIALMENTE PURIFICADO

Después de haber experimentado diversos caminos, reseñados en la bibliografía, para purificar extractos enzimáticos de productos vegetales encontramos más satisfactorio en su conjunto el descrito antes (apartado III.8.), consistente esquemáticamente, en una precipitación con acetona fría y un tratamiento posterior con PVP del precipitado obtenido, una vez disuelto convenientemente.

Ya en el apartado anterior hemos comentado co

mo la precipitación con acetona elimina la sustancia o sustancias que impedían detectar la actividad AIA-oxidasa, al permanecer aquellas disueltas en el sobrenadante. Efectivamente, el precipitado una vez disuelto, al que denominamos extracto B, exhibe ya actividad AIA-oxidasa, y tanto con peroxidasa, como con aquellas que se encuentran en el extracto B, se obtiene una actividad AIA-oxidasa en el sobrenadante después de su tratamiento con PVP = extracto B.

El uso del PVP en la precipitación de extractos crudos vegetales se ha generalizado enormemente en los últimos años (Jones y Hulme, 1961; Jones et al., 1963 y Klepper y Hageman, 1969), justificándose su efectividad por su gran capacidad para retener los compuestos fenólicos inhibidores, por formación de fuertes enlaces-H en sus grupos  $-CO-N=$ , en competición con las proteínas. Debemos mencionar aquí el detenido estudio hecho por Loomis y Battaille en 1966 sobre el tema.

En la Tabla I se recoge el contenido en proteínas y las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa de los distintos extractos.

La imposibilidad de determinar la actividad AIA-oxidasa en el extracto crudo A, nos impide conocer el efecto que la precipitación con acetona tiene sobre

Tabla I

CONTENIDO EN PROTEINAS Y ACTIVIDADES AIA-OXIDASA Y PEROXIDASA DE -  
LOS DISTINTOS EXTRACTOS

---

EXTRACTO	PROTEINAS mg/g hoja fresca	ACTIVIDAD	
		AIA-OXIDASA Unid./mg prot.	PEROXIDASA unid./mg prot
A	0,580	---	112,1
B	0,367	1,26	166,6
C	0,285	2,46	175,5

---

Las actividades y proteínas se determinaron como se indica en Ma  
teriales y Métodos; (A = extracto crudo, B = precipitación con aceto  
na, C = precipitación con acetona y tratamiento con PVP).



la misma, efecto que es claramente positivo sobre la actividad peroxidasa. El tratamiento con PVP, no afecta - en cambio, a esta actividad, en tanto que pone de manifiesto, la eliminación de inhibidores de la actividad AIA-oxidasa, al duplicar prácticamente su valor.

Hemos utilizado este último extracto, que conserva congelado su actividad durante varias semanas, en el estudio de algunas características del sistema enzimático.

#### IV.5. pH OPTIMO DE EXTRACCION

Se han estudiado la influencia del pH de extracción sobre los niveles de actividades específicas - AIA-oxidasa y peroxidasa en el extracto parcialmente purificado.

Se obtuvieron cuatro extractos de hojas partiendo de 2 g, como se indica en Materiales y Métodos - (aparts. III.7. y III.8.), pero utilizando en cada caso tampón fosfato de pH diferente: 5,6, 6,1, 6,6 y 7,1, encontrándose para ambas actividades un valor máximo cuando la extracción se realiza a pH 6,1.

IV.6. PROPIEDADES DEL SISTEMA ENZIMATICO AIA-OXIDASA/PEROXIDASA DE HOJAS DE OLIVO

IV.6.1. Presencia de ambas actividades enzimáticas

La primera característica que debemos resaltar del extracto parcialmente purificado es la presencia de ambas actividades: AIA-oxidasa y peroxidasa perfectamente detectables, como ya hemos comentado anteriormente. Las Figuras 7 y 8, reproducen a título de ejemplo, el curso de las reacciones enzimáticas, que tienen lugar cuando partes alícuotas de un mismo extracto, se someten a los ensayos descritos en los apartados III.9. y III.10..

Para cerciorarnos de que la desaparición del AIA, durante la incubación en presencia de nuestro extracto, respondía al proceso descrito en la bibliografía (Ray, 1956), para una acción enzimática AIA-oxidasa, obtuvimos una serie de espectros de absorción en el ultravioleta, tomando muestras periódicas del medio de incubación, (Figura 9). Los cambios observados en los espectros UV son similares a los descritos en la bibliografía (Ray, 1956), para otras AIA-oxidases, observándose

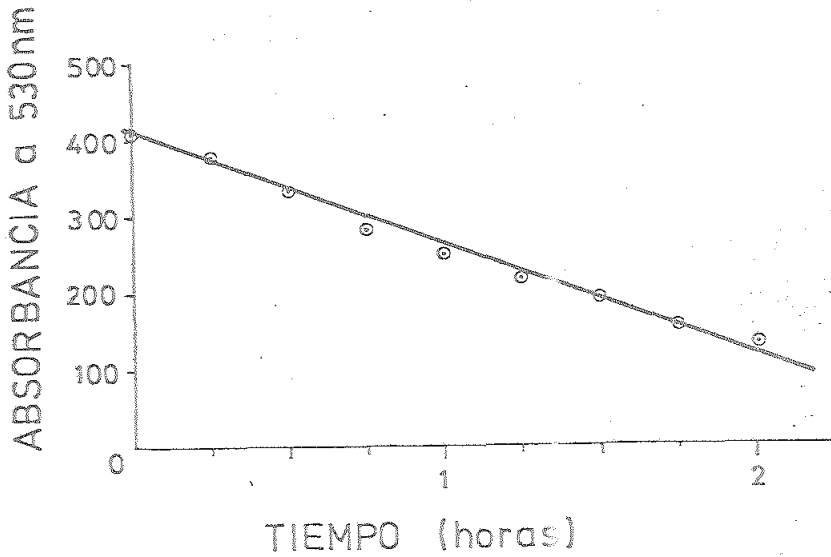


Figura 7: Actividad AIA-oxidasa del extracto parcialmente purificado. Medio de incubación: 1 ml DCP 3 mM, 1 ml  $Mn^{++}$  3 mM, 2 ml AIA - 1 mM, 5,75 ml tampón fosfato 0,02 M, pH 5,7 y 0,25 ml de extracto enzimático (75  $\mu$ g proteína).

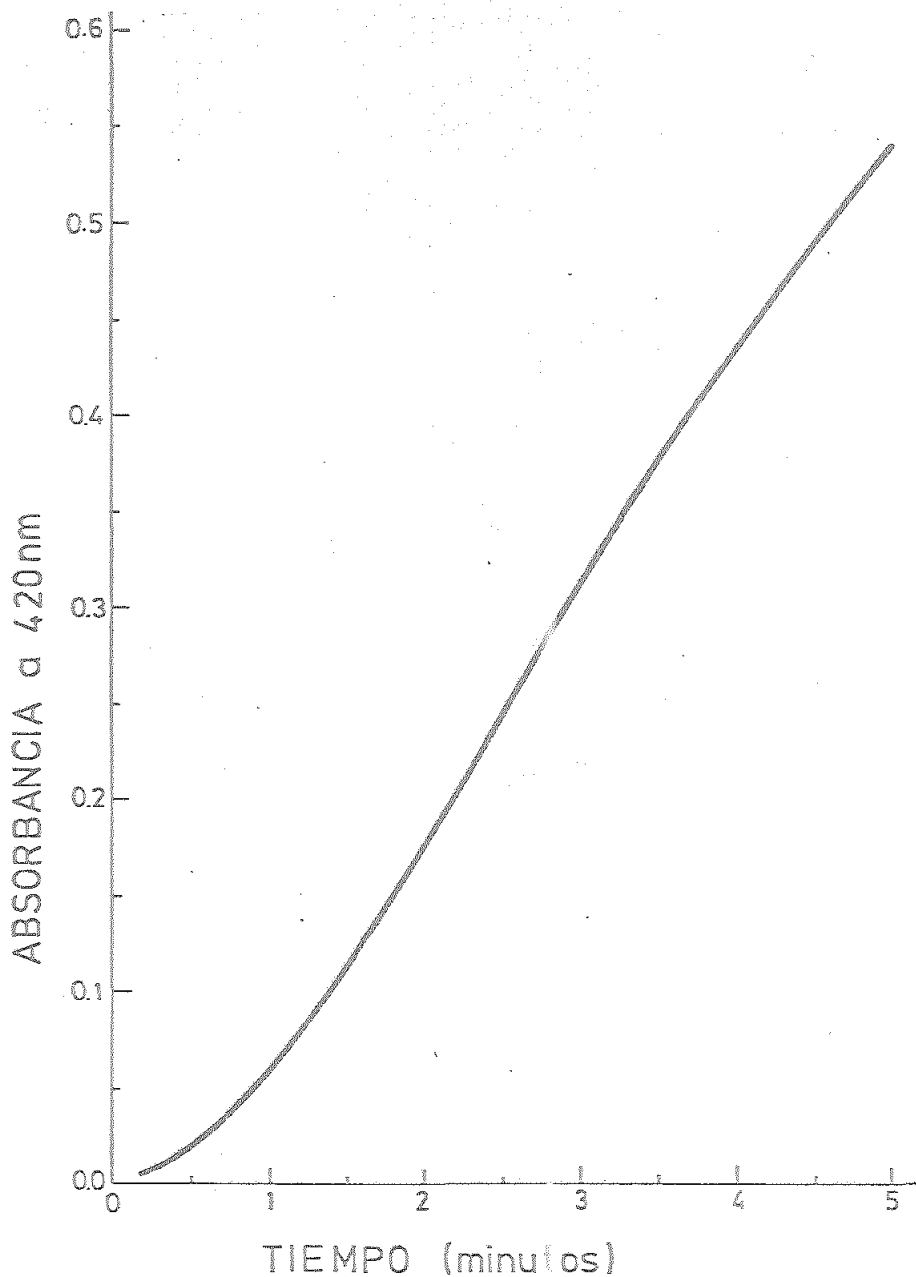


Figura 8: Actividad peroxidasa del extracto parcialmente purificado. Medio de incubación: 2 ml tampón fosfato 0,002 M, pH 6,1, 0,1 ml extracto enzimático 1:100 (0,3  $\mu$ g proteína), 0,2 ml guayacol 1% y 0,2 ml agua oxigenada 30 mM.

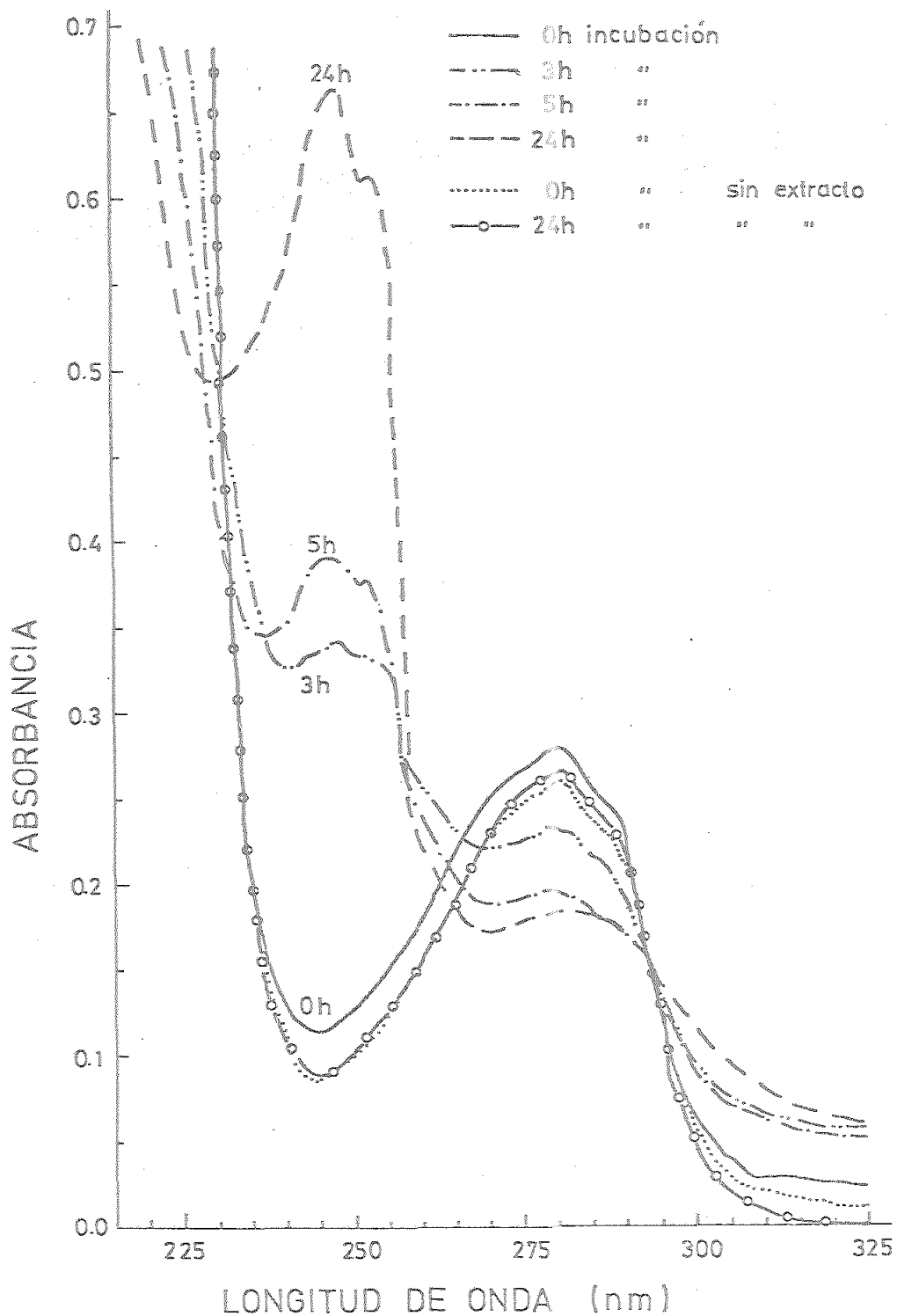


Figura 9: Espectros de absorción en el ultravioleta del proceso de oxidación del AIA por el extracto parcialmente purificado de hojas de olivo. Medio de incubación: 1 ml DCP 3 mM, 1 ml  $Mn^{++}$  3 mM, = 2 ml AIA 1 mM, 5,75 ml tampón fosfato 0,02 M, pH 5,7 y 0,25 ml extracto enzimático (75  $\mu g$  proteína). Para obtener el registro se diluye una alícuota 1 a 5 y se mide frente a agua.

el aumento en absorción a aprox. 254 y 247 nm característicos de los productos de oxidación del AIA. El aumento en absorción a 254 y 247 nm no parece corresponder al primer producto de la reacción, ya que la absorbancia a estas longitudes de onda continua cambiando aún después de que todo el AIA se ha destruido, medido por la reacción de Salkowski. La destrucción del AIA resulta en la formación de un número de intermediarios inestables hasta un producto que absorbe fuertemente a 254 y 247 nm. Los cambios en absorbancia a una de estas longitudes de onda, han sido usados como medida de la actividad AIA-oxidasa (Sequeira y Mineo, 1966; Machácková et al., 1975 y Ray, 1956).

La reacción de oxidación del AIA, a veces, suele ir precedida de un período de inducción más o menos largo, durante el cual no se observa transformación alguna del AIA. Este fenómeno ha sido frecuentemente recogido y comentado en la bibliografía (Gaspar et al., 1964; Pilet, 1964 y Knypl y Chylinska, 1974), atribuyéndose a la presencia de restos de inhibidores naturales. Pilet (1964), reduce considerablemente este período de inducción mediante la adición de DCP. Knypl y Chylinska (1974), lo eliminan con un nuevo tratamiento del extracto con poli

vinilpirrolidona (PVP), que asegura no afecta la cinética de destrucción del AIA. Hoyle (1972), indica que la presencia de una pequeña cantidad de  $H_2O_2$  hace desaparecer el período de inducción. Nosotros, en extractos con períodos de inducción apreciables, hemos intentado su eliminación aplicando los tres caminos reseñados. Sólo la elevación de la concentración de DCP parece de efectos positivos. Precisamente este ensayo nos llevó a modificar la concentración usual de este cofactor, 0,1 mM, en la mezcla de incubación hasta 0,3 mM, que hemos adoptado en el procedimiento.

La posible presencia de un cierto período de inducción en la oxidación del AIA es un hecho más haber en cuenta (recuerdénse nuestros comentarios anteriores, apart. III.3. sobre el comportamiento del extracto enzimático crudo) para no limitarse a medir la cantidad de AIA destruido, después de transcurrido un tiempo, cuando se trata de determinar la actividad de una preparación enzimática, pues, evidentemente, daría una idea totalmente falsa de tal actividad. Es necesario seguir el curso de la reacción tomando muestras periódicas (cada 15 min. por ejemplo) durante al menos 1-2 h.

La determinación de la actividad AIA-oxidasa=

merece ser comentada en otro aspecto muy interesante. Dicha actividad es inhibida por un exceso de sustrato (ver más adelante apart. IV.6.4.1.), condicionando y limitando así la concentración de AIA que debe ponerse en presencia del enzima para alcanzar el estado de saturación. La consecuencia es que, al seguir el curso de la reacción, si estamos en presencia de un extracto muy activo, no encontremos una relación lineal entre las absorbancias medidas y los tiempos transcurridos, como correspondería a una reacción de orden cero. Ello se debe a que no se alcanzó el estado de saturación desde un principio, o bien, a que este estado se ha perdido por la destrucción rápida de AIA (situación a la que siempre se llega, por supuesto, si la reacción se deja transcurrir durante un tiempo suficientemente largo). Estamos en presencia de una reacción de primer orden y, como tal, debe tratarse cinéticamente para el cálculo de la velocidad inicial. Efectivamente, en tales casos se encuentra una relación lineal entre  $\ln A$  y tiempos; que permite calcular la constante de velocidad y mediante ella la velocidad inicial.



#### IV.6.2. Efectos de la temperatura

Cuando se dan las circunstancias, que concurren en nuestro caso, de un extracto que exhibe dos actividades enzimáticas diferentes, el estudio de los efectos observados al someterlo a la acción del calor puede suministrar información preliminar sobre si se trata de un único enzima o de dos.

La ebullición, por supuesto, hace desaparecer ambas actividades, pero manteniendo el extracto a 30, 50, 70 y 90°C, durante 15 min, se observa una pérdida progresiva de las actividades oxidasa y peroxidasa (Tabla II). Existe una relación lineal negativa entre  $\ln v_t/v_0$  y  $t$ , siendo  $v_0$ , la velocidad inicial correspondiente al extracto original, y  $v_t$ , la velocidad inicial después de sometido a la temperatura  $t^\circ\text{C}$ . Esta relación se encuentra, tanto para la actividad oxidasa, como peroxidasa, y las rectas correspondientes coinciden entre si (comprobado estadísticamente) (Figura 10). Ello aboga por la hipótesis de que ambas actividades son desarrolladas por un único enzima.

Estrechamente relacionado con el efecto de la temperatura está el ensayo de mantener un extracto a

Tabla II

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LAS ACTIVIDADES AIA-OXIDASA Y PEROXIDASA

T°C	ACTIVIDAD AIA-OXIDASA			ACTIVIDAD PEROXIDASA		
	$\mu\text{g AIA/}$ min.mg prot.	$v_R =$ $100 v_t/v_o$	$\ln v_R$	$\Delta A/$ min.mg prot.	$v_R =$ $100 v_t/v_o$	$\ln v_R$
0	104,6	100	4,61	28,4	100	4,61
30	79,2	76	4,33	21,0	74	4,30
50	65,3	63	4,14	23,0	81	4,39
70	52,0	50	3,91	13,0	46	3,83
90	0,0	0	--	0,0	0	--

Un extracto enzimático parcialmente purificado de hojas se sometió a las temperaturas indicadas, determinándose las actividades AIA—oxidasa y peroxidasa según se indican en Materiales y Métodos.

○ AIA-oxidasa,  $\ln v_R = -9.9 \cdot 10^{-3} \cdot t + 4.62$

△ Peroxidasa,  $\ln v_R = -9.6 \cdot 10^{-3} \cdot t + 4.64$

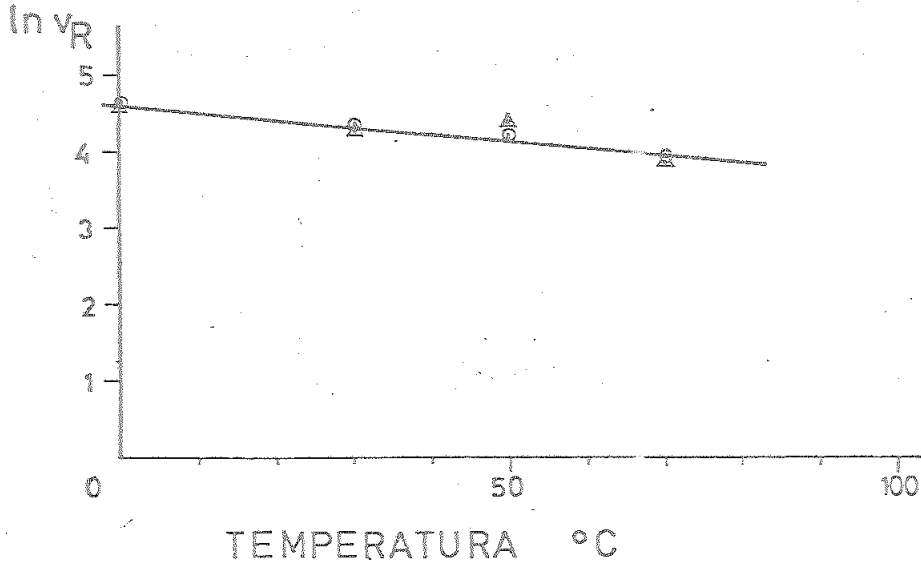


Figura 10: Influencia del calentamiento del extracto enzimático sobre las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa. Las actividades se determinan como se indica en Materiales y Métodos.

temperatura ambiente (20°C) durante 8 h, realizando medidas periódicas de las actividades oxidasa y peroxidasa. Se encuentra que a lo largo de las dos horas iniciales no hay disminución apreciable de ambas actividades, hecho de gran interés para las manipulaciones en el laboratorio (Figura 11). Se observa que a partir de las 2 h hay una pérdida progresiva de actividad, siendo similares los efectos en ambas actividades

#### IV.6.3. Influencia de la concentración de enzima

Operando bajo las condiciones normales en reacciones enzimáticas, es decir con un exceso de sustrato, la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de enzima presente en el medio. Esto deja de ser cierto, cuando la cantidad de enzima aumenta hasta tal punto que ya no hay exceso de sustrato. Las Figuras 12 y 13 reproducen casos experimentales correspondientes a un extracto parcialmente purificado de hojas de olivo.

Al estudiar la influencia sobre la velocidad inicial de la concentración del enzima, actuando como peroxidasa, hemos observado, en algunas ocasiones, que

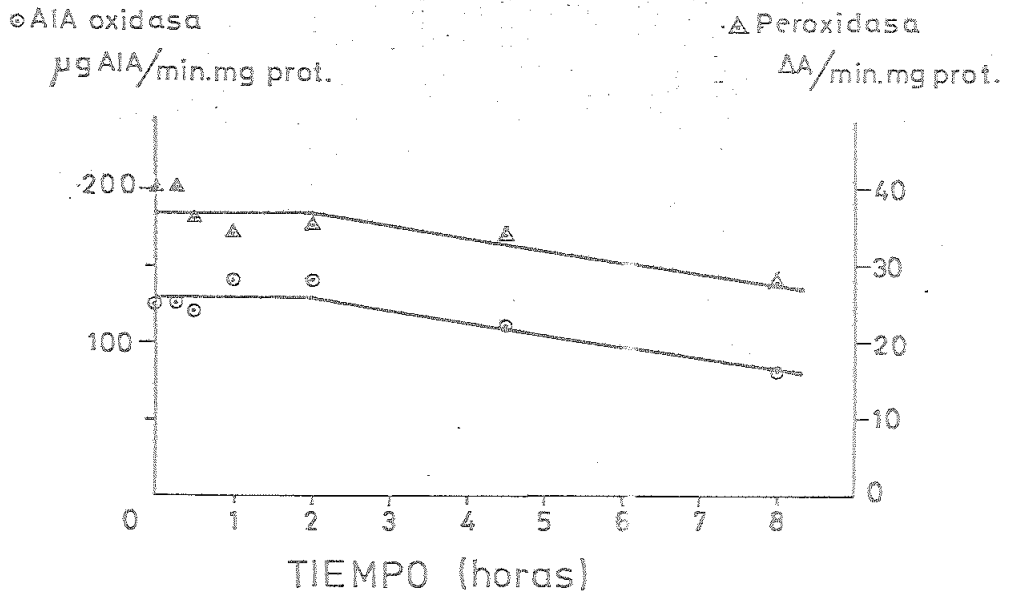


Figura 11: Efecto de la exposición del extracto enzimático a temperatura ambiente (20°C) sobre las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa. Las actividades se determinan como se indica en Materiales y Métodos.

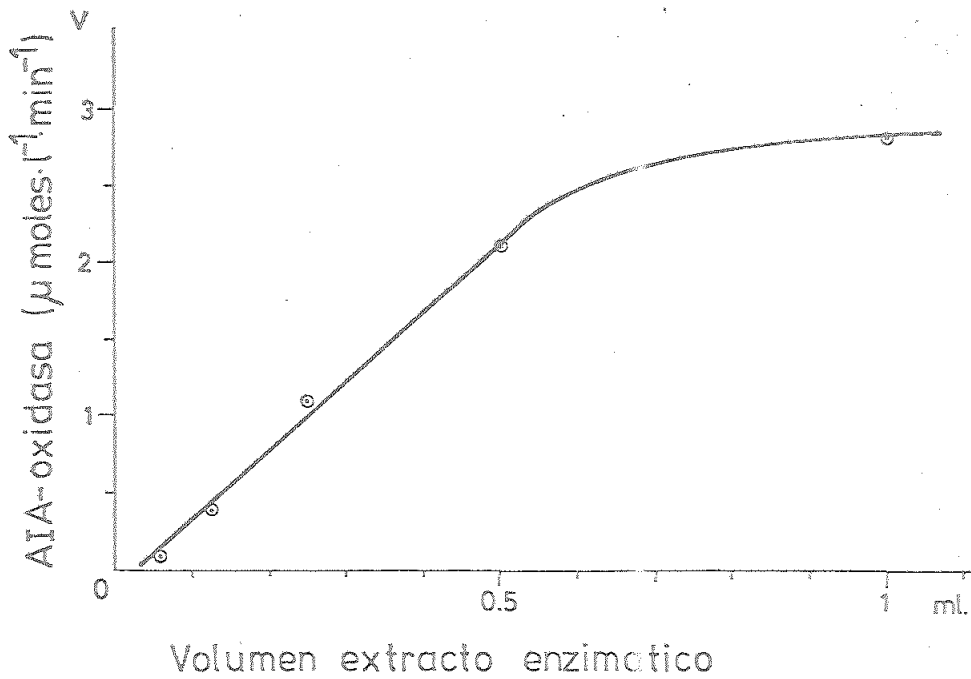


Figura 12: Influencia de la concentración de enzima sobre la actividad AIA-oxidasa (1 ml ext = 94  $\mu\text{g}$  proteína). La actividad se determina como se indica en el texto.

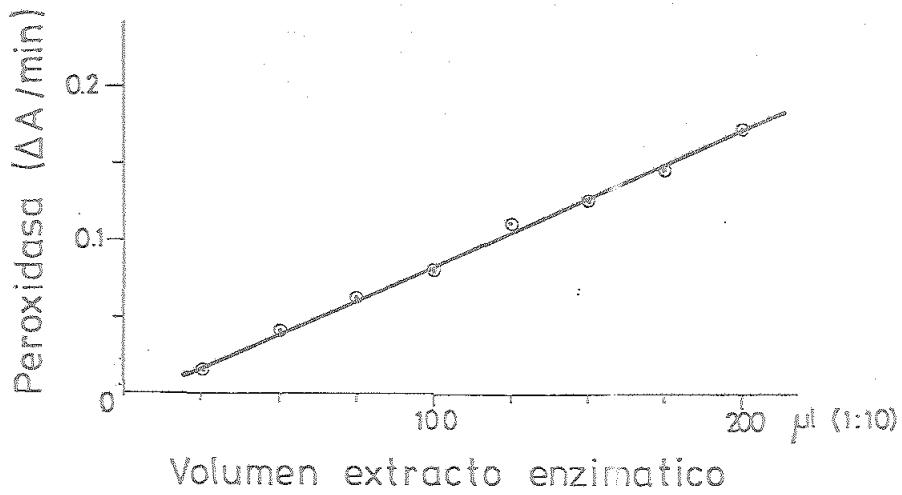


Figura 13: Influencia de la concentración de enzima sobre la actividad peroxidasa (1 µl ext = 9,4 ng proteína). La actividad se determina como se indica en el texto.

no existe una relación lineal para bajos contenidos de enzima y sólo a partir de una determinada concentración se presenta linealidad, fenómeno que suele ser atribuido a la presencia de impurezas tóxicas en alguno de los reactivos del medio incubación, (Dixón y Webb, 1971).

#### IV.6.4. Influencia de la concentración de sustrato

##### IV.6.4.1. Actividad AIA-oxidasa

La misma cantidad de un extracto enzimático - parcialmente purificado se incuba con cantidades crecientes de AIA, siguiendo las instrucciones del apartado III.9., de forma que las concentraciones de AIA en la mezcla de incubación sean las recogidas en la primera - columna de la Tabla III, y se determinan las velocidades iniciales. Dicha Tabla III y la Figura 14 reproducen los resultados obtenidos.

Se observa como, aproximadamente, a partir de la concentración 0,3 mM comienza a disminuir progresivamente la velocidad inicial de reacción, poniendo de manifiesto una inhibición de la actividad enzimática por las concentraciones altas del propio sustrato. Este fenómeno, descrito en muy diversos enzimas, fue ya obser-



Tabla III

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE AIA EN LA ACTIVIDAD AIA-OXIDASA

s (mM)	v ( $\mu\text{moles.}$ $1^{-1}.\text{min}^{-1}$ )	1/s	1/v
0,05	2,24	20,00	0,446
0,10	3,62	10,00	0,276
0,15	4,83	6,67	0,207
0,20	5,78	5,00	0,173
0,30	6,55	3,33	0,153
0,40	4,75	2,50	0,211
0,60	3,59	1,67	0,279
0,80	3,14	1,25	0,318
1,00	2,84	1,00	0,352
1,20	2,45	0,83	0,408

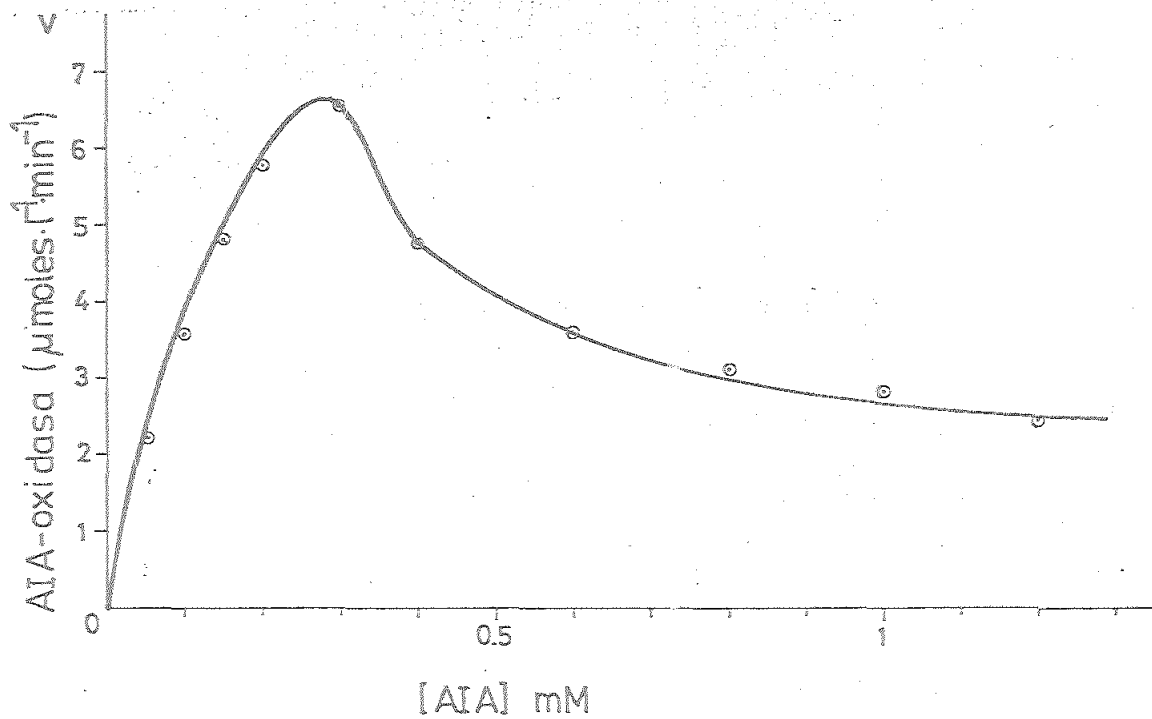


Figura 14: Inhibición de la actividad AIA-oxidasa por exceso de sustrato.

vado por Sequeira y Mineo (1966), en la AIA-oxidasa de la raíz del tabaco, así como también por Meudt (1971), estudiando la oxidación del AIA por la peroxidasa del rábano (HRP) y, más recientemente, por Machácková et al. (1975), operando con extracto de hojas de trigo.

Puesto que la ecuación de Michaelis-Menten sólo se cumple para las concentraciones bajas de sustrato, al representar gráficamente  $1/v$  frente a  $1/s$  (representación de Lineweaver-Burk) sólo aparecen alineados los puntos correspondientes a las concentraciones inferiores de sustrato, como indica la Figura 15, en tanto que los correspondientes a las altas concentraciones están fuera de la recta. En cambio, en la representación de  $1/v$  frente a  $s$  (Figura 16) se alinean estos últimos puntos y caen fuera los correspondientes a las concentraciones bajas.

Este comportamiento corresponde al esquema de un enzima con dos centros de unión diferentes (Dixon y Webb, 1971), a los que han de fijarse dos partes particulares de la molécula de sustrato para formar un complejo enzima-sustrato productivo, ES. Cuando la concentración de sustrato es muy elevada y las moléculas de sustrato tienden a amontonarse sobre la molécula de en-

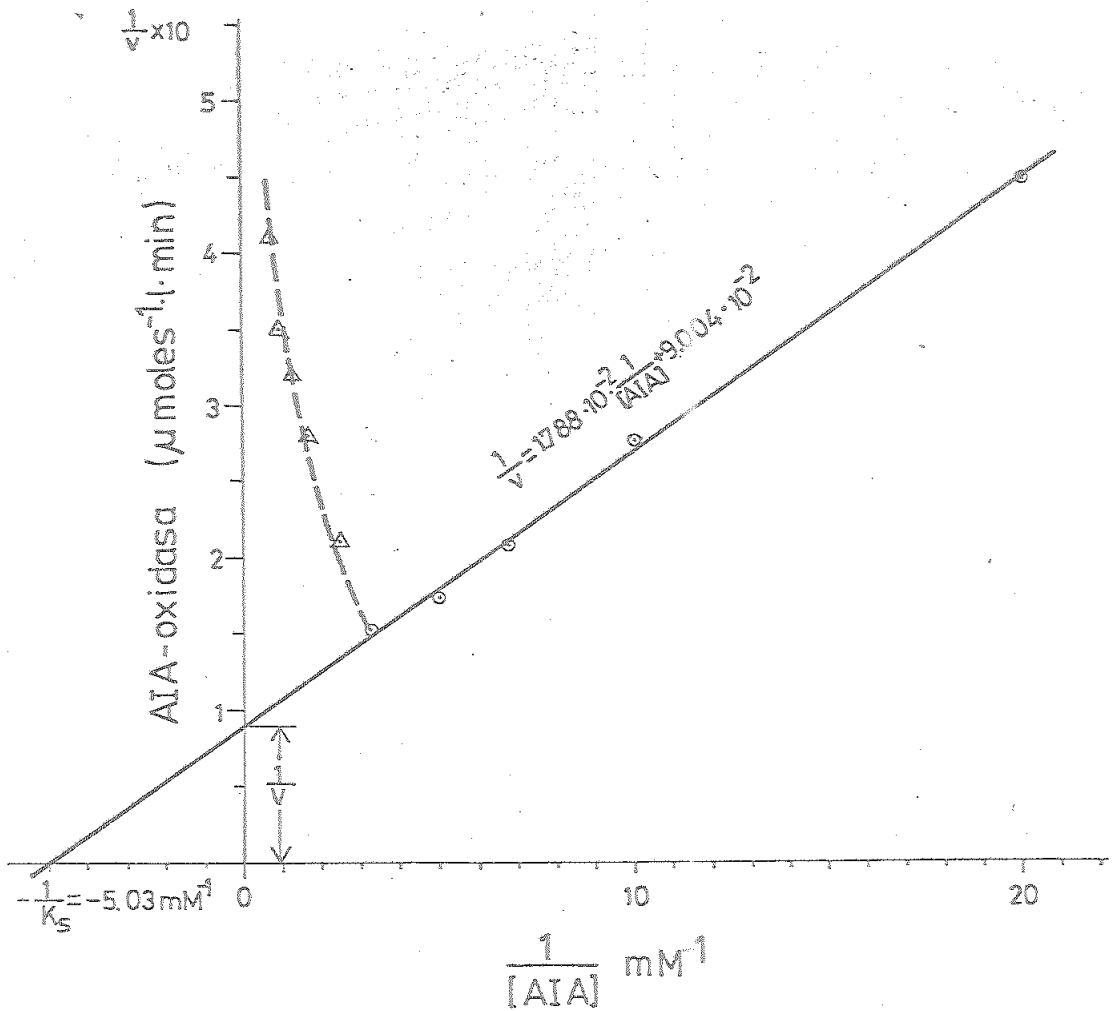


Figura 15: Inhibición de la actividad AIA-oxidasa por exceso de sustrato. Representación de Lineweaver-Burk de las velocidades iniciales de destrucción del AIA a diferentes concentraciones del mismo. Cálculo de la constante de disociación  $K_{ES}$ , del complejo productivo, ES.

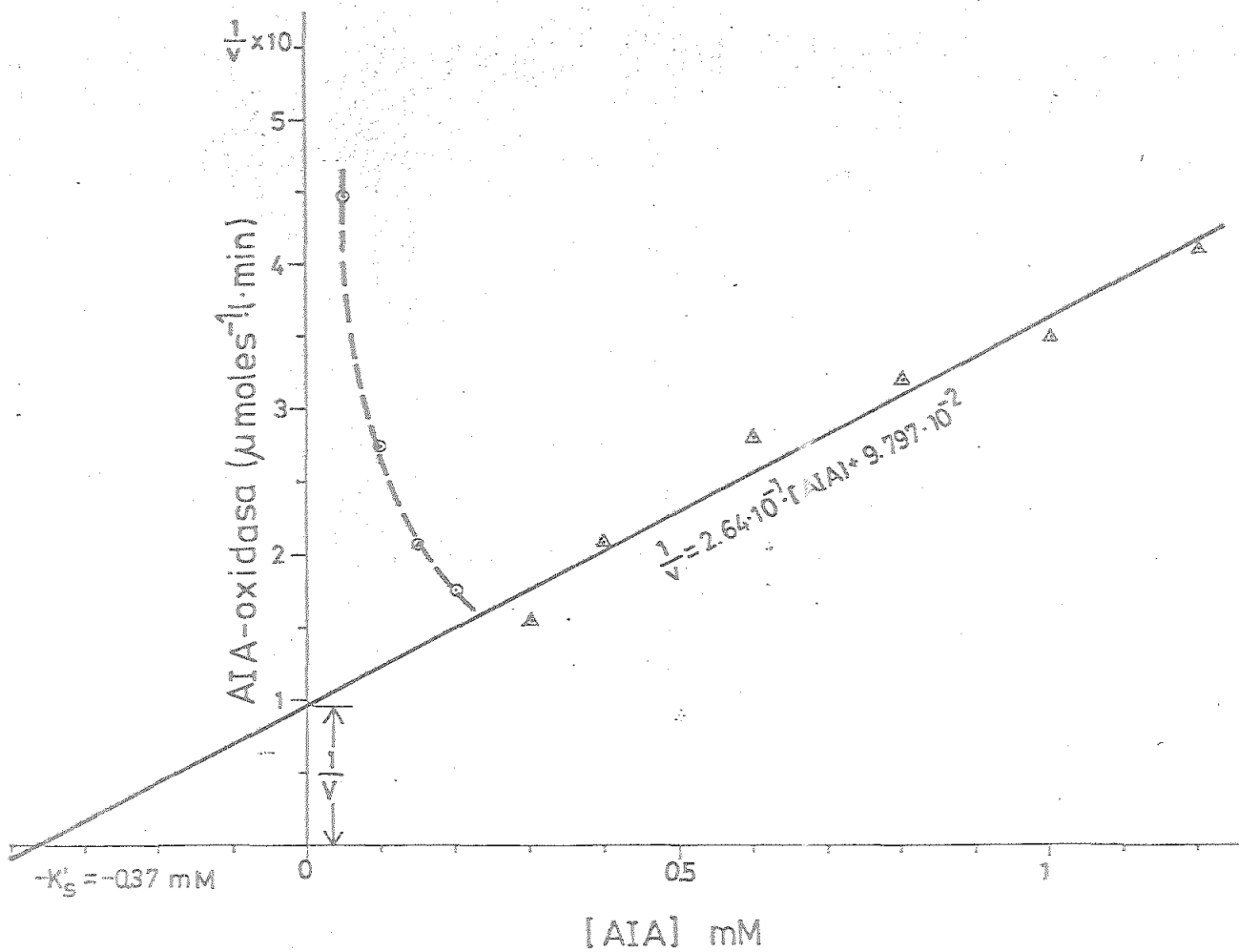
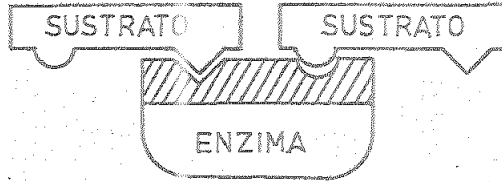


Figura 16: Inhibición de la actividad AIA-oxidasa por exceso de sustrato. Cálculo de la constante de disociación  $K'_S$ , del complejo improductivo,  $ES_2$ .

zima, puede llegar a formarse un complejo enzima-sustrato improductivo,  $ES_2$ . Tiene lugar una inhibición competitiva por el propio sustrato.

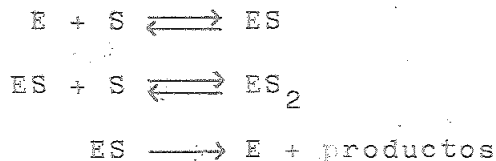


Complejo productivo  $ES$



Complejo improductivo  $ES_2$

Esquemáticamente, el proceso sería



y como se supone que la velocidad es proporcional a la concentración del complejo productivo,  $ES$ , se tiene como expresión de la misma

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_s}{s} + \frac{s}{K'_s}}$$

siendo  $K_s$  y  $K'_s$  las constantes de disociación de los complejos productivos e improductivos, respectivamente, y  $V$  sería la velocidad máxima si no hubiera inhibición. Las ecuaciones de las rectas de las Figuras 15 y 16 permiten calcular los valores de estos tres parámetros.

tros. Una vez conocida  $K_s$  y  $K'_s$  se puede calcular la concentración óptima de sustrato,

$$s_{opt.} = \sqrt{K_s \cdot K'_s}$$

entendiendo por tal, aquella para la cual se obtiene la mayor velocidad inicial de reacción.

Nuestros datos numéricos dan, para los distintos parámetros los siguientes valores:

$$\begin{aligned} V &= 10,7 \text{ umoles. l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \\ K_s &= 0,20 \text{ mM} \\ K'_s &= 0,37 \text{ mM} \\ s_{opt.} &= 0,27 \text{ mM} \end{aligned}$$

que interpretan bien los fenómenos observados. Nótese, en la Figura 14, como a concentraciones de sustrato iguales a  $K_s$  y  $K'_s$  corresponden aproximadamente velocidades mitad de la velocidad máxima teórica ( $10,7 \text{ umoles. l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) y como la velocidad máxima experimentalmente medible (máximo de la curva) se alcanza para una concentración de sustrato igual a  $s_{opt.}$

Esta inhibición por exceso de sustrato tendría un significado fisiológico si, como creen haber encontrado Meudt (1967), Basu y Tuli (1972), Frenkel

(1975 b) y Frenkel et al. (1975), las sustancias realmente activas hormonalmente son los productos de la degradación del AIA: el propio AIA al alcanzar concentraciones altas autorregula su transformación enzimática al inhibir la acción de la AIA-oxidasa.

#### IV.6.4.2. Actividad peroxidasa

La misma cantidad de un extracto enzimático parcialmente purificado se incubaba en cantidades crecientes de  $H_2O_2$ , siguiendo las instrucciones del apartado III.10., de forma que las concentraciones de  $H_2O_2$  sean las recogidas en la primera columna de la Tabla IV, y se determinan las velocidades iniciales. Dicha Tabla IV y la Figura 17 reproducen los resultados obtenidos.

La Figura 18 muestra una representación de Lineweaver-Burk de las velocidades iniciales de descomposición del  $H_2O_2$  a diferentes concentraciones de este sustrato, obteniéndose un valor de  $V = 0,24 \Delta A/\text{min}$  y una  $K_m$  para el  $H_2O_2$  de  $0,88 \text{ mM}$ .



Tabla IV

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE  $H_2O_2$  EN LA ACTIVIDAD PEROXIDASA

s (mM)	v $\Delta A/\text{min}$	1/s	1/v
0,08	0,0202	12,5	49,5
0,10	0,0250	10,0	40,0
0,16	0,0372	6,25	26,9
0,20	0,0480	5,0	20,8
0,32	0,0673	3,125	14,9
0,40	0,0805	2,5	12,4
0,64	0,1003	1,56	10,0
0,80	0,1142	1,25	8,8
1,00	0,1320	1,00	7,6
1,60	0,1585	0,625	6,3
2,00	0,1675	0,5	6,0
2,40	0,1810	0,417	5,5
4,00	0,1820	0,25	5,5
4,80	0,1850	0,208	5,4

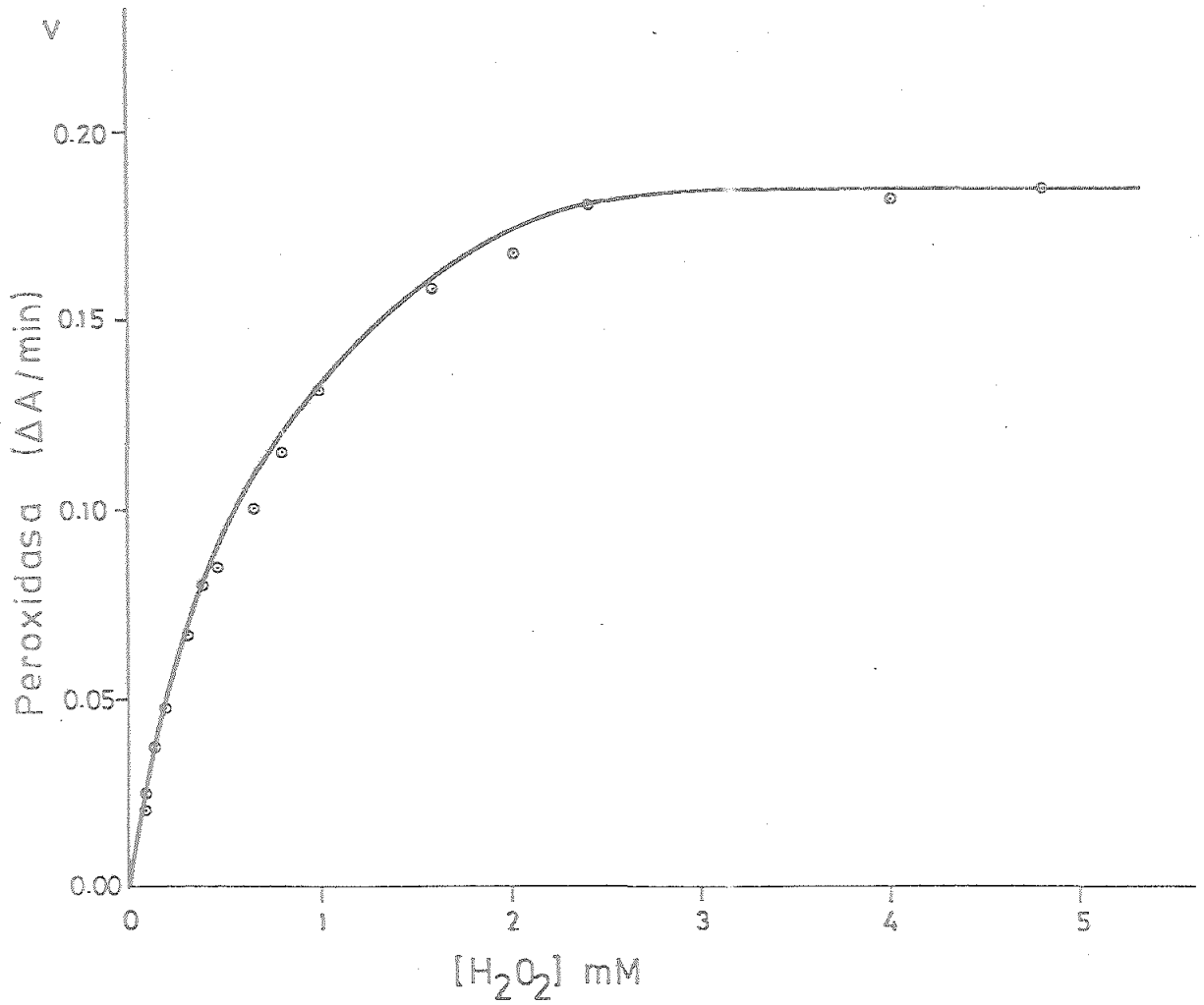


Figura 17: Influencia de la concentración de sustrato en la actividad peroxidasa.

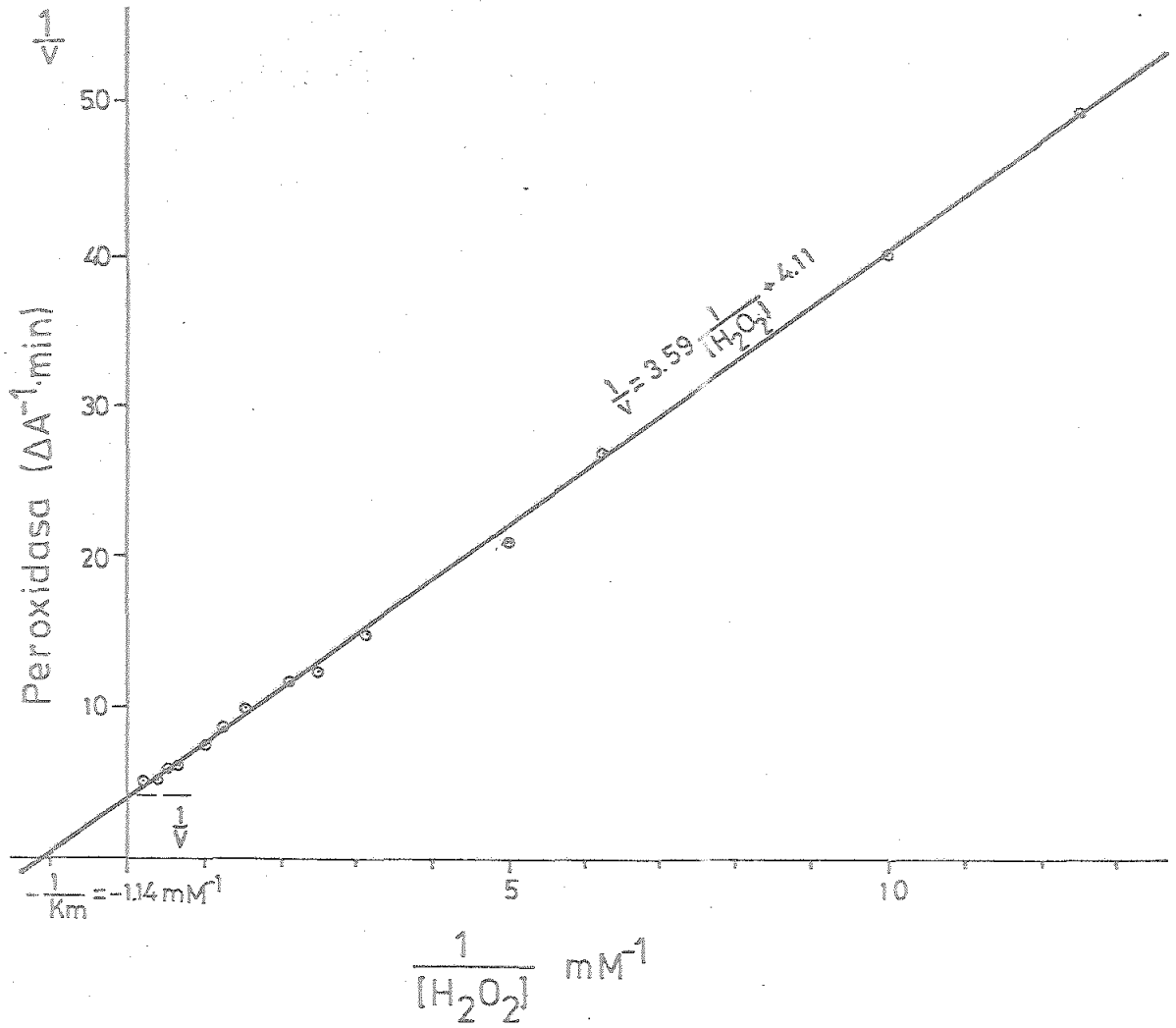


Figura 18: Representación de Lineweaver-Burk de las velocidades -  
iniciales de descomposición del  $H_2O_2$  a diferentes concentraciones=  
de esta.

#### IV.6.5. Influencia del pH sobre las actividades enzimáticas

La Figura 19 resume los resultados obtenidos cuando se determina la actividad AIA-oxidasa, llevando a cabo la incubación a pHs comprendidos entre 4 y 7. Se han utilizado tampones acético/acetato según Walpole (1937), y fosfato monopotásico/fosfato disódico según Sörensen (1937). Puesto que la curva reproduce bien la forma clásica de campana de la distribución normal, hemos calculado el pH óptimo usando la expresión de la media.

$$\text{pH}_{\text{opt.}} = \frac{\sum v_i \cdot \text{pH}_i}{\sum v_i} = 5,72$$

Este ensayo se ha repetido, obteniéndose como pH óptimo el valor 5,70. De acuerdo con estos resultados, adoptamos un pH = 5,7 en la mezcla de incubación.

No queremos dejar de comentar aquí que, en un primer ensayo utilizando tampones de citrato para obtener la escala de pH no se observó actividad alguna. Este fenómeno ya fue descrito por Stutz (1957), al estudiar el sistema AIA-oxidasa del *Lupinus albus* L. y apun

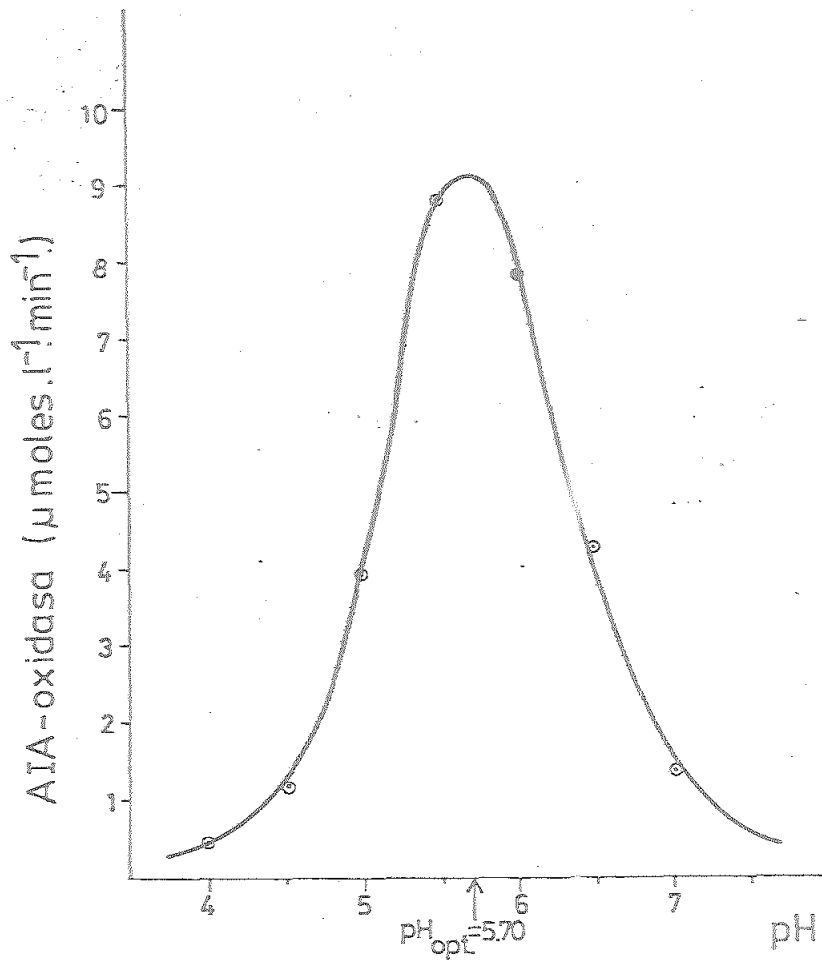


Figura 19: Influencia del pH de incubación en la actividad AIA-oxidasa.

taba que esta acción inhibidora del citrato, así como de otros ácidos orgánicos, succínico y málico, era función de sus capacidades para complejar los  $Mn^{++}$ . Estos efectos inhibidores por quelación de los iones  $Mn^{++}$  han sido mencionados por otros autores (Mudd et al., 1959).

En el caso de la actividad peroxidasa, la Figura 20 reproduce los resultados obtenidos para el margen de pH comprendido entre 4 y 7,5, apreciándose un máximo para el valor 6,1.

Los perfiles de pH obtenidos sugieren que el sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa puede tener dos grupos activos sensibles al pH. A partir de las intersecciones de las rectas, que se obtienen en las representaciones pH-log actividad, se han calculado dos valores de pK aparentes en ambas actividades. Estos valores son muy similares en ambas actividades, siendo las medias,  $pK_1 = 5,23$  y  $pK_2 = 6,36$ . Estos valores apuntan a la probable participación de residuos carboxílicos  $\beta$ -aspartil y/o  $\gamma$ -glutamil junto con grupos imidazol de la histidina, en la catálisis enzimática.

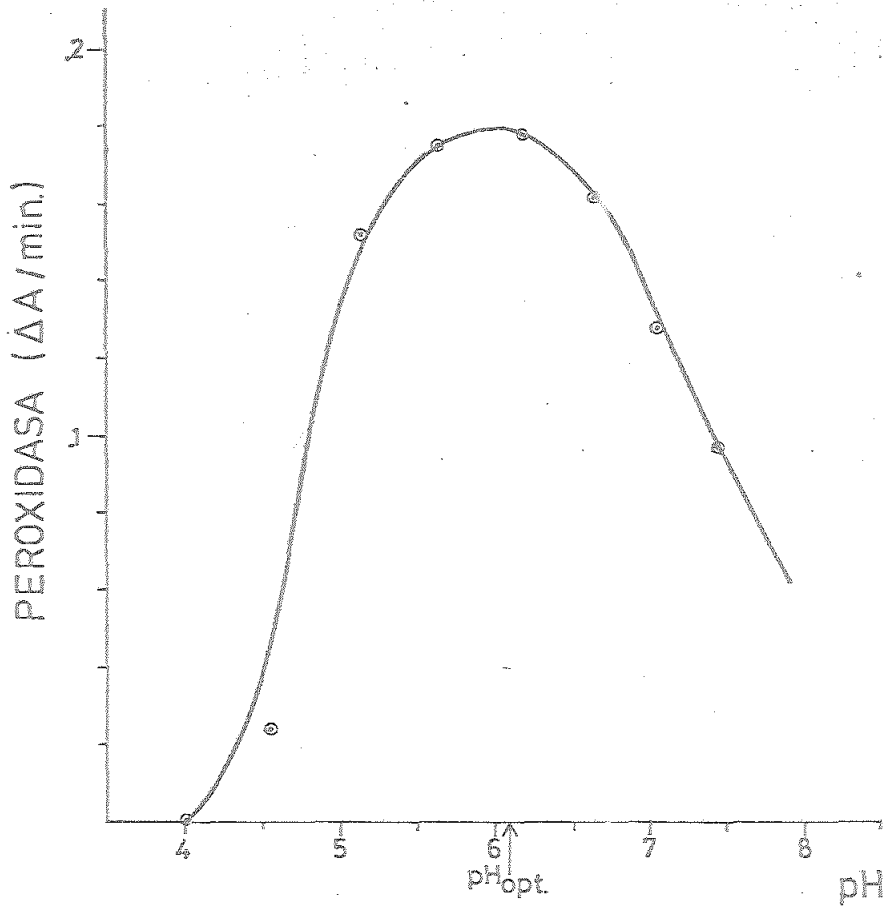


Figura 20: Influencia del pH de incubación en la actividad peroxidasa.

IV.6.6. Necesidad de cofactores en la actividad AIA-oxidasa

En un ensayo preliminar se realizaron dos incubaciones simultáneas de AIA y extracto enzimático parcialmente purificado, una conteniendo los cofactores ya clásicos en medidas de actividad AIA-oxidasa,  $Mn^{++}$  y DCP, a las concentraciones recogidas en la bibliografía, y la otra sin adicionarlos. En presencia de cofactores el AIA fue destruido, mientras que en su ausencia, y a lo largo de cuatro horas, no pudo detectarse destrucción alguna. Transcurrido este tiempo se adicionaron los cofactores y la reacción enzimática se inició ostensiblemente.

Para un estudio más adecuado del problema, planteamos y realizamos la experiencia factorial que recoge el siguiente esquema:

Experiencia factorial con cofactores

		$Mn^{++}$ (B)	
		0	b
DCP (A)	0	(1)	b
	a	a	ab



Factores: A = DCP  
B =  $Mn^{++}$

Niveles: 0 = 0 ml  
a = 1 ml DCP 1 mM  
b = 1 ml  $Mn^{++}$  1 mM

Todos los tratamientos tienen, además, en común: 2 ml de AIA 1 mM, 0,25 ml de extracto enzimático - parcialmente purificado y tampón pH = 5,7 hasta un volumen final de 10 ml. Simultáneamente se hizo una incubación con AIA y cofactores pero sin enzima.

La Figura 21 y la Tabla V recogen los resultados.

Las respuestas correspondientes a los tratamientos (1), a y b deben considerarse nulas, al ser iguales a la del ensayo "sin enzima"; en cambio, la respuesta correspondiente al tratamiento ab es, estadísticamente, altamente significativa. Pone claramente de manifiesto una fuerte interacción al estar presentes simultáneamente en la incubación ambos cofactores, probando, con toda evidencia, que es necesaria la presencia de  $Mn^{++}$  y DCP para que la reacción de destrucción del AIA transcurra, no teniendo efecto alguno la presencia en la mezcla de incubación de uno de ellos solamente. Ensayos posteriores nos permitieron establecer que la concentración óptima para ambos cofactores es 0,3 mM, en lugar de 0,1 mM que se usó en el ensayo factorial.

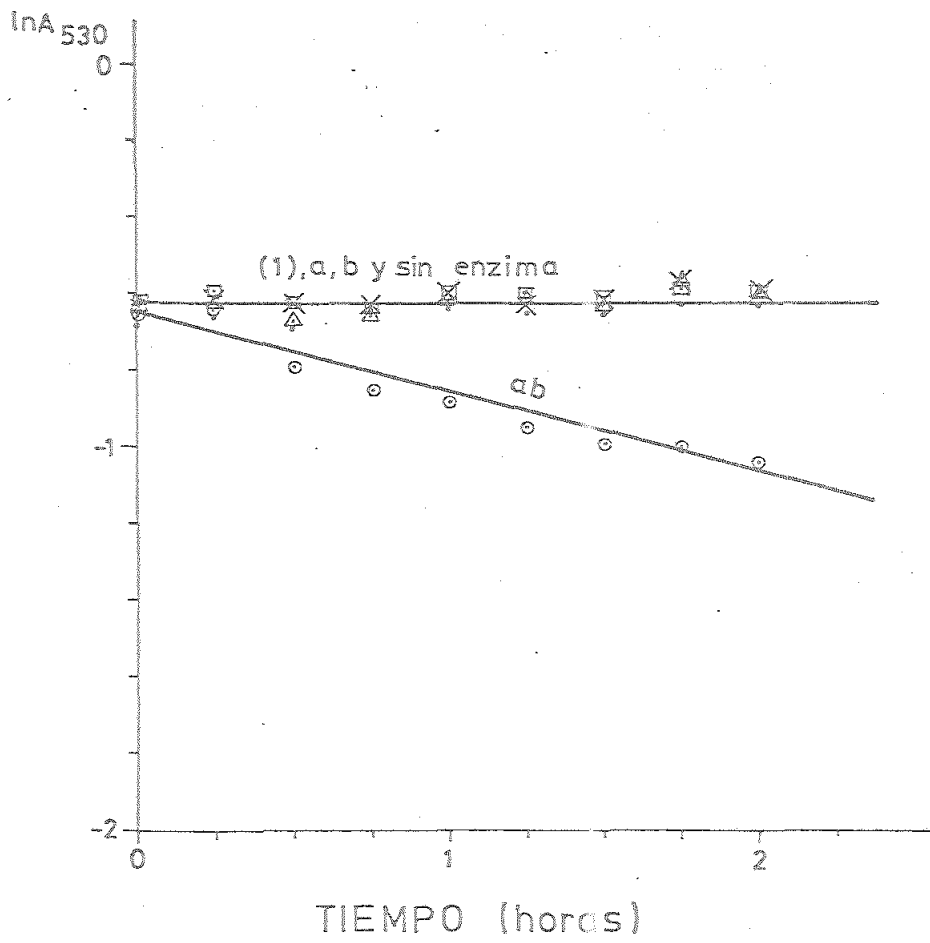


Figura 21: Necesidad de los cofactores DCP (a) y  $Mn^{++}$  (b) en la actividad AIA-oxidasa.

Tabla V

NECESIDAD DE LOS COFACTORES DCP y  $Mn^{++}$  EN LA ACTIVIDAD AIA-OXIDASA

TRATAMIENTO	k ( $min^{-1}$ )	v ( $\mu moles.l^{-1}.min^{-1}$ )
(1)	$0,11.10^{-3}$	$2,2.10^{-5}$
a	$0,12.10^{-3}$	$2,4.10^{-5}$
ab	$0,14.10^{-3}$	$2,8.10^{-5}$
ab	$3,13.10^{-3}$	$62,6.10^{-5}$
(1) sin enzima	$0,14.10^{-3}$	$2,8.10^{-5}$

(1) Sin cofactores

a DCP 0,1mM.

b  $Mn^{++}$  0,1mM.ab DCP 0,1mM,  $Mn^{++}$  0,1mM.

#### IV.6.7. Inhibidores

La supuesta presencia de un grupo hemo en la enzima de este sistema enzimático, nos indujo a estudiar los efectos de algunos inhibidores típicos de hierro: cianuro, azida y EDTA. Se han estudiado los tipos y constantes de inhibición en ambas actividades enzimáticas. En este estudio se han empleado, indistintamente, las representaciones de Lineweaver-Burk, que relaciona inversos de velocidades iniciales con inversos de concentraciones de sustrato, sin inhibidor y a una concentración determinada del mismo; y la de Dixon, que relaciona inversos de velocidades iniciales con concentraciones de inhibidor, a dos concentraciones determinadas de sustrato. En algunos casos se han utilizado las dos representaciones, obteniéndose constantes de inhibición similares.

##### IV.6.7.1. Cianuro

La Figura 22 muestra una representación de Lineweaver-Burk de las velocidades iniciales de destrucción del AIA, a diferentes concentraciones del mismo, en ausencia y en presencia de cianuro  $10^{-7}$  M. La inhibi

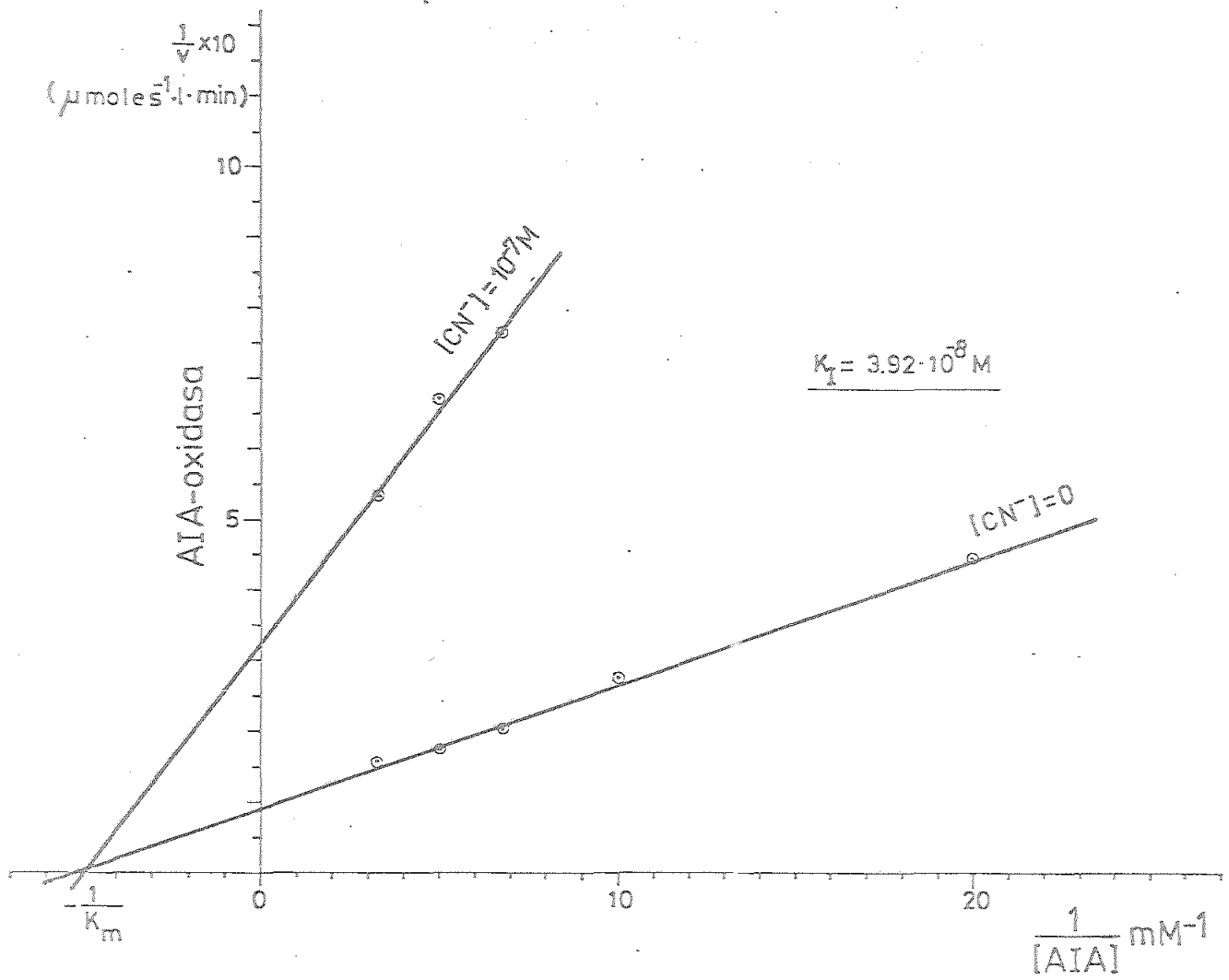


Figura 22: Inhibición no-competitiva de la actividad AIA-oxidasa - por el cianuro.

ción es de tipo no-competitivo con respecto al AIA, calculándose una  $K_I$  de  $3,92 \cdot 10^{-8}$  M. De la representación de Dixon se obtiene una  $K_I$  de  $5,47 \cdot 10^{-8}$  M prácticamente coincidente con la antes hallada.

La Figura 23 muestra una representación de Lineweaver-Burk de la actividad peroxidasa en ausencia y en presencia de cianuro  $4 \cdot 10^{-6}$  M. La inhibición es de tipo competitivo, calculándose una  $K_I$  para el cianuro de  $7,3 \cdot 10^{-6}$  M.

#### IV.6.7.2. Azida

La Figura 24 muestra una representación de Dixon de la actividad AIA-oxidasa, a concentraciones de AIA 0,05 y 0,2 mM. La inhibición es de tipo competitivo, calculándose una  $K_I$  para la azida de  $1,06 \cdot 10^{-3}$  M.

La Figura 25 muestra una representación de Dixon de la actividad peroxidasa, a concentraciones 1,2 y 2,4 mM de  $H_2O_2$ . La inhibición es de tipo competitivo, obteniéndose una  $K_I$  para la azida de  $4,13 \cdot 10^{-3}$  M. De la representación de Lineweaver-Burk se obtiene una  $K_I$  de  $1,03 \cdot 10^{-3}$  M.

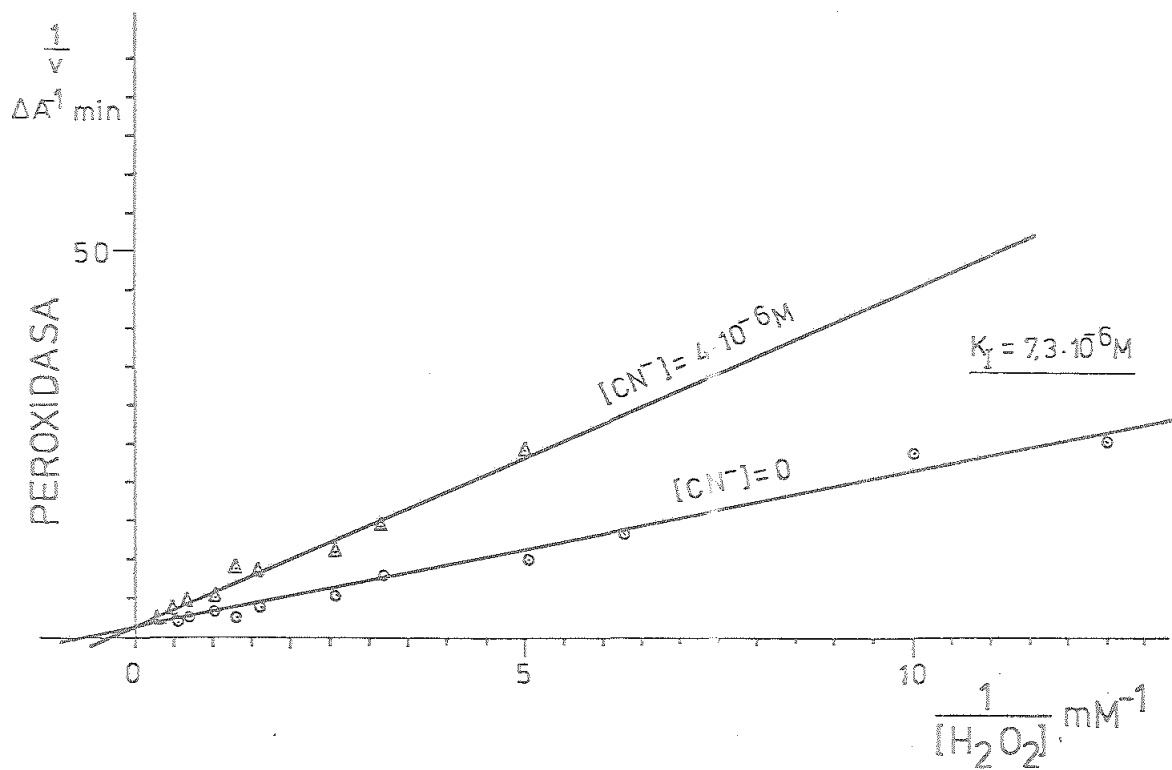


Figura 23: Inhibición competitiva de la actividad peroxidasa por el cianuro.

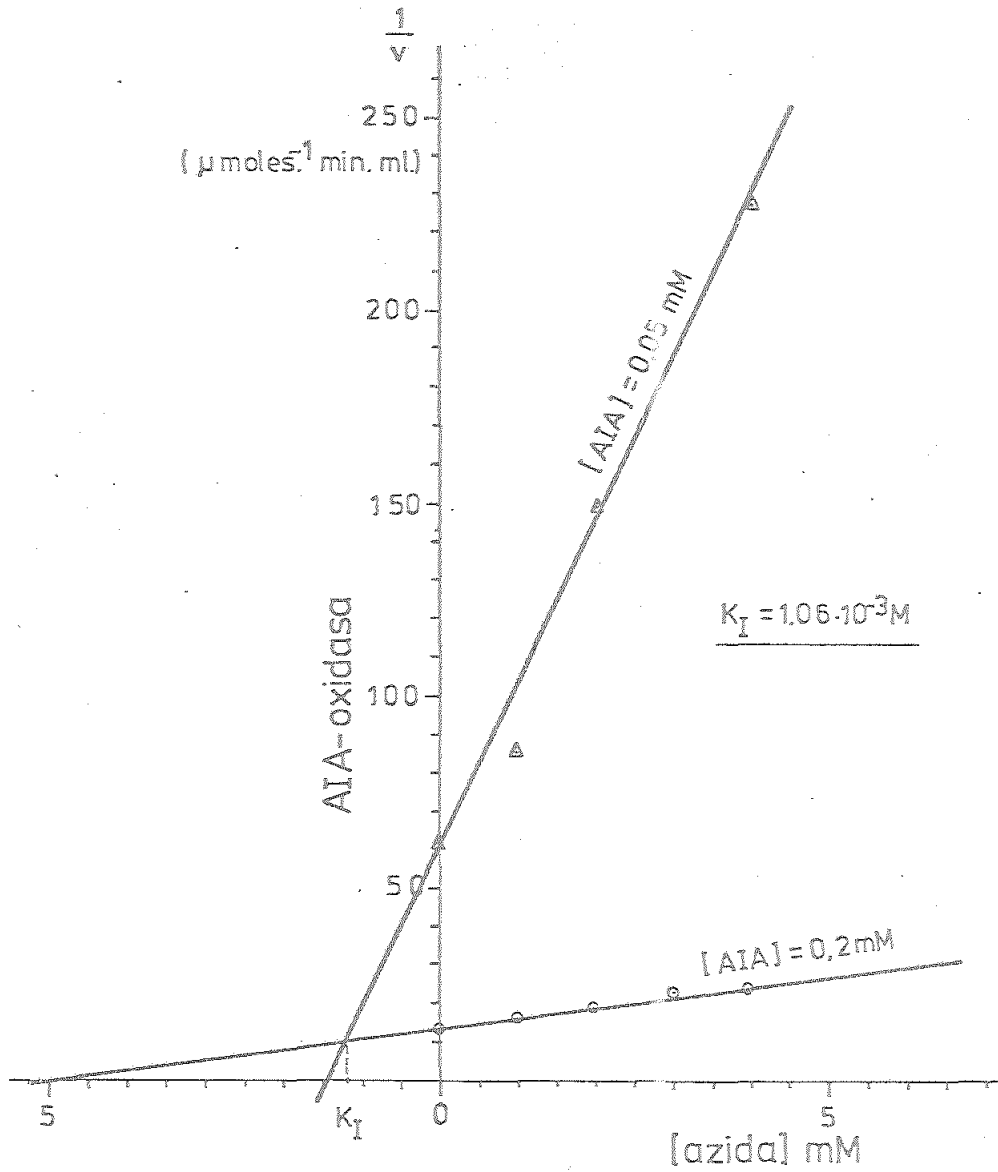


Figura 24: Inhibición competitiva de la actividad ATA-oxidasa por la azida.



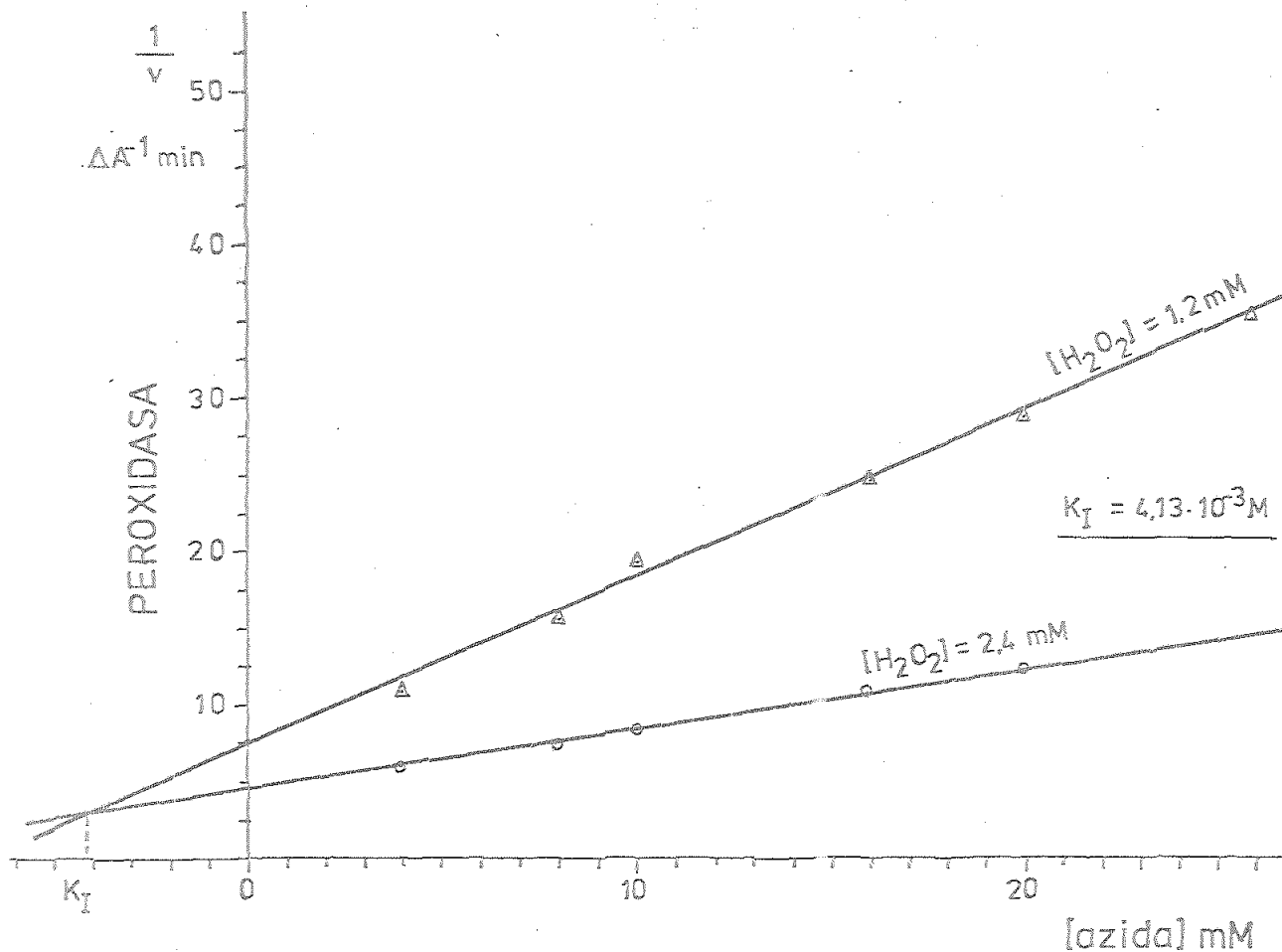


Figura 25: Inhibición competitiva de la actividad peroxidasa por la azida.

#### IV.6.7.3. EDTA

La Figura 26 muestra una representación de Dixon de la actividad AIA-oxidasa, a concentraciones 0,05 y 0,2 mM de AIA. La inhibición es competitiva, con una  $K_I$  para el EDTA de  $1,4 \cdot 10^{-4}$  M.

La Figura 27 muestra una representación de Dixon de la actividad peroxidasa, a concentraciones 2,4 y 4,8 mM de  $H_2O_2$ . La inhibición es competitiva, con una  $K_I$  para el EDTA de  $2,26 \cdot 10^{-6}$  M.

La Tabla VI resume los tipos y constantes de inhibición encontrados en cada caso.

Los estudios realizados con inhibidores del sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo muestran una marcada sensibilidad del sistema enzimático al cianuro, azida y EDTA, típicos inhibidores de hemoproteínas.

#### IV.6.7.4. Acriflavina

Por otra parte, hemos estudiado también, el efecto de la acriflavina, un potente inhibidor específico de flavoproteínas (Hellerman et al., 1946; Murphy y=

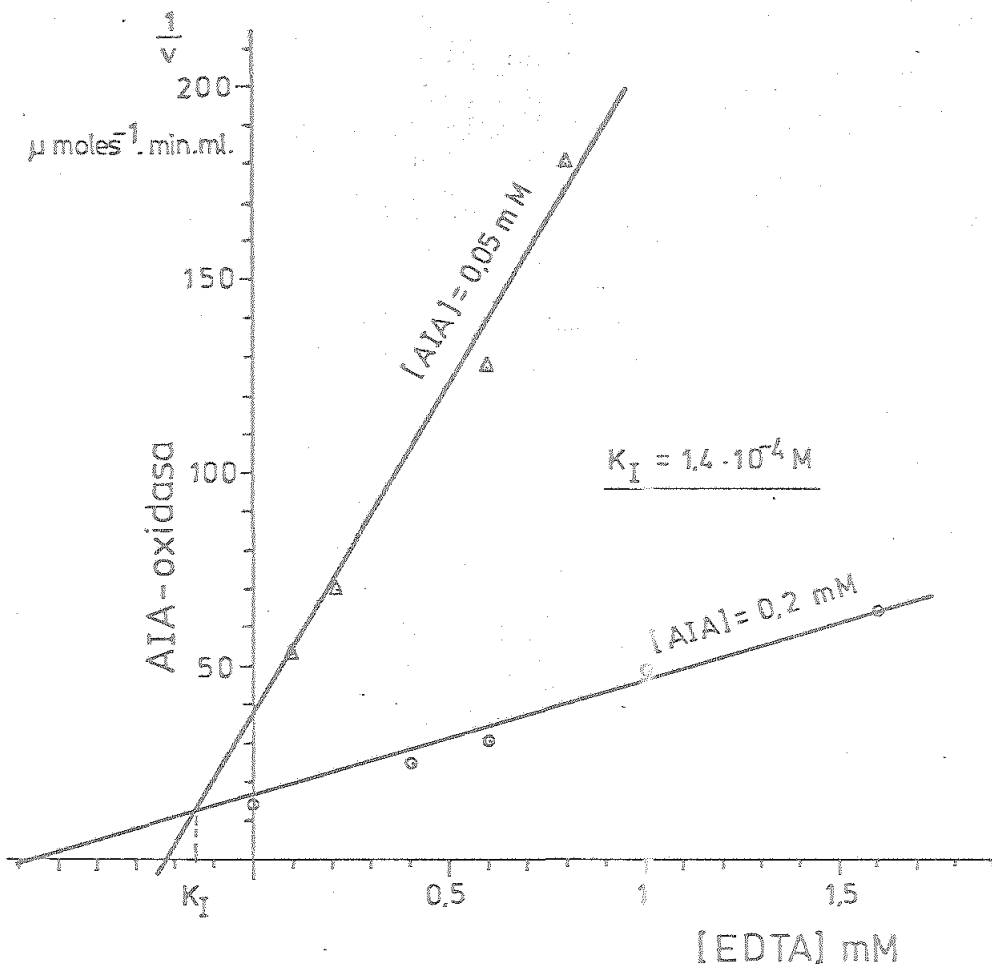


Figura 26: Inhibición competitiva de la actividad AIA-oxidasa por el EDTA.

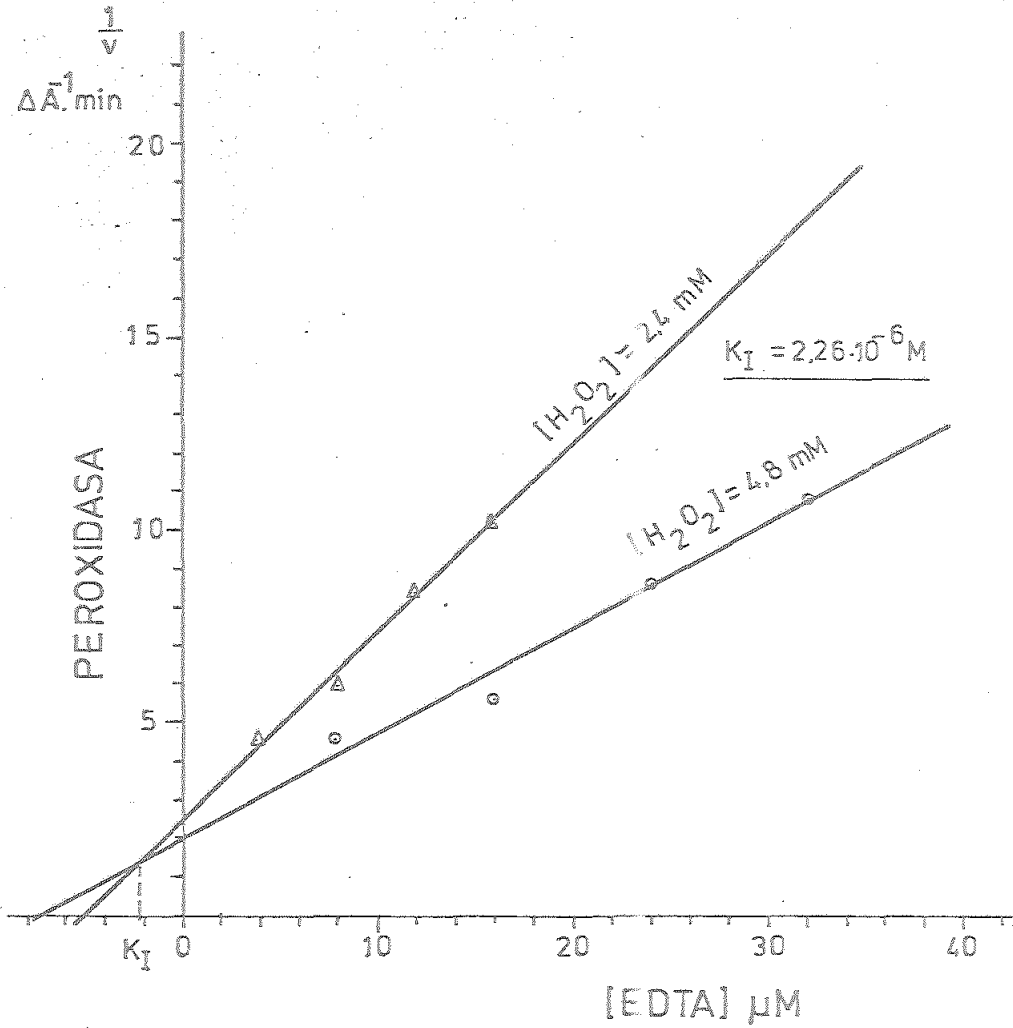


Figura 27: Inhibición competitiva de la actividad peroxidasa por el EDTA.

Tabla VI

TIPOS Y CONSTANTES DE INHIBICION ENCONTRADOS PARA EL CIANURO, AZIDA Y EDTA EN LAS ACTIVIDADES AIA-OXIDASA Y PEROXIDASA

INHIBIDOR	ACTIVIDAD	
	AIA-OXIDASA	PEROXIDASA
Cianuro	No-competitiva	Competitiva
	$K_I = 3,92 \cdot 10^{-8} M$	$K_I = 7,3 \cdot 10^{-6} M$
Azida	Competitiva	Competitiva
	$K_I = 1,06 \cdot 10^{-3} M$	$K_I = 4,13 \cdot 10^{-3} M$
EDTA	Competitiva	Competitiva
	$K_I = 1,44 \cdot 10^{-4} M$	$K_I = 2,26 \cdot 10^{-6} M$

O'hEocha, 1973a, b y c), en el sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa, ante la posibilidad de la presencia de un grupo prostético flavina, como tienen algunas peroxidases de bacterias (Dolin, 1957).

En la actividad peroxidasa, la acriflavina - 0,8  $\mu$ M, produce un 40% de inhibición. La inhibición de la actividad peroxidasa por la acriflavina, indica la posibilidad de la presencia de un grupo prostético flavina, que interviene en la actividad. Murphy (1973a b y c), estudiando peroxidases de algas no encuentra inhibición por la acriflavina.

En la actividad AIA-oxidasa, la acriflavina - 5  $\mu$ M, no sólo no ejerció inhibición alguna, sino que la cantidad de AIA destruido, se incrementó ostensiblemente (Figura 28). La falta de inhibición por la acriflavina en la actividad AIA-oxidasa excluye la posibilidad de que una flavina intervenga en la actividad.

Este hecho nos movió a realizar nuevas experiencias. Las incubaciones para determinar la destrucción de AIA por el extracto enzimático las realizamos normalmente a la luz del día existente en el laboratorio. Planeamos dos tipos de experiencias: 1º) Se incubaba AIA con extracto enzimático, con extracto más acriflavina

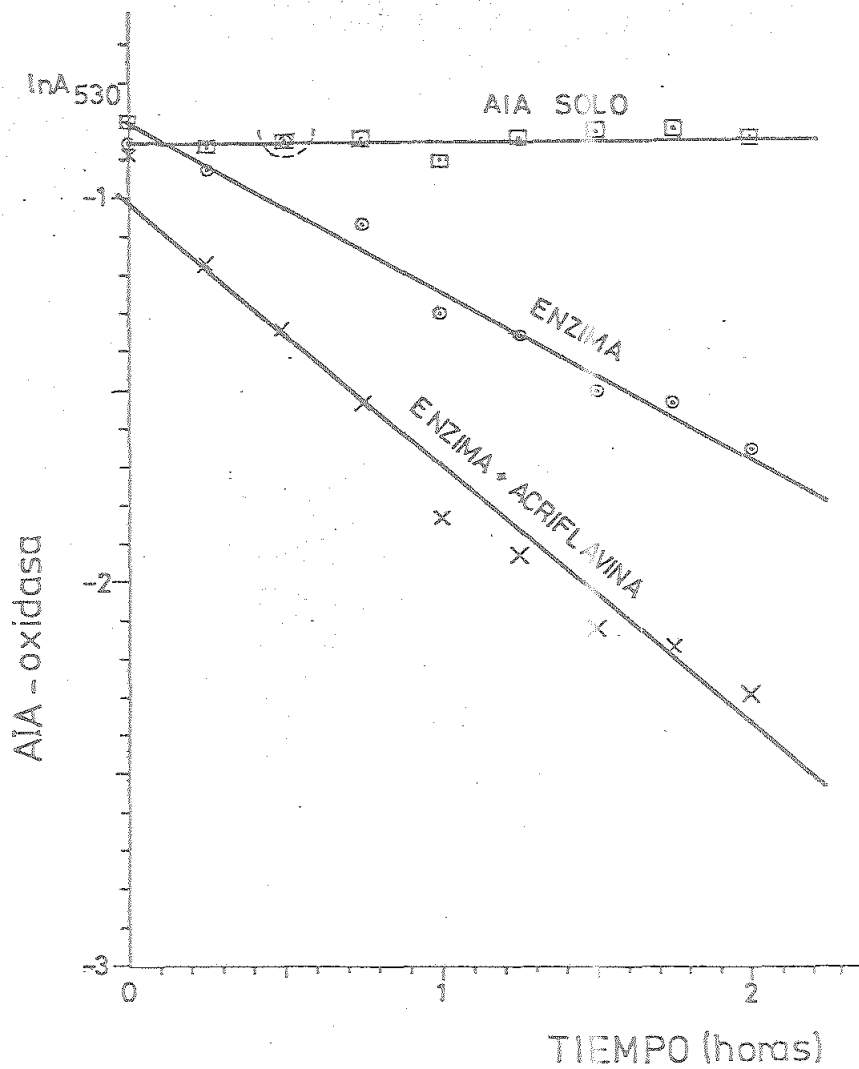


Figura 28: Efecto de la acriflavina sobre la actividad AIA-oxidasa.

na y con acriflavina asociada siempre con las correspondientes cantidades de cofactores ( $Mn^{++}$  y DCP); 2º) Las mismas incubaciones anteriores, pero, operando en la oscuridad. Cuando transcurrió una hora y media se encendió la luz artificial existente en la cámara oscura y se siguieron tomando muestras de las mezclas de incubación. Las Figuras 29 y 30 son ilustrativas de los fenómenos observados.

Puede verse como, a la luz, la acriflavina incrementa la velocidad de destrucción del AIA y también que la acriflavina sola es capaz de destruir el AIA. La cantidad de AIA destruido durante la incubación en presencia de enzima + acriflavina es aproximadamente la suma del destruido por el enzima más el destruido por la acriflavina.

En la oscuridad la acriflavina no actúa. Obsérvese como la recta correspondiente al ensayo AIA + acriflavina corre horizontalmente, coincidiendo con el ensayo de AIA solo, y el ensayo AIA + enzima + acriflavina tiene la misma pendiente que el ensayo AIA + enzima. Sin embargo, al encender la luz de la cámara oscura la acriflavina se activa y comienza la destrucción del AIA.



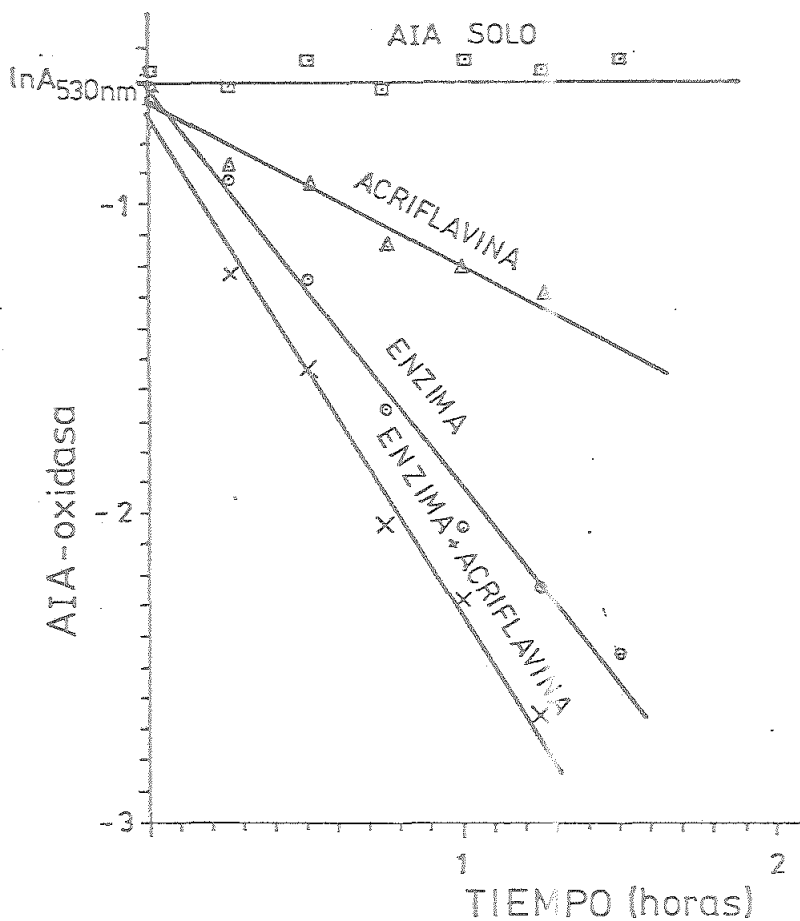


Figura 29: Efecto de la acriflavina a la luz, sobre la actividad - AIA-oxidasa. Más información en el texto.

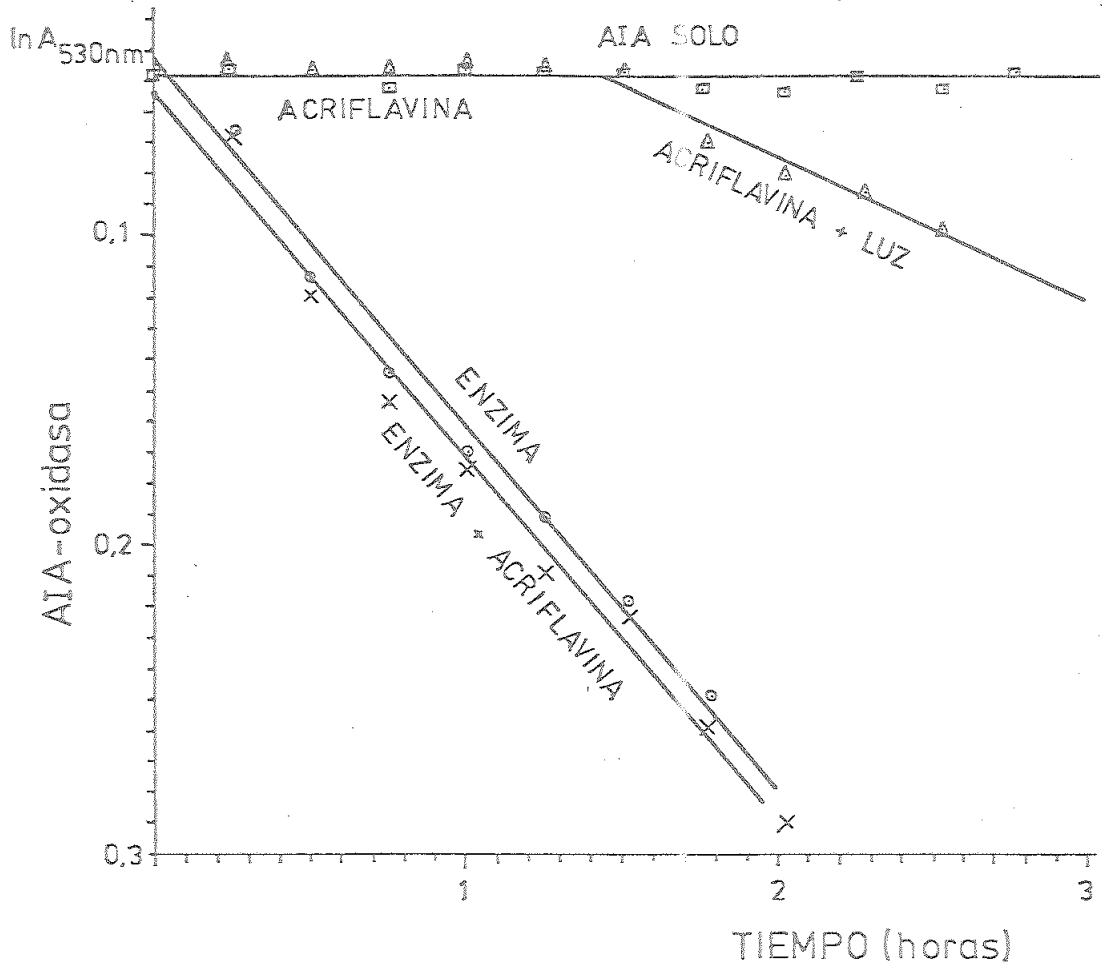


Figura 30: Efecto de la acriflavina en la oscuridad, sobre la actividad AIA-oxidasa. Más información en el texto.

Los aspectos cuantitativos de todos estos procesos quedan reflejados en la Tabla VII.

En otros ensayos pudimos comprobar que la acriflavina necesita también, para destruir el AIA, de la presencia en el medio de incubación de los cofacto--res DCP y  $Mn^{++}$ .

Para asegurarnos de que la acriflavina destruye realmente al AIA, hemos seguido espectrofotométricamente, por absorción en el UV, el proceso. Los espec---tros de absorción correspondientes al ensayo AIA + acriflavina son idénticos a los del ensayo AIA + extracto enzimático de hojas.

En su conjunto, el compòrtamiento de la acriflavina es análogo al encontrado por Galston (1948), y Galston y Baker (1949), para la riboflavina, capaz de óxidar al AIA bajo acción de la luz, pero no en la oscuridad, siendo también la reacción de primer orden, con una constante de velocidad,  $k = 7,2 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ , precisamente del mismo orden de magnitud que la encontrada por nosotros para la acriflavina ( $8,6 \cdot 10^{-3}$  y  $7,8 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ).

Tabla VII

EFFECTO DE LA ACRIFLAVINA A LA LUZ Y OSCURIDAD EN LA ACTIVIDAD  
AIA-OXIDASA

ENSAYO	k ( $\text{min}^{-1}$ )	v ( $\mu\text{moles.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )
<u>a la luz del día</u>		
AIA solo	0	0
AIA + enzima	$21,4.10^{-3}$	4,26
AIA + enz. + acrif.	$26,1.10^{-3}$	5,22
AIA + acriflavina	$8,6.10^{-3}$	1,72
<u>en la oscuridad</u>		
AIA solo	0	0
AIA + enzima	$19,3.10^{-3}$	3,86
AIA + enz. + acrif.	$19,7.10^{-3}$	3,94
AIA + acriflavina	0	0
AIA + acriflavina + luz	$7,8.10^{-3}$	1,56

#### IV.6.8. Comportamiento en ultrafiltración

Con objeto de obtener una primera información acerca del tamaño molecular del sistema enzimático, así como de disponer de extractos enzimáticos mas concentrados, donde poder estudiar el comportamiento electroforético del sistema, se han fraccionado y concentrado varias muestras de extractos enzimáticos, utilizando membranas XM-100, XM-50 y UM-10, siguiendo a Hoyle (1972); y como se ha descrito en el apartado III:13.

En un primer ensayo un extracto enzimático se ha filtrado a través de las membranas XM-100 y UM-10, según se indica en Materiales y Métodos, obteniéndose tres fracciones con pesos moleculares inferior a 10.000 (UF I), entre 10.000 y 100.000 (UF II) y superior a 100.000 (UF III), determinándose las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa en las distintas fracciones.

Las fracciones UF II y UF III presentan ambas actividad enzimáticas, la fracción UF I no presenta ninguna de las dos actividades enzimáticas. Estas dos fracciones con actividad (10.000/100.000 y superior a 100.000) se han utilizado para ensayos de electroforesis.

Posteriormente, se ha filtrado un extracto en zimático a través de las tres membranas, obteniéndose cuatro fracciones cuyas actividades específicas AIA-oxidasa y peroxidasa se recogen en la Tabla VIII.

Las fracciones UF 3 y UF 4 presentan ambas actividades enzimáticas, siendo las actividades específicas de la fracción UF 3, 3,6 veces superior a las de la fracción UF 4. Estos datos parecen indicar que ambas actividades son desarrolladas por el mismo enzima. En la fracción UF 2 hemos podido detectar actividad peroxidasa, si bien mucho menor que en las otras fracciones, pero no actividad AIA-oxidasa. Esto puede ser debido, a que la determinación de esta actividad, es mucho menos sensible que la determinación de la actividad peroxidasa.

#### IV.6.9. Comportamiento en filtración por gel

##### IV.6.9.1. Estudio de las actividades enzimáticas

Con el fin de obtener una mayor información sobre las dos actividades exhibidas por el sistema enzimático se han realizado ensayos de filtración en gel

Tabla VIII

ACTIVIDADES AIA-OXIDASA Y PEROXIDASA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS -  
POR ULTRAFILTRACION DE UN EXTRACTO ENZIMATICO DE HOJAS DE OLIVO

FRACCION	PESO MOLECULAR	ACTIVIDADES ESPECIFICAS	
		AIA-OXIDASA	PEROXIDASA
UF 1	inferior a 10.000	-	-
UF 2	10.000 a 50.000	-	57,9
UF 3	50.000 a 100.000	1,36	444,7
UF 4	superior a 100.000	0,37	122,8

de Sephadex. Se ha utilizado una columna (33 x 2,6cm.) de Sephadex G-100 equilibrada durante varios días con tampón fosfato 0,02 M, pH 6,1. Las restantes condiciones se indican en Materiales y Métodos.

1 ml de extracto enzimático se aplicó a la columna y el volumen de elución del sistema enzimático se determinó a partir de sus curvas de actividades.

La Figura 31 recoge los resultados de uno de los ensayos realizados.

Puede observarse, como ambas actividades se eluyen prácticamente juntas, lo cual apoya la hipótesis de que la misma proteína es el soporte de ambas actividades enzimáticas.

La columna se calibró con las proteínas patrones indicadas en Materiales y Métodos, estableciéndose la siguiente relación:

$$K_{av} = -0,5171 \log P_m + 2,612$$

siendo

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

De esta relación, se obtiene para el volumen



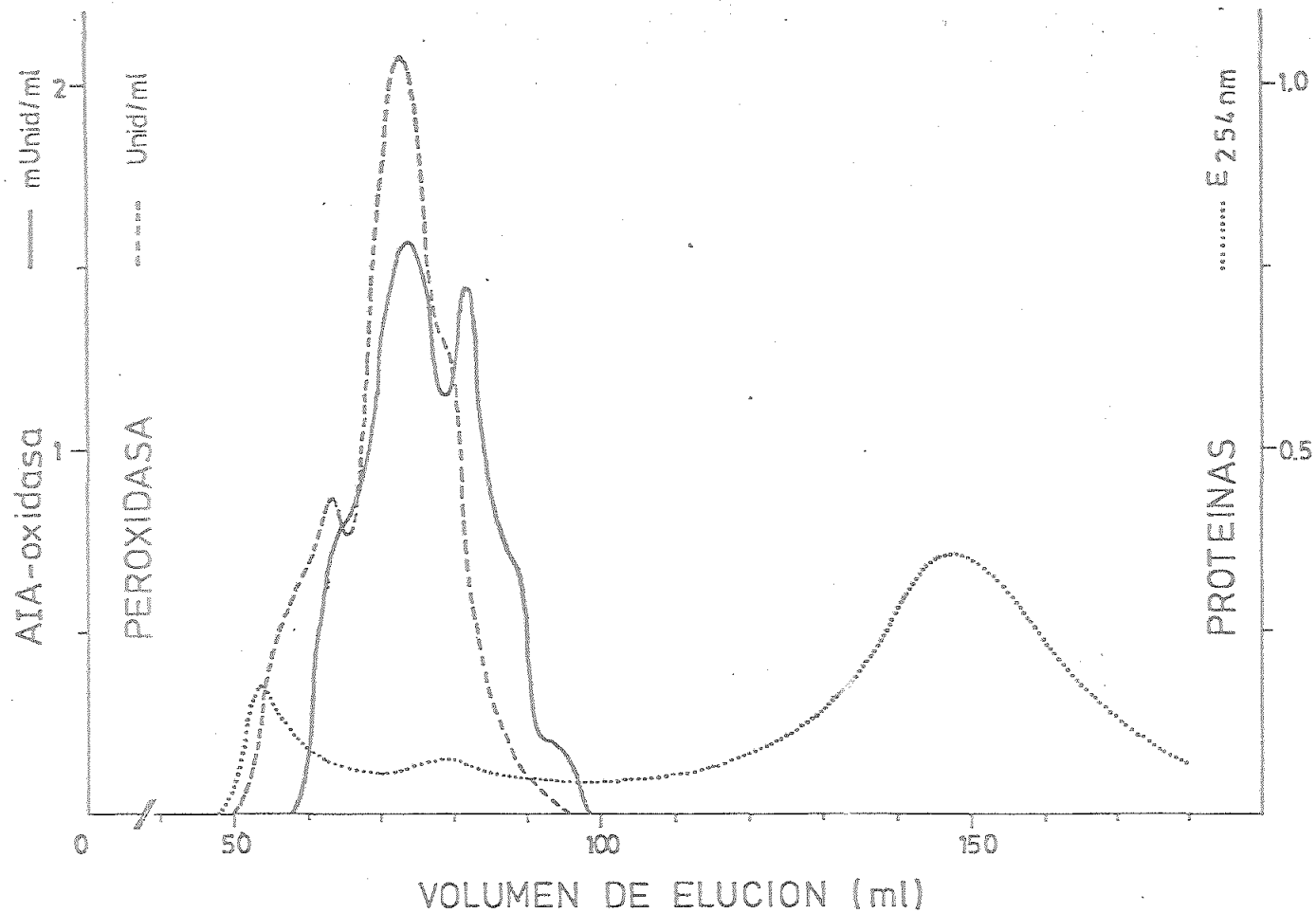


Figura 31: Cromatografía en una columna de Sephadex G-100 del sistema AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo. Las actividades - AIA-oxidasa y peroxidasa se midieron en alicuotas de las fracciones recogidas. Otros detalles se indican en el texto.

de elución del sistema enzimático un peso molecular algo superior a 50.000 D.

En algunos de los ensayos realizados se aprecian otros máximos de actividad, fundamentalmente uno al que le correspondería un peso molecular algo mayor de 30.000 D y otro, menos frecuente, de peso molecular comprendido entre 70.000 y 80.000 D.

Posteriormente a la realización de estos ensayos, pudimos disponer de otro tipo de Sephadex, de una columna de mayor longitud y de una mezcla más completa de proteínas de pesos moleculares conocidos, que hemos utilizado para determinar pesos moleculares como veremos a continuación.

#### IV.6.9.2. Determinación de pesos moleculares.

El peso molecular del sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo se ha determinado por filtración a través de una columna calibrada de Sephadex G-200 superfino, según Andrews (1964).

Se ha utilizado una columna (91,1 x 2,6 cm) de Sephadex G-200 superfino equilibrada durante varios días con tampón fosfato 0,02 M, pH 6,1 y calibrada con proteínas patrones de pesos moleculares conocidos. Las

proteínas patrones se han filtrado en dos recorridos, disueltas en 4 ml, con una concentración de 5 mg/ml de cada proteína, estableciéndose la siguiente relación:

$$K_{av} = -0,517 \log P_m + 2,917$$

Se aplicaron a la columna 4 ml de una preparación enzimática y el volumen de elución del sistema enzimático se determinó a partir de sus curvas de actividades.

De la Figura 32 se obtiene un peso molecular para el sistema enzimático de 54.100 D, prácticamente igual que el calculado anteriormente.

En este ensayo, se aprecian también picos de actividades, mucho menores, en volúmenes de elución a los que les corresponden pesos moleculares de 70.500 y 34.500 D, de acuerdo con lo obtenido en la columna más pequeña.

Aparece también un pico de actividad al que habría que asignarle, extrapolando en la curva de calibrado, un peso molecular de 290.000 D.

Nosotros pensamos que el sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa puede estar asociado, bien a restos de membranas o a otras proteínas, separándose

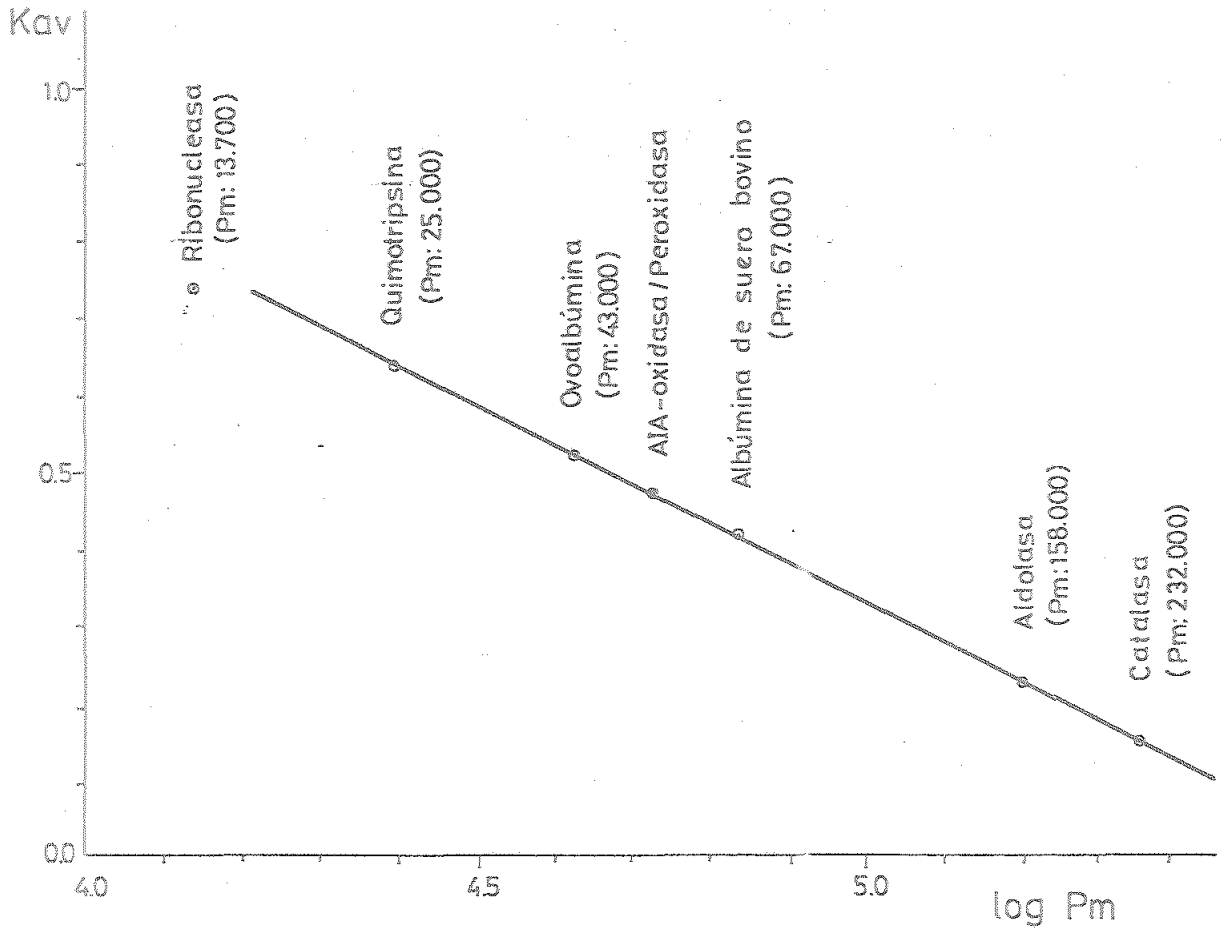


Figura 32: Peso molecular del sistema AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo determinado en una columna de Sephadex G-200 superfino. Más detalles se indican en el texto.

mas o menos según los tratamientos que experimenta el extracto, incluso al ir atravesando el lecho de Sephadex. Una prueba evidente de ello se obtuvo, cuando se reunieron y concentraron las fracciones a las que les corresponden un peso molecular de 290.000 D y se pasaron por la columna de Sephadex G-100, usada en los ensayos anteriores. Se obtuvieron tres picos claros, uno mayor con peso molecular 52.400 D, otro 34.500 D y otro mucho más pequeño de 104.500 D.

#### IV.6.10. Comportamiento electrofotético

##### IV.6.10.1. Isoelectroenfoque

Hemos sometido a isoelectroenfoque un extracto parcialmente purificado, y las dos fracciones obtenidas por ultrafiltración con actividades enzimáticas, (fracciones 10.000/100.000 y superior a 100.000).

La Figura 33 recoge el gradiente de pH obtenido en este ensayo.

Revelando las bandas como peroxidasas, la fracción con peso molecular entre 10.000 y 100.000 se comporta electroforéticamente como más pura, originan-

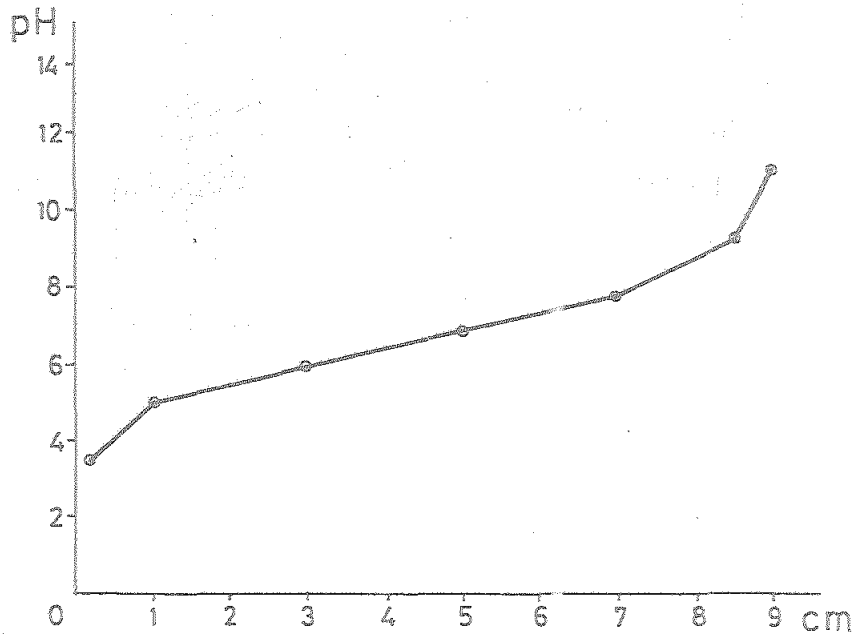


Figura 33: Gradiente de pH obtenido en isoelectroenfoque.

do bandas nítidas y bien definidas, correspondientes a isoenzimas con puntos isoelectríficos, pI, entre 4 y 7 - (ver Figuras 34a y 35).

La fracción de peso molecular superior a 100.000 no tiene un comportamiento electroforético correcto, quedando junto al lugar de aplicación de la muestra una gran cantidad de restos con actividad peroxidasa, que no llegan a formar bandas nítidas, pero que si emigran ligeramente hacia el ánodo. Este comportamiento coincide con la idea expresada en el apartado anterior, de que el sistema enzimático se encuentra ligado a restos celulares (membranas, etc.), o a otras proteínas.

En el extracto parcialmente purificado original llegan a distinguirse las mismas bandas que en las dos fracciones, aunque debido a la menor concentración no llegan a revelarse todas las bandas.

También hemos revelado las bandas electroforéticas por su actividad AIA-oxidasa (reactivo FBBB) y parece que se comportan análogamente a como lo hacen frente al reactivo de peroxidasa, si bien por su menor sensibilidad no llegan a visualizarse todas las bandas detectadas como peroxidasas, (ver Figura 34b).

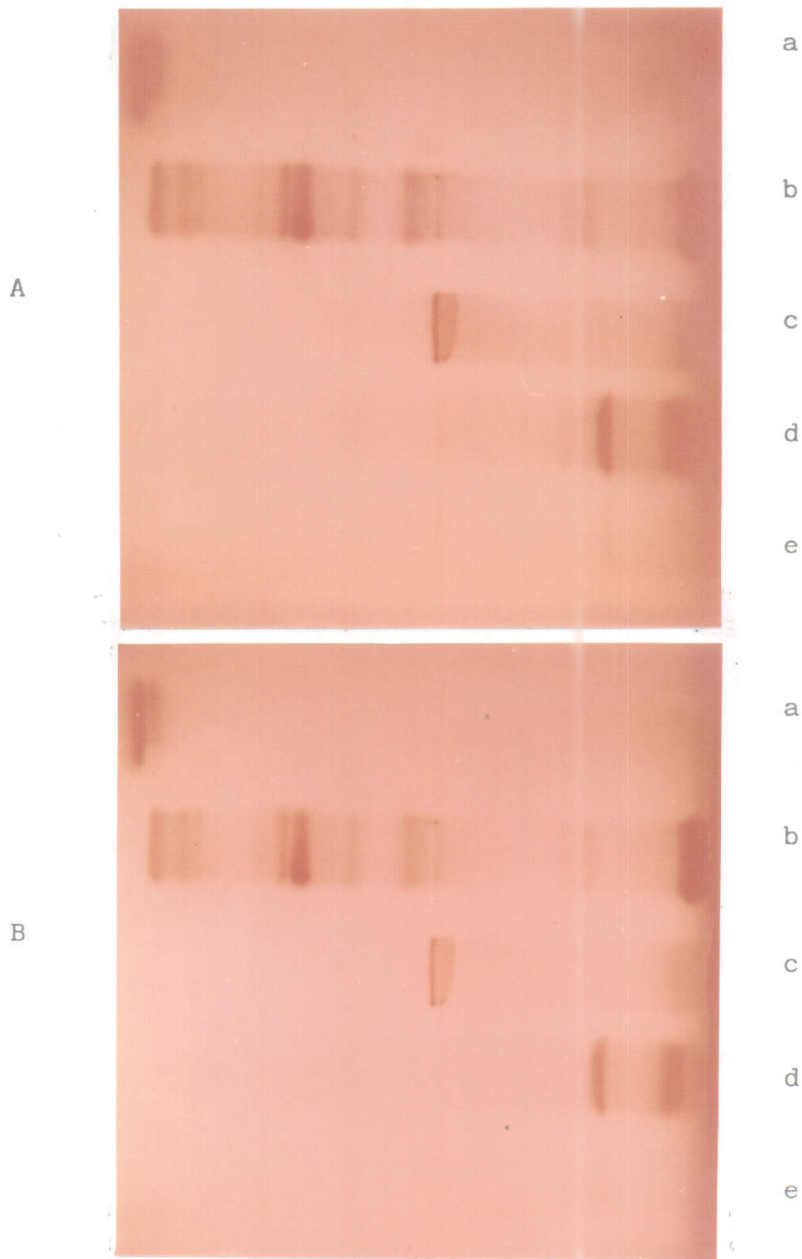


Figura 34: Isoelectroenfoque

A) AIA-oxidasa

B) Peroxidasa

a) Citocromo C

b) HRP

c) Superior a 100.000

d) 10.000/100.000

e) Extracto original



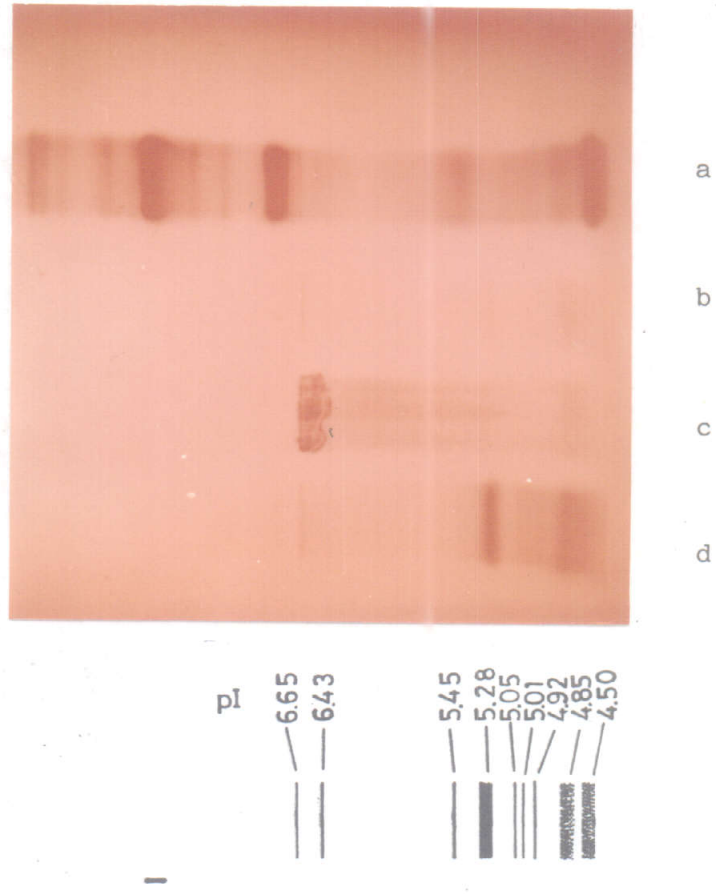


Figura 35: Isoelectroenfoque, actividad peroxidasa.

- a) HRP
- b) Extracto original
- c) Fracción superior a 100.000
- d) Fracción 10.000/100.000
  
- D) Esquema correspondiente a la fracción 10.000/100.000

#### IV.6.10.2. Electroforesis en gel con gradiente de concentración de poliacrilamida

Esta técnica electroforética para determinación de pesos moleculares ofrece la ventaja, como ya hemos comentado en el apartado III.15.2. de poder revelar las proteínas enzimáticas utilizando reactivos específicos para sus actividades. En nuestro caso hemos utilizado la reacción peroxidasa por su mayor sensibilidad. Las proteínas patrones, que se llevan simultáneamente en el mismo gel, se revelan con Coomassie y ello obliga a cortar el gel previamente al revelado.

Se someten a este proceso electroforético, como en el isoelectroenfoque (IEF), un extracto parcialmente purificado y las dos fracciones obtenidas de él con pesos moleculares comprendidos entre 10.000 y 100.000 y superior a 100.000.

Su comportamiento guarda gran analogía con el observado en IEF. La fracción de peso molecular entre 10.000 y 100.000 aparece más purificada, dando bandas nítidas; la fracción de peso molecular superior a 100.000 no tiene un comportamiento normal, originando "colas" y quedando en su mayor parte en el origen (zo-

na de los mayores pesos moleculares); el extracto original, de que proceden ambas fracciones, tiene un aspecto suma de los de las dos citadas fracciones.

En este ensayo se han empleado las siguientes proteínas patrones: Tiroglobulina (669.000), Ferritina (440.000), Catalasa (232.000), Lactato deshidrogenasa (140.000) y albúmina de suero bovino (67.000).

La fracción 10.000/100.000 y las proteínas patrones indicadas anteriormente, se someten a este proceso electroforético, aplicando 150 V durante 32 h (4.800 V x h), para asegurarnos de que las bandas alcanzado el "límite de poro".

Operando bajo estas condiciones, se han realizado tres ensayos.

La Figura 36 recoge uno de los ensayos realizados. La Figura 37 recoge la recta obtenida para las proteínas patrones, de uno de los ensayos realizados, que relaciona  $\log P_m$  con valores  $R_f$ , y la Tabla IX los valores de pesos moleculares y las medias, obtenidas en los tres ensayos, para las distintas bandas de la fracción 10.000/100.000.

En esta fracción pueden distinguirse hasta cinco bandas (ver Figura 36) de las cuales dos son mu-

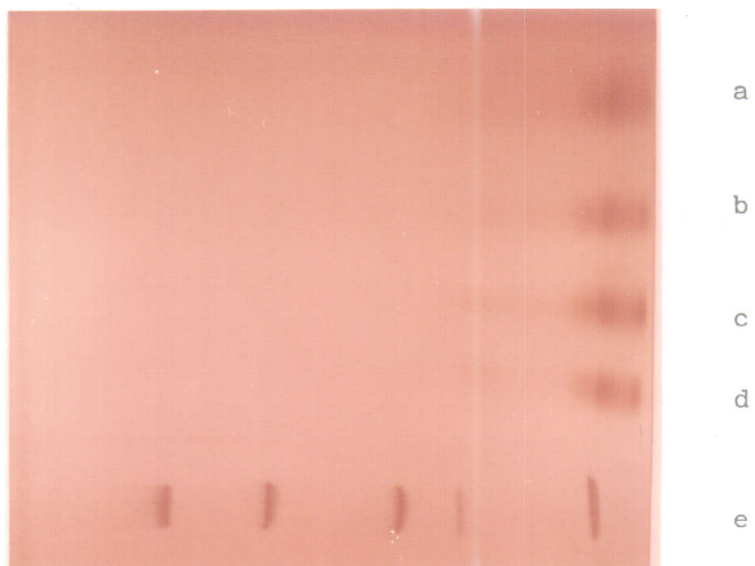


Figura 36: Electroforesis en gel con gradiente de concentración - de poliacrilamida.

a,b,c,d) Replicados de la fracción 10.000/100.000

e) Patrones de peso molecular conocido.

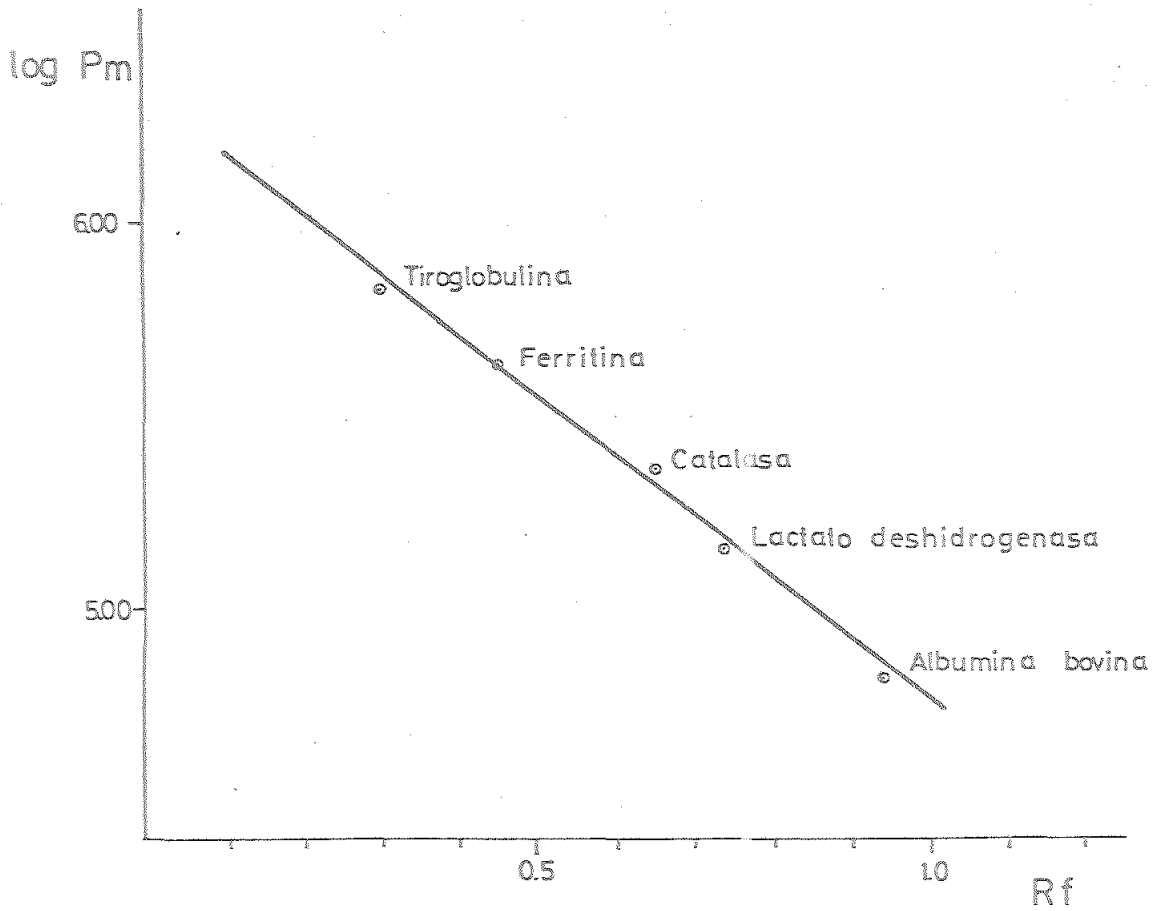


Figura 37: Gradiente de pesos moleculares obtenidos en electroforesis en gel con gradiente de concentración de poliacrilamida.

Tabla IX

PESOS MOLECULARES DE LAS DISTINTAS BANDAS OBTENIDAS EN ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DE CONCENTRACION DE POLIACRILAMIDA

BANDAS	PESOS MOLECULARES			Medios
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	
1	144.235	155.360	144.444	148.013
2	81.476	84.008	79.299	81.594
3	77.689	80.127	75.618	77.811
4	72.204	72.893	66.925	70.674
5	56.913	58.814	54.215	56.647

cho más intensas a las que les corresponden pesos moleculares de 70.674 y 56.647, coincidiendo con los máximos de actividad obtenidos en filtración por gel.

#### IV.7. SISTEMA AIA-OXIDASA/PEROXIDASA Y BIOSÍNTESIS DEL ETILENO

Los trabajos de Ku et al. (1969), y de Mapson y Wardale (1972), sobre formación de etileno a partir del ácido  $\alpha$ -ceto- $\gamma$ -metiltiobutírico (KMB), los más recientes de Konze y Kende (1979), operando con el ACC y las propias consideraciones de Adams y Yang (1979), sobre la posible intervención del  $H_2O_2$  en la ruptura del anillo de ciclopropano, previa a la liberación del etileno, nos indujeron a pensar que el sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa, aislado por nosotros del olivo, fuera activo "in vivo" en el paso ACC  $\rightarrow$  etileno, por reunir todas las características exigidas.

Ello nos movió a realizar las experiencias "in vitro" e "in situ" que se recogen a continuación, con objeto de que pudieran servir de apoyo a esta hipótesis.

IV.7.1. Formación de etileno a partir del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico por el sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo.

La Tabla X recoge los resultados de una experiencia que pone de manifiesto la necesidad del fosfato de piridoxal para que el sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo libere etileno a partir del ACC.

En efecto, cuando se ponen a incubar discos de hojas de olivo con ACC (1mM), se produce una cantidad apreciable de etileno. En cambio, cuando un extracto enzimático de hojas de olivo se induce con ACC, incluso diez veces más concentrado, 10 mM, en las condiciones óptimas encontradas por nosotros para desarrollar su actividad AIA-oxidasa (apart. III.9.), sólo se libera etileno en una proporción muy pequeña.

Este comportamiento, junto con el hecho ya citado, de la intervención del fosfato de piridoxal en el paso SAM  $\rightarrow$  ACC (Adams y Yang, 1979 y Lürssen et al., 1979), permaneciendo la base de Schiff formada, en la interpretación de Lürssen et al., hasta la poste



Tabla X

NECESIDAD DEL FOSFATO DE PRIRIDOXAL EN LA FORMACION DE ETILENO A -  
PARTIR DEL ACC POR EL SISTEMA ENZIMATICO AIA-OXIDASA/PEROXIDASA DE  
HOJAS DE OLIVO

INCUBACION	nmoles etileno/ g peso fresco o mg proteina
Discos de hojas*	773,7
Extracto enzimático**	42,4
Extracto enzimático + fosf. pirid. (0,4 mM)**	845,8

Condiciones de incubación:

\* ACC (1 mM), 3 discos de hojas de olivo (10mm Ø, 60 mg), volumen total de incubación 1 ml; 30°C, oscuridad, 24 horas.

\*\* ACC (10 mM), AIA (0,2 mM), DCP (0,3 mM),  $Mn^{++}$  (0,3 mM), tampón - fosfato (0,02 M, pH 5,7) y extracto enzimático (96,7 µg proteina), volumen total de incubación 5 ml; 30°C, oscuridad, 24 horas.

rior descomposición del ACC, así como, el que el método descrito por Boller et al. (1979), para determinar ACC= en extractos vegetales por una vía química, tiene como primer paso la unión del ACC al fosfato de piridoxal, - nos hicieron suponer que tal vez fuera necesaria la intervención del fosfato de piridoxal para que el sistema enzimático AIA-oxidasa pudiese actuar sobre el ACC y generar etileno.

En la citada Tabla, puede observarse, como la adición de fosfato de piridoxal al medio de incubación, aumenta en 20 veces la producción de etileno.

Una vez demostrada la necesidad del fosfato + de piridoxal, hemos estudiado la influencia de la con--centración del mismo en la velocidad de formación de e--tileno. La Figura 38 que representa los resultados obtenidos muestra que la concentración óptima de fosfato de piridoxal es 0,30 mM.

Por otra parte, hemos estudiado también los - posibles efectos de la presencia del coenzima A, solo o junto con el fosfato de piridoxal, ante la sugerencia - de su intervención en la ruta biosintética del etileno= por Lürssen et al. (1979), pero no hemos observado in--fluencia alguna.

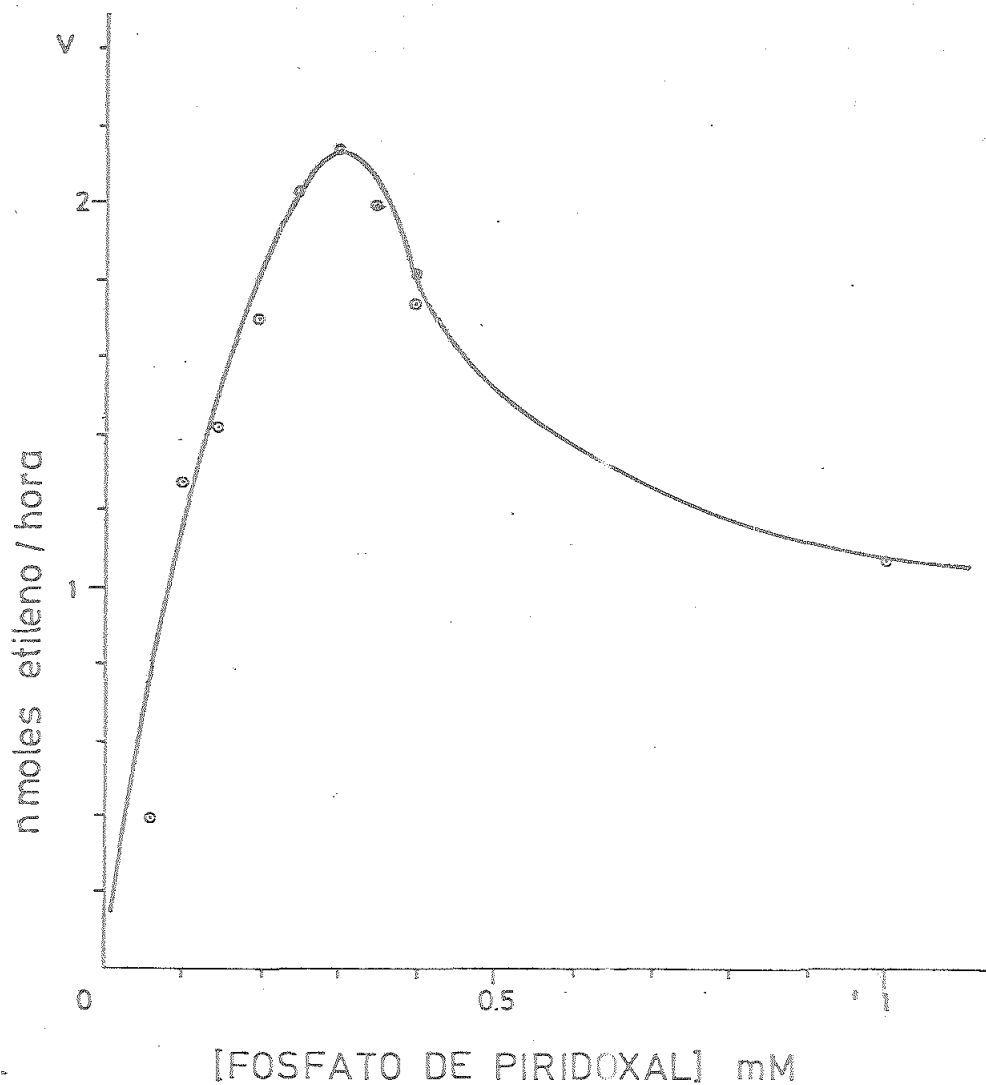


Figura 38: Influencia de la concentración de fosfato de piridoxal en la velocidad de formación de etileno a partir del ACC por el extracto enzimático de hojas de olivo. Condiciones de incubación: - ACC (10 mM), fosfato de piridoxal (0,05 a 1 mM), AIA (0,2 mM), DCP (0,3 mM),  $Mn^{++}$  (0,3 mM), tampón fosfato (0,02 M, pH 5,7) y extracto enzimático (45  $\mu$ g proteína), volumen total de incubación 1 ml;= 30°C, oscuridad, medidas periódicas.

La Tabla XI recoge una serie de experimentos que ponen de manifiesto la intervención del sistema enzimático en la liberación de etileno a partir del ACC.

En la Tabla XI (exp. nº 3 y 4) puede verse, la formación de cierta cantidad detectable de etileno, estando ausentes en la mezcla de incubación el extracto enzimático o el AIA. Este hecho lo explicamos por la posible formación, al estar presentes los iones  $Mn^{++}$ , de un complejo aminoácido-metal+fosfato de piridoxal del tipo descrito por Metzler et al. (1954), que a su vez podría generar etileno por vía no bioquímica. Efectivamente, omitiendo simultáneamente los iones  $Mn^{++}$  en la mezcla de incubación no se detecta formación alguna de etileno (tabla XI, exp. nº 5 y 6).

Por otra parte, la omisión en la mezcla de reacción de uno cualquiera de los cofactores clásicos, DCP o  $Mn^{++}$ , necesarios para el desarrollo de la actividad AIA-oxidasa, anula prácticamente la formación de etileno (tabla XI, exp. nº 7 y 8).

Los ensayos en atmósfera de nitrógeno o con extracto hervido (tabla XI, exp. 9 y 10), muestran una vez más, que se trata de un proceso aerobio y que el sistema enzimático es termolábil.

Tabla XI

FORMACION DE ETILENO A PARTIR DEL ACC POR EL SISTEMA ENZIMATICO +  
AIA-OXIDASA/PEROXIDASA DE HOJAS DE OLIVO

Exp. n°	MEZCLA DE INCUBACION	nmoles etileno/ mg proteina
1	Completa	845,8
2	Sin ACC	0,0
3	Sin extracto enzimático	24,5
4	Sin AIA	18,5
5	Sin extracto enzim. y Mn <sup>++</sup>	0,0
6	Sin AIA y Mn <sup>++</sup>	0,0
7	Sin DCP	9,8
8	Sin Mn <sup>++</sup>	4,2
9	En atmófera de nitrógeno	7,6
10	Extracto enzimático hervido	36,7

Condiciones de incubación:

ACC (10 mM), fosfato de piridoxal (0,4 mM), AIA (0,2 mM), DCP (0,3 mM), Mn<sup>++</sup> (0,3 mM), tampón fosfato (0,02 M, pH 5,7) y extracto enzimático (96,7 µg proteínas), volumen total de incubación 5 ml; 30°C, oscuridad, 24 horas.

Habiendo encontrado que la actividad AIA-oxidasa muestra inhibición por exceso de sustrato (apart. IV.6.4.1.), hemos estudiado el efecto de la concentración de AIA sobre la velocidad de formación de etileno.

Cuando se incubaba ACC con extracto enzimático de hojas de olivo según se indica en Materiales y Métodos (apart. III.16.), con concentraciones crecientes de AIA, entre 0,025 y 1,2 mM, la velocidad de formación de etileno aumenta con las concentraciones crecientes de AIA hasta 0,4 mM, a partir de aquí la producción de etileno disminuye. La Figura 39 recoge los resultados obtenidos.

La Tabla XII recoge los efectos de diversos inhibidores típicos del sistema AIA-oxidasa, en la formación de etileno a partir del ACC. Se incubaba ACC con extracto enzimático según se indica en Materiales y Métodos (apart. III.16.) con distintas cantidades de los inhibidores indicados. La velocidad de formación de etileno en presencia de los inhibidores se representa frente a las concentraciones de inhibidor, deduciéndose gráficamente de estas representaciones las concentraciones de cada inhibidor que producen el 50% de inhibición:

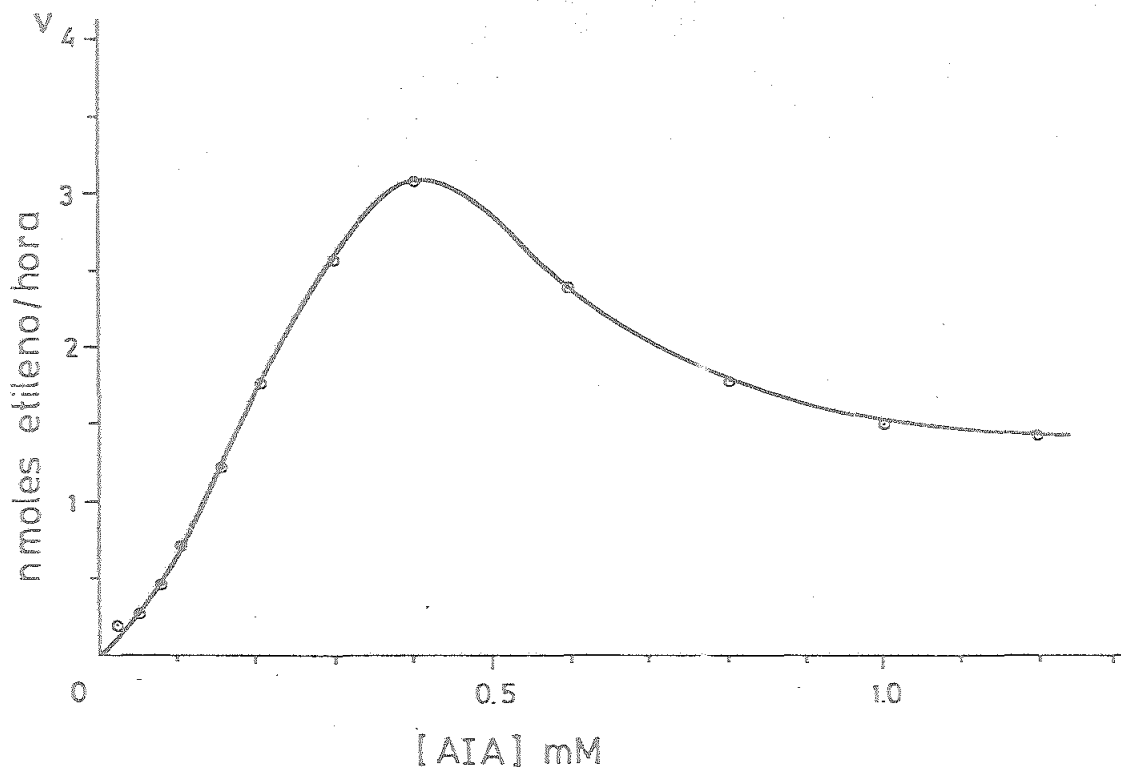


Figura 39: Influencia de la concentración de AIA en la velocidad de formación de etileno a partir del ACC por el extracto enzimático de hojas de olivo. Condiciones de incubación: ACC (10 mM), fosfato de piridoxal (0,3 mM), AIA (0,025 a 1,2 mM), DCP (0,3 mM),  $Mn^{++}$  (0,3 mM), tampón fosfato (0,02 M, pH 5,7) y extracto enzimático (45  $\mu$ g proteína), volumen total de incubación 1 ml; 30°C, oscuridad, medidas periódicas.

Tabla XII

INHIBIDORES DE LA PRODUCCION DE ETILENO A PARTIR DEL ACC "in vitro"

INHIBIDOR	Margen de concentración	Concentración que produce el 50% de inhibición
CoCl <sub>2</sub>	1 $\mu$ M - 50 $\mu$ M	37 $\mu$ M
KCN	10 $\mu$ M - 2 mM	212 $\mu$ M
NaN <sub>3</sub>	0,1 mM - 7 mM	5,9 mM
EDTA	50 $\mu$ M - 250 $\mu$ M	32 $\mu$ M
Catalasa	5 $\mu$ g - 20 $\mu$ g	4,9 $\mu$ g

Condiciones de incubación:

ACC (1 mM), fosfato de piridoxal (0,3 mM), AIA (0,2 mM), DCP (0,3 mM), Mn<sup>++</sup> (0,3 mM), tampón fosfato (0,02 M, pH 5,7), extracto enzimático (57,1  $\mu$ g proteínas) e inhibidor, volumen total de incubación 1 ml; 30°C, oscuridad, medidas periódicas.



IV.7.2. Formación de etileno a partir del ácido 1-amino-  
nociclopropano-1-carboxílico por tejidos de  
olivo

La Tabla XIII muestra como discos de hojas de olivo, incubados con ACC 1 mM, liberan hasta 160 veces más etileno que con agua sola (ACC endógeno), mientras que segmentos de pedúnculos y rodajas de aceitunas (de frutos pequeños, inmaduros) liberan menos etileno.

También recoge la Tabla XIII el efecto que, sobre la liberación de etileno, tienen la ausencia de oxígeno y la inmersión, durante dos minutos, de los discos de hoja en agua hirviendo. Se confirma, una vez más, como el paso ACC  $\rightarrow$  etileno requiere oxígeno y como interviene un sistema enzimático termolábil.

Los discos de hojas de olivo, triturados con agua o un tampón apropiado, pierden su capacidad para liberar etileno a partir del ACC, al igual que encuentran Lürssen et al. (1979), en otros tejidos vegetales. Este fenómeno fue interpretado por estos autores como prueba de que era necesaria la estructura organizada, intacta, de los tejidos para la reacción de la liberación de etileno. Nuestras experiencias con extractos

Tabla XIII

FORMACION DE ETILENO A PARTIR DEL ACC POR TEJIDOS DE OLIVO

MUESTRA	nmoles etileno/ g peso fresco
Discos de hojas + ACC	773,7
Discos de hojas sin ACC exógeno	4,7
Discos de hojas + ACC en atmósfera de nitrógeno	0,0
Discos de hojas hervidos + ACC	0,0
Segmentos de pedúnculos + ACC	73,5
Rodajas de aceitunas + ACC	6,6

Condiciones de incubación:

ACC (1mM), volumen total de incubación 1 ml; 30°C, oscuridad, 24 - horas. Se han utilizado 3 discos de 10 mm Ø (aprox. 60 mg), segmentos de pedúnculos (aprox. 60 mg) o rodajas de aceitunas (aprox. - 60 mg).

parcialmente purificados de hojas de olivo ponen claramente de manifiesto que no es correcta esa interpretación. Nosotros pensamos que, al destruirse las estructuras celulares se ponen en libertad sustancias, especialmente polifenoles, que inhiben la actividad enzimática AIA-oxidasa, como hemos mostrado en el apart. IV.4. y, consecuentemente, cesa la formación de etileno. Esta misma interpretación fue dada por Ku, Yang y Pratt (1969), estudiando la formación de etileno a partir de KMB, por incubación con extractos crudos de tomate.

La Tabla XIV recoge la acción "in situ" de los mismos inhibidores estudiados anteriormente en los ensayos con extractos enzimáticos de hojas de olivo. En este ensayo los inhibidores se han estudiado a una concentración fija (10  $\mu$ M, catalasa 5  $\mu$ g), y se ha llevado a la Tabla la inhibición en %. Puede observarse que también se encuentra inhibición en los ensayos realizados "in situ" por los mismos inhibidores estudiados "in vitro".

Tabla XIV.

INHIBIDORES DE LA PRODUCCION DE ETILENO A PARTIR DEL ACC POR DISCOS DE HOJAS DE OLIVO

---

INHIBIDOR	% inhibición
CoCl <sub>2</sub>	40
KCN	27
NaN <sub>3</sub>	42
EDTA	23
Catalasa	44

---

Condiciones de incubación:

ACC (1 mM), 3 discos de hojas de olivo (10 mm Ø, 60 mg) e inhibidor (10 µM; catalasa 5 µg), volumen total de incubación 1 ml; 30°C, oscuridad, medidas periódicas.

### IV.7.3. Nuestra hipótesis

Los resultados recogidos en los apartados IV.7.1. y IV.7.2., ponen de manifiesto que el sistema AIA--oxidasa, aislado de hojas de olivo y convenientemente purificado, en presencia de su sustrato, AIA, y de los cofactores, DCP y  $Mn^{++}$ , es capaz de liberar etileno a partir del ACC, en presencia de fosfato de piridoxal.

Las características y propiedades fundamentales de este sistema, estudiados por nosotros, corresponden a las atribuidas recientemente (Adams y Yang, 1979; Lürssen et al. 1979; y Konze y Keude, 1979) al enzima --presumiblemente activo en el último paso de la biosíntesis del etileno (ACC  $\rightarrow$  etileno).

Igualmente, el paralelismo existente entre -- las inhibiciones encontradas al estudiar la destrucción del AIA por el sistema AIA-oxidasa del olivo, las encontradas, y recogidas aquí (Tabla XII), en las experiencias "in vitro" de formación de etileno por acción de -- la AIA-oxidasa del olivo sobre el ACC y las, asimismo, -- puestas de manifiesto en los ensayos "in situ" con discos de hojas y ACC (Tabla XIV), apuntan a que este sistema enzimático sea el que actúe "in vivo" en la última

fase de la ruta biosintética del etileno.

Consideramos muy interesante el papel desempeñado por el fosfato de piridoxal, incrementando la liberación de etileno (unas veinte veces). En primer lugar, es una confirmación de la hipótesis, ampliamente sostenida por diversos autores de ser necesaria su intervención en el paso SAM  $\rightarrow$  ACC, para explicar la inhibición producida por la aminoetoxivinilglicina (AVG), típica de reacciones en que toma parte el fosfato de piridoxal, y, especialmente, un apoyo al esquema de Lürssen et al. (1979), quienes suponen que el fosfato de piridoxal permanece unido, como base de Schiff, al ACC hasta su degradación a etileno.

En nuestras experiencias, siguiendo a Boller et al. (1979), hemos hecho reaccionar previamente el ACC con el fosfato de piridoxal, antes de su incubación con el sistema enzimático. También hemos investigado la marcha de la liberación de etileno, agregando simultáneamente el fosfato de piridoxal y el extracto enzimático, observando que, en este caso, la velocidad inicial de formación de etileno es mucho más lenta, si bien, al cabo de 24 h. las cantidades de etileno formadas son, prácticamente iguales.

Sobre el posible mecanismo de la reacción que rompiendo el anillo de ciclopropano, pone en libertad al etileno, arroja luz la inhibición por la catalasa, que hemos encontrado tanto en los ensayos "in vitro" con extracto enzimático, como "in situ" con discos de hojas. Este comportamiento de la catalasa apunta a favor de la hipótesis expuesta por Adams y Yang (1979), que hace intervenir el agua oxigenada, formada previamente por una oxidasa, en la ruptura del anillo de ciclopropano en presencia de una peroxidasa. No cabe duda de que, precisamente, el sistema AIA-oxidasa ha mostrado siempre, ante la perplejidad de los investigadores que de él se han ocupado (Hoyle, 1972), esta dualidad de funciones oxidativa y peroxidativa.

Sin embargo, nosotros nos inclinamos por la intervención, no del agua oxigenada, sino de algún radical peroxídico, análogo a los descritos por Fox et al. (1975), en la degradación oxidativa del AIA por la peroxidasa del rábano (HRP), y a los que también hacen intervenir Mapson y Wardale (1972), interpretando los resultados de sus investigaciones sobre el papel del AIA en la formación de etileno a partir de KMB, por peroxidasa de rábano (HRP).

La intervención del sistema AIA-oxidasa y su sustrato, AIA, en este paso de la biosíntesis del etileno, explicaría, también, el fenómeno plenamente confirmado de un incremento en la producción de etileno por tejidos vegetales, cuando se someten a tratamiento con AIA. Esta producción de etileno, inducida por el AIA, responde positivamente a las concentraciones crecientes de AIA, hasta ciertos valores de estas, a partir de los cuales la producción disminuye, (Lieberman, 1979). Nosotros hemos visto como el AIA produce este efecto en la liberación de etileno a partir del ACC por el extracto enzimático de hojas de olivo. Este comportamiento se corresponde con el hecho, puesto de manifiesto por nosotros y otros autores (Zmrhal y Machácková, 1979), de presentar el sistema AIA-oxidasa inhibición por exceso de sustrato. Este punto de vista no coincide con el expuesto por Yu y Yang (1979), quienes opinan que el AIA ejerce su efecto estimulante sobre la producción de etileno al inducir la síntesis del enzima responsable de la conversión de SAM en ACC.



## V. CONCLUSIONES

1. En la zona de abscisión de la aceituna se ha detectado histoquímicamente la acumulación del sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa.
2. Se ha desarrollado un procedimiento que permite aislar y purificar parcialmente el sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa a partir de pedúnculos y hojas de olivo.
3. Se han estudiado algunas características del sistema enzimático. Merecen destacarse:
  - a) Dualidad de funciones enzimáticas AIA-oxidasa y peroxidasa, incluso a nivel de isoenzimas.
  - b) Termolabilidad.
  - c) Inhibición de la actividad AIA-oxidasa por exceso de sustrato.
  - d) pH óptimo próximo a 6 para ambas actividades enzimáticas.
  - e) Necesidad de los cofactores DCP (Diclorofenol) y  $Mn^{++}$  en la actividad AIA-oxidasa.
  - f) Inhibición de ambas actividades enzimáticas por=

cianuro, azida y EDTA, lo que parece confirmar la presencia de hierro en el sistema enzimático.

4. El sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo, bajo las condiciones óptimas para desarrollar su actividad, es capaz de liberar etileno a partir del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), su inmediato precursor en la ruta biosintética en vegetales superiores, siendo necesaria la presencia del fosfato de piridoxal.
5. Diversos tejidos del olivo, especialmente discos de hojas, son capaces de liberar etileno cuando se incuban con disolución de ACC.
6. En ambos ensayos "in vitro" e "in situ", la liberación de etileno es inhibida por los mismos compuestos que impiden el desarrollo de las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa.
7. Se emite la hipótesis de que el sistema enzimático=AIA-oxidasa/peroxidasa sea activo "in vivo" en el último paso de la ruta biosintética del etileno en los vegetales superiores: ACC → etileno. Esta hipó

tesis explicaría la presencia del sistema enzimático en la zona de abscisión, su dualidad de funciones y la inducción de la formación de etileno en tejidos vegetales por el AIA.

## VI. BIBLIOGRAFIA

- Abeles, F.B. 1966. *Plant Physiol.* 41:585.
- Abeles, F.B. 1968. *Plant Physiol.* 43:1577.
- Abeles, F.B. 1973. "Ethylene in plant biology". Academic Press. -  
New York-San Francisco-London.
- Abeles, F.B. y R.E. Holm. 1966. *Plant Physiol.* 41:1337.
- Adams, D.O. y S.F. Yang. 1977. *Plant Physiol.* 60:892.
- Adams, D.O. y S.F. Yang. 1978. *Plant Physiol. Suppl.* 61:90.
- Adams, D.O. y S.F. Yang. 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:170.
- Addicott, F.T. 1961. "Handbuch der Pflanzenphysiologie" XIV. W. Ruhland (ed). Springer-Verlag. Berlin. Göttingen. Heidelberg, p. 829.
- Addicott, F.T. 1965. "Handbuch der Pflanzenphysiologie" XV/2. -  
W. Ruhland (ed). Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York, p. 1094.
- Addicott, F.T. y R.S. Lynch. 1951. *Science* 114:688
- Addicott, F.T., R.S. Lynch y H.R. Carns. 1955. *Science* 121:644.
- Agarwala, S.C., C.P. Sharma y S. Farooq. 1965. *Plant Physiol.* -  
40:493.
- Anderson, J.D. y M. Lieberman. 1976. *Int. Conf. Plant Growth* -  
Subst, 9th Lausanne. Switzerland, collected abstr., -  
p. 17.
- Andrews, P. 1964. *Biochem. J.* 91:222.
- Baird, L.A.M. y B.D. Webster. 1979. *Hortic. Rev.* 1:172.

- Bangerth, F. 1978. J. Am. Soc. Hort. Sci. 97:781.
- Basu, P.S. y V. Tuli. 1972. Plant Physiol. 50:499.
- Ben-Tal, Y. y S. Lavee. 1976a. Sci. Hort. 4:337.
- Ben-Tal, Y. y S. Lavee. 1976b. HortScience 11:489.
- Ben-Yehoushua, S. y R.H. Biggs. 1970. Plant Physiol. 45:604.
- Biaifi, M.M. y O. Masera. 1973. Rev. Fac. Cienc. Agrar. Univ. Nac. =  
Cuyo. 19:177.
- Boller, Th., R.C. Herner y H. Kende. 1979. Planta 145:293.
- Bonner, J. 1960. Z. Schweiz. Forstv. 30:141.
- Burg, S.P. y E.A. Burg. 1962. Plant Physiol. 37:179.
- Burg, S.P. y E.A. Burg. 1966. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 55:262.
- Carns, H.R. 1966. Ann. Rev. Plant Physiol. 17:295.
- Catalina, L., R. Sarmiento y M. Valpuesta. 1972. An. Edafol. Agro-  
biol. 31:607.
- Clark, W.M. y H.A. Lubs. 1973. "Acid-Base Indicators" I.M. ...  
Kolthoff. Mac Millan Co. (ed). New York. p. 245.
- Coombe, B.G. 1976. Ann. Rev. Plant Physiol. 27:207.
- Coombe, B.G. y C.R. Hale. 1973. Plant Physiol. 51:269.
- DeLeo, P. y J.A. Sacher. 1970. Plant Physiol. 46:208.
- Dixon, M. y E.C. Webb. 1971. "Enzymes" Longman 2ª ed. Lóndon.
- Dolin, M.I. 1957. J. Biol. Chem. 225:557.
- Facey, V. 1950. New Phytol. 49:103.
- Fox, L.R., W.K. Paves y H.I. Nakada. 1968. Biochemistry 4:2754.

- Frenkel, C.H. 1972. *Plant Physiol.* 45:620.
- Frenkel, C.H. 1975a. "Facteurs et Regulation de la Maturation des Fruits", *Colloques Int. C.N.R.S.No 238, Paris 1974*, p. 201.
- Frenkel, C.H. 1975b. *Plant Physiol.* 55:480.
- Frenkel, C.H. y R. Dyck. 1973. *Plant Physiol.* 51:6.
- Frenkel, C.H. y N.F. Haard. 1973. *Plant Physiol.* 52:380.
- Frenkel, C.H., V.R. Haddon y J.M. Smallheer. 1975. *Plant Physiol.* 56:647.
- Fuchs, Y. y M. Lieberman. 1968. *Plant Physiol.* 43:2029.
- Galston, A.W. 1948. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.)*. 35:1017.
- Galston, A.W. y R.S. Baker. 1949. *Am. J. Bot.* 36:773.
- Gaspar, Th., M. Dubucq y R. Antoszewski. 1975. *Biologia Plantarum* 17:23.
- Gaspar, Th., P.L. Pilet y M. Bastin. 1964. *Physiol. Veg.* 2:221.
- Gordon, S.A. y R.P. Weber. 1951. *Plant Physiol.* 26:192.
- Hale, C.R. 1968. *Aust. J. Agr. Res.* 19:939.
- Hale, C.R., B.G. Coombe y J.S. Hawker. 1970. *Plant Physiol.* 45:620.
- Hartmann, H.T., M. El-Hamady y J. Whisler. 1972. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 97:781.
- Hartmann, H.T. y A.J. Heslop. 1968. *Calif. Agr.* 23:14.
- Hartmann, H.T., W.Reed y K. Opitz. 1976. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 101:278.



Hartmann, H.T., W.Reed, J. Whisler y K.W. Opitz. 1975. Calif. Agr. 29:4.

Hellerman, L., A. Lindsay y M.R. Bovernick. 1946. J. Biol. Chem. 163:553.

Horton, R.F. y D.J. Osborne. 1967. Nature (London). 214:1086.

Hoyle, M.C. 1972. Plant Physiol. 50:12.

Hoyle, M.C. 1977. Plant Physiol. 60:787.

Imaseki, H., K. Kondo y A. Watanabe. 1975. Plant Cell Physiol. 16:777.

Jacobs, W.P. 1962. Ann. Rev. Plant Physiol. 13:403.

Jeppsson, J.O., B. Franzén y K.O. Nilsson. 1978. Sci. Tools 25:69.

Jones, J.D. y A.C. Hulme. 1961. Nature 191:370.

Jones, J.D., A.C. Hulme. y L.S.C. Wooltorton. 1963. Phytochem. 3:201.

Kang, B.G., W. Newcomb y S.P. Burg. 1971. Science. 47:504.

Kende, H. y A.D. Hanson. 1977. "Proc. 9th Int. Conf. Plant Growth-Substances, Plant Growth Regulation", P.E.Pilet (ed). Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg. p. 172.

Klepper, L. y R.H. Hageman. 1969. Plant Physiol. 44:110.

Knypl, J.S. y K.M. Chylinska. 1974. Biochem. Physiol. Pflanzen 166:333.

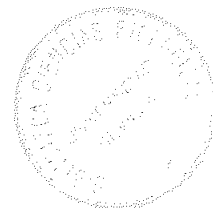
Konze, J.R. y H. Kende. 1979a. Planta. 146:293.

- Konze, J.R. y H.Kende. 1979b. *Plant Physiol.* 63:507.
- Ku, H.S., S.F. Yang y H.K. pratt. 1969. *Phytochem.* 8:567.
- Laibach, F. 1933. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 51:386.
- Larsen, P. 1936. *Planta* 25:311.
- Lau, O.L., W.W. John y S.F. Yang. 1978. *Plant Physiol.* 61:68.
- Lau, O.L. y S.F. Yang. 1973. *Plant Physiol.* 51:1011.
- Lavee, S., G. Barshi y A. Haskal. 1973. *Sci. Hort.* 1:63.
- Lieberman, M. 1979. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30:533.
- Lieberman, M., J.E. Baker y M. Sloger. 1977. *Plant Physiol.* 60:214.
- Lieberman, M. y A.T. Kunishi. 1971. *Plant Physiol. Suppl.* 47:22.
- Lieberman, M. y A.T. Kunishi. 1975. *Plant Physiol.* 55:1074.
- Loomis, W.D. y J. Battaile. 1966. *Phytochem.* 5:423.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. *J. Biol. Chem.* 193:265.
- Lürssen, K., K. Naumann y R. Schröder. 1979. *Z. Pflanzenphysiol.* 92:285.
- MacDonald, I.R. y R.J. Ellis. 1969. *Nature* 222:791.
- Macnicol, P.K. 1973. *Phytochem.* 12:1269.
- Machácková, I., K. Ganceva y Z. Zmrhal. 1975. *Phytochem.* 14:1251.
- Mapson, L.W. y D.A. Wardale. 1972. *Phytochem.* 11:1371.
- Marei, N. y J.C. Crane. 1971. *Plant Physiol.* 48:249.
- McCown, B.H., G.E. Beck y T.C. Hall. 1968. *Plant Physiol.* 43:578.

- McGlasson, W.B., H.C. Dostal y E.C. Tigchelaar. 1975. *Plant Physiology*. 55:218.
- Metzler, D.E., M. Ikawa y E.E. Snell. 1954. *J. Am. Chem. Soc.* 76:648.
- Meudt, W.J. 1967. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 144:118.
- Meudt, W.J. 1971. *Phytochem.* 10:2103.
- Michener, H.D. 1938. *Am. J. Bot.* 25:711.
- Morgan, P.W. y J.I. Durham. 1972. *Plant Physiol.* 50:313.
- Morgan, P.W. y W.C. Hall. 1962. *Physiol. Plant* 15:420.
- Morgan, P.W. y W.C. Hall. 1964. *Nature*. 201:91.
- Morré, D.J. 1968. *Plant Physiol.* 43:1543.
- Mudd, J.B., B.G. Johnson, R.H. Burris y K.P. Buchholtz. 1959. *Plant Physiol.* 34:144.
- Murphy, M.J. y C. O'hEocha. 1973a. *Phytochem.* 12:55.
- Murphy, M.J. y C. O'hEocha. 1973b. *Phytochem.* 12:61.
- Murphy, M.J. y C. O'hEocha. 1973c. *Phytochem.* 12:2645.
- Osborne, D.J. 1968. "Biochemistry and Physiology of Plant Growth-Substances". F.Wightman y G.Setterfield (ed). Runge - Press, Ottawa.
- O'Sullivan, M., M.J. Flynn y F.J. Codd. 1969. *Ir. J. Agric. Res.* 8:111.
- Overbeek, J. van. 1961. "Handbuch der Pflanzenphysiologie". XIV.= W.Rüchland (ed). Springer-Verlag. Berlin. Göttingen. - Heidelberg, p. 1137.

- Pilet, P.E. 1964. *Comp. Rend. Acad. Sc. Paris.* 259:1183.
- Pilet, P.E. y P. Lavanchy. 1969. *Physiol. Veg.* 7:19.
- Poovalah, B.W. y H.P. Rasmussen. 1973. *Plant Physiol.* 52:263.
- Poovalah, B.W., H.P. Rasmussen y M.J. Bukovac. 1973. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 98:16.
- Rasmussen, H.P. 1965. PhD Thesis, Michigan State Univ., East Lansing.
- Ray, P.M. 1956. *Arch. Biochem. Biophys.* 64:193.
- Reed, N.R. y H.T. Hartmann. 1976. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 101:633.
- Ridge, I. y D.J. Osborne. 1970a. *J. Expt. Bot.* 21:720.
- Ridge, I. y D.J. Osborne. 1970b. *J. Expt. Bot.* 21:843.
- Rubinstein, R. y A.C. Leopold. 1964. *Quart. Rev. Biol.* 39:356.
- Sacher, J. 1963. *Am. J. Bot.* 50:116.
- Sakai, S. y H. Imaseki. 1971. *Plant Cell Physiol.* 12:349.
- Schneider, E.A. y F. Wighman. 1974. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:487.
- Schrauwen, J. 1966. *J. Chromatog.* 23:180.
- Schwertner, H.A. y P.W. Morgan. 1966. *Plant Physiol.* 41:1513.
- Sequeira, L. e I. Mineo. 1966. *Plant Physiol.* 41:1200.
- Siegel, B.Z. y A.W. Galston. 1967. *Science* 157:1557.
- Sörensen, S.P.L. 1937. "Acid-Base Indicators". I.M. Kolthoff. MacMillan Co. (ed). New York. p. 249.
- Stewart, R.N., M. Lieberman y A.T. Kunishi. 1974. *Plant Physiol.* 54:1.

- Stonier, T. y H.M. Yang. 1973. *Plant Physiol.* 51:391.
- Stösser, R., H.P. Rasmussen y M.J. Bukovac. 1969. *Planta* 86:151.
- Stösser, R., H.P. Rasmussen y M.J. Bukovac. 1971. *Z. Pflanzenphysiologie* 64:382.
- Stutz, R.E. 1957. *Plant Physiol.* 32:31.
- Tang, T.W. y J. Bonner. 1948. *Am. J. Bot.* 35:570.
- Ulmer, R.L., F.A. Haskins y W.R. Akeson. 1971. *Crop Sci.* 11:816.
- Valdovinos, J.G. y T.E. Jensen. 1968. *Planta* 83:295.
- Valdovinos, J.G., T.E. Jensen y L.M. Sickb. 1973. *Planta* 102:324.
- Vendrell, M. 1969. *Aust. J. Biol. Sci.* 22:601.
- Vioque, A. y M.A. Albi. 1975. *Grasas y Aceites* 26:73.
- Vioque, A. y M<sup>a</sup> P. Villagrán. 1956. *Microchim. Acta*:804.
- Walpole, G.S. 1937. "Acid-Base Indicators". I.M. Kolthoff. Mac Millan Co. (ed). New York. p. 256.
- Webster, B.D. 1968. *Plant Physiol.* 43:1512.
- Yang, S.F. 1974. "The Chemistry and Biochemistry of Plant Hormones". Academic Press. New York-San Francisco-London.
- Yu, YB. y S.F. Yang. 1979. *Plant Physiol.* 64:1074.
- Zimmerman, P.W. y F. Wilcoxon. 1935. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 7:209.
- Zmrhal, Z. e I. Machácková. 1979. *Phytochem.* 17:1517.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de <sup>ca</sup> Blanca Proque Cuervo titulada "Aportaciones al conocimiento del proceso de abscisión de la acitima", acordó otorgarle la calificación de Calificada con laude

Sevilla, 18 de Febrero 1981

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

Presidente,

El Secretario,

El Doctorado,



500272271

FBI F 79-002

292271