

Peroxidasas y formación de etileno en hojas de olivo

B. Vioque*, J. C. Fernández-Maculet, M. A. Albi, J. M. Castellano y A. Vioque

Departamento de Fisiología y Tecnología Postrecolección
Instituto de la Grasa y sus Derivados
41012 - Sevilla (España)

(Recibido el 6 de junio de 1988)

B. VIOQUE, J. C. FERNANDEZ-MACULET, M. A. ALBI, J. M. CASTELLANO and A. VIOQUE. *Peroxidases and Ethylene Formation in Olive Tree Leaves*. Rev. esp. Fisiol., 45 (1), 47-52, 1989.

The loss of intercellular peroxidases from olive tree leaf sections subjected to isoelectric focusing correlates well with the capacity of the referred sections to convert 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) into ethylene. Both activities are compared in leaves of different ages (according to their position on the branch) and it is found that they follow a parallel course. The inhibition of the capacity to convert ACC into ethylene in homogenized olive tree leaves is due to inhibitors release. The results, in relation to other authors' reports, are discussed.

Key words: *Olea europaea* L., 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid, Ethylene, Peroxidases.

El etileno regula muchos aspectos del crecimiento, desarrollo y senescencia de las plantas (1). En vegetales superiores es sintetizado a partir de la metionina: Met^{**} → SAM → ACC → etileno (23). La mayor parte de los tejidos vegetales convierten el ACC en etileno, pero hasta ahora no se ha aislado ningún enzima que tenga todas las propiedades de la actividad formadora de etileno *in vivo*, existiendo una gran laguna en el conocimiento de este último paso. En los últimos años se han des-

crito varios sistemas *in vitro* que transforman el ACC en etileno (5, 9, 11, 15, 20, 21), pero no hay hasta ahora evidencias de que alguno de ellos actúe realmente *in vivo*.

Durante muchos años el papel de las peroxidasas en la conversión ACC → etileno ha atraído considerablemente la atención (6), en especial por su relación con el sistema AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo. No obstante, los resultados presentados hasta ahora son poco claros.

Por otra parte, el hecho de que la homogeneización de tejidos que producen etileno lleve al cese de su producción, se ha interpretado como prueba de que el EFE requiere integridad de membranas (23). Posteriormente, BOROCHOV y ADAM (4) han demostrado que esta reacción en

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

** *Abreviaturas:* IEF, isoelectroenfoque; ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; SAM, S-adenosilmetionina; AIA, ácido indolacético; EFE, enzima formador de etileno; DNP, dinitrofenol.

plantas es independiente de la integridad celular o de las membranas.

En el presente trabajo se compara la actividad peroxidasa con la capacidad para transformar el ACC en etileno en hojas de olivo y se presentan resultados que confirman que la inhibición del EFE en tejidos homogeneizados es debida a la liberación de inhibidores.

Material y Métodos

Se han utilizado hojas de *Olea europaea* L. cv. *Picual*, de árboles de unos 13 años de edad, cortadas en discos de 4 mm de diámetro. Se incuban 5 discos (aproximadamente 35 mg) con 1 ml de ACC 1 mM en la oscuridad a 30° C con agitación, en viales de 11 ml cerrados con tapones de caucho. A los tiempos indicados en cada caso se toma una muestra de 1 ml del espacio de cabeza para determinar etileno en un cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard 5890A, equipado con columna de alúmina y detector de ionización de llama.

La actividad peroxidasa *in vivo* se determina por incubación de 1 disco con 200 μ l de guayacol al 1 %, 200 μ l de H₂O₂ 30 mM y tampón fosfato 2 mM (pH 6,1) hasta un volumen total de 2,5 ml. Se agita durante 15 min a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 420 nm, en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8450A.

Obtención del extrato crudo de hojas de olivo. — 25 g de hojas de olivo, lavadas y secas, se trituran con 125 ml de tampón fosfato 20 mM pH 6,1 en un Omni-Mixer. El homogenado se filtra por gasa cuádruple y se centrifuga a 23.300 g durante 30 min. El extracto crudo es el sobrenadante resultante.

Isoelectroenfoque de secciones de hojas de olivo. — El procedimiento seguido en la infiltración de las secciones, condiciones del IEF y posterior tinción de las peroxi-

dasas sobre el gel de poliacrilamida son los descritos por VIOQUE *et al.* (22).

Secciones de hojas de olivo sin infiltrar, infiltradas bajo vacío con agua e infiltradas bajo vacío con solución acuosa de KCl 100 mM se someten a IEF. Transcurridos 30 min se retiran los tejidos del gel, se incuban con 1 ml de ACC 1 mM y se determina el etileno liberado tras 24 h. El IEF continúa 1 h más, se tiñen las peroxidases, se corta el gel en tiras de 115 $\times$ 15 mm y se determina la D.O. por transmisión utilizando un densitómetro/absorciómetro Joyce Loebl modelo Chromoscan, provisto de una rejilla vertical (10 $\times$ 0,5 mm) en el emisor y de un filtro 3 D.O. en el receptor.

Resultados

En la fig. 1 se recogen los perfiles de absorbancia por transmisión de las peroxidases intercelulares extraídas de las secciones de hojas de olivo durante el IEF. Los tejidos sin infiltrar (fig. 1A) casi no liberan peroxidases en comparación con los tejidos infiltrados. La infiltración bajo vacío con solución acuosa de KCl 100 mM (fig. 1C) libera mayor cantidad de peroxidases que la infiltración con agua (fig. 1B). Las secciones de tejidos correspondientes a los tres tratamientos se incuban con ACC 1 mM tras el IEF, determinándose el etileno liberado después de 24 h. En la fig. 2 se representan las áreas de los perfiles de absorbancia de las peroxidases extraídas en el IEF frente al etileno liberado por los tejidos sometidos a los tres tratamientos. Los valores son media de dos ensayos con tres replicados para cada tratamiento. Se pone de manifiesto que la salida de peroxidases de los espacios intercelulares de los tejidos disminuye la liberación de etileno por dichos tejidos, existiendo una buena correlación ($r = -0,9958$).

Hojas de olivo de distinta edad tienen distinta capacidad para transformar ACC en etileno. Se han determinado las activi-

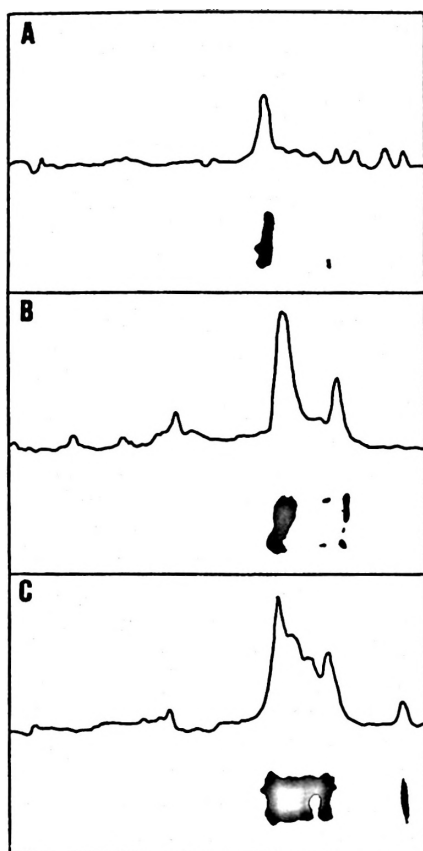


Fig. 1. Detección de peroxidadas intercelulares por IEF directo de secciones de hojas de olivo sometidas a diferentes tratamientos.

(A) no infiltradas, (B) infiltradas bajo vacío con agua, (C) infiltradas bajo vacío con KCl 100 mM.

dades peroxidasa y formadora de etileno *in vivo* en hojas de distinta edad según su posición en el ramillete. Para cada tipo de hoja se ha determinado el etileno con 5 viales replicados con 5 discos/vial y la actividad peroxidasa con 15 viales replicados con 1 disco/vial. En la fig. 3A se presentan los valores medios obtenidos para ambas actividades frente a la posición de la hoja en el ramillete. El experimento se ha repetido cuatro veces con similares resultados. En la fig. 3A puede observarse que ambas actividades siguen un curso para-

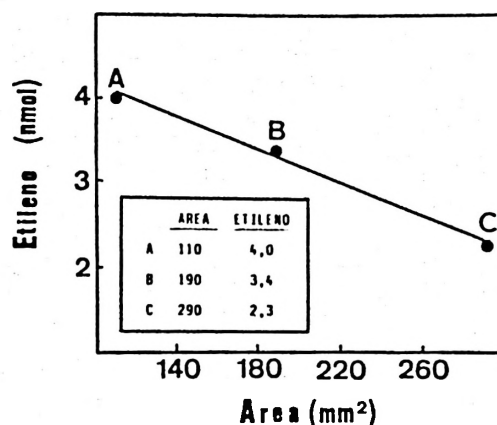


Fig. 2. Relación entre las peroxidadas intercelulares y el etileno liberado por secciones de hojas de olivo sometidas a IEF tras distintos tratamientos. (A) no infiltradas, (B) infiltradas bajo vacío con agua, (C) infiltradas bajo vacío con KCl 100 mM.

lelo, de forma que si se representa la actividad formadora de etileno frente a la actividad peroxidasa, se obtiene una relación lineal (fig. 3B).

Cuando se trituran hojas de olivo, cesa la producción de etileno (21). Para comprobar si esto es debido a una pérdida de la integridad de las membranas o a la liberación de inhibidores, se añaden distintas cantidades (0,5 y 0,9 ml) de extracto crudo de hojas de olivo al medio de incubación de discos enteros (tabla I). La formación de etileno se reduce al 32 y 6 % del control. El extracto crudo se pasa por una columna de Sephadex G-25 y se separa la fracción de alto Pm (excluida) de la de bajo Pm (retenida). Se añaden ambas fracciones (equivalentes a 0,9 ml de extracto crudo) por separado al medio de incubación de discos. Cuando se añade la fracción de alto Pm, no hay pérdida de actividad, 108 %; en cambio, al añadir la fracción de bajo Pm, la actividad se reduce al 4 %, del mismo orden que la obtenida con extracto crudo (tabla I). Estos resultados ponen de manifiesto la existencia en el extracto crudo de inhibidores de bajo Pm que son los responsables de la pérdida

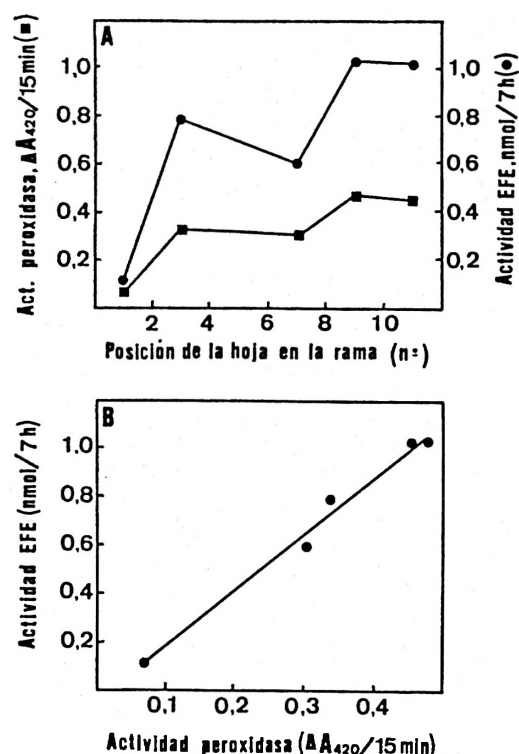


Fig. 3. Actividades peroxidasa y formadora de etileno (EFE) de hojas de olivo situadas en diferentes posiciones en la rama.

La posición 1 corresponde al extremo de la misma.

Tabla I. Formación de etileno por incubación de ACC 1 mM con discos de hojas de olivo bajo diferentes condiciones.

Las fracciones de alto Pm (excluida) y de bajo Pm (retenida) del extracto crudo se obtienen por cromatografía en columna (Sephadex G-25).

Incubación	Etileno/24 h	
	nmol	%
Extracto crudo	—	—
Discos	2,76	100
+ 0,5 ml extracto crudo	0,87	32
+ 0,9 ml extracto crudo	0,17	6
+ 0,9 ml fracción excluida	2,97	108
+ 0,9 ml fracción retenida	0,11	4

de actividad formadora de etileno en tejidos de olivo homogeneizados.

Discusión

Las peroxididas han sido relacionadas con la biosíntesis de etileno debido a algunas características de la misma: necesidad de oxígeno, participación de radicales libres (12) o incluso participación de peróxido de hidrógeno (2).

Tras el descubrimiento del ACC como inmediato precursor del etileno, varios equipos de investigadores han intentado confirmar la participación de las peroxididas en este último paso y, aunque los datos aportados no sean concluyentes, las pruebas en apoyo de esta hipótesis son cada vez mayores. VIOQUE *et al.* (21) obtuvieron un extracto de hojas de olivo con actividad AIA-oxidasa y peroxidasa que transforma el ACC en etileno en presencia de Mn^{++} y varios cofactores. SHIMOKAWA (19) también purificó un enzima a partir de frutos de *Citrus unshiu* que presentaba iguales propiedades. Otros autores (14, 17) estudiaron separadamente el papel de las peroxididas en este paso usando peroxidasa purificada de trigo y guisante. Concluyeron que si bien el ACC no se convierte en etileno directamente por una peroxidasa, no se puede excluir que estén de alguna manera implicadas en el proceso, suministrando radicales libres o alguna forma activada de oxígeno. FRENKEL y MUKAI (7) estudiaron el efecto del AIA y de un inhibidor de la AIA-oxidasa en la producción de etileno a partir de ACC en ensayos *in vivo* e *in vitro*. El AIA estimuló la producción de etileno, que se vio restringida por un inhibidor de la AIA-oxidasa, por lo que esta actividad podría controlar la liberación de etileno regulando los niveles de auxina. La evolución de los mono- y difenoles durante la maduración de la pera *Passe-crassane* podría regular la biosíntesis de etileno gracias a sus acciones contrapuestas sobre la actividad

AIA-oxidasa (3). El hecho de que la actividad AIA-oxidasa se vea estimulada en presencia de ACC podría indicar que la síntesis de ACC y su interacción con la AIA-oxidasa puede ser un importante sistema regulador en el desarrollo vegetal (16). Recientemente GASPAS *et al.* (8) presentaron una secuencia de reacciones que relacionan auxina y etileno, con las peroxidasas básicas como responsables de la conversión $\text{ACC} \rightarrow$ etileno y la participación del Mn^{++} , hipótesis apoyada por BOYER y DE JAEGER (6) que propusieron una intervención de las peroxidasas y el manganeso en el paso $\text{ACC} \rightarrow$ etileno para explicar la «thigmomorfogénesis» de *Bryonia dioica* Jacq.

Los resultados aquí presentados, que relacionan las actividades peroxidasa y formadora de etileno *in vivo* apoyan la posibilidad de una implicación de aquella en la conversión $\text{ACC} \rightarrow$ etileno. El hecho de que no se haya aislado, hasta ahora, ningún enzima que tenga todas las propiedades del EFE nativo, hace suponer que este paso no sea tan simple y que en él puedan intervenir varios enzimas relacionados entre sí.

Durante mucho tiempo se ha pensado que el último paso de la biosíntesis del etileno *in vivo* podría estar asociado a membranas, ya que es inhibido por compuestos lipofílicos, DNP y, en general, por sustancias que alteran la estructura de las membranas (23); además, esta reacción cesa al homogeneizar los tejidos vegetales (13). No obstante, existen evidencias de que no es necesaria una integridad de las membranas. Así lo concluyeron BOROCHOV y ADAM (4) en estudios con pétalos de clavel; la inhibición por DNP tiene lugar por interacción directa con el enzima, no con los lípidos estructurales, invalidando de esta forma el modelo de membranas propuesto por JOHN (10).

La liberación de inhibidores de bajo Pm durante la homogeneización de los tejidos puede explicar fácilmente el hecho de que todos los tratamientos que supongan des-

trucción del sistema de membranas de la célula inhiban la biosíntesis de etileno, sin que necesariamente el EFE esté asociado a membranas. Además, hay que tener en cuenta que los resultados obtenidos en ensayos *in vivo* con compuestos lipofílicos, choque osmótico, DNP, etc. son limitados debido a la poca especificidad de los sistemas y a las altas concentraciones requeridas para promover su efecto (18).

Resumen

Se comparan la actividad peroxidasa con la capacidad para transformar el ACC en etileno, en tejidos sometidos a isoelectroenfoque tras distintos tratamientos y en tejidos de diferente edad, encontrándose una relación lineal. La inhibición de la capacidad para convertir el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico en etileno en hojas de olivo homogeneizadas se debe a la liberación de inhibidores de bajo Pm.

Palabras clave: *Olea europaea* L., Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, Etileno, Peroxidasas.

Bibliografía

1. Abeles, F. B.: Ethylene in plant biology. Academic Press, Londres, 1973, pp. 103-196.
2. Adams, D. O. y Yang, S. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 170-174, 1979.
3. Billot, J.: *Physiol. Vég.*, 21, 527-535, 1983.
4. Borochoy, A. y Adam, Z.: *FEBS*, 173, 139-141, 1984.
5. Bousquet, J. F. y Thimann, K. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 1.724-1.727, 1984.
6. Boyer, N. y De Jaeger, G.: En «Molecular and physiological aspects of plant peroxidases» (Greppin, H., Penel, C. y Gaspar, T., ed.). University of Geneva, Ginebra, 1986, pp. 47-60.
7. Frenkel, C. y Mukai, M. K.: En «Ethylene: Biochemical, physiological and applied aspects» (Fuchs, Y. y Chalutz, E., ed.). Nijhoff, M. y Junk, W. Publishers, La Haya, 1984, pp. 303-316.
8. Gaspar, T., Penel, C., Castillo, F. J. y Greppin, H.: *Physiol. Plant.*, 64, 418-423, 1985.
9. Guy, M. y Kende, M.: *Planta*, 160, 281-287, 1984.

10. John, P.: *FEBS Letters*, 152, 141-143, 1983.
11. Konze, J. R. y Kende, H.: *Planta*, 146, 293-301, 1979.
12. Lieberman, M.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 30, 533-591, 1979.
13. Lürssen, K., Naumann, K. y Schröder, R.: *Z. Pflanzenphysiol.*, 92, 285-294, 1979.
14. Macháčeková, I. y Zmrhal, Z.: *Physiol. Plant.*, 53, 479-482, 1981.
15. Mayak, S., Legge, R. L. y Thompson, J. E.: *Planta*, 153, 49-56, 1981.
16. Mussell, H.: *Phyton*, 45, 55-60, 1985.
17. Rohwer, F. y Mäder, M.: *Z. Pflanzenphysiol.*, 104, 363-372, 1981.
18. Smith, A. R. y Hall, M. A.: En "The biosynthesis and metabolism of plant hormones" (Crozier, A. y Hillman, J. R., ed.). Cambridge University Press, Cambridge, 1984, pp. 201-229.
19. Shimokawa, K.: *Phytochemistry*, 22, 1903-1908, 1983.
20. Vinkler, C. y Apelbaum, A.: *FEBS Letters*, 162, 252-256, 1983.
21. Vioque, A., Albi, M. A. y Vioque, B.: *Phytochemistry*, 20, 1473-1475, 1981.
22. Vioque, B., López, A., Castellano, J. M., Albi, M. A. y Vioque, A.: *Electrophoresis*, 7, 392-393, 1986.
23. Yang, S.F. y Hoffmann, N. E.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35, 155-189, 1984.