

UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA

ESTUDIO DEL POLIMORFISMO ISOENZIMÁTICO EN EL PIMIENTO
DE PADRON, *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, A LO LARGO DEL
DESARROLLO

TESIS DOCTORAL

M^ª DE LOS ANGELES BERNAL PITA DA VEIGA

ABRIL, 1993

T.UDC 61

UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA

ESTUDIO DEL POLIMORFISMO ISOENZIMATICO EN EL PIMIENTO
DE PADRON, *Capsicum annum* L. var. *annuum*, A LO LARGO DEL
DESARROLLO

TESIS DOCTORAL

M^a DE LOS ANGELES BERNAL PITA DA VEIGA

ABRIL, 1993

UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA
FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DEL POLIMORFISMO ISOENZIMATICO EN EL PIMIENTO
DE PADRON, *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, A LO LARGO DEL
DESARROLLO

MEMORIA PRESENTADA PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR EN BIOLOGIA

M^a DE LOS ANGELES BERNAL PITA DA VEIGA

ABRIL, 1993

D. EDUARDO GONZALEZ GURRIARAN, PROFESOR TITULAR Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL Y BIOLOGIA VEGETAL DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA

CERTIFICA:

que la memoria titulada "Estudio del polimorfismo isoenzimático en el pimiento de Padrón, *Capsicum annum* L. var. *annuum*, a lo largo del desarrollo", presentada por la Lcda. M^a de los ANGELES BERNAL PITA DA VEIGA para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada en su totalidad en el Departamento de Biología Animal y Biología Vegetal de la Universidad de La Coruña.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en La Coruña, a 24 de Febrero de mil novecientos noventa y tres.

E. González Gurriarán



Fdo. : Eduardo González Gurriarán.

Dña. FUENCISLA MERINO DE CACERES, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL Y BIOLOGIA VEGETAL DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA

CERTIFICA:

que la memoria titulada "Estudio del polimorfismo isoenzimático en el pimiento de Padrón, *Capsicum annuum* L. var. *annuum* a lo largo del desarrollo", presentada por la Lcda. M^a de los ANGELES BERNAL PITA DA VEIGA ha sido realizada en su totalidad en el Departamento de Biología Animal y Biología Vegetal de la Universidad de La Coruña bajo mi dirección, y cumple las condiciones exigidas para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Y para que así conste, firmo la presente certificación en La Coruña, a 24 de Febrero de mil novecientos noventa y tres.



Fdo. : Fuencisla Merino de Cáceres.

La firmante de esta Memoria ha disfrutado durante su realización de una Beca Predoctoral de la Xunta de Galicia.

La Coruña, 25 de Febrero de 1993.

Fdo.: M^a de los Angeles Bernal Pita da Veiga.

Resultados parciales de la presente Memoria han sido incluidos en los siguientes artículos de investigación:

- MERINO DE CACERES, F y BERNAL A. 1992. Estudio de la variabilidad isoenzimática en distintas poblaciones de pimiento de Padrón *Capsicum annuum* L. var. *annuum*. *Nova Acta Cient. Compos.* 3. En prensa.

- BERNAL, A., CALDERON, A.A., PEDREÑO, A., MUÑOZ, R., ROS BARCELO, A. y MERINO DE CACERES, F. 1993. Dyhydrocapsaicin oxidation by *Capsicum annuum* (var. *annuum*) peroxidase. *J. Food Sci.* En prensa.

- BERNAL, A., CALDERON, A.A., PEDREÑO, A., MUÑOZ, R., ROS BARCELO, A. Y MERINO DE CACERES, F. 1993. The subcellular localization of isoperoxidases in *Capsicum annuum* L. leaves and their different expression in vegetative and flowered plants. *Ann. Bot.* En Prensa.

Agradecimientos

Curiosamente, esta puede ser una de las partes de una tesis más complicada de escribir, ya que a menudo las palabras se quedan cortas y no llegan a reflejar lo que se esconde debajo de cada una de las experiencias. En todo este tiempo, he contado con el apoyo de mucha gente, y es más que probable que alguien se me olvide.

Quiero comenzar, expresando mi más sincero agradecimiento a la Dra. Fuencisla Merino de Cáceres, Directora de esta memoria, sin cuyo constante apoyo y tenacidad no se llevaría a cabo el presente trabajo.

A la Dra. Esperanza Cerdán Villanueva y a la Dra. Josefina Méndez Felpeto, por la ayuda inestimable que de ellas recibí en todo momento.

A Maribel, compañera de fatigas en la cámara oscura, a la cual debo agradecer su amistad y compañerismo. Como también, a Andrés y José por sus horas intentando hacerme entender los entresijos del ordenador.

Al Dr. Alfonso Ros Barceló y todo su equipo (Mari Angeles, Calderón, A.A., Angeles, José Miguel, Romi), por su hospitalidad y generosidad, y por toda la ayuda desinteresada que me han prestado.

A la Dra. Paca Sevilla, Pepe y Marisol, del CEBAS de Murcia, por la ayuda prestada para la realización de este trabajo.

A mis amigos María, Aida y Juanjo por haberme soportado durante todos estos años, lo cual tiene su mérito.

A mis compañeros de esta Facultad, por los que siempre me he sentido apoyada.

Y muy especialmente, a la persona que siempre ha estado a mi lado y ha depositado en mi una confianza de la que a veces, no me he sentido merecedora.

A todos ellos, gracias.

A Mina y Lolo.

Abreviaturas.	2
Introducción. El Pimiento.	3
Capítulo I.- Estudio de la variabilidad enzimática en el pimiento de Padrón.	11
Capítulo II.- Localización subcelular de diferentes sistemas enzimáticos en el pimiento de Padrón.	47
Capítulo III.- Estudio de la diferente localización subcelular de las peroxidasas y su variación con el desarrollo.	90
Capítulo IV.- Metabolismo oxidativo de la capsicina y la dihidrocapsicina por peroxidasas de rábano y de pimiento.	163
Conclusiones.	194
Bibliografía.	197
Apéndice.	219

Ai	absorbancia a i nm
AIA	ácido indol-3-acético
BSA	seroalbúmina bovina
EDTA	ácido etilén-diamín-N,N,N',N'-tetracético
G6PDH	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
HEPES	ácido N-2-hidroxiethylpiperazín-N'-2-etanosulfónico
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
IDH	isocitrato deshidrogenasa
MES	ácido 2 -(N-morfolino) etanosulfónico
4MN	4-metoxi- α -naftol
MOPS	ácido morfolino propanosulfónico
MTT	bromuro de 3 -(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NADP ⁺	B-nicotinamín-adenín-dinucleótido-fosfato
NBT	nitroazul de tetrazolio
PMS	metosulfato de fenacina
PVP-P	polivinil polipirrolidona
PVP-40	polivinil pirrolidona
Tris	tris (hidroximetil)-aminometano

INTRODUCCION

El pimiento

El pimiento es una planta cultivada que se ha extendido por todo el mundo desde su lugar de origen en la zona central de Sudamérica (McLeod y col., 1983). Muchos países, entre ellos España, lo incluyen en sus programas de cultivo y ha llegado a tener una considerable importancia económica equiparable por ejemplo, a la del tomate.

Según Rico (1983), en el pimiento crudo se encuentran en proporciones variables todas las sustancias nutritivas necesarias: proteínas, sales, vitaminas, grasas, azúcares y sustancias colorantes y aromáticas. El agua contenida en el fruto fresco tiene un notable interés biológico. Las semillas poseen grasa y en la pulpa se encuentran azúcares, mientras que las células del epicarpio contienen aceites esenciales que dan al fruto su aroma característico. También coincide en señalar que el valor alimenticio del pimiento se debe a su contenido en vitaminas C y A, esta última como provitamina en los frutos que contienen carotenoides.

Según D'Arcy y Eshbaugh (1974) *Capsicum annuum* L. var. *annuum* es una planta anual herbácea, con sistema radicular pivotante y profundo, provisto de numerosas raíces adventicias. El tallo es de crecimiento limitado y erecto, con un tamaño medio que puede variar entre 0,5 y 1,5 m. Las hojas son lampiñas, enteras, ovales o lanceoladas con un ápice muy pronunciado (acuminado) y un peciolo largo. Las flores son solitarias, raramente en pares, con ausencia de constricción prominente entre la base del cáliz y el pedicelo observándose mejor en el fruto; el cáliz no presenta dientes o son rudimentarios; la corola es blanca, raras veces violeta; las anteras, en número de 5, son generalmente azules a violetas con filamentos cortos.

El fruto es una baya semicartilaginosa de color verde (inmaduro) y rojo o naranja en estado de madurez; colgante, raras veces erecto, con talla y forma variable. Las semillas son redondeadas y ligeramente reniformes, suelen tener 3-5 mm de longitud; se insertan en la placenta cónica de disposición central, y son de un color amarillo pálido. En 1 gr. puede haber 150 - 200 semillas y su poder germinativo dura de tres a cuatro años.

El pimiento es un cultivo de clima cálido, exigente en calor, situándose por encima del tomate y algo menos que la berenjena. Para su desarrollo óptimo y producción, se estiman necesarias temperaturas diurnas entre 20 - 25°C y nocturnas entre 16 - 18°C. Las necesidades de temperatura del pimiento son crecientes a medida que se desarrolla. No le favorecen los cambios bruscos entre la noche y el día, por ello las zonas de menor variación térmica (zonas costeras, reguladas por la proximidad del mar) favorecen, en general, los contenidos de bioelementos de la planta, lo que se traduce en un mejor desarrollo, pero la calidad del fruto es inferior a la obtenida en zonas de mayor variación térmica anual (Zapata y col., 1991).

La semilla no germina por debajo de 13°C ni por encima de 37°C, consiguiéndose el máximo porcentaje de germinación entre 20° y 30°C. Resulta muy interesante que durante el período de germinación y desarrollo de la plántula la temperatura no baje de 18°C, pues parece que este hecho tiene influencia en la futura producción (Rico, 1983).

Igualmente es exigente en humedad ambiental, con requerimientos del orden del 50-70%, especialmente durante la floración y cuajado de los frutos. Durante las primeras fases de desarrollo precisa y tolera una humedad relativa más elevada que en fases posteriores.

El pimiento también es exigente en luminosidad durante su ciclo vegetativo, especialmente en la floración, ya que ésta se ve reducida y las flores son más débiles en situaciones de escasa luminosidad. La falta de luz provoca un cierto ahilamiento de la planta, con alargamiento de los entrenudos y de los tallos, que quedarán débiles y no podrán soportar el peso de una cosecha abundante de frutos.

Respecto al terreno de cultivo, la planta de pimiento no se desarrolla bien en suelos arcillosos, prefiriendo aquellos con textura areno-limosa. En cualquier caso, el suelo debe drenar perfectamente, ya que el exceso de humedad genera fácilmente la asfixia radicular y el desarrollo de enfermedades criptogámicas.

El pH óptimo para su cultivo se sitúa entre 6,5 y 7. Se muestra sensible a la salinidad del suelo, que influye negativamente sobre la calidad de la cosecha.

Existe unanimidad histórica en señalar como orígenes del pimiento el Nuevo Mundo. Lo atestiguan los restos encontrados del mismo en yacimientos arqueológicos. En 1926, Safford recupera de tumbas de Perú, vainas secas de pimiento que presentaban más de dos mil años de antigüedad. En 1886, De Candolle concluye, a partir de la ausencia de referencias de esta planta en las lenguas antiguas, "que *Capsicum* no es indígena del Viejo Mundo".

El centro fundamental de cultivo del pimiento *Capsicum annuum* se sitúa en Méjico con una localización secundaria en Guatemala. Los últimos exploradores trajeron *Capsicum* al Viejo Mundo, siendo introducido en España por Colón en su viaje de retorno de 1493 (Boswell, 1949). A partir de aquí, su cultivo se extendió por la zona Mediterránea hasta Inglaterra en 1548 y llegó a Europa Central en el 1600 (Boswell, 1949).

El género *Capsicum* es un miembro de la familia *Solanaceae*. Todavía no se conoce con exactitud el número de especies que existen en este género (Pickersgill, 1992). Sin embargo, las especies económicamente importantes, incluso con sus especies salvajes más próximas, forman un grupo coherente de aproximadamente 11 especies. A diferencia de *Lycopersicon*, los miembros de 3 grupos diferentes de *Capsicum* (el grupo *annuum*, el grupo *baccatum* y el grupo *pubescens*) han sido cultivados. En el grupo *annuum*, *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens* y *Capsicum chinense*, han sido probablemente cultivados independientemente en distintas partes de América.

Las especies cultivadas se han desarrollado a partir de diferentes reservas ancestrales en tres centros de origen diferentes: Méjico (*Capsicum annuum* L.), "Amazonia" (*Capsicum chinense* Jacq. y *Capsicum frutescens* L.) y el Sur de Perú y Bolivia (*Capsicum baccatum* L. y *Capsicum pubescens*).

Los estudios de isoenzimas han sido utilizados en investigaciones genéticas y de producción con diferentes objetivos, particularmente cuantificar la variabilidad genética de poblaciones, ampliar el conocimiento de los sistemas de producción, definir las relaciones sistemáticas y filogenéticas y establecer mapas de genes (Tanksley, 1983)

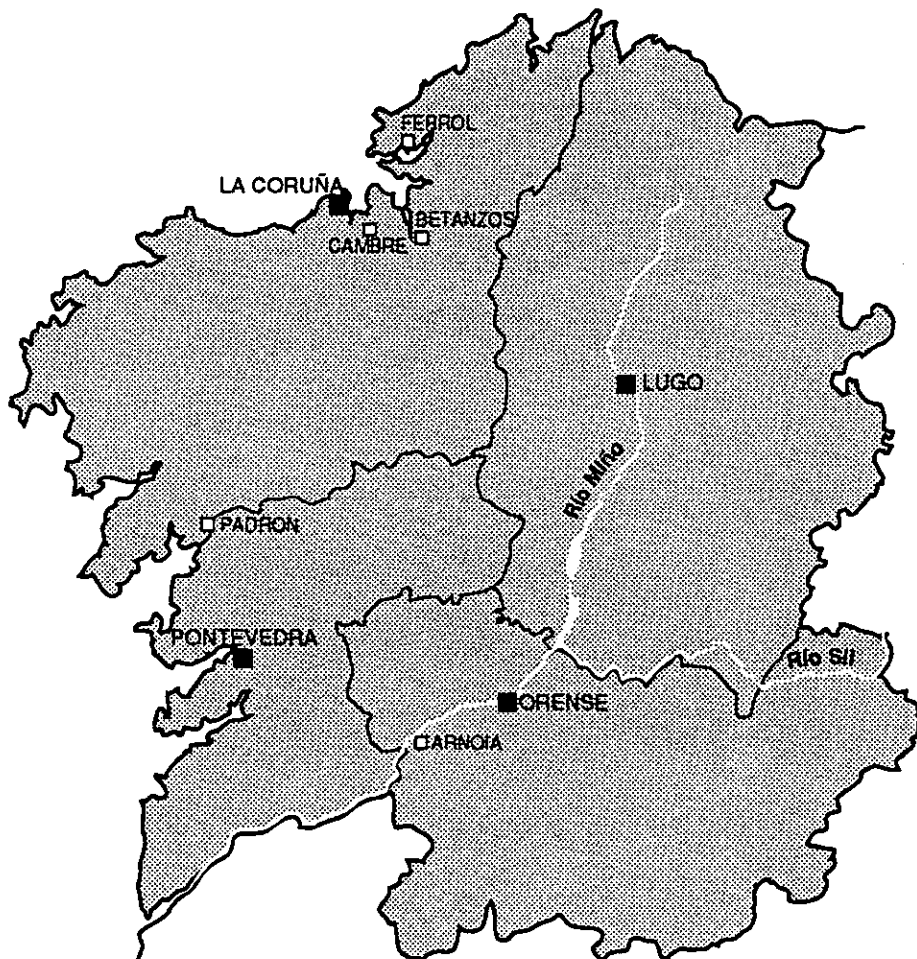
Capsicum es un género con problemas taxonómicos. En 1978, Eshbaugh revisa los problemas de nomenclatura en el género, y afirma que muchas de las dificultades se plantean cuando se comparan estudios basados en caracteres morfológicos y aquellos basados en caracteres alozímicos. En el pimiento, la mayor parte de los estudios con isoenzimas han estado encaminados a establecer el papel

taxonómico de este género (McLeod y col., 1979b, 1983) y a estimar el grado de relación entre distintas variedades de pimientos (Panda y col., 1986).

Esta problemática en el aspecto taxonómico, podría explicar los escasos estudios realizados con isoenzimas relativos a su diferente compartimentación y sus variaciones con el desarrollo, cuando lo comparamos con otros miembros de la familia *Solanaceae* (tomate, tabaco, petunia, etc..)

En la provincia de La Coruña, se cultiva la variedad *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, a la cual pertenece el conocido pimiento de Padrón. Este tipo de pimiento se cultiva de modo extensivo en el territorio que comprende la comarca de Herbón y zonas colindantes, bien en el exterior o en invernadero. En Herbón, se cree que fueron los Padres Franciscanos quienes trajeron las semillas, siendo conservado hasta nuestros días por los agricultores. Dada la importancia económica y gastronómica que este cultivo presenta, su producción se ha extendido en Galicia, de manera que podemos encontrar con grandes explotaciones en otras zonas. Concretamente en la provincia de La Coruña, aparecen importantes áreas de cultivo, en Cambre, Ferrol, Betanzos, etc.. que han sido objeto de nuestro estudio.

Pero quizás, uno de los principales motivos de la popularidad de este tipo de cultivo, aparte de sus características nutritivas y medicinales, es el peculiar gusto picante del pimiento que es debido a un alcaloide denominado capsicina (Thresh, 1876). Las condiciones del suelo y el clima, particularmente la temperatura, se han considerado responsables de los niveles variables de picante de pimiento en diferentes localidades (Erwin, 1932). Otha (1962a) considera que una temperatura nocturna alta favorece un alto contenido en capsicina, y éste puede variar entre las plantas de un mismo genotipo (Brauer, 1962).



Mapa de Galicia en el que se señalan las localidades de recogida de pimientos.

Son numerosas las variedades de pimientos que están reconocidas en el Instituto de Semillas y Plantas de Vivero (BOE 28 de Junio de 1985), siendo el pimiento de Padrón una de las pocas que se considera pura. Atendiendo a las recomendaciones de la FAO de recolectar y mantener los materiales autóctonos como reserva de la variabilidad genética de las especies y como base de la mejora en sí, nos encontramos que en Galicia existe una especie muy interesante desde este punto de vista y que no ha sido apenas estudiada.

El hecho de que *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, sea una variedad ampliamente establecida y adaptada a las condiciones ambientales de nuestra comunidad, lo convierten en un sujeto idóneo para la realización de estudios que nos permitan conocer el polimorfismo isoenzimático que presenta, así como las variaciones que aparezcan como consecuencia del desarrollo de la planta y de la diferente compartimentación subcelular de sus enzimas.

CAPITULO I

Estudio de la variabilidad enzimática en el pimiento de Padrón.

1.1. Introducción.	14
1.1.1. Generalidades	14
1.1.2. Visualización de las isoenzimas	15
1.1.3. Base genética de los fenotipos isoenzimáticos.....	16
1.1.4. Estudios genéticos	17
1.2. Objetivos.	18
1.3. Material y métodos.	19
1.3.1. Material vegetal	19
1.3.2. Ensayos zimográficos	19
1.3.2.1. Preparación de las muestras	19
1.3.2.2. Preparación de los geles de almidón	20
1.3.2.3. Carga de las muestras	20
1.3.2.4. Montaje y conexión	21
1.3.2.5. Revelado de los geles	22
1.3.2.6. Fijación de los geles	22
1.3.2.7. Cálculo del Rf	27
1.3.2.8. Sistemas enzimáticos estudiados	27
1.3.2.9. Nomenclatura de las enzimas	28
1.4. Resultados.	29
1.4.1. Análisis de los patrones electroforéticos	29

1.4.1.1. Isocitrato Deshidrogenasa (IDH)	29
1.4.1.2. Aconitasa (ACON)	29
1.4.1.3. 6-Fosfogluconato Deshidrogenasa (6-PGDH)	33
1.4.1.4. Málico Deshidrogenasa (MDH)	33
1.4.1.5. Esterasa (EST)	33
1.4.1.6. Peroxidasa (PRX)	33
1.4.1.7. Sikímico Deshidrogenasa (SKDH)	36
1.4.1.8. Glutamato Oxalacetato Transaminasa (GOT)	36
1.4.1.9. Fosfogluco Isomerasa (PGI)	36
1.4.1.10. Fosfogluco Mutasa (PGM)	36
1.5. Discusión.	43

1.1. - INTRODUCCION

1.1.1. - GENERALIDADES.

Desde su descubrimiento en 1957 por Hunter y Markert, las isoenzimas han jugado un importante papel en muchos campos de la biología. El término de isoenzimas fue introducido por Markert y Moller en 1959, para designar a cada una de las múltiples formas moleculares de una enzima con similar o idéntica especificidad de sustrato que aparecen en un organismo.

La electroforesis de proteínas en gel se ha convertido en uno de los métodos estándar con aplicación en multitud de disciplinas biológicas. La utilización de la electroforesis de proteínas, para el análisis de isoenzimas, ha sido realmente importante en estudios sistemáticos y evolutivos así como también en agronomía (Tanksley y Orton, 1983).

Pero quizás la más significativa de las propiedades de las isoenzimas, sea la simple base genética de muchos polimorfismos. Ya que las isoenzimas son proteínas, pueden reflejar alteraciones en la secuencia de ADN por modificaciones en su composición de aminoácidos. Estos cambios en la composición de aminoácidos, podrían alterar la carga o, menos frecuentemente, la conformación de la enzima, originando un cambio en la movilidad electroforética lo cual proporciona un método extremadamente útil para evaluar las diferencias genéticas entre grupos (Markert y Moller, 1959).

Esto ha sido puesto de manifiesto cuando los extractos de tejidos se someten a electroforesis en varios tipos de geles y a continuación se sumergen en soluciones que tienen tinciones enzimáticas específicas. Los análisis genéticos pueden

indicar que algunas de las variantes proteicas están codificados por alelos alternativos de un simple locus, en cuyo caso los productos alélicos se denominan alozimas (Prakash y col., 1969) con el fin de distinguirlas del fenómeno más general de las isoenzimas. Las alozimas exhiben generalmente herencia Mendeliana y expresión codominante (Weeden y Wendel, 1990).

1.1.2. - VISUALIZACION DE LAS ISOENZIMAS.

La separación electroforética de mezclas complejas de proteínas, puede realizarse en distintos tipos de técnicas, como son: almidón, poliacrilamida, isoelectroenfoque y agarosa (Wendel y Weeden, 1990). Este último por lo general carece de suficiente poder resolutivo, y por esta y otras razones, no se suele utilizar para el estudio del polimorfismo enzimático (Womack y Moll, 1986).

El medio más comunmente utilizado para los análisis rutinarios es el almidón (Scandalios, 1969; Shaw y Prasad, 1970; Vallejos, 1983) ya que nos permite el análisis de un gran número de individuos para varias enzimas. Entre las razones que apoyan el uso del almidón estarían: la simplicidad de su preparación, su naturaleza no tóxica, su economía y el hecho de que las muestras no precisen una preparación especial (centrifugado, diálisis, etc...). Sin embargo, la razón más importante para su popularidad es la diferencia con otros medios en la cantidad de datos generados por gel. Los geles de almidón se pueden cortar horizontalmente en varias lonchas idénticas, siendo posible ensayar distintas enzimas al mismo tiempo, mientras que por ejemplo, con la poliacrilamida sólo se puede estudiar una enzima por gel.

No se debe olvidar la existencia de evidencias importantes como el que la electroforesis en geles de almidón es un detector imperfecto de polimorfismo alozímico

(Shaw, 1970) y así, la detección del grado de variabilidad puede incrementarse o disminuir utilizando técnicas electroforéticas adicionales.

1.1.3. - BASE GENETICA DE LOS FENOTIPOS ISOENZIMATICOS.

Cuando los geles se sumergen en una solución de tinción específica para una enzima, el patrón de bandas resultante es el fenotipo electroforético. Este fenotipo varía ampliamente en su complejidad dependiendo de numerosos factores, incluyendo el organismo y el tejido estudiado así como la enzima ensayada (Wendel y Weeden, 1990).

Se pueden considerar distintos factores determinantes del número de bandas observadas en el gel: 1) número de genes, 2) estatus alélico (homocigotos o heterocigotos), 3) estructura cuaternaria del producto proteico, y 4) compartimentación subcelular (Wendel y Weeden, 1990).

Una de las formas de estimar la variabilidad genética es mediante la cantidad de polimorfismos de la población, que es simplemente la proporción de loci estudiados que son polimórficos (variables). Hablaremos de sistemas monomórficos, cuando no existe ningún tipo de variación en los distintos sistemas analizados.

1.1.4. - ESTUDIOS GENETICOS.

Los estudios de variabilidad genética de las isoenzimas han sido llevados a cabo en un gran número de especies vegetales. Estos datos han contribuido de una manera significativa al conocimiento de la selección natural (Clegg, 1983), de la sistemática (Crawford, 1983) y de la estructura de la población (Ritland, 1983).

En el pimiento la mayoría de los estudios realizados por medio de

electroforesis en gel de almidón, han estado encaminados al establecimiento del control genético de las isoenzimas con el fin de mejorar la producción de las distintas variedades, así como también al conocimiento del origen evolutivo del género y de las formas domésticas (McLeod y col., 1983).

Los análisis genéticos en *Capsicum* de los loci isoenzimáticos se realizaron con la ayuda de los conocimientos previos en *Lycopersicon* (Wendel y Weeden, 1990). Aunque estos estudios fueron realizados independientemente en *Capsicum* por Tanksley (1984), el tipo de variación observada era a menudo similar a la del tomate.

Dadas las características peculiares de estas variedades, su mantenimiento y conservación se convierte en un importante problema, ya que estos materiales se encuentran adaptados a las condiciones ambientales de la zona, aunque deba mejorarse su producción (Frankel y Hawhes, 1975). De ahí, que sea importante realizar un estudio previo acerca de la variabilidad genética existente en dicho cultivo.

1.2. - OBJETIVOS

Establecer el comportamiento de una serie de sistemas enzimáticos utilizando técnicas de electroforesis en geles de almidón y determinar el grado de variabilidad que presentan estos sistemas en las poblaciones de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* en Padrón y otras localidades. También se van a comparar los resultados obtenidos en esta variedad con los que presentan otros tipos de pimientos cultivados en nuestra región (pimiento tipo "guindilla", pimiento Amoia y pimiento Sonar, también conocido como "híbrido francés") que se caracterizan por presentar notables diferencias morfológicas principalmente en la forma, tamaño y color del fruto respecto al pimiento de Padrón.

1.3. - MATERIAL Y METODOS

1.3.1. - MATERIAL VEGETAL.

Se utilizaron plantas de *Capsicum annuum* L. var. *annuum*. Para realizar este estudio, la recogida de material se realizó en la comarca de Herbón (Padrón) y en diferentes localidades de la provincia de La Coruña (Betanzos, Cambre, Ferrol). A la hora del muestreo éste se hizo de modo que sólo se cogió un fruto maduro de cada planta, con lo cual se obtuvo una muestra no sesgada del total de la población. Se sacaron las semillas, se dejaron secar y posteriormente se guardaron en sobres numerados.

Las semillas previamente embebidas en agua durante 24 horas se pusieron a germinar en el laboratorio a temperatura ambiente, en bandejas de plástico sobre papel humedecido. A los 15-30 días la plántula había alcanzado un tamaño adecuado para su transplante a maceta, pasándose a continuación al invernadero en dónde continuaron su desarrollo bajo condiciones ambientales.

1.3.2. - ENSAYOS ZIMOGRÁFICOS.

1.3.2.1. - Preparación de la muestra.

Se escogieron las hojas más jóvenes de la planta, con un tamaño aproximado de 1 cm. Se utilizó como tampón de extracción el de Roose y Gottlieb (1978) que contenía ClK 10mM, Cl₂Mg 1mM, EDTA 1mM, 2-mercaptoetanol 14mM, ácido ascórbico 0,1M en tampón Tris ClH 0,1M pH 7,80 al cual se le añadieron 0,2 gr de

PVP-P y 0,05 gr de PVP-40 por cada 2 ml de tampón. La extracción se realizó a 4°C en una proporción 1:2, peso:volumen.

En los distintos extractos se impregnaron papeles de filtro Watman nº 3 de 3x12 mm que se introdujeron en el gel de almidón.

1.3.2.2. - Preparación de los geles de almidón.

Se empleó almidón de patata hidrolizado. Fué necesario ensayar la concentración óptima del mismo, que normalmente se encuentra comprendida entre el 10% y 11%, para un volumen de tampón del gel de 300 ml. Para alcanzar la gelificación, la disolución coloidal formada por el almidón y el correspondiente tampón, tenía que entrar en ebullición. La gelificación se realizó directamente sobre cubetas de metacrilato de 14x17x1 cm, en las que a su vez se cargaron las muestras.

Era importante que la superficie de las cubetas se encontrase totalmente limpia, evitándose de esta forma la aparición de una fina lámina intersticial de solución tampón que al ionizarse pudiese interferir el avance normal de las proteínas a través de la matriz. Una vez que había alcanzado la gelificación, se dejó enfriar durante una hora y se tapó con un plástico, dejándolo así hasta el día siguiente en que se procedió a su carga.

1.3.2.3. - Carga de las muestras.

Con una espátula se efectuó un corte transversal sobre la matriz de almidón a 3 cm aproximadamente de uno de los extremos de la cubeta. El corte debía ser completamente recto para evitar la distorsión en el frente de avance de las proteínas. A continuación los papeles Whatman nº3 empapados en las muestras, se introdujeron en

la ranura del gel apoyados en la cara frontal, asegurándose de que tocasen el fondo de la cubeta. La distancia entre las muestras normalmente era igual al ancho del papel de filtro.

El primer papel se impregnó con una disolución coloreada de Azul de Bromofenol al 1% con el fin de poder localizar en cualquier momento la situación del frente de avance de los iones.

1.3.2.4. - Montaje y conexión.

En cada uno de los dos compartimentos de que disponía la cubeta de electroforesis se añadieron 300 ml del tampón del electrodo. Si la proteína que se ensayaba tenía carga eléctrica neta negativa en las condiciones particulares de electroforesis que se probaban, el gel se colocaba en la cubeta de modo que el origen se situase junto al cátodo.

Se colocó un plástico encima de la zona sobre la que iba a migrar la proteína con el fin de evitar una deshidratación excesiva a lo largo de las horas que durase la electroforesis. El contacto eléctrico entre el tampón del electrodo y la matriz del almidón se consiguió mediante unas esponjillas, que cubrían todo el ancho del gel.

Finalmente, todo el conjunto se introdujo en una cámara a 4°C, asegurándose de que existiera una buena refrigeración. Se realizaron las conexiones y se fijaron en la fuente de alimentación las condiciones específicas de tensión e intensidad. Se aplicó un voltaje de 150 V durante los primeros 20 minutos, pasados los cuales se retiraron los papeles Whatman y se dejó transcurrir la electroforesis al potencial correspondiente según el sistema utilizado.

Se utilizaron tres sistemas (Tabla I - 1). Las condiciones de electroforesis se especifican en la Tabla I - 2 y se determinó el sistema idóneo para cada enzima, así como la loncha en la cual era mejor la resolución (Tabla I - 3, 4 y 5).

1.3.2.5. - Revelado de los geles.

Una vez transcurrido el tiempo preciso para la separación electroforética, se procedía al revelado. Para ello, se rebanaba la matriz de almidón en finas lonchas, utilizándose sólo las lonchas interiores, donde las condiciones de electroforesis eran más uniformes. Las lonchas se introducían en cubetas, en las que se vertía la mezcla de revelado específica para cada sistema estudiado (Tabla I - 3, 4 y 5). Finalmente se incubaban a oscuridad y, dependiendo del sistema, a temperatura ambiente o en estufa a 37°C.

La actividad enzimática debía detectarse con rapidez para evitar la difusión de los componentes que se habían separado, ya que el proceso de difusión continuaba después de que se hubiera cortado la corriente.

1.3.2.6. - Fijación de los geles.

Una vez detectada visualmente la actividad enzimática en la loncha de almidón, si se quería conservar el zimograma, los reactivos residuales debían eliminarse mediante un abundante lavado con agua y añadiendo 20 ml. de ácido acético al 20% para detener la reacción. A continuación se podía proceder al fotografiado de los mismos.

Si se deseaba conservar por más tiempo, era preciso reemplazar el acético al 20% por glicerina al 50%, se empaquetaban en plástico y se mantenían refrigerados a 4°C.

Tabla I - 1. - Sistemas de electroforesis en gel de almidón.

Sistema	Tampón Gel	Tampón Electrodo	Ref.
I	A - Histidina 7mM pH 7,00	B - Tris 0,135M pH 7,00 Citrato 43mM	1
II	C - Tris 15mM pH 7,80 Citrato 4mM	D - Borato 0,3M pH 7,80	2
III	E - Tris 15mM pH 8,00 EDTA 2mM Borato 37mM	F - Tris 0,2M pH 8,50 EDTA 2mM Borato 0,15M	3

1.- Vallejos, 1983. 2.- Rick y col.,1977. 3.- Guries y Ledig, 1978.

Tabla I - 2. - Condiciones de electroforesis de los diferentes sistemas.

Sistema	% Almidón	Tampón Gel	Tampón Electrodo	Potencial	Tiempo
I	10,5%	A	B	7 W	2h,30'
II	10,5%	C	D	10 W	3h
III	11%	E	F	12-17 W	3h,30'

Tabla I - 3. - Sistema I, enzimas, nº de loncha y técnica de tinción.

Enzima	nº de Loncha	Composición de la mezcla de revelado	Ref.
IDH	2	Tris ClH 0,1M pH 7,5 DL-Isocitrato 2mM, Cl ₂ Mn 0,01M, NADP 0,12mM, MTT 0,34mM, PMS 0,06mM.	1
ACON	3	Tris ClH 0,2M pH 8,0 Cis-Aconítico 8,6mM, Cl ₂ Mg 0,01mM, NADP 0,13mM, NBT 0,18mM, PMS 0,13mM, 10 u IDH.	4
6PGDH	4	Tris ClH 0,1M pH 7,5 6Fosfogluconico 1mM, 10 ul Cl ₂ Mg 1%, NADP 0,21mM, MTT 0,48mM, PMS 0,13mM.	1
MDH	5	Tris ClH 0,1M pH 7,5 DL-Malato 30mM pH 7,5, Cl ₂ Mg 0,01mM NAD 0,45mM, MTT 0,48mM, PMS 0,13mM.	5

4.- Conckle y col., 1982. 5.- Brow y col., 1978.

Tabla I - 4. - Sistema II, enzimas, nº de loncha y técnica de tinción.

Enzima	nº de Loncha	Composición de la mezcla de revelado	Ref.
EST	2	Tampón Fosfato 50mM pH 6,0 α -naftil acetato 1% en acetona, Fast Blue RR 2,5mM.	6
PRX	3	Tampón Acetato 0,1M pH 4,5 O-Dianisidine 3mM H ₂ O ₂ 1mM.	7

6.- Shaw y Prasad, 1970. 7.- Brewbaker y col., 1968.

Tabla I - 5. - Sistema III, enzimas, nº de loncha y técnica de tinción.

Enzima	nº de Loncha	Composición de la mezcla de revelado	Ref.
SKDH	2	Tris ClH 0,1M pH 8,8 Ac. Sikímico 2mM, Cl ₂ Mg 0,01mM, NADP 0,08mM, MTT 0,24mM, PMS 0,065mM.	1
PGI	3	Tris ClH 0,1M pH 7,5 Fructosa-6-Fosfato 1,18mM, Cl ₂ Mg 0,01mM, NADP 0,07mM, MTT 0,52mM, PMS 0,17 mM, 20 u G6PDH.	1
PGM	4	Tris ClH 0,1M pH 7,5 Glucosa-1-Fosfato 8mM, Cl ₂ Mg 0,01mM, NADP 0,07mM, MTT 0,52mM, PMS 0,17 mM, 20 u G6PDH.	1
GOT	5	Tris ClH 0,1M pH 8,0 Piridoxal 0,2mM, L-Aspártico 10mM, α- Ketoglutarico 7mM, Fast Blue BB 3,6mM.	7

1.3.2.7. - Cálculo del Rf.

En función de la distancia de migración del frente del tampón del electrodo desde el punto de inserción de las muestras, se calculaba el Rf de las diferentes bandas según la siguiente formula:

$$R_f = \frac{D_b}{D_f}$$

D_b = Distancia de migración de la banda (cm); D_f = Distancia de migración del frente del tampón del electrodo (cm).

1.3.2.8. - Sistemas enzimáticos estudiados.

Las enzimas estudiadas han sido las siguientes:

ENZIMA	SIMBOLO	NUMERO EC
Isocitrato Deshidrogenasa	IDH	EC 1.1.1.42
Aconitasa	ACON	EC 4.1.2.3
6-Fosfogluconato Deshidrogenasa	6-PGDH	EC 1.1.1.44
Málico Deshidrogenasa	MDH	EC 1.1.1.37
Esterasa	EST	EC 3.1.1.1
Peroxidasa	PRX	EC 1.11.1.7
Sikímico Deshidrogenasa	SKDH	EC 1.1.1.25
Fosfogluco Isomerasa	PGI	EC 5.3.1.9
Fosfogluco Mutasa	PGM	EC 2.7.5.1
Glutamato-Oxalacetato Transaminasa	GOT	EC 2.6.1.1

1.3.2.9. - Nomenclatura de las enzimas.

Las isoenzimas se designaban con una letra, en función de su movilidad relativa respecto al frente de azul de bromofenol, que acompañaba al símbolo de la enzima: la isoenzima con migración más anódica se designaba como a, la siguiente b y así sucesivamente. Para cada isoenzima el alelo con mayor movilidad relativa, se denominaba 1, el siguiente 2, etc...

1.4. - RESULTADOS

1.4.1. - ANALISIS DE LOS PATRONES ELECTROFORETICOS.

Los ensayos realizados en nuestro laboratorio nos han permitido poner a punto las técnicas electroforéticas en gel de almidón para las diferentes enzimas, adaptándolas al pimiento de Padrón. Como consecuencia de ello, podemos determinar cuales son los sistemas idóneos para cada una de las enzimas, así como las condiciones de electroforesis.

Hemos analizado 16 poblaciones de *Capsicum annum* L. var. *annuum* (Figura I - 1) con un total de 50 individuos por población, para 10 sistemas enzimáticos, presentándose a continuación el comportamiento de dichas enzimas. La movilidad relativa y el número de subunidades se presentan en la tabla I - 6. La estructura monomérica o dimérica se deduce en base a datos bibliográficos y al número de bandas que se detectan en el heterocigoto, que generalmente es una unidad superior al número de subunidades que componen la enzima.

1.4.1.1. - Isocitrato Deshidrogenasa (IDH).- Presenta una única zona de actividad anódica IDH-a, con una sola banda. La estructura es la de una enzima dimérica, presentando el pimiento de Padrón el alelo lento (Figura I - 2A).

1.4.1.2. - Aconitasa (ACON).- Presenta dos zonas de actividad anódicas. La forma rápida, ACON-a aparece con una sola banda, al igual que la forma lenta ACON-b. La baja actividad que manifiesta la enzima así como la escasa resolución del gel de almidón para este sistema no nos ha permitido obtener una foto adecuada.



Figura I - 1.- Planta de pimiento de Padrón *Capsicum annuum* L. var. *annuum*.

Tabla I - 6. - Movilidad relativa de las diferentes formas alozímicas y estructura de la proteína.

Isoenzima	Alozima ^I			Estructura Proteína ^{II}
	1	2	3	
IDH-a	0,17	0,15	0,13	D
ACON-a	0,3	-	-	M
ACON-b	0,2	-	-	M
6-PGDH-a	0,22	0,21	0,20	D
6-PGDH-b	0,13	-	-	D
MDH-a	0,27	0,25	0,23	D
MDH-b	0,08	0,1	-	M
EST-a	0,96	-	-	M
EST-b	0,83	0,77	-	M
EST-c ^{III}	0,25	-	-	M
PRX-a	0,90	-	-	M
PRX-b	0,85	0,82	-	M
PRX-c ^{III}	0,1	-	-	M
SKDH-a	0,3	0,26	-	M
SKDH-b	0,24	0,20	-	M
PGI-a	0,42	-	-	D
PGI-b	0,15	-	-	D
PGM-a	0,41	-	-	M
PGM-b	0,29	0,22	-	M
GOT-a	0,25	-	-	D
GOT-b	0,20	-	-	D

^I Movilidad electroforética relativa respecto al frente de Azul de Bromofenol.

^{II} M - Monómera; D - Dímera.

^{III} Catódicas.

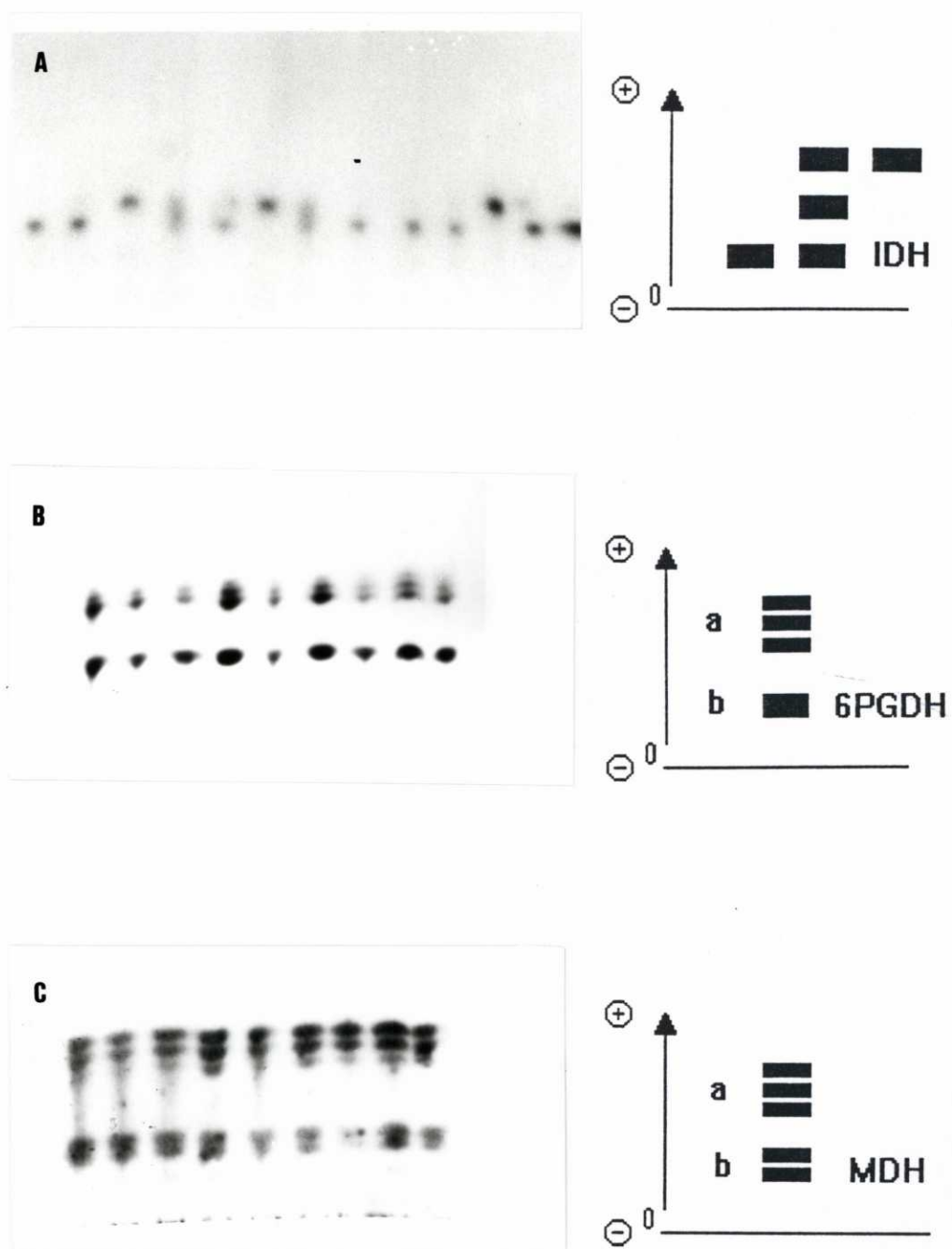


Figura I - 2.- Patrones isoenzimáticos en gel de almidón utilizando el sistema I. IDH (A), 6PGDH (B) y MDH (C).

1.4.1.3. - 6-Fosfogluconato Deshidrogenasa (6-PGDH).- Esta enzima se caracteriza por presentar dos zonas de actividad enzimática. La zona rápida aparece constituida por tres bandas que hemos denominado 6PGDH-a, y la zona lenta, en dónde sólo se distingue una banda, 6PGDH-b. Se trata de una enzima dimérica (Figura I - 2B).

1.4.1.4. - Málico Deshidrogenasa NAD⁺ (MDH).- Presenta dos zonas de actividad. MDH-a constituida por tres bandas (dímera) y MDH-b con dos bandas (monómera) (Figura I - 2C).

1.4.1.5. - Esterasa (EST).- Esta enzima se caracteriza por presentar dos zonas de actividad en la parte anódica del gel y otra en la parte catódica.

En las EST anódicas distinguimos una zona de migración rápida (con el frente de borato), constituida por una sola banda que hemos denominado EST-a. La otra zona de actividad, EST-b presenta dos bandas. Las EST catódicas se caracterizan por presentar una única zona de actividad (EST-c), con una banda. Todas ellas se comportarán como enzimas monómeras (Figura I - 3).

1.4.1.6. - Peroxidasa (PRX).- Al igual que las esterases, distinguimos peroxidasas anódicas y catódicas. Las peroxidasas anódicas aparecen próximas al frente del borato, con dos zonas de actividad. La zona rápida presenta una sola banda (PRX-a), mientras que la zona lenta PRX-b presenta dos bandas.

Las peroxidasas catódicas aparecen en una única zona del gel, denominada PRX-c, constituida por una sola banda, próxima al punto de inserción de las muestras (Figura I - 4).

Se trata de enzimas de estructura monomérica.

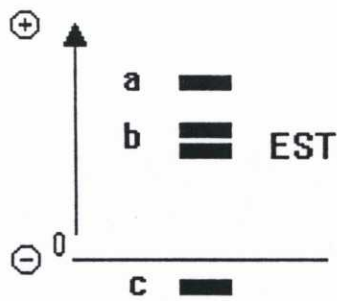
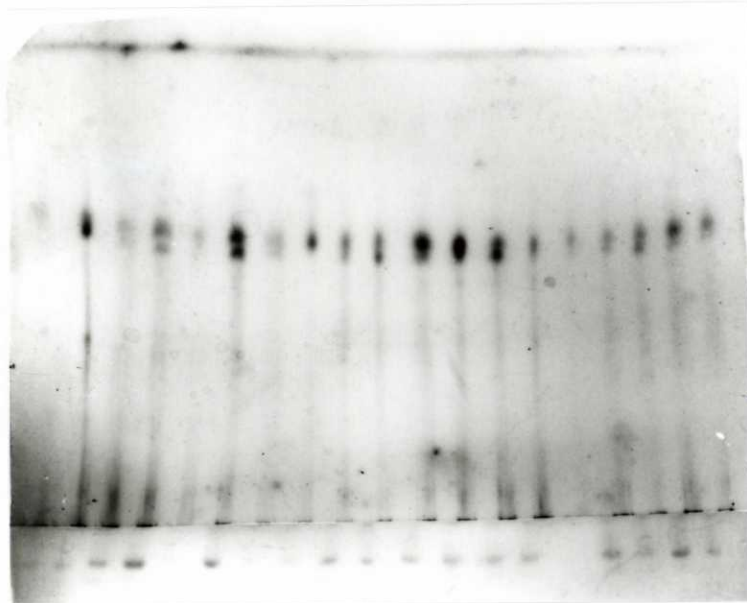


Figura I - 3.- Patrones isoenzimáticos en gel de almidón utilizando el sistema II. EST.

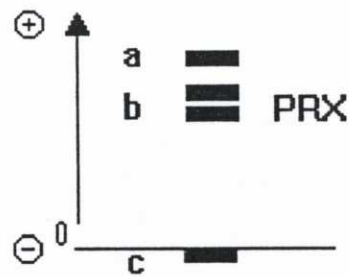


Figura I - 4.- Patrones isoenzimáticos en gel de almidón utilizando el sistema II. PRX.

1.4.1.7. - Sikímico Deshidrogenasa (SKDH).- Esta enzima presenta dos zonas de actividad, cada una de ellas doblemente bandeada. A la forma rápida la hemos denominado SKDH-a y la forma lenta SKDH-b, que aparece débilmente teñida y no llega a detectarse en la fotografía. Su comportamiento se correspondería con el de enzimas de estructura monomérica (Figura I - 5A).

1.4.1.8. - Glutamato Oxalacetato Transaminasa (GOT).- Se caracteriza por presentar dos zonas de actividad en el gel, GOT-a y GOT-b, ambas con una banda. Se trata de enzimas monómeras (Figura I - 5B).

1.4.1.9. - Fosfogluco Isomerasa (PGI).- Aparecen dos zonas de actividad en los geles de almidón. PGI-a presenta una sólo banda al igual que PGI-b. Se trata de enzimas con estructura dimérica (Figura I - 6A).

1.4.1.10. - Fosfogluco Mutasa (PGM).- Presenta dos zonas de actividad. La zona rápida PGM-a aparece constituida por una sola banda, mientras que PGM-b presenta dos bandas. Se trata de enzimas con estructura monomérica (Figura I - 6B).

El análisis realizado para estos sistemas en las diferentes poblaciones mostró la ausencia de variación genética, comportándose todas ellas como sistemas monomórficos, con lo cual podemos afirmar que en *Capsicum annum* L. var. *annuum* parece no existir variabilidad genética en dichos sistemas. (Figuras I - 2, 6).

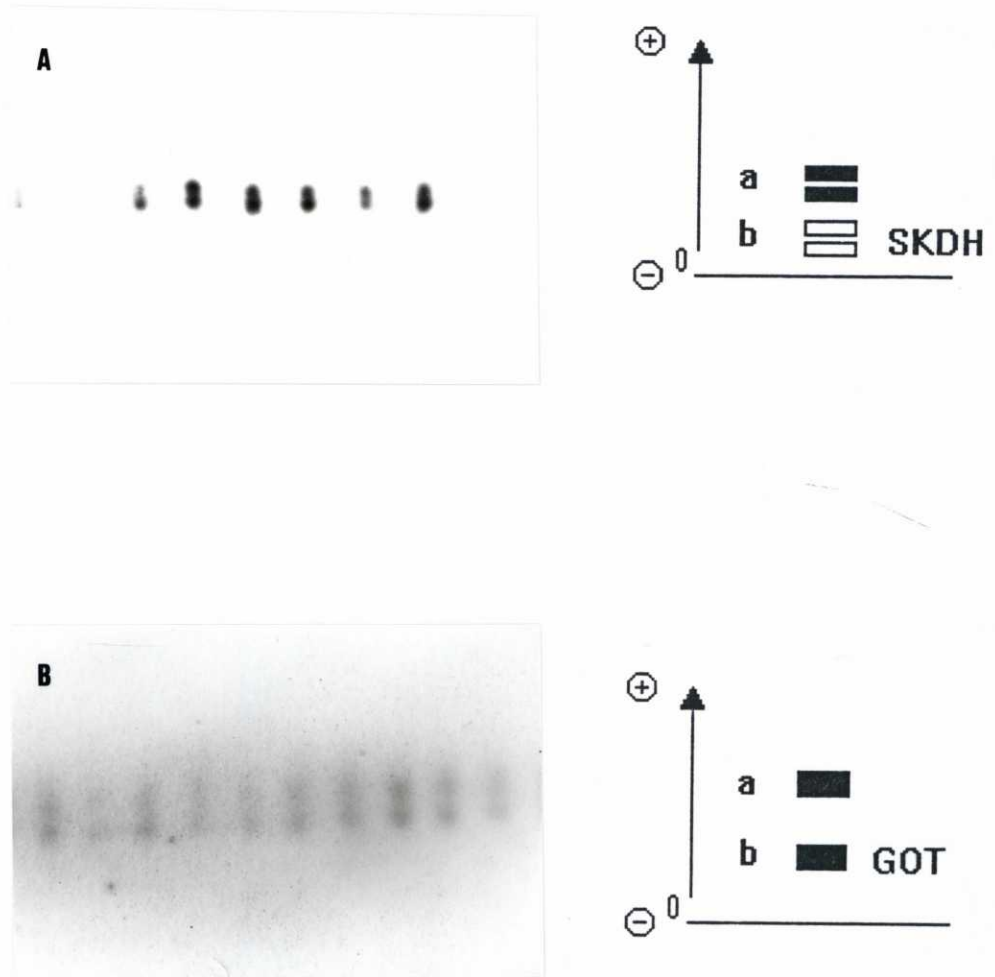


Figura I - 5.- Patrones isoenzimáticos en gel de almidón utilizando el sistema III. SKDH (A) y GOT (B).

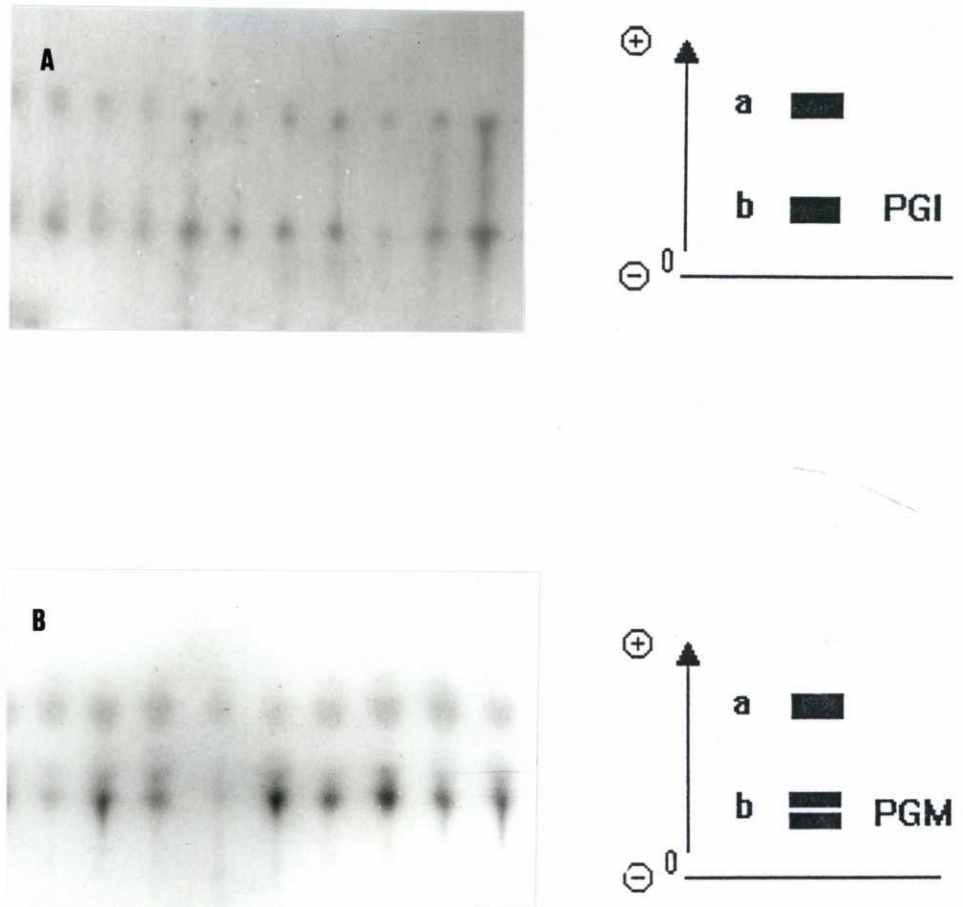


Figura I - 6.- Patrones isoenzimáticos en gel de almidón utilizando el sistema III. PGI (A) y PGM (B).

Paralelamente a este estudio con diferentes poblaciones de pimiento de Padrón *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, realizamos un estudio con otras variedades comerciales de pimiento, entre ellas, pimiento tipo "guindilla" (Figura I - 7), pimiento de Arnoia (Figura I - 8), y el pimiento Sonar (Figura I - 9), también conocido como "híbrido francés". Estas tres variedades, se distinguen principalmente por la forma, tamaño y color del fruto, ya que el aspecto de la planta es bastante similar, si bien presentan algunas leves diferencias en cuanto a la forma y tamaño de la hoja.

En estas variedades se estudiaron las mismas enzimas y pudimos comprobar que el comportamiento de éstas era exactamente el mismo, con la excepción de la enzima IDH.

Esta enzima, muestra en el pimiento de Padrón una única zona de actividad con un Rf de 0,13. También hemos observado como el pimiento de Arnoia presentaba el alelo rápido de dicha isoenzima con un Rf de 0,17 y este alelo aparecía invariablemente en todos los individuos estudiados. El pimiento Sonar presentaba ambos alelos, ya que aparecía la isoenzima IDH con un patrón tribandeado, con Rfs. 0,17, 0,15 y 0,13 respectivamente, que se corresponden con las diferentes combinaciones de las dos subunidades que constituyen la isoenzima IDH-a (Figura I - 2A).



Figura I - 7.- Planta de pimiento tipo "guindilla".



Figura I - 8.- Planta de pimiento de Arnoia.



Figura I - 9.- Planta de pimiento Sonar.

1. 5. - DISCUSION

Se ha estudiado el comportamiento de diez sistemas enzimáticos en dieciseis poblaciones de pimiento de Padrón, *Capsicum annuum* L. var. *annuum* por medio de electroforesis en geles de almidón y se ha podido observar como el patrón de las enzimas no presenta ningún tipo de variación, no existiendo por lo tanto variabilidad genética en los sistemas estudiados.

Esto coincide con los escasos estudios existentes en *Capsicum annuum* respecto a variabilidad genética. McLeod y col. (1983) muestran como en un taxón individual, el número de loci polimórficos está muy reducido y las poblaciones pertenecientes al mismo taxón son, electroforéticamente, muy similares unas a otras (Jensen y col., 1979). Recientemente Belletti y col. (1992) en *Capsicum annuum* no observan polimorfismo en algunos sistemas estudiados por nosotros, y sí encuentran un bajo polimorfismo en otros sistemas, tales como ADK, DIA, MNR y RBCS, que no han sido tratados en este estudio.

El bajo nivel de polimorfismo y de heterocigosis es probablemente el resultado de la capacidad del pimiento de comportarse como una planta autógama. Esto se puede explicar correlacionando toda una serie de factores biológicos y ambientales que afectan a los niveles de variabilidad genética en poblaciones de plantas. Así por ejemplo, es algo comprobado que por lo general las Gimnospermas son más variables que las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Hamrick y col., 1979).

Por otro lado, las especies con una mezcla de reproducción sexual y asexual mantienen unos valores más altos de variación que las que presentan un sólo mecanismo reproductor (Hamrick y col., 1979). En este sentido, el pimiento es una

planta autógena facultativa, esto es, se reproduce por autofecundación aunque en determinadas condiciones puede experimentar fecundación cruzada. Debido a este carácter preferente de autogamia, su tasa de variabilidad es muy baja (Rick y col., 1977). Jensen y col. (1979) sugieren que esto provoca la aparición de poblaciones constituidas por una o más subpoblaciones altamente monomórficas, con una pequeña tasa o ausencia completa de alogamia.

Con respecto al nivel de ploidía, sabemos que el pimiento es una planta diploide con un nº de cromosomas $2n=14$ (Tanksley, 1987); diferentes estudios comparativos del nivel de variabilidad genética existentes en especie poliploides y diploides, indican que las primeras son más polimórficas que las especies diploides (Roose y Gottlieb, 1976).

McLeod y col. (1979b) encuentran que en el género *Capsicum* la variabilidad genética es menor en las especies cultivadas. Pickersgill y Heiser (1976) ya habían mencionado que en América del Sur las poblaciones de pimientos eran cultivadas en pequeños jardines familiares, en los que sólo se plantaban un pequeño número de individuos. Cada año, las plantas se obtenían a partir de las semillas del año anterior, con lo cual se estaba contribuyendo al mantenimiento de los bajos niveles de variabilidad. Sin embargo, las formas salvajes que presentan un ligero incremento en el grado de variabilidad (McLeod y col., 1983) también eran de baja variabilidad genética.

Si consideramos que el pimiento de Padrón es una especie doméstica, fuertemente adaptada a la zona de cultivo, Herbón, en dónde los cultivos se mantienen de generación en generación por selección de las mejores semillas, se explica esta notable ausencia de variabilidad genética en los diferentes sistemas enzimáticos estudiados.

Es interesante destacar que este tipo de selección practicada, al realizarse sobre líneas homocigóticas que mantienen el genotipo inalterado, es de poca utilidad, ya que el mayor tamaño de la semilla seleccionada es debida sólo a efectos ambientales.

Por otra parte, hemos estudiado el comportamiento de estos sistemas enzimáticos en otras variedades comerciales de pimiento: pimiento tipo "guindilla", pimiento de Arnoia y pimiento Sonar, que son variedades de aspecto muy diferente, sobre todo en lo que afecta al tamaño, color y forma del fruto.

Si comparamos los datos genéticos con las características morfológicas, observamos cómo estas cuatro variedades totalmente diferentes, aparecen indistinguibles desde el punto de vista isoenzimático, a excepción del sistema IDH. En este sistema, hemos observado como el pimiento de Padrón presenta el alelo lento de la isoenzima IDH-a, el pimiento de Arnoia la forma rápida de dicho alelo y el pimiento Sonar la forma que se correspondería con el heterocigoto.

Este hecho, ha sido observado en animales y plantas. Avise y col. (1975) y Komfield y Koehn (1975) establecen grupos de peces que eran morfológicamente diferentes pero no se podían diferenciar por electroforesis en gel. Resultados similares fueron presentados por Carson y col. (1975) que establece unas similitudes alozímicas elevadas entre dos especies de *Drosophila* morfológica y citológicamente diferentes.

En el género *Capsicum* existe un gran nivel de variación morfológica. Sin embargo, la variabilidad genética a nivel isoenzimático, no siempre está relacionada con los patrones de variedad morfológica, como sucede en *Capsicum cardenasii* y *Capsicum eximium* que son fáciles de separar morfológicamente pero no alozímicamente (Jensen y col., 1979). Lo mismo sucede en *Capsicum annum* en el que se pueden reconocer distintos taxones, en base a fundamentos morfológicos (Pickersgill

y col., 1978), pero los datos alozímicos describen estos diferentes taxones como inseparables (McLeod y col., 1979a).

El estudio que hemos realizado con diferentes poblaciones de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* viene a confirmar estos resultados, al comportarse los distintos tipos de pimientos, algunos muy diferentes en su aspecto externo, de la misma forma desde el punto de vista isoenzimático.

Esta ausencia de variabilidad genética, si bien les resta importancia para estudios poblacionales, los hace especialmente interesantes para investigaciones sobre la localización subcelular, así como de desarrollo y de distribución en los distintos tejidos.

CAPITULO II

**Localización subcelular de diferentes sistemas
enzimáticos en el pimiento de Padrón.**

2.1. Introducción.	50
2.1.1. Localización subcelular de isoenzimas	50
2.1.2. Localización subcelular de los sistemas 6PGDH, PGI y PGM.....	52
2.1.3. Técnicas utilizadas en el estudio de la localización subcelular.....	54
2.1.4. Origen de las isoenzimas cloroplásticas	56
2.1.5. Existencia de variabilidad en los distintos compartimentos	56
2.2. Objetivos.	58
2.3. Material y métodos.	59
2.3.1. Material vegetal	59
2.3.2. Aislamiento y purificación de cloroplastos	59
2.3.2.1. Aislamiento y purificación de cloroplastos de hojas	60
2.3.2.2. Aislamiento de cloroplastos a partir de frutos	61
2.3.3. Estudio del gradiente	62
2.3.3.1. Determinación de clorofila	62
2.3.3.2. Determinación de la densidad	62
2.3.3.3. Determinación de la integridad de los cloroplastos	63
2.3.4. Medida de actividades enzimáticas	64
2.3.4.1. Medida de la actividad citocromo c oxidasa	64
2.3.4.2. Medida de la actividad hidroxipiruvato reductasa	64
2.3.4.3. Medida de la actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa	65
2.3.4.4. Medida de la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa	65

2.3.4.5. Medida de la actividad fosfogluco isomerasa	66
2.3.4.6. Medida de la actividad fosfogluco mutasa	66
2.3.5. Técnica del lixiviado de polen	67
2.3.6. Otros métodos	68
2.4. Resultados.	69
2.4.1. Localización subcelular	69
2.4.2. Análisis electroforético de los cloroplastos	73
2.4.3. Obtención de enzimas citosólicas. Técnica del lixiviado de poler		75
2.4.4. Aislamiento y purificación de enzimas del fruto	76
2.5. Discusión.	86

2.1. - INTRODUCCION

2.1.1. - LOCALIZACION SUBCELULAR DE ISOENZIMAS.

La mayoría de los datos experimentales obtenidos en las isoenzimas vegetales en los últimos años, no solamente han ayudado a conocer la estructura de las poblaciones y las relaciones filogenéticas entre especies afines sino que también han permitido revelar algunos rasgos característicos de casi todos los sistemas enzimáticos. Entre los más importantes se encuentran la estabilidad del número de loci para sistemas enzimáticos específicos y la consecuente compartimentación subcelular de las isoenzimas. Este fenómeno ha sido analizado en profundidad por Gottlieb (1982), e investigaciones posteriores han confirmado y ampliado en general estas conclusiones.

En las plantas, el número de isoenzimas de un sistema enzimático particular, a menudo refleja el número de compartimentos subcelulares en los cuales se requiere la misma actividad enzimática (Gottlieb, 1982). En la tabla II - 1 presentamos el número de isoenzimas en una planta diploide "ideal" en la que se relacionan sólo aquellas isoenzimas visualizadas generalmente por procedimientos de tinción ordinarios.

Muchos de los sistemas enzimáticos presentes en esta tabla poseen más de una isoenzima. Una pregunta obvia sería el por qué las plantas requieren más de una isoenzima para una enzima particular. Esta redundancia ha sido atribuida a la necesidad de separar las isoenzimas de cada uno de los compartimentos subcelulares en los cuales tendrá lugar la misma reacción (Gottlieb, 1982). La concentración de metabolitos y el pH son diferentes en los distintos compartimentos, por lo que podría ser necesario la existencia de diferentes isoenzimas para que exista una catálisis eficaz.

Tabla II - 1. - Número, localización subcelular y estructura de isoenzimas en los sistemas más comúnmente ensayados.

Sistema Enzimático	Número de Isoenzimas	Distribución Subcelular	Estructura	Referencias
ACON	1-3	c, mt	Monómera	Brouquise y col. 1987
ADH	1-3	c	Dímera	Freeling y Schwarz, 1973
EST	2-10	c	Monómera	Tanksley y Rick, 1980
PGI	2	c, p	Dímera	Schnarrenberger y Oeser, 1974 Gottlieb, 1977
IDH (NADP)	1	c	Dímera	Tanksley, 1984 Ni y col. 1987
MDH(NAD)	3	c, mt, mb	Dímera	Goodman y col. 1980
PGM	2	c, p	Monómera	Weeden y Gottlieb, 1980 Navot y Zamir, 1986
6PGDH	2	c, p	Dímera	Weeden y Marx, 1984
SKDH	1-2	c, p	Monómera	Tanksley y Kuehn, 1985 Weeden y Gottlieb, 1980

Abreviaciones para los compartimentos subcelulares: c= citosol, p= plástidos, mt= mitocondria, mb= membrana.

Esta compartimentación de las funciones celulares es un rasgo típico de los organismos superiores, la cual es necesaria por razones de tipo energético y es de fundamental importancia en los procesos de metabolismo celular, regulación y diferenciación.

Para enzimas con funciones bioquímicas bien definidas y especialmente para aquellas que actúan en las rutas del metabolismo primario (glicolisis y ruta de las pentosas fosfato, ciclo de Calvin y de Krebs y biosíntesis de aminoácidos), se puede predecir el número de loci que se expresarán en la mayoría de las plantas diploides.

Cada una de las isoenzimas expresadas, tendrán una diferente localización subcelular y una estructura determinada. En contraste, otros sistemas enzimáticos, tales como peroxidasa, esterasa, diaforasa, fosfatasa ácida, etc... presentan una gran variación en el número total de las isoenzimas que se expresan, número de isoenzimas por compartimento subcelular y número de subunidades por enzima (Weeden y Wendel, 1990).

2.1.2. - LOCALIZACION SUBCELULAR DE LOS SISTEMAS 6PGDH, PGI Y PGM.

La 6-Fosfogluconato Deshidrogenasa (6-PGDH EC1.1.1.44) pertenece a la ruta oxidativa de las pentosas fosfato y cataliza la transformación del 6-Fosfogluconato a Ribulosa 5 Fosfato. Mediante esta ruta se genera NADPH cuando la glucosa-6-fosfato se oxida hasta ribosa-5-fosfato. Este azúcar de cinco carbonos o sus derivados, son componentes de biomoléculas importantes tales como el ATP, CoA, NAD, FAD, RNA y DNA. La vía de las pentosas fosfato cataliza también la interconversión de azúcares de tres, cuatro, cinco, seis y siete carbonos en una serie de reacciones no oxidativas.

Todas estas reacciones tienen lugar en el citosol. En las plantas, parte de la vía de las pentosas fosfato participa también en la formación de hexosas a partir de CO₂ en la fotosíntesis (en el interior del cloroplasto), obteniendo a partir de ella poder reductor en forma de NADPH, que servirá como dador de electrones en las biosíntesis reductoras (Stryer, 1988).

Esta enzima presenta dos formas isoenzimáticas diferentes, una localizada en los cloroplastos y la otra en el citosol en espinaca (Schnarrenberger y col., 1973) y en rábano (Schnarrenberger y col., 1975). En tomate, Tanksley y Kuehn (1985) detectan la presencia de cuatro formas isoenzimáticas, de las cuales una está localizada en los cloroplastos y las otras tres, presumiblemente en el citosol.

En el cloroplasto, como resultado del funcionamiento del ciclo de Benson-Calvin, se produce la incorporación neta de carbono inorgánico en moléculas orgánicas. Esto permite que algunos de sus intermediarios deriven hacia la síntesis de sacarosa y almidón como productos finales de la fijación y que, además, pueda regenerar sus intermediarios de forma autocatalítica.

El almidón constituye el principal polisacárido de reserva de las plantas, y la sacarosa el carbohidrato del que sacan especial provecho los demás tejidos de la planta. La ruta que lleva a la producción del almidón se halla íntegramente localizada dentro del cloroplasto, en tanto que la síntesis de la sacarosa se desarrolla en el citoplasma.

Los enzimas Fosfogluco Isomerasa (EC 5.3.1.9) y Fosfogluco Mutasa (EC 2.7.5.1) intervienen en las reacciones del metabolismo de las hexosas fosfato, presentando dos formas isoenzimáticas, una localizada en los cloroplastos y la otra en el

citosol (Schnarrenberger y Oeser, 1974; Mühlbach y Schnarrenberger, 1978).

Ambas enzimas catalizan en el cloroplasto las reacciones que conducen a la síntesis de almidón a partir de 3 Fosfoglicerato en condiciones de iluminación. Las reacciones también tienen lugar en la oscuridad cuando el almidón es degradado a Dihidroxiacetona Fosfato para exportar al citosol. Las isoenzimas citosólicas funcionarán en la ruta que va desde la Dihidroxiacetona Fosfato a la síntesis de sacarosa así como su degradación.

Estos patrones de isoenzimas así como su compartimentación subcelular, han sido establecidos en muchas otras enzimas del metabolismo de los azúcares fosfato, a excepción de las hojas de las plantas C₄, en las cuales la situación es diferente. Se ha detectado la presencia de al menos tres isoenzimas para PGI y PGM (Herbert y col., 1979). En las plantas C₄ (Hatch y Osmond, 1976) una de las tres isoenzimas está asociada con las células del mesófilo y las otras dos con las células de la vaina vascular (Herbert y col., 1979).

2.1.3. - TECNICAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO DE LA LOCALIZACION SUBCELULAR.

Existen dos técnicas que se pueden emplear para demostrar la presencia de una isoenzima particular en un orgánulo: aislamiento de orgánulos por medio de fraccionamiento subcelular y análisis de los extractos de polen.

La aproximación más directa para determinar la localización subcelular de las isoenzimas es el aislamiento de orgánulos y su posterior análisis electroforético. En muchos casos, los orgánulos son aislados mediante fraccionamiento celular combinando

distintas centrifugaciones diferenciales y utilizando diversos gradientes (Quail, 1979). Los problemas son muchos, e incluyen la selección del tampón con la osmolaridad y aditivos apropiados, las técnicas de homogenización y las condiciones de centrifugación.

Los tejidos de determinadas plantas son particularmente difíciles con respecto al aislamiento de orgánulos. En muchas especies, la envuelta de los cloroplastos es muy sensible a la ruptura celular, y el homogeneizado difícilmente proporciona cloroplastos intactos. Otro problema son los altos niveles de componentes fenólicos endógenos (Anderson, 1968). Sin embargo, mediante la inclusión de algunos aditivos al tampón de homogeneizado, se puede mejorar la calidad del extracto.

Una vez aislados los orgánulos, su pureza se puede comprobar mediante microscopía óptica y mediante medida de la actividad de enzimas marcadoras. Entre los marcadores más generalmente utilizados están la citocromo c oxidasa (para mitocondrias), la hidroxipiruvato reductasa (para peroxisomas).

Weeden y Gottlieb (1980) demuestran que a partir de pequeñas cantidades de polen (ej., 5 mgr) de diferentes especies, utilizando diferentes tampones, se pueden obtener enzimas citosólicas, mientras que las isoenzimas plastídicas, mitocondriales y de los microcuerpos, no eluyen con la misma rapidez. Las isoenzimas de los orgánulos se pueden extraer rápidamente si se homogeneiza el polen. Este procedimiento si bien no es válido para asignar una isoenzima particular a un orgánulo específico, sí lo es en una primera aproximación a la interpretación de los zimogramas complejos (Warwick y Gottlieb, 1985; Bayer y Crawford, 1986). La interpretación de los patrones de isoenzimas derivados del polen, debe realizarse con cautela, ya que la ausencia de una enzima en el lixiviado de polen no indica necesariamente que la isoenzima sea organular, ya que

podría ocurrir que no se expresara o que no fuera lixiviable. Por lo tanto, hay que hacer notar que la proporción de enzimas expresadas en el polen puede no ser idéntica a la expresada en los tejidos somáticos (Tanksley y col., 1981; Sari-Gorla y col., 1986).

2.1.4. - ORIGEN DE LAS ISOENZIMAS CLOROPLASTICAS.

La presencia de isoenzimas cloroplásticas puede ser postulada como una consecuencia natural del origen endosimbionte de estos orgánulos (Margulis, 1970). Este modelo sugiere que las proteínas actuales que contiene el cloroplasto estaban ya especificadas en el genoma del simbionte procarionta. Durante la evolución de las células de la planta, los genes codificadores del simbionte se transfirieron al núcleo, pero los productos proteicos de estos genes desplazados seguirían reteniendo su especificidad por el cloroplasto. Experimentos con plantas que carecen de la capacidad para sintetizar proteínas en los plastos, confirman que muchas proteínas específicas de los plástidos son sintetizadas en los ribosomas citosólicos (Boulter y col., 1972; Feirabend y Mikus, 1977).

Por otra parte, la existencia de isoenzimas con una diferente compartimentación celular, sería consecuente con el hecho de que el intercambio de muchos azúcares fosfato, nucleótidos y coenzimas entre los dos compartimentos está muy limitado por la envuelta cloroplástica.

2.1.5. - EXISTENCIA DE VARIABILIDAD EN LOS DIFERENTES COMPARTIMENTOS.

Se ha observado la existencia de diferencias significativas en la variabilidad

entre las isoenzimas cloroplásticas y citosólicas. En *Clarkia*, la enzima PGI presenta 6 alozimas para su forma plastídica, mientras que presenta 20 variantes en la forma citosólica (Weeden y Gottlieb, 1980). Así mismo, la movilidad electroforética de todas las isoenzimas plastídicas es muy similar, a menudo migran en la misma región del gel, en contraste con las isoenzimas citosólicas que suelen ser diferentes.

Estas diferencias entre las dos isoenzimas pueden estar relacionadas con los requerimientos para el transporte del posible precursor plastídico a través de la envuelta del cloroplasto como también con el ambiente interno especializado del cloroplasto. (Gottlieb, 1982).

2.2. - OBJETIVOS

La doble compartimentación, cloroplástica y citosólica, de las rutas glicolítica y de las pentosas fosfato ha sido demostrada en diferentes especies vegetales, pero los estudios realizados al respecto en solanáceas son escasos. Esta es la razón por la que nos propusimos determinar la localización subcelular de los sistemas enzimáticos 6-PGDH, PGI y PGM en *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, utilizando técnicas de fraccionamiento subcelular y de purificación de orgánulos, para la obtención de cloroplastos. La posterior comparación de la fracción cloroplástica y la fracción citosólica obtenida mediante lixiviado de polen, con la de extractos de hojas por medio de electroforesis en geles de almidón, nos va a permitir identificar las diferentes isoenzimas con su compartimentación subcelular correspondiente.

2.3. - MATERIAL Y METODOS

2.3.1. - MATERIAL VEGETAL.

La obtención del material vegetal ha sido indicado en el apartado 1.3.1. Se han utilizado hojas de plantas y pericarpio de frutos verdes de pimiento *Capsicum annuum* L. var. *annuum* cultivados en invernadero.

2.3.1. - AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE CLOROPLASTOS.

A la hora de realizar la extracción de cloroplastos, con independencia del método, existen una serie de consideraciones que son generales.

- El material utilizado fue sometido a un proceso previo de oscuridad (12 horas) a 4°C, para evitar el exceso de almidón durante la extracción.

- El material fué lavado convenientemente y cortado en pequeños trozos, con el fin de facilitar la extracción de los cloroplastos y disminuir la ruptura de los mismos.

- Para reducir la concentración de Percoll o sacarosa, en las fracciones obtenidas de los gradientes, éstas se diluyeron convenientemente con tampón Tris ClH 50 mM pH 7,5 con DTT 10 mM antes de realizar los ensayos de las actividades enzimáticas. En algunas ocasiones, las bandas de cloroplastos en los gradientes se recuperaron con ayuda de una jeringa y se diluyeron 10 veces con el medio de lavado correspondiente al protocolo realizado, con el fin de eliminar el Percoll o la sacarosa. Los cloroplastos se recuperaron a las g a las que se habían obtenido en el proceso de aislamiento, resuspendiéndose posteriormente en un pequeño volumen de medio de lavado.

- Todas las operaciones se realizaron a 4°C.

2.3.2.1. - Aislamiento y purificación de cloroplastos de hojas.

Para el aislamiento y purificación de cloroplastos se empleó el método de Palma y col. (1986), que es una modificación del método descrito por Schwitzguebel y Siegenthaler (1984).

Para la obtención de cloroplastos, las hojas se homogeneizaron en un medio que contenía manitol 0,35 M, cisteína 4 mM, EDTA.Na₂ 1 mM, BSA al 0,2% en tampón MOPS-KOH 30 mM pH 7,5 con una proporción 1:2, p:v.

El proceso se realizó bien con mortero, macerando suavemente, o con una batidora Hamilton con golpes de 2 seg a velocidad máxima. El homogeneizado se filtró a través de 8 gasas y una tela de Miracloth (40µ de diametro de poro), y el eluido resultante se centrifugó a 80xg durante 1 minuto.

El sobrenadante de esta primera centrifugación, se sometió a continuación a una centrifugación de 3000xg durante 1 minuto. El precipitado, enriquecido en cloroplastos, se resuspendió cuidadosamente con ayuda de un pincel nº 4, en un medio de lavado que contenía manitol 0,3 M, EDTA.Na₂ 1 mM, BSA al 0,2% en tampón MOPS-KOH 20 mM pH 7,2 y se centrifugó nuevamente a 3000xg durante 1 minuto.

El nuevo precipitado de cloroplastos lavados se resuspendió con sumo cuidado, en un volumen mínimo de medio de lavado (1-2 ml) y se depositó 1 ml de esta suspensión sobre un gradiente discontinuo de Percoll, con la siguiente composición: 1,3 ml al 60%; 3,1 ml al 45%; 2 ml al 27% y 2 ml al 21% de Percoll (v/v). Las últimas capas estaban suplementadas con 1,2-propanodiol 0,1 M. Los gradientes se prepararon en tampón MOPS-KOH 10 mM pH 7,2 conteniendo sacarosa 0,25M y BSA al 0,2%.

Los gradientes se centrifugaron a 20.000xg durante 30 minutos (Beckman J2-21, rotor JS-13.1). El gradiente se eluyó por desplazamiento ascendente de sacarosa (45%) empleándose un fraccionador de gradientes (Beckman Fraction Recovery System). Las fracciones se recogieron en volúmenes de 1 ml.

La identificación de los cloroplastos a lo largo del gradiente se realizó mediante la medida del contenido de clorofila en todas las fracciones. Las actividades hidroxipiruvato reductasa y citocromo c oxidasa se emplearon como marcadores enzimáticos de peroxisomas y mitocondrias, respectivamente. Se determinó también la densidad en todas las fracciones del gradiente, y la integridad de los cloroplastos en los picos de clorofila del gradiente.

2.3.2.2. - Aislamiento de cloroplastos a partir de frutos.

Los cloroplastos fueron obtenidos a partir de pericarpio de frutos verdes de *Capsicum annuum* L. var. *annuum*. Para realizar el aislamiento se siguió un método básicamente similar al utilizado con las hojas, diferenciándose sólo en la composición del gradiente.

El pericarpio de fruto, previamente lavado, se cortó en pequeños trozos y se dejaron impregnar durante 10 minutos en tampón de homogeneizado, en una proporción 1:2, p:v. Tanto la composición de los medios (medio de homogeneizado y lavado) así como el protocolo a seguir, hasta llegar a gradiente, fue exactamente el mismo al utilizado para la obtención de cloroplastos a partir de hojas.

El precipitado de cloroplastos lavados se resuspendió con sumo cuidado, con la ayuda de un pincel fino, en un volumen mínimo de medio de lavado (1 ml) y se depositó sobre un gradiente discontinuo de Percoll, con la siguiente composición: 4,5 ml

al 45% y 4,5 ml al 15% de Percoll (v/v). Los gradientes se prepararon en tampón MOPS-KOH 10 mM pH 7,2 conteniendo sacarosa 0,25 M y BSA al 0,2%.

La centrifugación se realizó a 20.000xg durante 30 minutos (Beckman J2-21, rotor JS-13.1). El gradiente se eluyó por desplazamiento ascendente de sacarosa (45% p/p) empleando un fraccionador de gradientes (Beckman Fraction Recovery System). Las fracciones se recogieron en volúmenes de 1 ml.

2.3.3. - ESTUDIO DEL GRADIENTE.

2.3.3.1. - Determinación de clorofila.

La concentración de clorofila se determinó según el método de Amon (1949). La clorofila fue extraída con acetona al 80%, con protección frente a la luz, centrifugándose posteriormente a 1700xg durante 10 minutos a 4°C. La concentración de clorofila se determinó en los sobrenadantes por medida de la absorbancia a 652 nm frente a un blanco que contenía acetona al 80% en agua.

2.3.3.2. - Determinación de la densidad.

La determinación de la densidad aproximada de las soluciones de Percoll se llevó a cabo, a temperatura ambiente, con un refractómetro de mano Shibuya (p/p). Los porcentajes de concentración obtenidos por refractometría se convirtieron en densidad (g/cm³) a partir de datos de densidad de Percoll (Pharmacia Fine Chemicals, 1980) y mediante las expresiones desarrolladas por Sandalio (1987):

$$\text{densidad} = 0,0093 \times C + 0,9549$$

donde C es la concentración medida por el refractómetro, en %.

2.3.3.3. - Determinación de la integridad de los cloroplastos.

La integridad de los cloroplastos aislados se determinó por el método de Lilley y col. (1975) basado en la reducción del ferricianuro, siguiendo la disminución de la absorbancia a 410 nm. Se utilizó un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV-160A. Para cada muestra analizada se efectuaron dos reacciones, una en medio isotónico y otra en medio hipotónico, respectivamente. En el primer caso, la mezcla de reacción, mantenida en agitación constante en un volumen final de 3 ml, contenía sorbitol 0,32 M, EDTA.Na₂ 2 mM, Cl₂Mg 1 mM, Cl₂Mn 1 mM, D,L-gliceraldehido 10 mM, CINH₄ 2,5 mM en tampón Hepes-NaOH 50 mM pH 7,6 y un volumen adecuado de muestra. La reacción se inició por la adición, en la cubeta problema, de ferricianuro a una concentración final de 0,05 mM, y se siguió el curso de la reducción del ferricianuro a 410 nm y 25°C durante 5 -10 minutos. En medio hipotónico se sustituyó el sorbitol por agua destilada, manteniéndose constantes las concentraciones de los demás reactivos así como las condiciones de ensayo.

Una vez determinados los incrementos de absorbancia de las dos reacciones, el porcentaje de integridad de los cloroplastos se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$\% \text{ Integridad} = 100 - \frac{P_I}{P_L} \times 100$$

donde P_I = pendiente de la reacción con cloroplastos "íntegros" y P_L = pendiente de la reacción con cloroplastos lisados.

2.3.4. - MEDIDA DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

2.3.4.1. - Citocromo C oxidasa (EC 1.9.3.1).

La medida de la actividad citocromo c oxidasa usando citocromo c reducido como sustrato, se realizó de acuerdo a Schnarrenberger y col. (1971).

La enzima (25-100 μ l) se preincubó con 0,4 ml de tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7,0 y Tritón X-100 al 0,75% (v/v) durante tres minutos, a temperatura ambiente. A continuación, se inició la reacción por la adición de citocromo c reducido 24 μ M, preparado en el mismo tampón. El curso de la misma se siguió por registro continuo de la disminución de la absorbancia a 550 nm y 25°C frente a un blanco con citocromo c oxidado, compuesto por 0,4 ml de Tritón X-100 al 0,75% (v/v), citocromo c reducido 24 μ M, tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7,0 y 10 μ l de una solución saturada de ferricianuro potásico, preparado en el tampón anterior.

El citocromo c reducido se preparó añadiendo, a una solución de citocromo c 24 μ M preparada en el tampón de reacción, ditionito sódico hasta una concentración final de 0,4 mM.

Las actividades enzimáticas en todos los ensayos se calcularon utilizando un ϵ_{550} de $21 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el producto de la oxidación enzimática del citocromo c reducido (Tolbert y col., 1968).

2.3.4.2. - Hidroxipiruvato Reductasa (EC 1.1.1.29).

Se utilizó el método descrito por Tolbert y col. (1970) que consiste en la medida, a 340 nm y 25°C, de la oxidación del NADH a NAD acoplada a la reducción del hidroxipiruvato a glicerato.

La mezcla de reacción, en un volumen final de 1 ml, contenía Tritón X-100 al 0,5% (v/v), NADH 4 mM, hidroxipiruvato 10 mM, tampón fosfato potásico 20 mM pH 6,2 y enzima. La reacción se iniciaba por la adición del hidroxipiruvato, siguiéndose la desaparición del NADH a 340 nm durante 5 minutos en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A.

2.3.4.3. - Fosfoenol Piruvato Carboxilasa (EC 4.1.1.31).

Se utilizó el método descrito por Besford y col. (1985). La actividad fosfoenol piruvato carboxilasa se midió utilizando un sistema de enzimas acopladas donde el fosfoenol piruvato es carboxilado a oxalacetato, el cual a su vez es reducido por el NADH a malato, cambio que se traduce en un cambio en la absorbancia a 340 nm.

Para los ensayos rutinarios, los medios de reacción contenían: NADH 0,35 mM, 24 unidades de MDH, Cl_2Mg 10 mM, EDTA. Na_2 0,2 mM, DTT 2,5 mM, CO_3HK 5 mM, tampón Hepes-KOH 50 mM pH 8,00 y una cantidad apropiada de enzima. La reacción se iniciaba por la adición de fosfoenol piruvato a una concentración final 4 mM.

Las actividades enzimáticas en estos dos ensayos se calcularon utilizando un ϵ_{340} de $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el producto de la oxidación enzimática del NADH (Vigil, 1983).

2.3.4.4. - 6-Fosfogluconato Deshidrogenasa (EC 1.1.1.44).

La medida de la actividad enzimática 6-fosfogluconato deshidrogenasa se realizó según el método descrito por Tanksley y Kuehn (1985), utilizando 6-fosfogluconato como sustrato. La actividad enzimática era estudiada observando la

reducción del NADP a NADPH detectándose por un cambio en la absorbancia a 340 nm.

Los medios de reacción estaban compuestos por NADP 1,3 mM, 6-fosfogluconato 2,1 mM, tampón Tris ClH 0,1 M pH 7,5 y enzima. La reacción se iniciaba por la adición del sustrato y los incrementos de absorbancia a 340 nm se siguieron durante 5 minutos a 25°C utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A.

2.3.4.5. - Fosfogluco Isomerasa (EC 5.3.1.9).

La medida de la actividad fosfogluco isomerasa se midió según el método descrito por Weeden y Gottlieb (1982) a 25°C mediante un sistema de enzimas acopladas en el cual se añadió fructosa-6-fosfato como sustrato y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa como enzima acoplada. La producción de NADPH por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa era registrada a 340 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A.

La mezcla de reacción contenía NADP 0,5 mM, fructosa 6 fosfato 10 mM, Cl₂Mg 10 mM, 0,5 u/ml de G6PDH, tampón Tris ClH 0,1 M pH 8,0 y enzima. La reacción se inició por la adición de fructosa 6 fosfato y los incrementos de absorbancia a 340 nm se siguieron durante 5 minutos.

2.3.4.6. - Fosfogluco Mutasa (EC 2.7.5.1).

La medida de la actividad fosfogluco mutasa usando glucosa 1 fosfato como sustrato, se realizó de acuerdo a Sicher (1989), con ligeras modificaciones, mediante un sistema de enzimas acopladas, en el cual se añadía glucosa 1 fosfato como sustrato y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa como enzima acoplada.

Los medios de reacción estaban compuestos por NADP 0,5 mM, glucosa 1

fosfato 2 mM, 0,5 u/ml de G6PDH, tampón Tris ClH 0,1 M pH 8,0 y enzima. La reacción se inició por la adición de glucosa 1 fosfato y los incrementos de absorbancia a 340 nm se siguieron durante 5 minutos.

Las actividades enzimáticas empleadas en estos tres ensayos se calcularon utilizando un ϵ_{340} de $6,22 \times 10^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el producto de la oxidación enzimática del NADP.

Las actividades enzimáticas, se expresaron en nkat para todos los ensayos enzimáticos (cantidad de enzima que convierte un nmol por segundo (nmol s^{-1}) de sustrato en producto).

2.3.5. - TECNICA DEL LIXIVIADO DE POLEN.

La técnica del lixiviado de polen se realizó según el método descrito por Weeden y Gottlieb (1980).

El polen fresco se recogió a partir de flores de *Capsicum annum* L. var. *annuum* y se depositó directamente en un tampón Tris ClH 50 mM pH 8,00. Aproximadamente se depositaron 15 mgr de polen en 1 ml de tampón, y se dejó lixiviar de 4 a 24 horas a 4°C. Los extractos eran utilizados posteriormente para la electroforesis (25 μ l) y para la realización de las medidas enzimáticas.

El homogeneizado de polen se obtenía triturando el lixiviado con la ayuda de un poter, en el mismo tampón en que se depositaba a lixiviar, y a continuación se congelaba. Posteriormente se procedía a su inmediata descongelación y se centrifugaba a 20.000xg durante 5 minutos (Biofuge). A continuación se recogía el sobrenadante y se procedía a realizar las medidas de las actividades enzimáticas así como la electroforesis en gel de almidón.

2.2.6. - OTROS METODOS.

La separación de las isoenzimas de los diferentes sistemas estudiados, mediante electroforesis en geles de almidón, se ha descrito en el apartado 1.3 así como los medios de revelado utilizados para su tinción.

2.4. - RESULTADOS

2.4.1. - LOCALIZACION SUBCELULAR.

Con objeto de investigar la localización subcelular de las isoenzimas de cada uno de los sistemas enzimáticos 6-PGDH, PGI y PGM se aislaron cloroplastos a partir de hojas de pimiento de Padrón y se purificaron posteriormente en un gradiente de Percoll.

La tabla II - 2 muestra algunas características fisiológicas de la preparación de cloroplastos obtenidos por centrifugación en dicho gradiente. En este se puede apreciar la existencia de tres picos de clorofila que se corresponden con la 2ª, 3ª y 7ª fracción. Estos picos representan la fracción de cloroplastos rotos, ($d = 1.043$) y las dos siguientes, las fracciones de cloroplastos íntegros ($d = 1.061$, Integridad = 86,33% y $d = 1.076$, Integridad = 78,0% respectivamente) (Figura II - 1). Los cloroplastos íntegros fueron identificados por la medida de la integridad mediante el test del ferricianuro, como figura en el apartado 2.3.3.3.

Con objeto de determinar la contaminación por otros orgánulos se utilizaron las siguientes enzimas: citocromo c oxidasa como marcadora de mitocondrias y hidroxipiruvato reductasa como marcadora de peroxisomas.

Respecto a la contaminación por mitocondrias, la enzima citocromo c oxidasa presentaba un máximo de gran actividad, que coincidía con los cloroplastos rotos (fracción 2ª, $d = 1.043$) (Tabla II - 2; Figura II - 2). Debido a que las mitocondrias presentan un grado de sedimentación muy similar al de los cloroplastos, resultaba muy difícil obtener preparaciones de cloroplastos totalmente libres de mitocondrias. A pesar de ello, la contaminación por mitocondrias en la segunda fracción de cloroplastos íntegros, fue mínima.

Tabla II - 2. - Características fisiológicas de las diferentes fracciones de un gradiente de Percoll, utilizado para el aislamiento de cloroplastos a partir de hojas de pimiento de Padrón. Las actividades se expresan en nkat/ml y los resultados son el promedio de tres experiencias independientes.

Fracción	mgr Chl/ml	Densidad	%Int.	Cit. C Oxid.	HyPr.	PGI
Homogeneizado	0,118	-	-	0,215	0,531	9,310
Suspensión	0,319	-	-	0,415	0,182	9,590
1	0,011	1,021	-	0,046	0,010	0,666
2	0,331	1,043	33,66	0,365	0,019	1,128
3	0,051	1,061	86,33	0,056	0,015	1,394
4	0,017	1,067	-	0,034	0,010	1,012
5	0,014	1,071	-	0,016	0,016	1,178
6	0,020	1,074	-	0,049	0,015	0,979
7	0,053	1,076	78,00	0,016	0,010	1,726
8	0,012	1,079	-	0,019	0,019	0,410
9	0,014	1,087	-	0,021	0,015	0,730
10	0,013	1,088	-	0,016	0,010	0,531

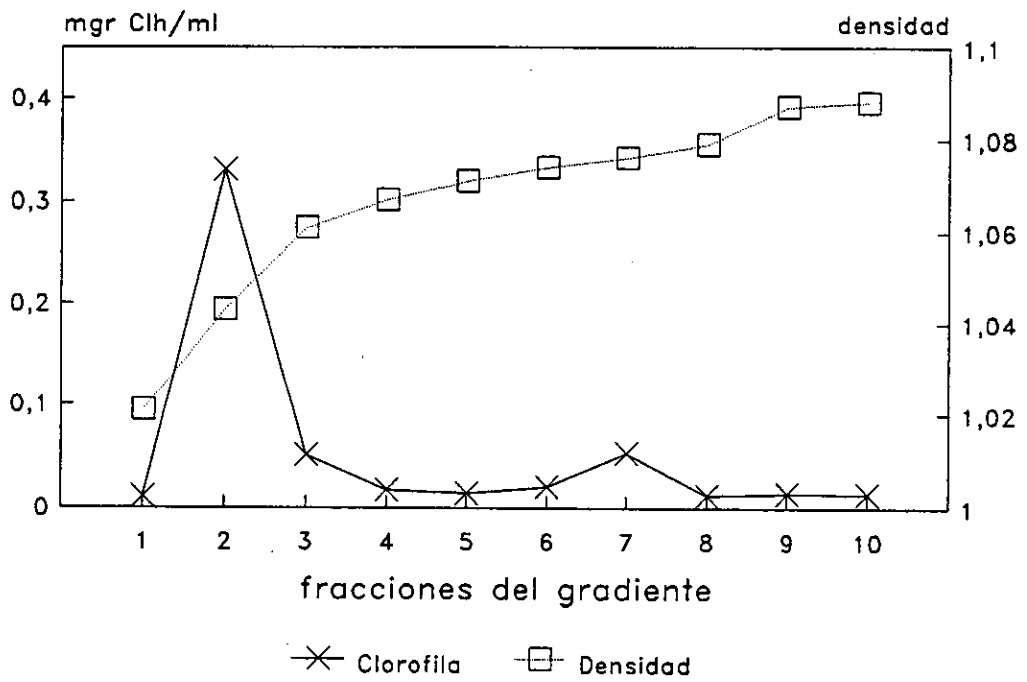


Figura II - 1. - Distribución de clorofila (mgr/ml) y densidad a lo largo del gradiente de Percoll. Las fracciones se recogieron en volúmenes de 1 ml.

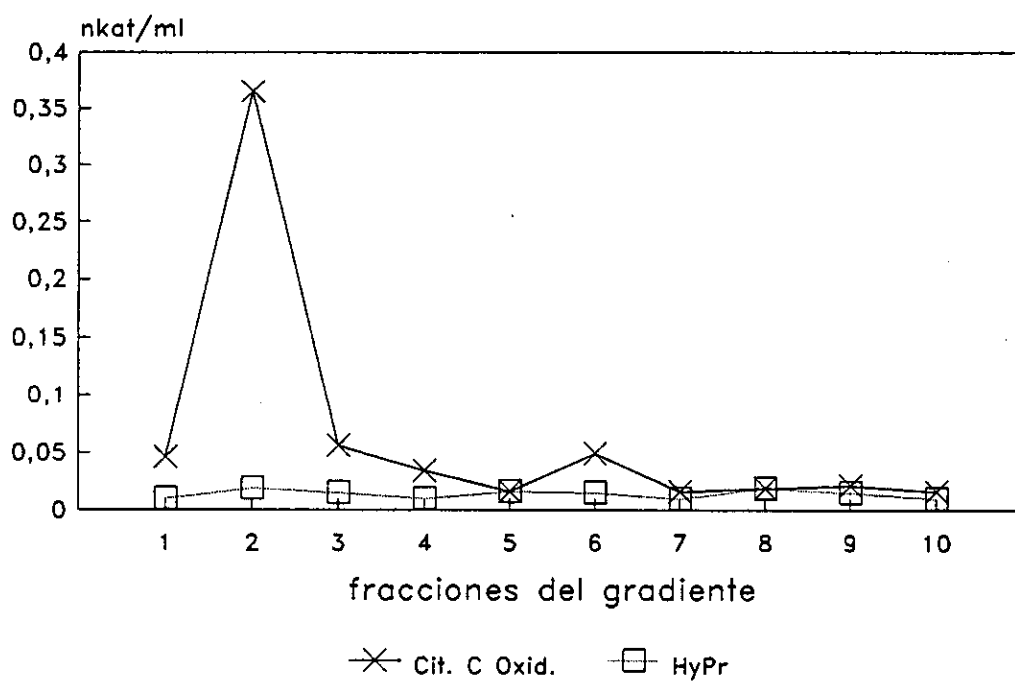


Figura II - 2. - Distribucción de enzimas marcadoras de contaminación a lo largo del gradiente de Percoll. Citocromo C oxidasa (Cit. C Oxid.) e Hidroxipiruvato Reductasa (HyPr). Las fracciones se recogieron en volúmenes de 1 ml.

La enzima hidroxipiruvato reductasa presentaba dos picos de actividad, uno en la fracción 2ª y otro en la fracción 8ª ($d = 1.043$ y $d = 1.079$ respectivamente, Tabla II - 2; Figura II - 2). Si comparamos los valores de la actividad hidroxipiruvato reductasa en los cloroplastos purificados pertenecientes a la 3ª fracción con los de la suspensión, cloroplastos sin purificar (Tabla II - 2), observamos que la contaminación de los primeros se ha reducido a un 8,24%.

A continuación se analizaron las diferentes fracciones del gradiente, respecto a la actividad de la enzima PGI. Se observó la existencia de dos picos de actividad, que se correspondían con la fracción 3º y 7º y que comprendían en conjunto un 32,53% de la actividad PGI (Tabla II - 2) respecto a la fracción de cloroplastos sin purificar.

2.4.2. - ANALISIS ELECTROFORETICO DE LOS CLOROPLASTOS.

Mediante el aislamiento de cloroplastos y posterior visualización por electroforesis, pudimos determinar la localización de la forma cloroplástica, asignando la localización de la forma citosólica por exclusión. Sometimos las fracciones de cloroplastos purificados a electroforesis en geles de almidón, comparándolas con la del homogeneizado de hoja.

El sistema 6-PGDH presenta dos zonas de actividad anódica denominadas 6-PGDH-a y 6-PGDH-b (Figura I - 2B). La más rápida está constituida por 3 bandas presentando 6-PGDH-b, una sola banda. La fracción de cloroplastos, en los geles de almidón, presenta actividad sólo en la zona correspondiente a 6-PGDH-a, (la más anódica) de lo que podemos inferir que esta sería la forma cloroplástica (Figura II - 3A).

La enzima PGI migra hacia dos regiones en los geles de almidón. Hemos denominado PGI-a la más anódica y PGI-b, a la menos anódica presentando cada

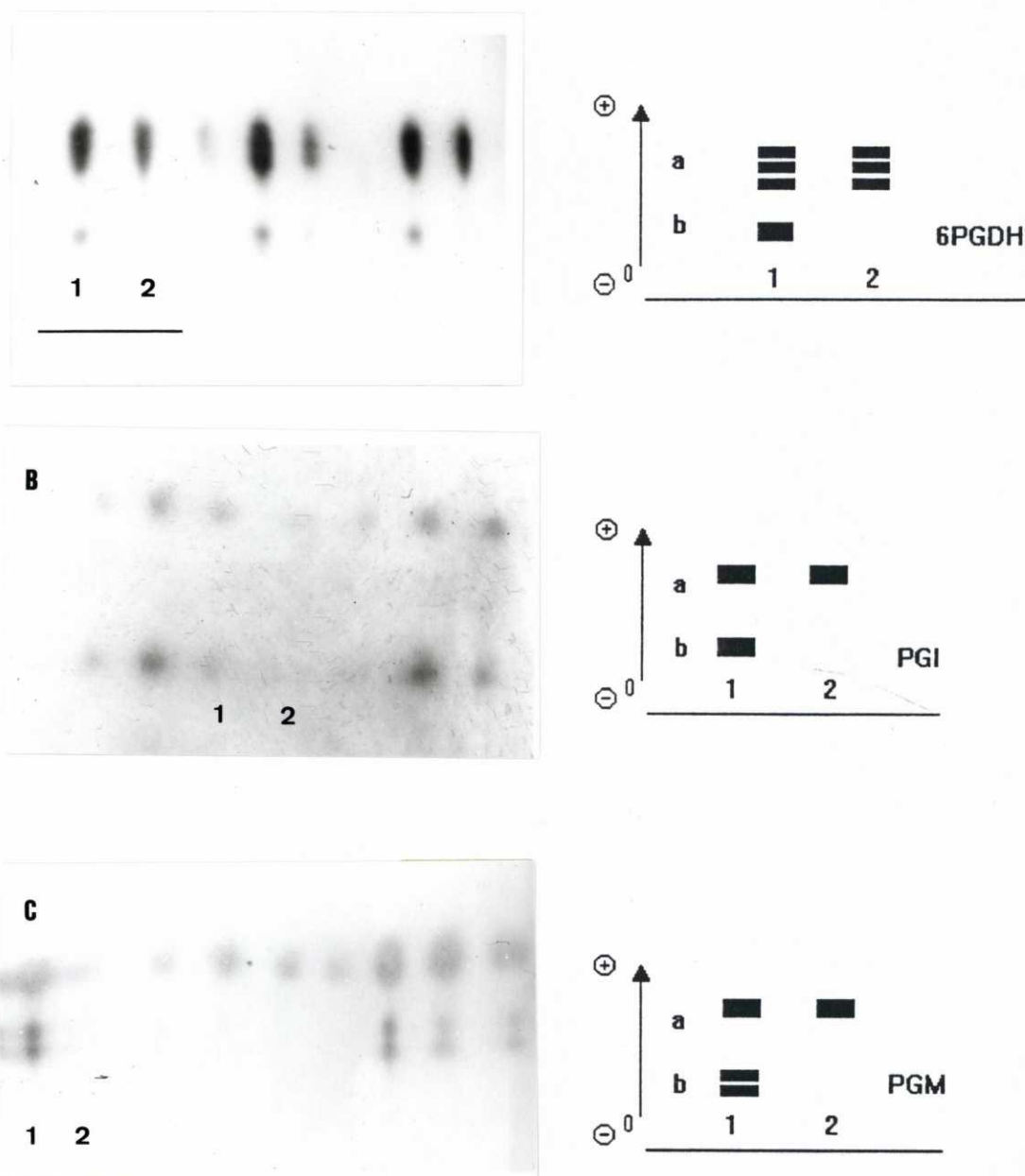


Figura II - 3. - Patrones de isoenzimas, en geles de almidón, de los sistemas 6PGDH (A), PGI (B) y PGM (C). Línea 1: homogeneizado de hoja. Línea 2: fracción de cloroplastos.

región una sola banda (Figura I - 6A). La fracción de cloroplastos contiene solo la isoenzima PGI-a, por lo tanto la forma rápida se correspondería con la forma isoenzimática cloroplástica (Figura II - 3B).

El sistema PGM presenta dos zonas de actividad anódicas. PGM-a no llega a definirse con claridad en los geles de almidón, mientras que PGM-b aparece constituida por dos bandas (Figura I - 6B). Cuando comparamos los patrones electroforéticos del homogeneizado de hoja y la fracción de cloroplastos, estos sólo presentan actividad en la zona más anódica del gel, de lo que se puede deducir que PGM-a sería la forma cloroplástica (Figura II - 3C).

2.4.3. - OBTENCION DE ENZIMAS CITOSOLICAS. TECNICA DEL LIXIVIADO DE POLEN.

Para obtener el complemento de enzimas citosólicas, desarrollamos la técnica del lixiviado de polen, que nos permitió obtener las enzimas presentes en el citosol de una forma rápida y simple, y con una contaminación mínima por otros orgánulos.

El primer paso a establecer era determinar el tiempo óptimo de lixiviado, considerando para ello el mayor porcentaje de una enzima marcadora citosólica y que a su vez, estuviera acompañado por una baja contaminación.

Para ello, se midieron las actividades enzimáticas de tres enzimas: fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPc: marcadora citosólica), citocromo c oxidasa (Cit. C. oxid.: marcadora mitocondrial) e hidroxipiruvato reductasa (HyPr: marcadora de peroxisomas) a diferentes tiempos, y se estableció el % en relación a la actividad de las mismas en el homogeneizado de polen, en el cual estaría presente tanto el componente citosólico como plastídico.

Como se puede observar en la tabla II - 3, el tiempo óptimo era alrededor de las 8 horas, tiempo en el que encontramos el mayor porcentaje de la enzima citosólica (PEPc - 43,48%), actividad que disminuye a medida que aumenta el tiempo de lixiviado, para alcanzar un mínimo a las 24 horas (Figura II - 4). Por otra parte, la contaminación que presenta el lixiviado de polen a las 8 horas es mínimo. En el caso de la contaminación por mitocondrias, ésta es nula a excepción de las 24 horas, en que presenta un valor del 1,27%. La enzima HyPr permanece más o menos constante con independencia del tiempo (5,35-6,60%) (Tabla II - 3; Figura II - 4).

Procedimos a continuación a medir la actividad de los tres sistemas enzimáticos que estábamos ensayando. Como se puede apreciar en la tabla II - 4, 6-PGDH presenta su óptimo a las 24 horas (4,23%) mientras que PGI y PGM presentan un óptimo a las 8 horas, si bien existe un ligero incremento a las 24 horas. (Figura II- 5).

A continuación ensayamos los diferentes extractos (lixiviado de polen y extracto de hoja) en geles de almidón, para determinar la movilidad electroforética de estas presumibles formas citosólicas.

En los diferentes sistemas estudiados, el lixiviado de polen se caracterizó por aparecer en una única zona del gel, que coincidía con las formas menos anódicas de las enzimas estudiadas que denominamos 6-PGDH-b, PGI-b y PGM-b (Figura II - 6A y B).

2.4.4. - AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ENZIMAS DE FRUTO.

Paralelamente, realizamos el aislamiento de cloroplastos a partir de frutos verdes de *Capsicum* utilizando un gradiente diferente de Percoll con objeto de mejorar la actividad de las isoenzimas cloroplásticas y tratar de reducir la contaminación, principalmente por mitocondrias. Ya que el comportamiento era similar al de las hojas

Tabla II - 3. - Actividades enzimáticas marcadoras en el lixiviado de polen a diferentes tiempos. Las actividades se expresan en nkat/ml y los resultados son el promedio de tres experiencias independientes.

Fracción	PEPc		Cit. C Oxid.		HyPr	
	nkat/ml	%	nkat/ml	%	nkat/ml	%
Homogeneizado						
Polen	1,35	100	0,864	100	1,53	100
Lixiviado Polen						
4 horas	0,186	13,77	0,000	0	0,082	5,35
8 horas	0,587	43,48	0,000	0	0,101	6,60
12 horas	0,362	26,81	0,000	0	0,088	5,75
24 horas	0,080	5,92	0,011	1,27	0,088	5,75

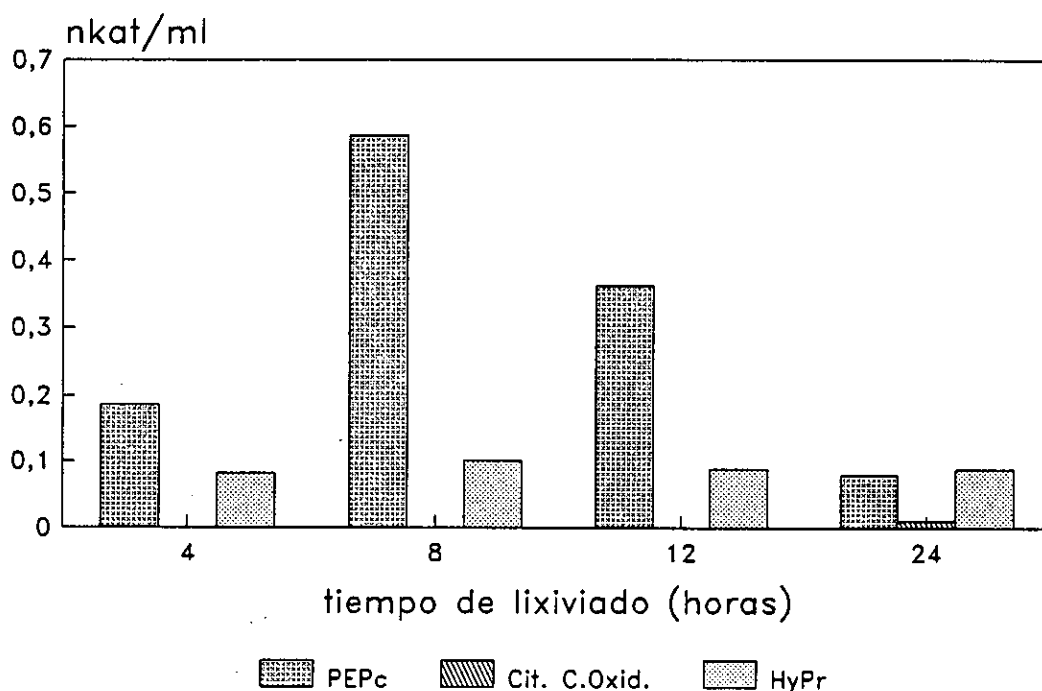


Figura II - 4. - Distribución de las actividades enzimáticas marcadoras, a lo largo del tiempo, del lixiviado de polen. Fosfoenol Piruvato Carboxilasa (PEPc), Citocromo C oxidasa (Cit. C Oxid.) e Hidroxipiruvato Reductasa (HyPr). Las actividades se expresan en nkat/ml.

Tabla II - 4. - Actividades enzimáticas en el lixiviado de polen en diferentes tiempos. Las actividades se expresan en nkat/ml y los resultados son el promedio de tres experiencias independientes.

Fracción	6PGDH		PGI		PGM	
	nkat/ml	%	nkat/ml	%	nkat/ml	%
Homogeneizado						
Polen	1,56	100	6,52	100	5,33	100
Lixiviado Polen						
4 horas	0,017	1,08	0,995	15,26	0,047	0,8
8 horas	0,017	1,08	1,611	24,70	0,118	2,2
12 horas	0,012	0,7	0,971	14,89	0,028	0,4
24 horas	0,066	5,28	1,46	22,39	0,059	0,93

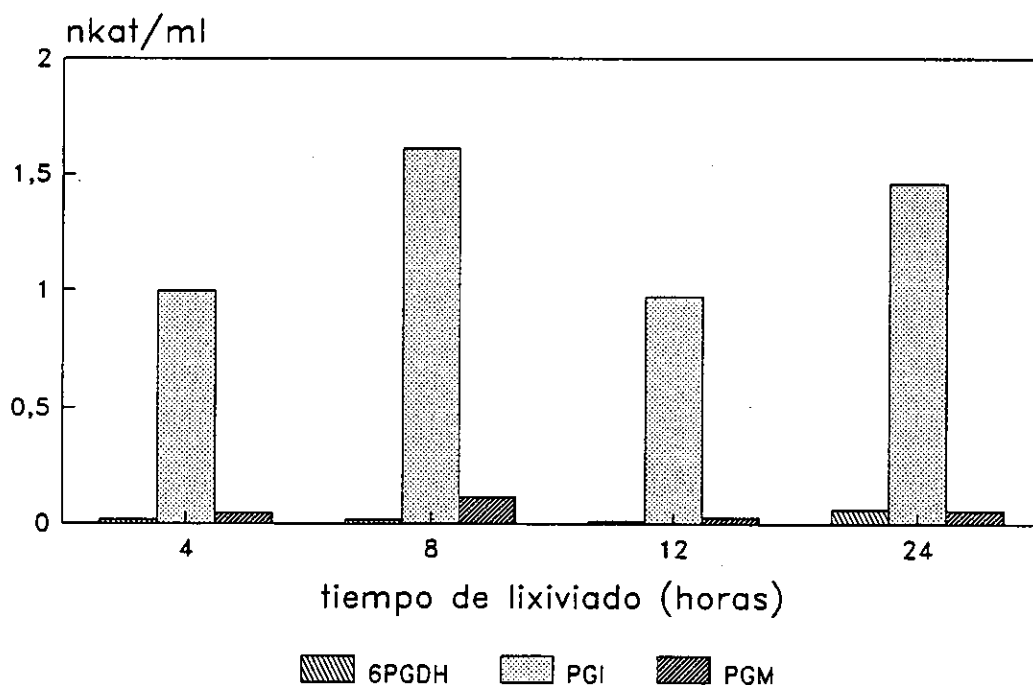


Figura II - 5. - Distribución de las actividades enzimáticas, a lo largo del tiempo, del lixiviado de polen. 6-Fosfogluconato Deshidrogenasa (6-PGDH), Fosfogluco Isomerasa (PGI) y Fosfogluco Mutasa (PGM). Las actividades se expresan en nkat/ml.

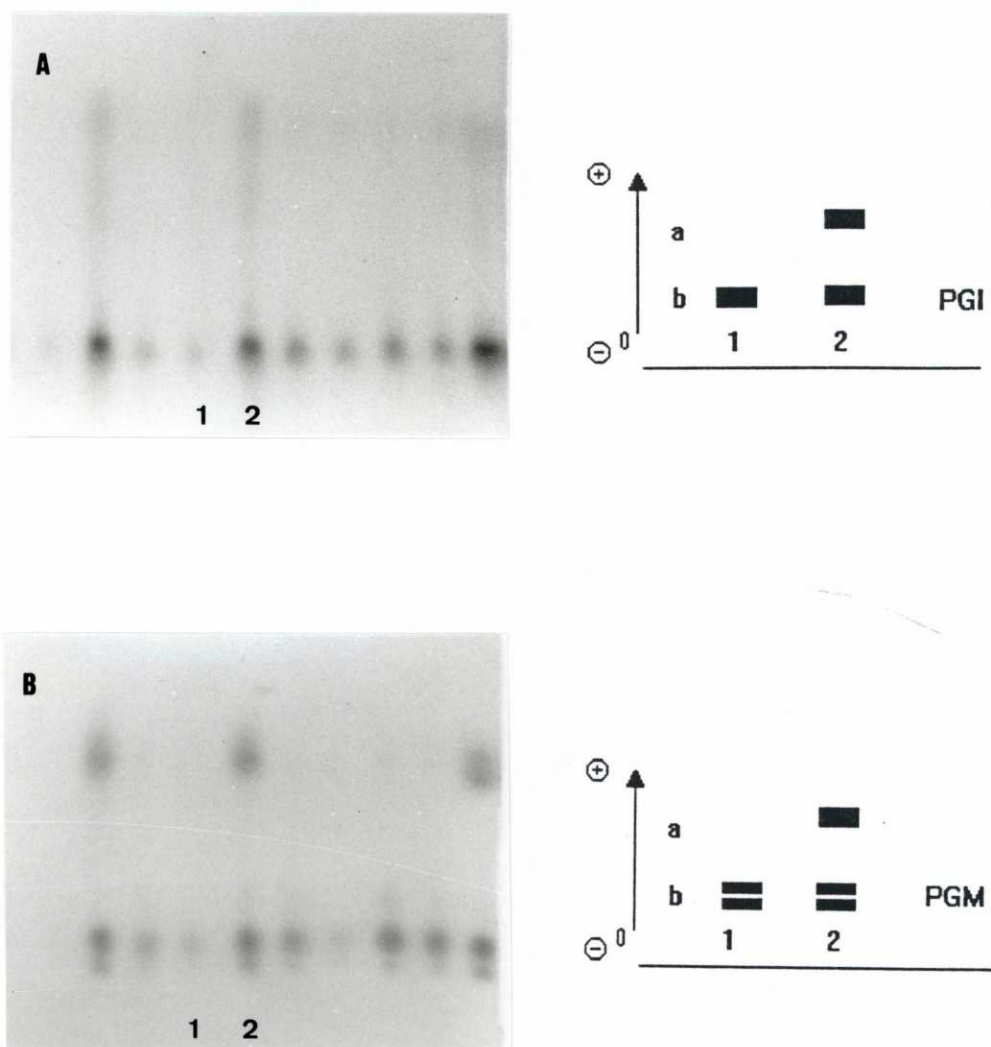


Figura II - 6. - Patrones de isoenzimas, en gels de almidón, de los sistemas PGI (A), y PGM (B). Línea 1: lixiviado de polen. Línea 2: homogeneizado de hoja.

solamente hemos estudiado las fracciones enriquecidas en cloroplastos.

Los resultados que se pueden observar en la tabla II - 5 muestran como, este tipo de gradiente, nos permitió aumentar la actividad específica de las isoenzimas cloroplásticas. Con ello se consiguió una mejor visualización de las enzimas en el revelado de la electroforesis. Sin embargo, no se logró eliminar la contaminación por mitocondrias.

También se realizaron ensayos de aislamiento de cloroplastos de fruto en gradientes de sacarosa (resultados no presentados). Con este tipo de gradiente, se mantenían los niveles de contaminación y la actividad de las enzimas era inferior a la obtenida con los gradientes de Percoll.

La comparación del comportamiento electroforético de las diferentes fracciones: homogeneizado de fruto, fracción de cloroplastos y lixiviado de polen, nos permitió ratificar la localización subcelular de las diferentes formas isoenzimáticas en los tres sistemas estudiados.

En fruto, como en hojas, los geles teñidos para 6-PGDH, PGI y PGM muestran la presencia de dos zonas de actividad anódicas. Las formas rápidas (6-PGDH-a, PGI-a y PGM-a) están localizadas en los cloroplastos, mientras que las formas lentas (6-PGDH-b, PGI-b y PGM-b) aparecen en el citosol. En la Figura II - 7, presentamos el patrón correspondiente a PGM.

Estos resultados, confirman la diferente localización subcelular de los pares de isoenzimas de los sistemas estudiados, en hojas y frutos. En la Figura II - 8, presentamos un esquema gráfico de la movilidad de estos pares de isoenzimas en geles de almidón, en las diferentes fracciones pertenecientes a lixiviado de polen, homogeneizado (de hoja o fruto) y fracción de cloroplastos.

Tabla II - 5. - Actividades enzimáticas marcadoras (citocromo c oxidasa e hidroxipiruvato reductasa) y actividad enzimática fosfogluco isomerasa, en las diferentes fracciones de cloroplastos, obtenidos a partir de frutos de *Capsicum* en gradientes de Percoll. Las actividades se expresan en nkat/ml y los resultados son el promedio de tres experiencias independientes.

Actividades enzimáticas			
Fracción	Cit. C. Oxid.	HyPr	PGI
Homogeneizado	1,36	0,332	4,38
Suspensión	0,149	0,614	7,37
1ª Banda Cloroplastos	0,032	0,099	4,41
2ª Banda Cloroplastos	0,033	0,033	3,88

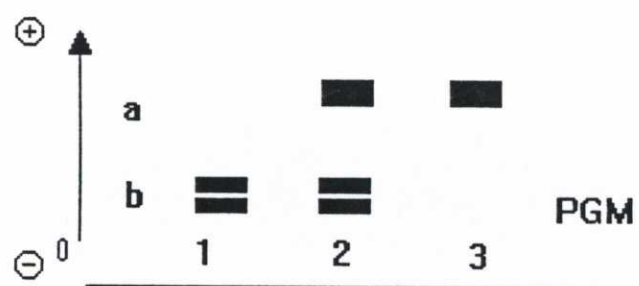
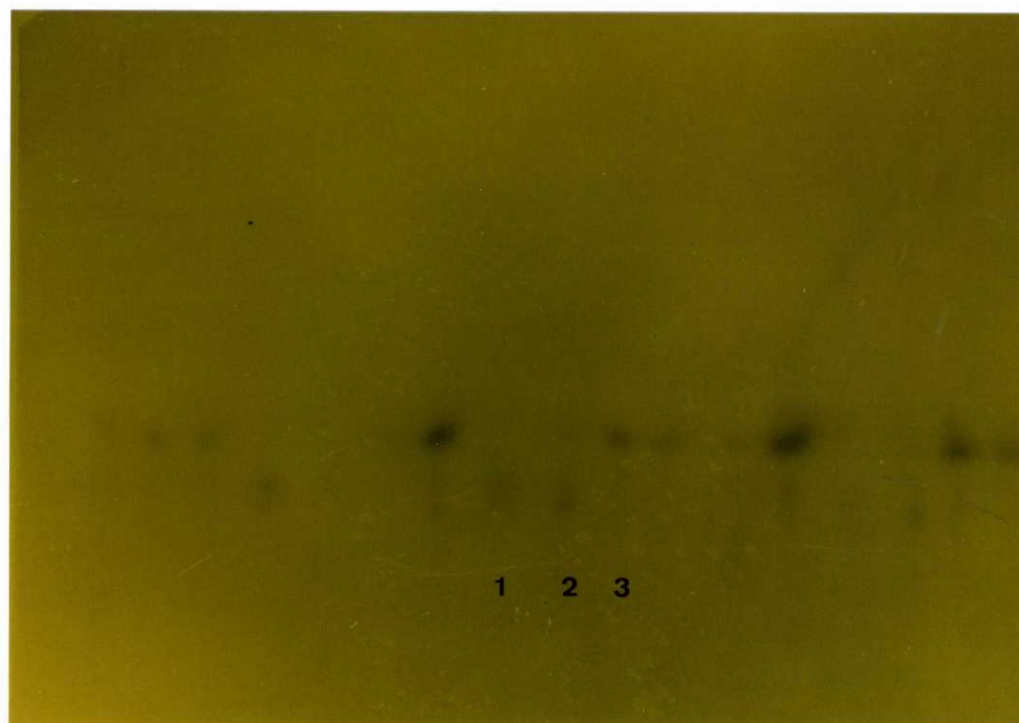


Figura II - 7. - Patron de isoenzimas, en geles de almidón, del sistema PGM (Fosfogluco Mutasa). Línea 1: lixiviado de polen. Línea 2: homogeneizado de fruto. Línea 3: fracción de cloroplastos.

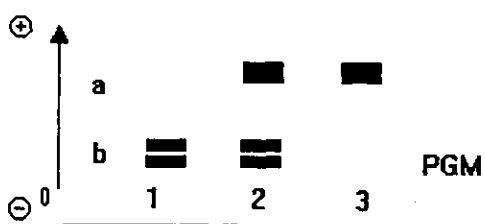
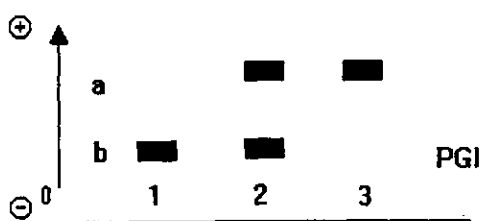
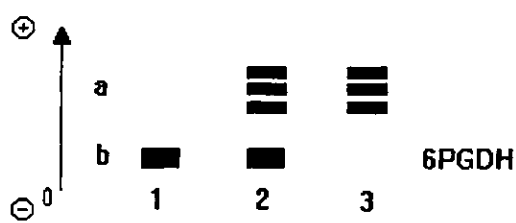


Figura II - 8. - Esquema gráfico de la compartimentación subcelular de los pares de isoenzimas de los sistemas 6PGDH (A), PGI (B) y PGM (C): Línea 1: lixiviado de polen. 2: homogeneizado (hoja/fruto). Línea 3: fracción de cloroplastos.

2.5. - DISCUSION

El estudio de la localización intracelular de las isoenzimas nos proporciona una valiosa información acerca de la compartimentación de las rutas metabólicas.

Debido a la localización de las enzimas que nos proponíamos estudiar, el objetivo principal era aislar los cloroplastos. En un homogeneizado, los cloroplastos íntegros pueden ser separados de los cloroplastos rotos, mitocondrias y peroxisomas, eligiendo un medio de centrifugación con una densidad apropiada (Mifflin y Beevers, 1974). La sacarosa ha sido frecuentemente utilizada para controlar la densidad de los medios en las preparaciones de cloroplastos, sin embargo las altas concentraciones requeridas son lesivas para los cloroplastos (Leech, 1977).

El Percoll parece que posee características que lo convierten en el compuesto más apropiado para el control de la densidad de los medios, ya que posee una alta densidad, baja viscosidad, baja osmolaridad y no es tóxico para los orgánulos (Mills y Joy, 1980). Su idoneidad se confirma cuando examinamos las preparaciones de cloroplastos en Percoll: estos aparecen intactos en gran parte, son fisiológicamente activos, y presentan una baja contaminación por mitocondrias, peroxisomas y fragmentos de cloroplastos.

Esto lo hemos podido confirmar en los estudios realizados con los frutos de *Capsicum*. Se realizó la experiencia de aislar cloroplastos, utilizando gradientes de sacarosa y de Percoll. En el primer caso, debido a las altas concentraciones de sacarosa utilizadas, las preparaciones obtenidas se caracterizaban por presentar unos

valores de integridad inferiores a los obtenidos con Percoll, así como unos mayores índices de contaminación por mitocondrias y peroxisomas y una menor actividad en las enzimas estudiadas, razón por la cual decidimos no utilizar este gradiente en las hojas.

Hemos determinado las enzimas plastídicas, aislando cloroplastos intactos y rompiéndolos posteriormente por congelación-descongelación, y comparando mediante electroforesis en geles de almidón los extractos a partir de cloroplastos con aquellos obtenidos de hojas.

Al comparar nuestros resultados con los obtenidos por distintos autores en otras especies, se observan algunas diferencias.

Hemos detectado para la enzima 6-PGDH, de la ruta de las pentosas fosfato, la presencia de dos formas isoenzimáticas, de las cuales la más anódica (6-PGDH-a), aparece localizada en los cloroplastos, mientras que 6-PGDH-b está en el citosol. En *Lycopersicon* Tanksley y Kuehn (1985) detectan la presencia de cuatro formas de 6-PGDH de las cuales, 6-PGDH-C, con una movilidad intermedia respecto a A, B y D, aparece en la fracción cloroplástica.

Sabemos que tanto PGI como PGM, enzimas pertenecientes a la glicolisis y gluconeogénesis, tienen una doble compartimentación, esto es, que existe una isoenzima citosólica y otra cloroplástica, pero no siempre su movilidad electroforética es la misma. Así en PGI, la isoenzima PGI-a está localizada en la fracción cloroplástica, mientras que la PGI-b parece estar limitada al citosol. Estos resultados también están de acuerdo con los hallados en espinaca (Schnarrenberger y Oeser, 1974), rábano (Schnarrenberger y col., 1975) y remolacha azucarera (Simcox y Dennis, 1978).

En cambio el comportamiento de PGM varía en algunas especies. Como en el caso anterior aparecen dos isoenzimas, pero en el guisante la forma más anódica

PGM-a se corresponde con la isoenzima citosólica, mientras que PGM-b es cloroplástica (Weeden y Gottlieb, 1980). En nuestro material, la isoenzima PGM-a tiene una localización cloroplástica y la PGM-b citosólica. Esto mismo sucede en espinaca (Mühlbach y Schnarrenberger, 1978).

La técnica anteriormente expuesta, nos permitió identificar las enzimas cloroplásticas, y por exclusión, las citosólicas. Pero para confirmar estos resultados recurrimos a la técnica del lixiviado de polen, que nos permitió obtener pequeñas cantidades de enzima citosólica.

Nuestro estudio muestra como a las 8 horas de mantener el polen sumergido en el tampón, se alcanza un 43,48% de enzima marcadora citosólica proporción que disminuye posteriormente, y que presenta unos niveles de contaminación muy bajos. En 1980 Weeden y Gottlieb, que estudian el comportamiento en los lixiviados de polen de diferentes enzimas del metabolismo primario de distintas especies, llegan a la conclusión de que, durante las primeras horas de empapado del polen en un tampón apropiado, las enzimas citosólicas de los sistemas estudiados salen al exterior, quedando aquellas formas enzimáticas ligadas a orgánulos confinadas al interior del grano.

A las 24 horas, observamos como la proporción de actividad de PEPc ha descendido hasta un 5,92%. Esto tiene su explicación en que a las 24 horas la mayor parte de los granos de polen se han roto, liberando todo su contenido enzimático, y es muy probable que esta enzima se vea afectada por algún componente externo. Esta pérdida de actividad enzimática también ha sido detectado en otras especies. En *Oenothera organensis* a las 19 horas se detecta la ausencia de una banda perteneciente al patrón de esterases, sugiriendo el autor que dicha banda es sensible

hacia algún factor externo que afecte a la solución enzimática (Makinen y Brewbaker, 1967).

Este hecho también es aplicable al resto de las enzimas, ya que los otros tres sistemas enzimáticos presentan su pico de actividad a las 8 horas, con un descenso a las 12 horas. En cambio el incremento que experimentan a las 24 horas, más que a una mayor proporción de enzima citosólica se puede presumir que corresponda a un incremento en la contaminación debido a la ruptura de los granos de polen. Así, la enzima marcadora mitocondrial que no se había detectado hasta el momento, presenta una actividad del 1,27% a las 24 horas.

Una vez confirmada la existencia de actividad enzimática en el lixiviado de polen, así como la naturaleza predominantemente citosólica de este componente enzimático, con un grado de contaminación mínimo, se pasó a examinar los patrones electroforéticos de aquellos sistemas que mejor se resolvían en los geles de almidón. Para ello, se comparó el patron de bandas de dos enzimas (PGI y PGM) en diferentes fracciones : homogeneizado de hoja y lixiviado de polen.

Los resultados venían a confirmar lo ya observado, que las isoenzimas citosólicas se correspondían con aquellas formas isoenzimáticas que no aparecían en los geles de almidón cuando aislábamos cloroplastos, esto es, las formas menos anódicas. Esta menor movilidad de las formas citosólicas para las enzimas PGI y PGM, coincide con los resultados obtenidos por Weeden y Gottlieb (1980) en espinaca, en dónde la forma menos anódica de estas dos enzimas coincide con la forma citosólica, mientras que en *Pisum* sólo aparece la forma menos anódica de PGI, apareciendo la forma más anódica de PGM en el lixiviado de polen.

CAPITULO III

**Estudio de la diferente localización subcelular de las
peroxidasas y su variación con el desarrollo.**

3.1. Introducción.	94
3.1.1. Isoenzimas y diferenciación	94
3.1.2. Reacciones catalizadas por peroxidasas	95
3.1.3. Tipos de peroxidasas y localización subcelular	96
3.1.4. Técnicas utilizadas en los estudios de localización subcelular de peroxidasas	98
3.1.5. Procesos fisiológicos mediados por peroxidasas	100
3.1.5.1. Procesos de crecimiento	101
3.1.5.2. Procesos de la pared vegetal	102
3.1.5.3. Procesos de floración	102
3.1.6. Peroxidasas en plantas	103
3.1.7. Peroxidasas en la familia <i>Solanaceae</i>	104
3.2. Objetivos.	105
3.3. Material y métodos.	106
3.3.1. Material vegetal	106
3.3.2. Técnicas de fraccionamiento subcelular	106
3.3.2.1. Homogenización y fraccionamiento subcelular	106
3.3.2.2. Extracción de la enzima enlazada a membranas	107
3.3.2.3. Extracción de la enzima enlazada a paredes	107
3.3.2.4. Aislamiento de isoperoxidasas de los espacios libres de la pared	108

3.3.2.5. Aislamiento y purificación de protoplastos del mesófilo	108
3.3.2.6. Aislamiento de vacuolas a partir de los protoplastos	109
3.3.3. Medida de las actividades enzimáticas	111
3.3.3.1. Medida de la actividad peroxidasa frente a guaiacol	111
3.3.3.2. Medida de la actividad peroxidasa frente a 4-metoxi- α -naftol	112
3.3.3.3. Medida de la actividad glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	112
3.3.3.4. Medida de la actividad α -manosidasa	113
3.3.4. Ensayos zimográficos	113
3.3.4.1. Electroforesis en geles de almidón	113
3.3.4.1.1. Preparación de las muestras	113
3.3.4.1.2. Intensidad de los zimogramas	114
3.3.4.1.3. Otros métodos	114
3.3.4.2. Isoelectroenfoque	115
3.3.4.2.1. Preparación de los geles y fotopolimerización	115
3.3.4.2.2. Preparación de las muestras	115
3.3.4.2.3. Disoluciones de electrodo y desarrollo del electroenfoque	115
3.3.4.2.4. Medida del gradiente de pH formado	116
3.3.4.2.5. Revelado de la actividad peroxidasa con 4-metoxi- α -naftol	116
3.3.4.2.6. Revelado de la actividad peroxidasa con guaiacol	116
3.3.4.2.7. Nomenclatura de peroxidasas	117
3.4. Resultados.	118
3.4.1. Comportamiento del sistema peroxidasa	118
3.4.1.1. Peroxidasa a	118
3.4.1.2. Peroxidasa b	122

3.4.1.3. Peroxidasa c	122
3.4.1.4. Expresión diferencial de las isoenzimas en la planta	123
3.4.1.5. Estudio mediante scanning de los zimogramas	123
3.4.2. Actividad peroxidasa a lo largo de la planta	124
3.4.3. Distribución de la actividad peroxidasa a lo largo del eje de la planta	126
3.4.4. Fraccionamiento subcelular de la actividad peroxidasa en hojas	136
3.4.5. Actividad peroxidasa soluble y patrones de isoenzimas en hojas de plantas en estado vegetativo y floral	139
3.4.6. Localización subcelular de las isoenzimas peroxidasa	139
3.5. Discusión.	149
3.5.1. Comportamiento del sistema peroxidasa	150
3.5.2. Actividad peroxidasa en relación al gradiente de crecimiento	152
3.5.3. Localización subcelular de las isoenzimas peroxidasa y su relación con el estado de desarrollo de la planta	156

3.1. - INTRODUCCION

3.1.1. - ISOENZIMAS Y DIFERENCIACION.

Uno de los mayores problemas a la hora de estudiar la diferenciación celular, es establecer las etapas bioquímicas que acompañan al desarrollo de las células. En este proceso de diferenciación hay una continua síntesis y degradación de enzimas específicas y proteínas estructurales. El mecanismo exacto por el cual las células de los organismos multicelulares regulan la diferente expresión de macromoléculas durante su ciclo de desarrollo no se conoce.

Según Scandalios (1974), las isoenzimas son la expresión de la diferenciación celular, y un análisis detallado de los cambios que sufren a lo largo del desarrollo así como su distribución en la célula, nos pueden ayudar a conocer el mecanismo de la diferenciación celular.

La ubicuidad de las peroxidases en plantas (Saunders y col., 1964) y su fácil ensayo han contribuido a su popularidad como una prueba de la diferenciación celular y del crecimiento, siendo una de las enzimas más estudiadas hasta el momento.

Gracias al desarrollo de las técnicas electroforéticas y al desarrollo de las técnicas citoquímicas por Hunter y Markert (1957), se pudo demostrar en un principio su alto grado de polimorfismo, siendo las peroxidases probablemente las que presentan un mayor número de isoenzimas, llegando a alcanzar las 42 isoformas en extractos celulares de rábano (Hoyle, 1977).

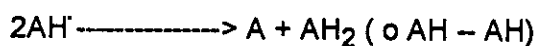
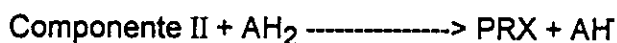
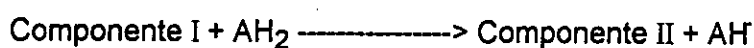
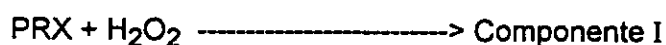
Aunque la peroxidasa ha sido, y es, objeto de numerosos estudios, son muchos los aspectos que aún quedan por dilucidar, como la naturaleza de su elevado polimorfismo enzimático, la localización subcelular de las diferentes isoenzimas, la

regulación de su actividad catalítica, o, en definitiva, su función. Todos estos interrogantes hacen, que hasta la fecha, no se tenga una visión global sobre las funciones fisiológicas que las peroxidasas desempeñan en la planta.

3.1.2. - REACCIONES CATALIZADAS POR PEROXIDASAS.

Las peroxidasas son glicoproteínas (Hendriks y col., 1985) que catalizan la oxidación de ciertos compuestos orgánicos, tanto en presencia como en ausencia de peróxido de hidrógeno. Las peroxidasas de las plantas generalmente forman con el peróxido tres tipos de componentes, denominados Componente I, II y III, que presentan espectros característicos de absorción. Los Componentes I y II se han considerado intermediarios enzimáticos obligatorios en la reacción de peroxidasas, regenerando la ferriperoxidasa original (Gaspar y col., 1982).

La reacción general catalizada por las peroxidasas sería:



En su ausencia, el O₂ es el agente que se reduce (Gaspar y col., 1982). En reacciones dependientes del oxígeno molecular, las peroxidasas catalizan la oxidación del ácido indol-3-acético (AIA) (Gaspar, 1986; Grambow y Langenbeck, 1983), así como la oxidación del NADH (Akazawa y Conn, 1958; Yokota y Yamazaki, 1965). En este

último caso, la peroxidasa actuaría como una oxidasa sobre el NADH, generándose H_2O_2 sobre el que actuará posteriormente.

3.1.3. - TIPOS DE PEROXIDASA Y LOCALIZACION SUBCELULAR.

Mediante electroforesis, cromatografía de intercambio iónico e isoelectroenfoque, se han separado 2 grupos de isoenzimas peroxidasa: básicas (catódicas) y ácidas (anódicas) (Gaspar y col., 1985). Aunque el número de isoenzimas obtenidas depende estrechamente de la técnica de separación utilizada, la constitución química y las propiedades de estos dos grupos son claramente diferentes (Gaspar y col., 1982).

Para asignar una posible función a una proteína, es necesario saber en qué tipo de célula o estructura celular está presente. Los intentos por clarificar la localización de peroxidases en las células de las plantas, se han realizado a partir de estudios de microscopía electrónica (Griffing y Fowke, 1985). Sin embargo, las pruebas citoquímicas son insuficientes en muchos casos para establecer la localización subcelular exacta de las isoenzimas de peroxidasa, ya que estas enzimas son altamente polimórficas en plantas (Mäder y Bopp, 1976) y, aparentemente, cada isoenzima tiene una localización subcelular diferente, como se ha observado a partir de estudios de fraccionamiento subcelular (Schloss y col., 1987; Ros Barceló y col., 1989b).

Gaspar y col. (1982) han revisado profundamente la compartimentación de estas enzimas, y la principal conclusión que se puede obtener a partir de la literatura disponible, es que las peroxidases están principalmente asociadas con la pared celular y la vacuola, dependiendo en última instancia de la naturaleza de la célula, y de su estado de desarrollo (Griffing y Fowke, 1985; Catesson, 1980).

La pared celular es el principal compartimento de actividad peroxidasa, aunque la importancia de esta localización difiere entre especies (Perrey y col., 1989). La localización de las peroxidasas en este espacio extracitoplásmico ha sido descrito por numerosos autores, para muchas especies de plantas y usando distintas técnicas (Gaspar y col., 1982; Van Huystee, 1987). Las enzimas presentes en la pared poseen un punto isoeléctrico y unas propiedades catalíticas diferentes a las establecidas en la vacuola; el punto isoeléctrico es ácido y son específicas de sustratos tipo lignina (Ros Barceló y col., 1987). Por otra parte, estas isoenzimas son rápidamente excretadas a los espacios extracelulares (Mäder y Walter, 1986).

Boller y Kende (1979) utilizando métodos bioquímicos, demuestran la presencia de actividad peroxidasa en vacuolas de plantas. Schloss y col. (1987) confirman la naturaleza básica de isoenzimas peroxidasa obtenidas a partir de vacuolas aisladas de *Nicotiana tabacum*. Recientemente, estos resultados han sido confirmados por Perrey y col. (1989) que hallan dos peroxidasas básicas a partir de diferentes órganos de *Lupinus polyphyllus*.

El hecho de que las enzimas peroxidasas aparezcan principalmente localizadas en estos dos compartimentos de la planta, pared y vacuola, hace pensar que estas enzimas probablemente sean proteínas secretorias (Akazawa y Hara-Nishimura, 1985; Mäder y Walter, 1986; Van Huystee, 1987). Las peroxidasas para exportar serían sintetizadas en polisomas ligados a la membrana del retículo endoplásmico rugoso (Stephan y Van Huystee, 1980). En la ruta de secreción, las membranas migran del retículo endoplásmico al aparato de Golgi y desde aquí, al plasmalema. Con lo cual, sería consecuente con esta hipótesis, detectar actividad peroxidasa en el retículo endoplásmico, aparato de Golgi y vesículas derivadas del mismo. Distintas experiencias

confirman dicha localización (Poux, 1969; Goff, 1975; Catesson, 1980b; Griffing y Fowke, 1985; Catesson y col., 1986; Ros Barceló y col., 1986, 1988a y 1989b).

3.1.4. - TECNICAS UTILIZADAS EN LOS ESTUDIOS DE LOCALIZACION SUBCELULAR DE PEROXIDASAS.

En la célula vegetal, podemos distinguir dos compartimentos: el protoplasto y el apoplasto. El protoplasto, comprendería el citoplasma con todos sus orgánulos y la membrana plasmática que lo rodea. El apoplasto sería el espacio extracitoplásmico que incluye paredes celulares y espacios intercelulares.

A la hora de tratar la localización subcelular de las peroxidasas en la célula vegetal, conviene establecer "a priori" una clasificación basada en el procedimiento realizado para obtener los distintos tipos de enzimas.

Se considera una enzima como soluble, o enzima no ligada a una determinada estructura subcelular, si después de la centrifugación del homogeneizado de tejido a 100.000xg durante una hora, la proteína permanece en los sobrenadantes (Penefsky y Tzagoloff, 1971).

La centrifugación de homogeneizados de tejidos vegetales, muestra que una proporción de la proteína celular es particulada y que la mayor parte de esta proteína está estrechamente asociada a membranas (Coleman, 1973). Se consideran proteínas asociadas a la pared celular aquellas que permanecen ligadas a dicha estructura subcelular durante el aislamiento mecánico de ésta (Lamport y Catt, 1981), y esta definición tiende a excluir enzimas de la membrana plasmática y enzimas que se encuentran libres, de una forma soluble, en el apoplasto.

Según la técnica utilizada se distinguen cuatro tipos de enzimas (Li y col., 1989):

1. Enzimas obtenidas a partir de lavados de tejidos por soluciones que no deterioren el plasmalema, estando solubles en el apoplasto o ligadas a la pared débilmente.

2. Enzimas solubles protoplásticas que pueden ser obtenidas rompiendo las células y precipitando los orgánulos y los restos de paredes.

3. Enzimas iónicamente ligadas que pueden ser extraídas del precipitado de membranas y paredes por soluciones salinas de alta fuerza iónica.

4. Enzimas covalentemente ligadas que pueden ser extraídas por tratamientos con enzimas hidrolíticas (celulasa, pectinasa, etc...) y que estarían covalentemente ligadas o atrapadas a las membranas y/o a la pared.

Las enzimas solubles en el apoplasto o débilmente ligadas a la pared, pueden ser extraídas mediante la técnica de infiltración a vacío de un líquido en el tejido vegetal, seguido de su recuperación por centrifugación. La técnica no provoca la ruptura del protoplasto, y posee la ventaja adicional de que, dependiendo de la fuerza iónica y la composición del medio de infiltración, es posible diferenciar la actividad enzimática libre en los espacios intercelulares, de la actividad enzimática enlazada a la pared celular.

Este método fue utilizado por 1ª vez por Klement (1965). Los espacios eran primero infiltrados con H₂O destilada, centrifugándose posteriormente las muestras para recoger el fluido. Sin embargo, no existía ningún tipo de control relativo a si la fracción obtenida contenía sólo fluidos intercelulares. Era posible que parte del material presente en ese fluido, perteneciera a la célula debido a ruptura del tejido durante el proceso de infiltración y centrifugación.

En 1974, Rathmell y Sequeira modifican esta técnica, incluyendo el uso de enzimas marcadoras citoplásmicas, para poder establecer el origen apoplástico de este

fluido para lo cual miden la enzima Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa (G6PDH E.C.1.1.1.49).

Para obtener el resto de enzimas, se siguen las técnicas de fraccionamiento subcelular. Las enzimas solubles citoplásmicas, se obtienen por homogenización del tejido en tampón apropiado, y posterior centrifugación elevada, obteniéndose un sobrenadante que llevará el complemento de enzimas solubles en el citoplasma, y un precipitado compuesto de membranas y paredes. Si se quiere obtener un precipitado de paredes y otro de membranas, basta con realizar una centrifugación diferencial de este primer precipitado acompañado de lavados sucesivos. Sin embargo, la ruptura de células conlleva la mezcla de todos los componentes celulares, y puede dar lugar frecuentemente a interacciones no específicas de la enzima con ciertas estructuras subcelulares (Gaspar y col., 1982).

Como complemento a la técnica de fraccionamiento celular, se realiza la experiencia de obtención y purificación de protoplastos (células vegetales desprovistas de pared) que nos ofrecerá el complemento de enzimas presentes en el interior de la célula.

3.1.5. - PROCESOS FISIOLÓGICOS MEDIADOS POR PEROXIDASAS.

Las peroxidasas parecen influir en un gran número de procesos fisiológicos (Gaspar y col., 1982). Los más significativos serían su papel en los procesos de crecimiento y diferenciación, en base a su participación en la biosíntesis de lignina y en la oxidación del ácido indol-3-acético (Van Huystee y Cairns, 1982). También han sido relacionadas con los cambios bioquímicos y estructurales asociados con las infecciones por patógenos y lesiones (Van Loon y Callows, 1983). Recientemente se ha sugerido la

participación de las peroxidasas en el metabolismo de los alcaloides (Perrey y col., 1989; Blom y col., 1991)

El número de posibles sustratos para peroxidasas es muy elevado y se puede asumir que cada reacción catalizada por peroxidasas va a tener un papel específico en el mantenimiento o en la adaptación de las estructuras y funciones de las células de la planta a su ambiente (Gaspar y col., 1991).

3.1.5.1. - Procesos de crecimiento.

En contraste con los animales que pueden cambiar su localización, las plantas requieren adaptarse a los cambios y al estrés de su ambiente para sobrevivir, y lo realizan alterando sus patrones de crecimiento (Gaspar y col., 1991).

El control homeostático de la cantidad de AIA en las plantas, es una parte integral del conocimiento de la acción de la auxina (Ferrer y col., 1991). Este control viene dado por su biosíntesis, síntesis conjugada e hidrólisis de conjugados de AIA y oxidaciones no-descarboxilativas y descarboxilativas (Sembdner y col., 1980). Se sabe que las peroxidasas catalizan la descarboxilación *in vitro* del AIA, mediante diferentes mecanismos y rutas (Grambow y Langenbeck-Schwich, 1983; Ferrer y col., 1991; Pedreño y col., 1988) y se acepta generalmente que estas enzimas actúan como AIA oxidasas *in vivo*.

Hay muchos ejemplos de correlación entre el nivel de actividad peroxidasa en un tejido y la capacidad de crecimiento o edad fisiológica del mismo (Gaspar y col., 1982; Van Huystee, 1987). Sin embargo, la ausencia de especificidad *in vitro* de las numerosas isoperoxidasas, unido a la falta de pruebas acerca de la presencia de los productos derivados de la acción de las peroxidasas sobre el AIA (Reinecke y Bandurski, 1988), hace que todavía sea sujeto de discusión.

3.1.5.2. - Procesos de la pared vegetal.

La peroxidasa puede participar en la biogénesis de la pared celular a través de, al menos, seis reacciones diferentes (Gaspar y col., 1991): 1) el acoplamiento oxidativo de los residuos de tirosina en la extensina, con la consiguiente formación de extensina insoluble; 2) el acoplamiento oxidativo de los residuos de ácidos hidroxicinámicos y p-hidroxibenzoicos de las pectinas y ciertos xilanos; 3) la unión de la extensina a los polisacáridos de la pared celular; 4) la biosíntesis de ligninas; 5) la unión de las ligninas a las glicoproteínas de la pared celular; 6) la deposición e inmovilización de la suberina.

Todos estos mecanismos determinan finalmente una pérdida de plasticidad y por lo tanto, un incremento en la rigidez de esta estructura subcelular (Taiz, 1984).

3.1.5.3. - Procesos de floración.

El desarrollo reproductor en las plantas implica la promoción de actividad meristemática en las yemas florales y es concomitante con la supresión en las yemas vegetativas, aunque en muchos casos, las yemas florales pueden ser diferenciadas a partir de las yemas vegetativas (Zeevaart, 1976). La peroxidasa es una enzima que puede ser crucial en la respuesta anterior debido a su participación en la homeostasis del AIA a través de su catabolismo (Ros Barceló y Muñoz, 1992) ya que el ácido indolacético puede inhibir y promover la iniciación floral en las plantas con flores (Bernier, 1988). En *Sinapis*, como en otras plantas (Bernier, 1988), la auxina es promotora a bajas dosis e inhibidora a altas dosis (Bernier, 1988). En este contexto, las hojas han sido utilizadas para detectar los efectos más tempranos de la inducción floral con objeto de conocer la fisiología de la floración a nivel subcelular y molecular (Greepin y Penel, 1991).

En espinaca, Greepin y Penel (1991) señalan que la actividad de las peroxidases básicas está relacionada con el estado de la planta y, por otro lado, estas enzimas pueden ser utilizadas como marcadoras para seguir la transición del estado vegetativo al floral. Sin embargo, la participación de las peroxidases en la respuesta a la floración no se conoce completamente, ya que esta enzima aparece en múltiples formas moleculares que difieren en sus propiedades catalíticas y localización subcelular (Ferrer y col., 1992; Zhen y Van Hystee, 1992).

3.1.6. - PEROXIDASAS EN PLANTAS.

Las isoenzimas de peroxidases se sabe que aparecen en una gran variedad de tejidos y en un gran número de especies vegetales. De hecho, han sido las enzimas más estudiadas. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados han sido puramente descriptivos y la interpretación de los resultados, en muchos casos, altamente especulativos.

En Gramíneas, las peroxidases han sido utilizadas como marcadoras de la evolución y sistemática principalmente, con el fin de establecer relaciones filogenéticas entre especies (Johnson y Hall, 1966; Chu, 1967; Brewbaker y col., 1985). En maíz, fueron genéticamente definidas por Scandalios y Sorenson (1976).

En Leguminosas, durante los últimos años, se han comenzado a realizar estudios utilizando peroxidases como marcadoras en relación a su papel en los procesos de diferenciación (Goldberg y col., 1986; Angelini y col., 1990; Thorpe y col., 1978; Ferrer y col., 1991) y también se han realizado otros referentes a su localización subcelular (Takahama y Egashira, 1990; Ferrer y col., 1992).

3.1.7. - PEROXIDASAS EN LA FAMILIA *Solanaceae*.

En la familia *Solanaceae*, a la cual pertenece la variedad *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, objeto de nuestro estudio, las peroxidasas han sido estudiadas a diferentes niveles y en distintas especies. *Lycopersicon* (Tanksley y Rick, 1980); *Datura* (Conklin y Smith, 1971); *Solanum* (Oliver y Martínez-Zapater, 1985); *Petunia* (Wijsman y Hendriks, 1986) y *Capsicum* (Tanksley, 1984).

La mayor parte de estos estudios han sido realizados desde un punto de vista genético, con análisis de poblaciones y establecimiento de relaciones filogenéticas. En esta familia, los patrones son muy similares, con sólo algunas diferencias interespecíficas características (Wijsman y Hendriks, 1986).

Estudios posteriores relativos a las propiedades bioquímicas, localización celular, especificidad de órgano y en relación con el desarrollo, muestran que existe similitud en los zimogramas de PRX en diferentes géneros de la familia, particularmente los grupos rápidos anódicos y catódicos (Wijsman y Hendriks, 1986). Hendriks y col. (1990b), por medio de ensayos inmunológicos, demuestran que el grupo de isoenzimas anódicos rápidos en *Petunia* es estructuralmente homólogo al que presentan otras especies de solanáceas, entre ellas, *Capsicum annuum*, llegando a afirmar que el grupo de peroxidasas rápidas anódicas de *Petunia* podría ser representativo del grupo de peroxidasas anódicas rápidas en la familia *Solanaceae*.

3.2. - OBJETIVOS

Los objetivos de este capítulo están encaminados a la caracterización del polimorfismo enzimático de las peroxidasas en el pimiento así como las variaciones que pueden presentar a lo largo del desarrollo.

La utilización de diversas técnicas electroforéticas, unido a las técnicas de infiltración y de fraccionamiento, nos van a permitir relacionar las distintas isoenzimas con los compartimentos subcelulares.

Dada la importancia de las peroxidasas en los procesos de crecimiento, se va estudiar su actividad y la expresión diferencial de las isoenzimas en el estado vegetativo y floral para establecer las isoformas específicas que puedan caracterizar el desarrollo reproductor.

3.3. - MATERIAL Y METODOS

3.3.1. - MATERIAL VEGETAL.

La obtención del material vegetal ha sido indicado en el apartado 1.2.1. La selección de las plantas en diferentes estados de desarrollo (vegetativo y floral), se realizó teniendo en consideración los siguientes criterios:

- edad de la planta
- tamaño
- pares de hojas
- desarrollo de yema floral

3.3.2. - TECNICAS DE FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.

3.3.2.1. - Homogenización y fraccionamiento subcelular.

Las hojas se lavaron con agua destilada y se homogeneizaron en un mortero con arena a 4°C, en una proporción 1:5, p:v en un tampón de extracción compuesto por sacarosa 0,25M, $(\text{AcO})_2\text{Mg}$ 1mM y Tris ClH 5mM pH 7,2. Las fracciones de peroxidasa soluble, enlazada a membranas y a paredes, se obtuvieron según la técnica de Ros Barceló y col. (1989b).

El homogeneizado se filtró sobre una gasa de celulosa, de aproximadamente 0,2 mm de malla, descartándose el material retenido. El eluido de la filtración sobre gasa de celulosa, se centrifugó durante 15 minutos a 1000xg en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5. El precipitado de esta centrifugación, se consideró como fracción primaria

de paredes, y el sobrenadante de la centrifugación anterior se centrifugó de nuevo a 20.000xg durante 20 minutos a 4°C considerándose el precipitado de esta última centrifugación como fracción de membranas, y el sobrenadante como fracción soluble.

3.3.2.2. - Extracción de la enzima enlazada a membranas.

La solubilización de la actividad peroxidasa enlazada a membranas, se realizó de acuerdo con la técnica desarrollada por Ros Barceló y col. (1988a).

Para solubilizar la enzima iónicamente enlazada a la fracción de membranas, se incubaron éstas con CIK 1M 30 minutos, centrifugándose a continuación a 20.000xg durante 20 minutos, y al sobrenadante obtenido se le consideró fracción de peroxidasas iónicamente enlazadas a las membranas.

3.3.2.3. - Extracción de la enzima enlazada a paredes.

La extracción de la enzima enlazada a paredes, se realizó de acuerdo con la técnica de Ros Barceló y col. (1987).

La fracción primaria de paredes celulares, obtenida después de la centrifugación del filtrado sobre gasa estéril de celulosa, se resuspendió con Tritón X-100 al 1% y n-octanol al 0,2% en tampón Tris ClH 5 mM pH 7,2. A continuación se centrifugó a 1000xg durante 10 minutos. El nuevo sedimento se lavó con el mismo tampón para eliminar restos membranosos y seguidamente, con tampón Tris ClH 50 mM tres veces, centrifugándose de igual forma. El precipitado obtenido, se consideró fracción de paredes.

Para solubilizar la enzima iónicamente enlazada a la fracción de paredes, éstas se incubaron con CIK 1M 30 minutos, centrifugando a continuación a 1000xg

durante 10 minutos, considerándose al sobrenadante de esta centrifugación, como fracción de peroxidasas iónicamente enlazadas a la pared. Con el fin de solubilizar la actividad peroxidasa covalentemente enlazada a paredes, el precipitado resultante de la extracción de la peroxidasa iónicamente enlazada, se resuspendió en tampón acetato 0,1 M pH 5,0 suplementado con celulasa al 1% (p/v). Después de 12 horas a 25°C, los residuos de paredes se centrifugaron a 1000xg durante 10 minutos.

Las fracciones de peroxidasa se dializaron durante toda la noche en tampón Tris ClH 50 mM pH 7,2.

3.3.2.4. - Aislamiento de isoperoxidasas de los espacios libres de la pared.

Discos de hojas de 7 mm de diámetro, se lavaron exhaustivamente con tampón Tris ClH 50 mM pH 7,6 a 4°C y se infiltraron a vacío durante 10 minutos en el mismo tampón (con/sin Cl_2Ca 100 mM), en una proporción 1:5, p:v.

El fluido del espacio libre de la pared se recuperó después de la centrifugación de los discos de hoja infiltrados, a 1000xg durante 5 minutos a 4°C (Rathmell y Sequeira, 1974).

La contaminación del fluido libre de la pared por contaminantes citosólicos, se determinó usando glucosa-6-fosfato deshidrogenasa como enzima marcadora.

3.3.2.5. - Aislamiento y purificación de protoplastos del mesófilo.

La epidermis inferior de las hojas se retiró con la ayuda de unas pinzas y aproximadamente 1,0 gr se sumergieron en un tampón de preplasmólisis Tris Mes 25 mM pH 5,5 conteniendo BSA al 0,5% (p/v) y sorbitol 0,65 M para evitar la deshidratación del tejido vegetal.

A continuación, las hojas se depositaron en medio de incubación (20 ml) conteniendo Caylasa al 1% (p:v), Pectoliasa al 0,02% (p:v), Pectinasa al 0.2% (p:v), BSA al 0,5% (p:v), sorbitol 0,65 M en tampón Tris Mes 25 mM pH 5,5 a temperatura ambiente durante 1 hora en oscuridad y se agitaron ocasionalmente.

Los protoplastos así obtenidos, se filtraron a través de una gasa de nylon (40 μm de malla), y se centrifugaron a 100xg durante 6 minutos y se lavaron 2 veces por resuspensión en un tampón de lavado, compuesto por BSA al 0,5% (p:v), sorbitol 0,65 M en tampón Tris Mes 25 mM pH 7,4.

Con el fin de purificar los protoplastos del mesófilo, el último precipitado se resuspendió en tampón de lavado (1 ml) y se depositaron en un gradiente discontinuo de Ficoll 400 (0% (p:v), 5% (p:v), 10% (p:v) y 20% (p:v)), centrifugándose a 2000xg durante 10 minutos. Las capas verdes aparecían en las interfases 0-5% y 5-10%, que se recuperaron por succión y se observaron al microscopio (400x) para chequear la integridad y pureza de la preparación de protoplastos, procediéndose a su posterior fotografiado.

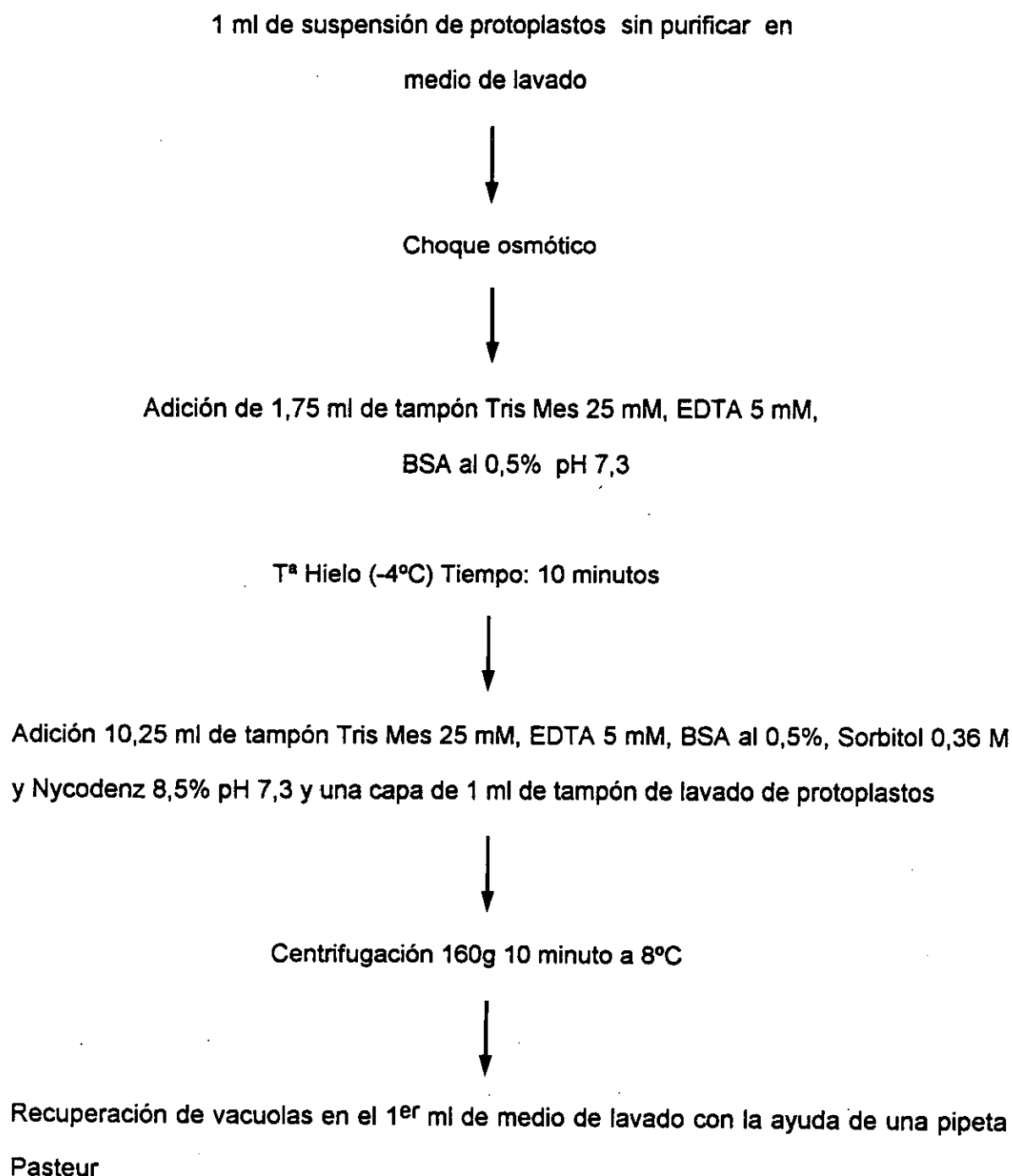
Los protoplastos del mesófilo, se sometieron posteriormente a un proceso de congelación/descongelación y se centrifugaron a 2000xg durante 5 minutos, procediéndose a realizar las medidas de la actividad enzimática.

3.3.2.6. - Aislamiento de vacuolas a partir de protoplastos.

Las vacuolas se obtuvieron a partir de una suspensión de protoplastos sometida a choque osmótico y se aislaron por flotación mediante la técnica de Renaudin y col. (1986) con algunas modificaciones.

El protocolo para la de obtención de vacuolas queda reflejado en la Figura III -1. Para ello los protoplastos sin purificar se resuspendieron en 1 ml de tampón de

Figura III - 1.- Protocolo general del procedimiento de obtención de vacuolas.



lavado que contenía sorbitol 0.65 M, BSA al 0,5% en tampón Tris Mes 25 mM a pH 7,4. Seguidamente, y para efectuar el choque osmótico, se adicionó 1,75 ml de tampón Tris Mes 25 mM, EDTA 5 mM y BSA al 0,5% a pH 7,3 y se mantuvo en un baño de hielo durante 10 minutos en agitación moderada y ocasional. Transcurrido este tiempo, la suspensión se mezcló rápidamente con 10,25 ml de tampón Tris Mes 25 mM que contenía EDTA 5 mM, BSA 0,5%, sorbitol 0,36 M y Nycodenz al 8,5% a pH 7,3 depositándose en la parte superior del tubo 1 ml de tampón de lavado de protoplastos.

Las vacuolas quedaban depositadas en la parte superior del tubo, después de la centrifugación a 160xg durante 10 minutos a 8°C. Con la ayuda de una pipeta Pasteur se cogía 1 ml de estas vacuolas ya purificadas.

A continuación, se procedió a la observación al microscopio óptico de las vacuolas obtenidas, para determinar el grado de contaminación por protoplastos y restos celulares, así como para su posterior fotografiado.

Por último, para realizar las medidas de las diferentes actividades enzimáticas, las vacuolas se sometieron a un proceso de congelación-descongelación y se dializaron frente a un tampón Tris Mes 25 mM pH 7,3 durante toda la noche.

3.3.3. - MEDIDA DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

3.3.3.1. - Medida de la actividad peroxidasa frente a guaiacol.

La medida de la actividad peroxidasa usando guaiacol como sustrato, se realizó de acuerdo a Ferrer y col. (1990).

Los medios de reacción estaban compuestos por guaiacol 5 mM, H₂O₂ 0,33 mM, tampón Fosfato 60 mM pH 7,0 y enzima. La reacción se inició por la adición de

enzima, y los incrementos de absorbancia a 470 nm se siguieron durante 1 minuto a 25°C utilizando un espectrofotómetro UVIKON.

Las actividades enzimáticas empleadas en todos los ensayos se calcularon utilizando un ϵ_{470} de $26,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el producto de la oxidación enzimática del guaiacol (Chance y Maehly, 1955).

3.3.3.2. - Medida de la actividad peroxidasa frente a 4-Metoxi- α -Nafthol.

La medida de la actividad peroxidasa utilizando 4-metoxi- α -nafthol como sustrato, se realizó mediante el método descrito por Ferrer y col. (1990).

Los medios de reacción estaban compuestos por 4-metoxi- α -nafthol 1 mM, H_2O_2 0,33 mM, tampón Tris ClH 50 mM pH 7,5 y enzima. Los incrementos de absorbancia se realizaron a 593 nm utilizando un espectrofotómetro UVIKON.

Las actividades enzimáticas empleadas en todos los ensayos se calcularon utilizando un coeficiente de extinción ϵ_{593} de $21 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el producto de la oxidación enzimática del 4-metoxi- α -nafthol.

3.3.3.3. - Medida de la actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

La actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (D-glucosa-6-fosfato: NADP^+ 1-oxidoreductasa, EC 1.1.1.49) se ensayó espectrofotométricamente según el método descrito Löhr y Waller (1974).

Los medios de reacción contenían b- $\text{NADP}^+\text{Na}_2\text{H}$ 30 mM, tampón trietanolamina-ClH 50 mM, EDTA 5 mM pH 7,5 y enzima. Después de incubar a 25°C durante 5 minutos, se adicionaron a los medios de reacción NaH-glucosa-6-fosfato 40 mM, y se registraron los incrementos de absorbancia a 340 nm durante 5 minutos.

Para el cálculo de la actividad enzimática se empleó un ϵ_{340} de $6,22 \times 10^3$ $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.3.3.4. - Medida de la actividad α - manosidasa.

La actividad α - manosidasa (α - D - manósido manohidrolasa, EC 3.2.1.24) se determinó de acuerdo con el método descrito por Wagner (1983).

A 0,5 ml de medio de reacción conteniendo p-nitrofenilfosfato- α -manopiranosido 0,6 mM en tampón succinato 0,1 M pH 5,0 se le añadieron 50 μ l de extracto enzimático, incubándose la mezcla a 30°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 0,8 ml de Na_2CO_3 1 M y se midió la absorbancia a 405 nm.

Para el cálculo de la actividad enzimática se empleó un ϵ_{405} de 18.3×10^3 $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.3.4. - ENSAYOS ZIMOGRÁFICOS.

3.3.4.1. - Electroforesis en gel de almidón.

3.3.4.1.1. - Preparación de las muestras.

Las muestras (tallo, hoja y peciolo), se lavaron 3 veces con H_2O destilada, se secaban con papel de filtro y se cortaban en pequeños fragmentos. Estos se depositaban en un mortero (previamente enfriado) y en un baño de hielo. Se añadía tampón de homogeneizado (tampón Fosfato 0,2M pH 6) en proporción 1:1 por gramo de materia fresca. Una vez realizado el homogeneizado, se filtraba sobre 5 gasas, se recogía el extracto y se vertía en un tubo ependorf.

Se procedía a su congelación a -20°C , con el fin de romper todas las estructuras celulares existentes en el extracto y liberar así las enzimas existentes. Se descongelaba y resuspendía con un Mixotub procediéndose inmediatamente a su centrifugación durante 10 minutos a $12.700\times g$ en una microcentrífuga Biofuge, estando ya el sobrenadante apto para los distintos ensayos a realizar.

En el caso de la determinación de la actividad peroxidasa a lo largo del gradiente de crecimiento, el tallo se cortaba en fragmentos consecutivos de aproximadamente 1 cm de longitud. Las hojas y los peciolo se recogían en función de su orden de disposición a lo largo del eje de la planta.

3.3.4.1.2. - Intensidad de los zimogramas.

Los negativos de las fotografías de los geles se midieron por densitometría para determinar la distinta intensidad de las bandas. Cada muestra se analizaba independientemente utilizando un espectrofotómetro Beckman con un sistema accesorio para los negativos, realizándose las medidas a 550 nm.

3.3.4.1.3. - Otros métodos.

La separación de las isoenzimas de las peroxidasas, mediante electroforesis en geles de almidón, así como el revelado de las mismas utilizando o-dianisidina como sustrato, se ha descrito en el apartado 1.3.2.

3.3.4.2. - Isoelectroenfoque.

3.3.4.2.1. - Preparación de los geles y fotopolimerización.

La preparación de los geles y el proceso de fotopolimerización se llevaron a cabo según el procedimiento descrito por Wrigley (1971), con pequeñas modificaciones (Calderón y col., 1990). Los medios de polimerización se prepararon en un baño de hielo, y estaban compuestos por acrilamida al 30%, N,N-metilén-bis (acrilamida) al 1%, riboflavina 40 $\mu\text{gr/ml}$, glicerol al 20% y anfolinas de rango de pH 3,5-10 al 40%. Los medios se desgasificaron utilizando una trompa de vacío durante 5 minutos y, con una pipeta Pasteur, se formaron columnas de gel de 60 mm de longitud y 5 mm de diámetro interno. En la interfase gel-aire se depositó una gota de agua, y se dejaron polimerizar bajo luz fluorescente de una intensidad de 4700 lux durante 45 minutos, a 25°C.

3.3.4.2.2. - Preparación de las muestras.

Las muestras de proteínas se prepararon en sacarosa al 60%. Estas muestras (100 μl) se depositaron sobre la superficie del gel y, sobre ellas, se depositó una "capa protectora" de anfolinas (100 μl), compuesta por anfolinas de rango de pH 3,5-10 al 40% en sacarosa al 30%.

En un tubo paralelo, en lugar de los 100 μl de proteína, se depositaron 100 μl de una disolución de orceina al 0,2% en sacarosa al 60%, como patrón del isoelectroenfoque (Wrigley, 1969).

3.3.4.2.3. - Disoluciones de electrodo y desarrollo del electroenfoque.

Como disoluciones de electrodo se utilizaron ácido o-fosfórico al 0,2% para

el ánodo, e hidróxido sódico al 0,5% para el cátodo (Pedreño y col., 1988).

El electroenfoque se realizó a 4°C, utilizando una fuente de alimentación LKB 2103 PS, a una intensidad de corriente de 1 mA por gel durante 45 minutos, seguido por la aplicación de una diferencia de potencial constante de 800 V durante 75 minutos.

3.3.4.2.4. - Medida del gradiente de pH formado.

Al finalizar el electroenfoque, atendiendo siempre al patrón de distribución de las orceínas, el gel correspondiente se fraccionó con una cuchilla en secciones de aproximadamente 0,5 cm, secciones que fueron eluidas durante 2 horas a 25°C frente a CIK 10 mM. Al cabo de este tiempo, se midió el pH en los eluidos.

3.3.4.2.5. - Revelado de la actividad peroxidasa con 4-MN.

El revelado de las isoenzimas de la peroxidasa con 4-MN se llevó a cabo incubando los geles durante 15 minutos a 25°C en un medio idéntico al anteriormente descrito para el seguimiento espectrofotométrico de la actividad enzimática. Transcurrido este tiempo, los geles se lavaron con agua destilada y se mantuvieron en oscuridad a 4°C.

3.3.4.2.6. - Revelado de la actividad peroxidasa con guaiacol.

El teñido de las isoenzimas peroxidasa utilizando guaiacol como sustrato se realizó de acuerdo con Ros Barceló y col. (1987). Los geles se sumergieron, durante 3 horas a 25°C en oscuridad, en una disolución que contenía guaiacol 5 mM y H₂O₂ 0,3 mM en tampón acetato 0,1 M pH 5,0. Transcurrido este tiempo, los geles se lavaron y almacenaron en tampón acetato 0,1 M pH 5,0.

3.3.4.2.7. - Nomenclatura de peroxidasas.

La resolución de las isoformas por enfoque isoelectrico permite clasificarlas en isoformas con puntos isoelectricos ácidos (A) o básicos (B), asignándose subíndices crecientes al aumentar el pI.

3.4. - RESULTADOS

3.4.1. - COMPORTAMIENTO DEL SISTEMA PEROXIDASA.

En *Capsicum annuum* L. var. *annuum* y utilizando como sustrato o-dianisidina, se han detectado en geles de almidón tres zonas de actividad peroxidasa, dos en la zona anódica del gel y una en la zona catódica.

Las peroxidasas anódicas o ácidas aparecen próximas al frente del borato, con dos zonas de actividad. Siguiendo el sistema de nomenclatura tradicional basado en la diferente velocidad de migración en el gel, distinguimos una zona rápida y una zona lenta. En tejidos maduros la zona rápida aparece constituida por un triplete con unos Rf promedios de 9, 9,3 y 9,6 respectivamente. Hemos denominado esta zona PRX-a y las bandas constitutivas PRX-a₁, PRX-a₂ y PRX-a₃. La zona lenta PRX-b presenta dos bandas, con unos Rf promedios de 8,2 y 8,5 denominándose PRX-b₁ y PRX-b₂ a las bandas constituyentes.

Las peroxidasas catódicas o básicas, presentan una única zona de actividad, denominándose a esta zona PRX-c que aparece constituida por dos bandas, PRX-c₁ próxima al punto de inserción de las muestras y PRX-c₂, con un Rf promedio de 0,5.

3.4.1.1. - Peroxidasa a.

Hemos observado que la PRX-a presenta un comportamiento variable en cuanto al número e intensidad de las bandas del triplete en función de la edad del órgano estudiado (Figura III - 2,3 y 4).

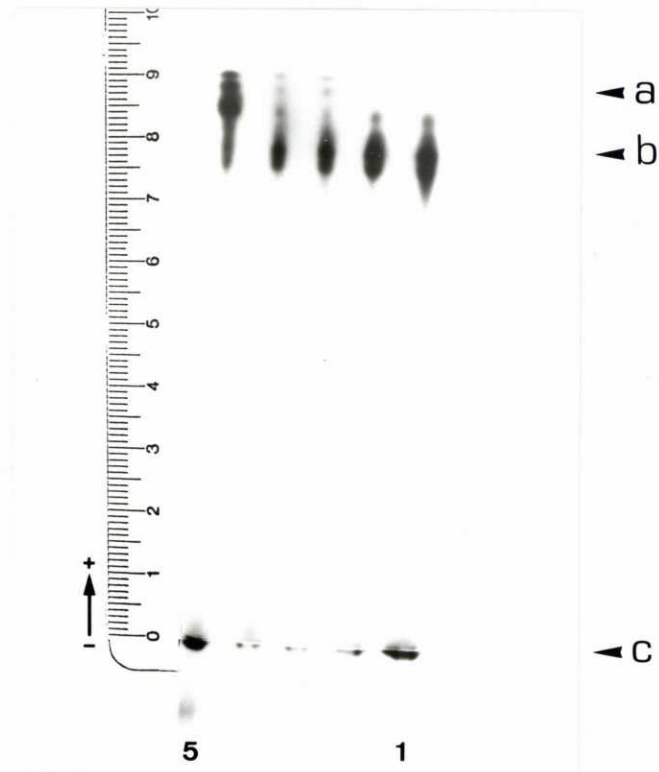


Figura III - 2.- Patrón de isoenzimas de peroxidasa en geles de almidón en los diferentes fragmentos del tallo de una planta en estado vegetativo. 1.- Parte apical del tallo. 2 - 4.- Fragmentos intermedios. 5.- Parte basal del tallo.

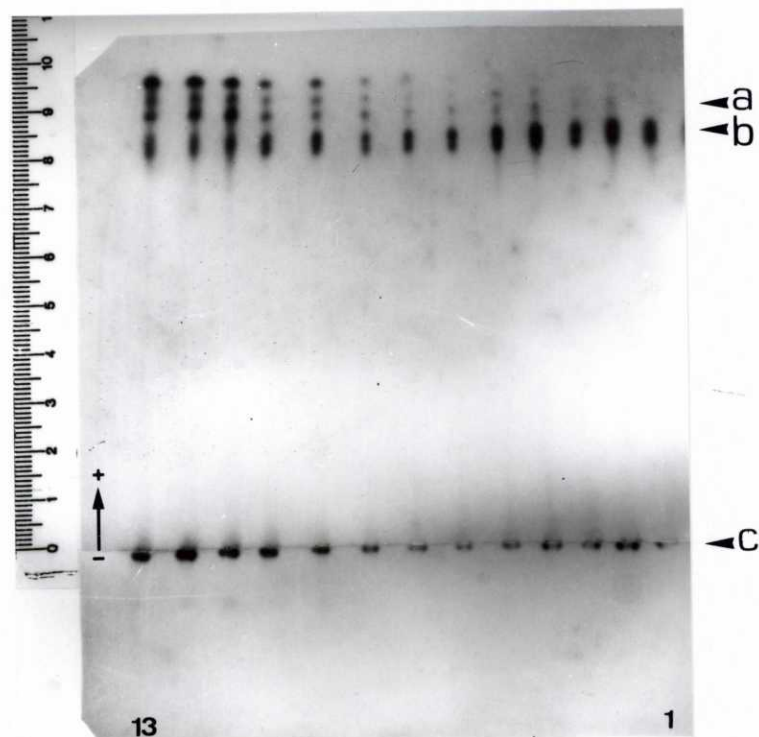


Figura III - 3.- Patrón de isoenzimas de peroxidasa en geles de almidón en los diferentes fragmentos del tallo de una planta en estado floral. 1.- Parte apical del tallo. 2 - 12.- Fragmentos intermedios. 13.- Parte basal del tallo.

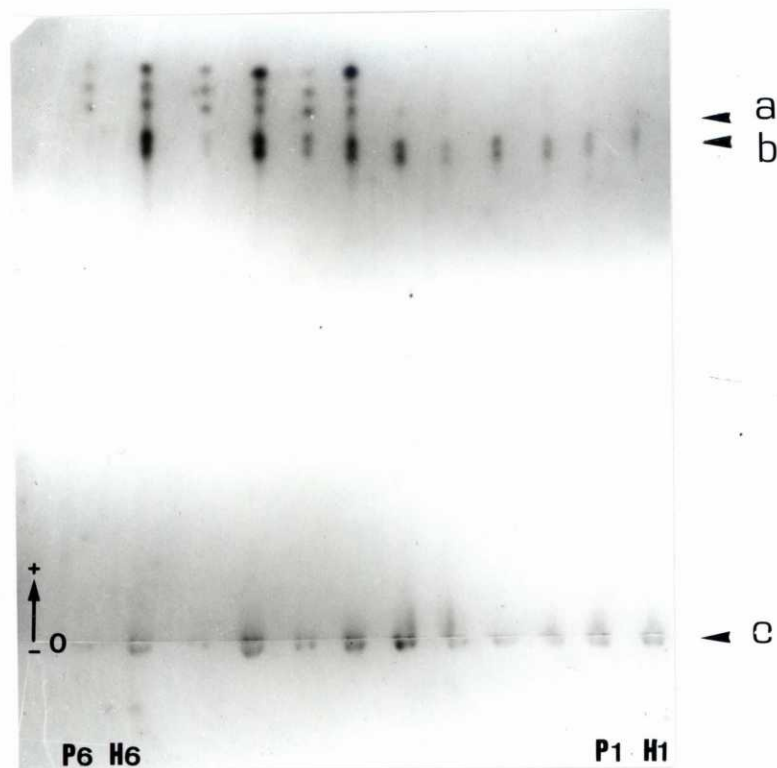


Figura III - 4.- Patrón de isoenzimas de peroxidasa en geles de almidón en las diferentes hojas y peciolo de una planta en estado floral. 1.- Parte apical del tallo. 2 - 5.- Fragmentos intermedios. 6.- Parte basal del tallo. H.- Hoja. P.- Peciolo.

En órganos jóvenes, parte apical del tallo y hojas de la zona apical en claro proceso de diferenciación, la PRX-a aparece con una única banda. Sería la banda lenta del triplete, que hemos denominado PRX-a₁. En órganos en una fase de desarrollo más avanzado, fragmentos intermedios del tallo y hojas intermedias, la banda PRX-a₁ se presenta más teñida y aparece la segunda banda del triplete, PRX-a₂.

PRX-a₃ aparece solamente en órganos adultos, parte basal del tallo y hojas primarias, y con ella, PRX-a₂ y PRX-a₁ constituyendo el triplete. Existe diferencia en la intensidad de las bandas constitutivas de este triplete y generalmente en un órgano maduro, la banda PRX-a₃ del triplete aparece más intensamente teñida que las otras.

3.4.1.2. - Peroxidasa b.

La segunda zona de actividad PRX-b, que invariablemente aparece constituida por dos bandas en todos los órganos estudiados, muestra una mayor intensidad en órganos jóvenes que en órganos maduros, siendo la intensidad igual en ambas bandas (Figura III - 2,3 y 4).

En los órganos más jóvenes, el tamaño y la intensidad de las bandas es tan grande que llegan a unirse las dos, dando la impresión de una sola banda.

3.4.1.3. - Peroxidasa c.

Al igual que la PRX-a, esta isoenzima presenta un comportamiento variable en cuanto al número e intensidad de las bandas, en función de la edad del órgano estudiado. (Figura III - 2,3 y 4).

En órganos jóvenes, parte apical del tallo y hojas de la zona apical, PRX-c sólo presenta una banda, próxima al punto de inserción de las muestras, PRX-c₁ cuya

intensidad se incrementa con la edad del órgano. Solamente en órganos maduros aparece la forma rápida de esta isoenzima, PRX-c₂.

3.4.1.4. - Expresión diferencial de las isoenzimas en la planta.

Para realizar esta parte del trabajo hemos utilizado plantas en estado vegetativo y floral, seleccionándolas según los criterios expuestos en el apartado 3.3.1 de este capítulo.

Las plantas en estado vegetativo tenían aproximadamente una edad de 1 mes a partir del momento de la protusión de la raíz, un tamaño no superior a 10 cm, presentaban un número de hojas entre 4-6 y no poseían yema floral en la parte apical. Las plantas en estado floral, tenían una edad de 3 meses, un tamaño ostensiblemente mayor a 10 cm., un número de hojas superior a 10 y yema floral en la parte apical.

Dependiendo del grado de madurez del tejido, el patrón de peroxidasas anteriormente expuesto variaba de manera cualitativa y cuantitativa, pudiéndose demostrar la existencia de un gradiente de actividad peroxidasa en la planta, tanto en peroxidasas catódicas como anódicas.

Este gradiente en los geles de almidón, tanto en el estado vegetativo (Figura III - 2) como en el estado floral (Figura III - 3 y 4), se traducía en la aparición gradual de las bandas constitutivas de PRX-a, la disminución en la intensidad de las PRX-b y el aumento en la actividad de las PRX-c cuando vamos del ápice a la base.

3.4.1.5. - Estudio mediante scanning de los zimogramas.

El scanning de los negativos obtenidos a partir de los zimogramas son una sensible prueba que corrobora los resultados obtenidos.

Hemos realizado el scanning de las bandas de todos los segmentos, pero sólo presentamos los que hemos considerado más significativos, esto es, segmentos apicales del tallo (Figura III - 5; 1 y 3), segmentos intermedios (Figura III - 5; 5 y 8) y parte apical del tallo (Figura III - 5; 10 y 12) pertenecientes a una planta en estado floral (Figura III- 3).

En ellos se puede apreciar los dos hechos hasta hora destacados:

- Pequeño descenso en la actividad de las peroxidasas catódicas, con un posterior incremento muy grande en la parte basal.

- Cambios graduales en la actividad de las peroxidasas anódicas, con la aparición de las bandas constitutivas de las PRX-a y disminución progresiva de las PRX-b.

El scanning de los distintos segmentos, no llega a diferenciar en el caso de las PRX-b, entre PRX-b₁ y PRX-b₂. Esto puede ser debido a la gran intensidad de la mancha y la proximidad de las bandas, lo cual es un importante factor limitante a la hora de realizar este estudio.

3.4.2. - ACTIVIDAD PEROXIDASA A LO LARGO DE LA PLANTA.

El ensayo enzimático, utilizando guaiacol como sustrato, ratifica los cambios detectados por electroforesis en geles de almidón, y confirmados por scanning en los segmentos de tallo de una planta en estado floral. Con independencia del estado en que ésta se encuentre (vegetativo o floral), este gradiente de actividad se repite en todos los órganos estudiados, tallo y hojas.

Existen dos máximos de actividad peroxidasa, que se corresponden con la parte apical del tallo y con la parte basal del mismo. Sin embargo, en la planta en estado

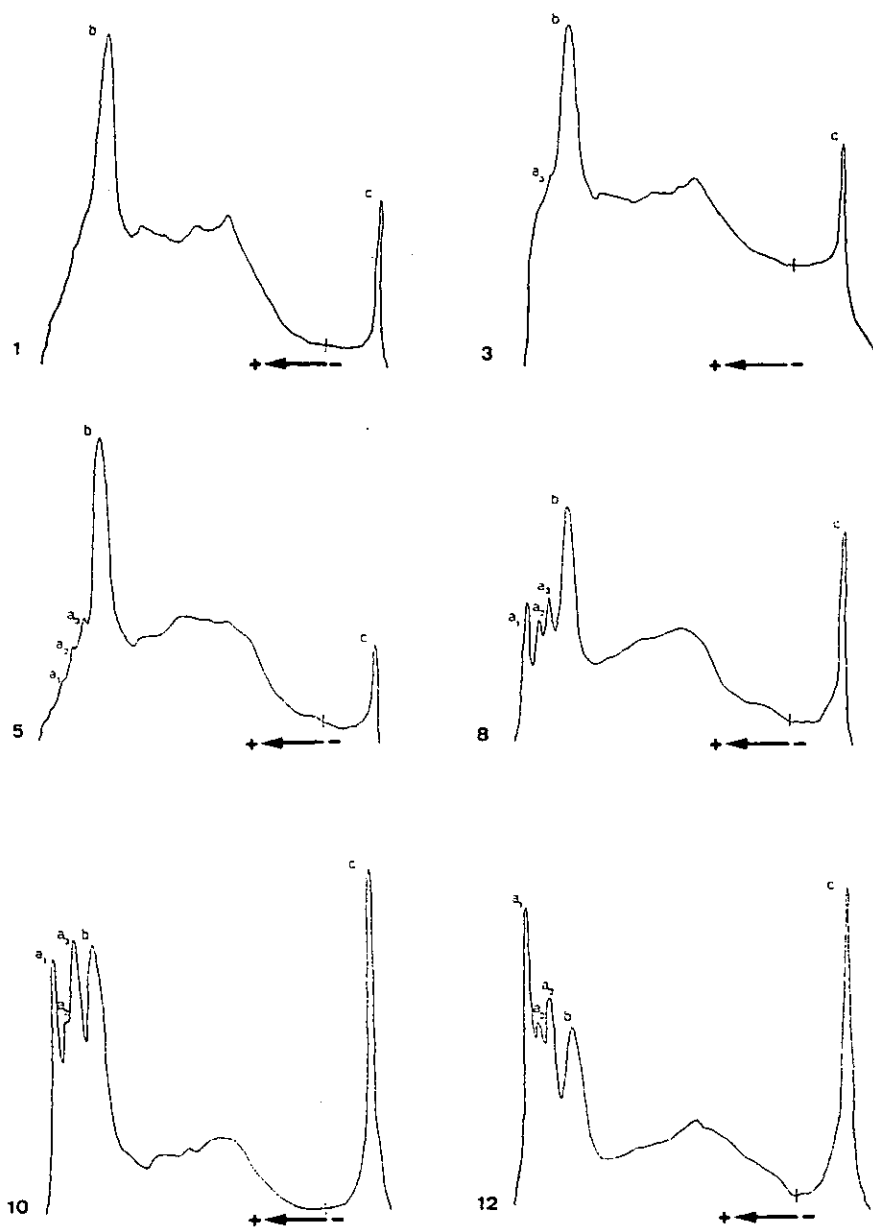


Figura III - 5.- Estudio densitométrico mediante scanning de la actividad peroxidasa en geles de almidón, pertenecientes a los fragmentos 1, 3, 5, 8, 10 y 12 del tallo de una planta en estado floral. (Figura III - 3).

floral, debido a la mayor longitud del tallo, podemos detectar una zona intermedia, en la cual la actividad peroxidasa permanece más o menos constante.

En una planta en estado vegetativo (Figura III - 6) observamos como existe un pico de actividad que se corresponde con la parte apical del tallo. En el 2º fragmento, aparece un punto de inflexión caracterizado por un descenso en la actividad, observando a continuación un incremento progresivo en la actividad peroxidasa para constituir el 2º pico de actividad en la parte basal.

En una planta en estado floral (Figura III - 7), se observa que a partir del 1º máximo existe un descenso hasta el segmento nº 7 de la parte intermedia del tallo. A partir de aquí, la actividad peroxidasa sufre un ligero incremento que se continua en los segmentos siguientes, presentando un pico final de actividad en el segmento nº 12, que se corresponde con la parte basal del tallo.

En una planta en estado vegetativo, no llegamos a observar una fase intermedia de actividad en el tallo, como en el caso de una planta en estado floral.

Estos resultados muestran también la gran diferencia existente entre la actividad peroxidasa en una planta en estado floral y la planta en estado vegetativo. Así, la actividad en una planta en estado floral vemos que es dos o tres veces mayor que en una planta en estado vegetativo, con independencia del segmento a lo largo del tallo.

3.4.3. - DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA A LO LARGO DEL EJE DE LA PLANTA.

Hemos estudiado la distribución de la actividad peroxidasa libre en los espacios de la pared vegetal de los distintos pares de hojas de plantas en estado vegetativo y floral, considerando su disposición a lo largo del tallo. Utilizamos para ello la técnicas de infiltración a vacío, que nos permite recuperar el complemento de enzimas

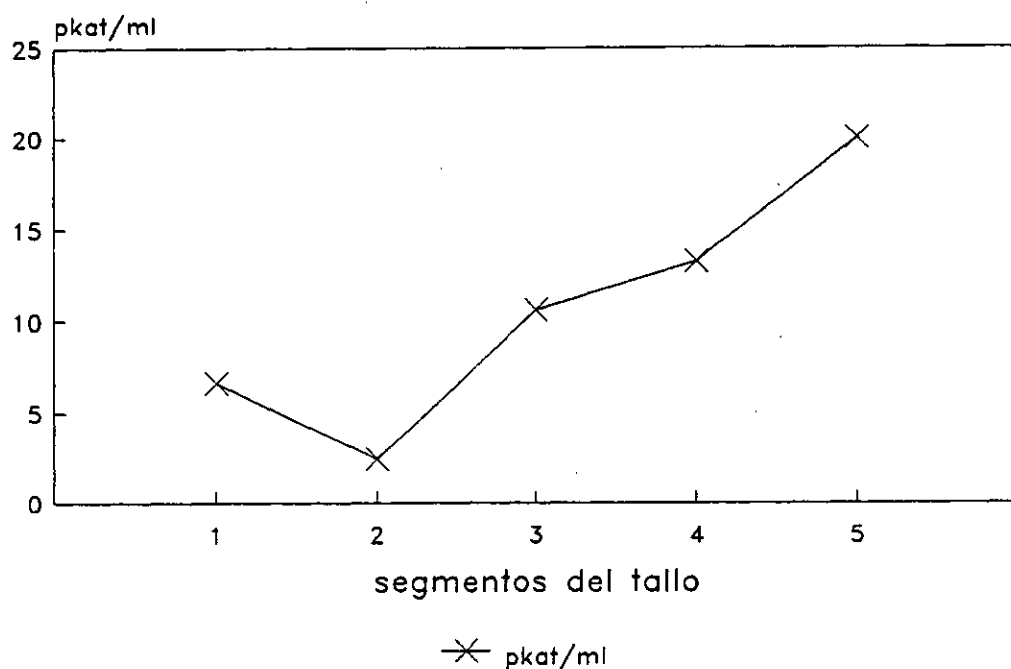


Figura III - 6.- Representación gráfica del nivel de actividad peroxidasa medida con guaiacol a lo largo del tallo, en una planta en estado vegetativo. 1.- Parte apical del tallo. 2 - 4.- Fragmentos intermedios. 5.- Parte basal del tallo. Las actividades vienen expresadas en pkat/ml y los resultados son el promedio de tres experiencias independientes.

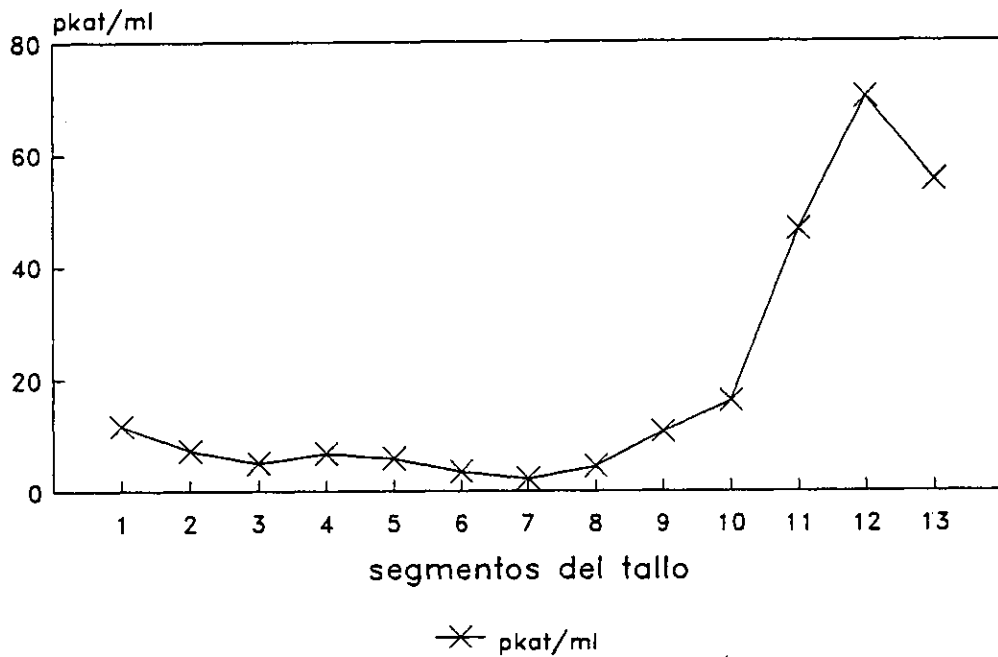


Figura III - 7.- Representación gráfica del nivel de actividad peroxidasa medida con guaiacol a lo largo del tallo, en una planta en estado floral. 1.- Parte apical del tallo. 2 - 12.- Fragmentos intermedios. 13.- Parte basal del tallo. Las actividades vienen expresadas en pkat/ml y los resultados son el promedio de tres experiencias independientes.

solubles libres en dichos espacios, así como aquellas formas enzimáticas iónicamente ligadas a la pared cuando la infiltración del tejido se realiza con un tampón suplementado con Cl_2Ca 100 mM. La contaminación citosólica, estimada por la medida de la actividad glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, fué inferior al 0,1% en todas las experiencias realizadas.

Si comparamos la actividad peroxidasa intracelular frente a la actividad peroxidasa recuperada del fluido intercelular, observamos como existe un transporte de peroxidasas al espacio apoplástico a medida que descendemos hacia la base del tallo, paralelo a un incremento en la actividad de las peroxidasas iónicamente enlazadas a la pared.

En una planta en estado vegetativo (Tabla III - 1; Figura III - 8), en el 1º par de hojas, situadas en la zona más apical, un 91,31% de la actividad peroxidasa se encuentra en el interior de la célula, recuperándose sólo un 4,47% en el fluido intercelular. Esta actividad presenta un valor similar al de la actividad peroxidasa iónicamente ligada a la pared (4,21%). En el 2º par de hojas, observamos ya como ha existido un incremento drástico en la actividad peroxidasa soluble extracelular, que llega a alcanzar un valor del 16,09% respecto a la actividad total, mientras que la actividad iónicamente enlazada presenta un valor del 20,26%.

En una planta en estado floral (Tabla III - 2; Figura III - 9), el proceso de incorporación de las peroxidasas a la pared y a los espacios intercelulares es mucho más evidente. El balance de peroxidasas intracelulares frente a extracelulares, ofrece una distribución caracterizada por la presencia de dos máximos de actividad en el 1º par para las intracelulares y en 4º par de hojas para las extracelulares. Frente a un 93,79% de actividad peroxidasa intracelular en el 1º par, en el 4º par esta actividad ha disminuido a un valor del 41,93%, mientras que la actividad peroxidasa extracelular que

Tabla III - 1.- Distribución de la actividad peroxidasa utilizando guaiacol como sustrato, según la técnica de infiltración a vacío, en los distintos pares de hojas de una planta en estado vegetativo. Las actividades se expresan en pkat/gr de tejido y los resultados son la media de dos experiencias independientes.

Par de hojas	Fracción	Actividad Peroxidasa	
		pkat/gr	%
1° Par	Soluble Protoplástica	3,47	91,31
	Iónica de Pared	0,16	4,21
	Soluble Apoplástica	0,17	4,47
2° Par	Soluble Protoplástica	3,36	63,66
	Iónica de Pared	1,07	20,26
	Soluble Apoplástica	0,85	16,09

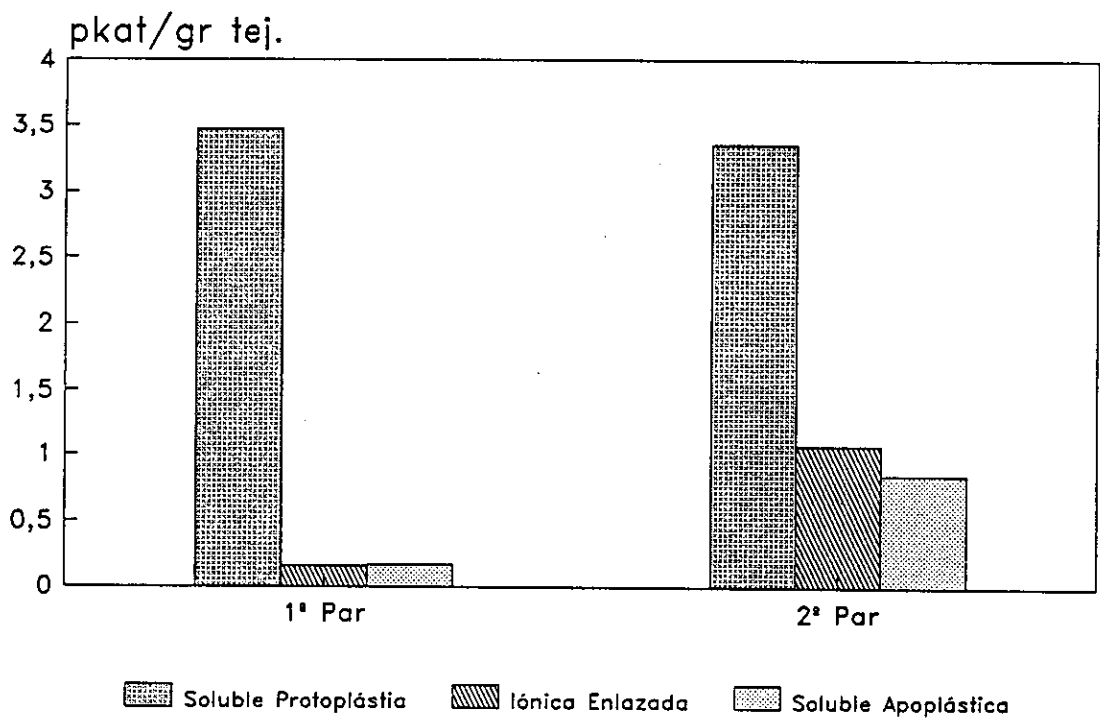


Figura III - 8.- Distribución de la actividad peroxidasa utilizando guaiacol como sustrato, en los diferentes pares de hojas de una planta en estado vegetativo. Las actividades vienen expresadas en pkat/gr de tejido y los resultados son la media de dos experiencias independientes.

Tabla III - 2.- Distribución de la actividad peroxidasa utilizando guaiacol como sustrato, según la técnica de infiltración a vacío, en los distintos pares de hojas de una planta en estado floral . Las actividades se expresan en pkat/gr de tejido y los resultados son la media de dos experiencias independientes.

Par de hojas	Fracción	Actividad Peroxidasa	
		pkat/gr	%
1° Par	Soluble Protoplástica	8,97	93,79
	Iónica de Pared	0,32	3,38
	Soluble Apoplástica	0,26	2,81
2° Par	Soluble Protoplástica	3,55	84,10
	Iónica de Pared	0,36	8,69
	Soluble Apoplástica	0,30	7,20
3° Par	Soluble Protoplástica	3,64	62,37
	Iónica de Pared	1,25	21,41
	Soluble Apoplástica	0,94	16,20
4° Par	Soluble Protoplástica	1,95	41,93
	Iónica de Pared	1,27	27,31
	Soluble Apoplástica	1,43	30,75

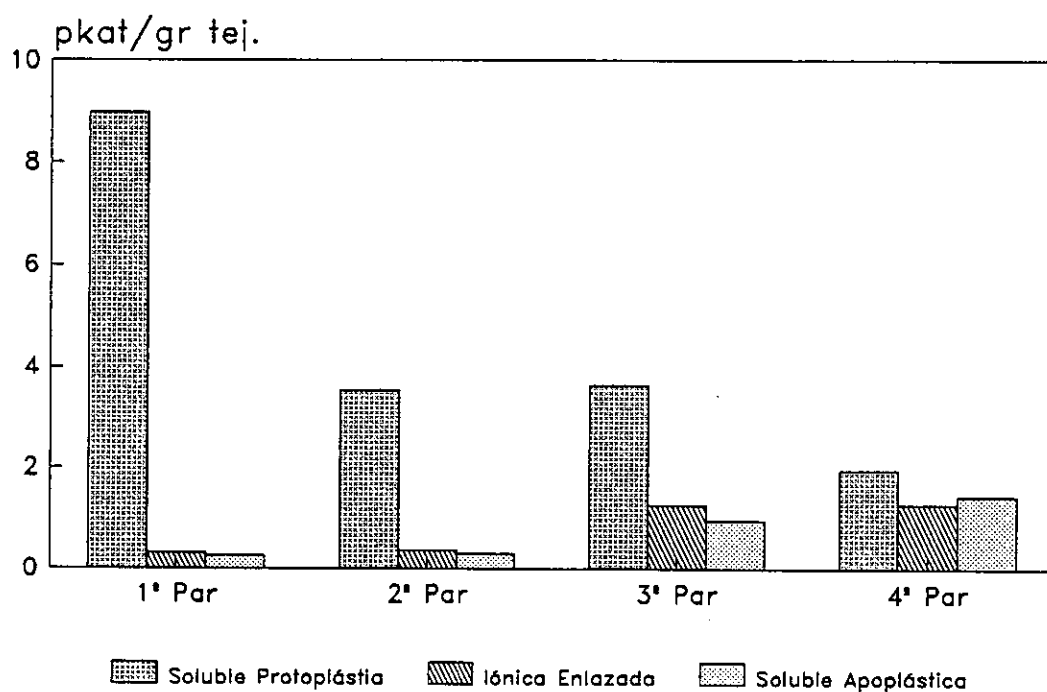


Figura III - 9.- Distribución de la actividad peroxidasa utilizando guaiacol como sustrato, en los diferentes pares de hojas de una planta en estado floral. Las actividades vienen expresadas en pkat/gr de tejido y los resultados son la media de dos experiencias independientes.

en el 1^{er} par de hojas presentaba un valor del 2,81% en el 4º par aumenta hasta un valor del 30,75%. Observamos también un incremento en la proporción de peroxidasas iónicamente enlazadas a la pared. Así, en el 1^{er} par de hojas, esta actividad representa un 3,38% de la actividad peroxidasa total, frente al 27,31% en el 4º par de hojas.

Las distintas fracciones obtenidas por infiltración a vacío en una planta en estado floral, se sometieron a continuación a electroforesis en geles de almidón (Figura III - 10). La observación de los patrones de isoenzimas en los diferentes pares de hojas, muestra como este incremento en las peroxidasas extracelulares, se refleja en la aparición progresiva de las isoenzimas constitutivas del triplete de peroxidasas a, así como un aumento de la actividad de las peroxidasas c y la aparición de la segunda forma c₂. Paralelamente, observamos como la mayor proporción de actividad peroxidasa intracelular en el primer par de hojas, se corresponde con la forma isoenzimática peroxidasa b más intensamente teñida (Figura III - 10; línea a). La disminución de la actividad peroxidasa intracelular en los distintos pares de hojas, está relacionada con una disminución progresiva de la intensidad de tinción de estas peroxidasas b.

Los patrones de isoenzimas de actividad peroxidasa, recuperada del espacio libre de la pared celular con tampón con Cl₂Ca (Figura III - 10; línea b) y con tampón sin Cl₂Ca (Figura III - 10; línea c), muestran la presencia de las 7 isoenzimas previamente establecidas. En estos resultados se puede observar que el nivel de estas isoenzimas es sensiblemente mayor en el fluido del espacio libre de la pared recuperado con tampón suplementado con Cl₂Ca, lo cual nos permite suponer que estas isoenzimas estarían en equilibrio con las formas solubles libres en el apoplasto.

Figura III - 10.- Patrones de isoenzimas peroxidasa intracelulares (línea a), extraídas con tampón conteniendo Cl_2Ca (línea b) y extraídas con tampón (c), teñidas con o-dianisidina, en hojas de una planta en estado floral.

3.4.4. - FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA EN HOJAS.

El fraccionamiento subcelular de hojas pertenecientes a plantas en estado vegetativo de *Capsicum annuum* nos revela que la mayor parte de la actividad, utilizando guaiacol como sustrato, está localizada en la fracción soluble (no-sedimentable) (67 pkat g PF⁻¹ 89,70%), estando el resto de la actividad asociada iónicamente a la pared celular (6,33 pkat g PF⁻¹ 8,50%) y a la fracción de membranas (1,0 pkat g PF⁻¹ 1,30%). La actividad peroxidasa covalentemente enlazada a la pared (0,34 pkat g PF⁻¹) contribuye sólo en un 0,50% con respecto al total de actividad peroxidasa (Tabla III - 3).

Los patrones de isoperoxidasas soluble, enlazada a membrana, iónicamente enlazada a la pared y covalentemente enlazada a la pared se analizaron por isoelectroenfoque en un gradiente de pH de 3,5-10 y se tiñeron posteriormente con 4-MN como sustrato. Los resultados (Figura III - 11) muestran la presencia de 6 isoenzimas peroxidasa básicas (catiónicas) (B₁₋₆) en la mayor parte de las fracciones subcelulares. Las isoperoxidasas ácidas (aniónicas) (A₁₋₃) aparecen principalmente en la fracción soluble (Fig III - 11, línea a) mientras que en la fracción covalentemente enlazada a la pared (Fig III - 11, línea d), sólo está presente la isoperoxidasa más básica (B₆).

Ya que la fracción peroxidasa soluble no-sedimentable presenta la mayor proporción de actividad peroxidasa (aproximadamente un 90%) y en ella aparecen la mayor parte de las isoenzimas peroxidasa, utilizaremos dicha fracción para posteriores estudios de la actividad peroxidasa y de los patrones de isoenzimas en hojas pertenecientes a plantas en estado vegetativo y plantas en estado floral.

Tabla III - 3.- Distribución de la actividad peroxidasa según la técnica de fraccionamiento celular en hojas de *Capsicum annum*. La actividad enzimática viene expresada en pkat/gr de tejido y los resultados son la media de dos experiencias independientes.

Fracción	Actividad Peroxidasa	
	pkat/gr	%
Soluble	67	89,70
Iónica de Membrana	1,02	1,30
Iónica de Pared	6,33	8,50
Covalente de Membrana	0,34	0,50

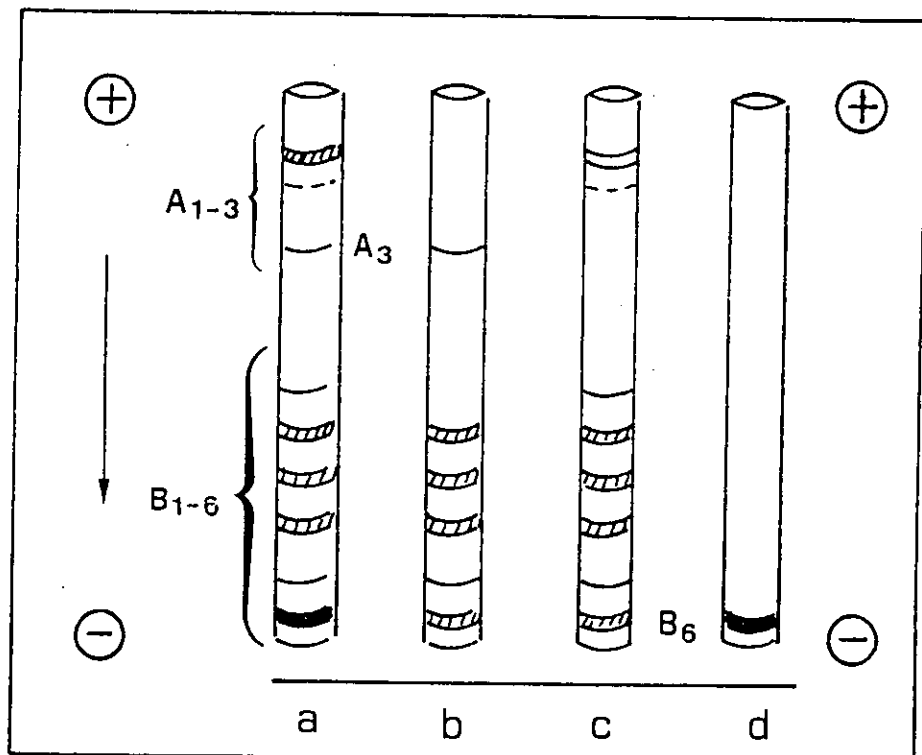


Figura III - 11.- Patrón de isoenzimas de peroxidasa soluble (a), enlazada a membranas (b), iónicamente enlazada a paredes (c) y covalentemente enlazada a paredes (d) a partir de hojas en estado vegetativo teñidas con 4-metoxi- α -naftol. Las flechas indican el sentido de la migración de la proteína durante el isoelectroenfoque. La intensidad de bandeado comparativo viene dada por el grado de sombreado.

3.4.5. - ACTIVIDAD PEROXIDASA SOLUBLE Y PATRONES DE ISOENZIMAS EN HOJAS DE PLANTAS EN ESTADO VEGETATIVO Y FLORAL.

Hemos estudiado el nivel de actividad peroxidasa soluble en plantas en estado vegetativo y floral, utilizando 4-MN como sustrato, teniendo en cuenta la posición de la hoja a lo largo de cuatro internodos desde el ápice. Los resultados muestran que el nivel de actividad peroxidasa en hojas de plantas en estado vegetativo es menor que el establecido en plantas en estado floral, con independencia de la posición de la hoja a lo largo de los internodos (Figura III - 12). En plantas en estado floral, las hojas a partir del segundo internodo, ofrecen la actividad peroxidasa más alta (Figura III - 12), mientras en plantas en estado vegetativo, esta actividad era baja y más o menos constante a lo largo de los cuatro internodos.

El análisis de los patrones de isoenzimas a lo largo de los internodos en plantas en estado vegetativo (Figura III - 13A) y plantas en estado floral (Figura III - 13B) revela que el incremento en la actividad peroxidasa observado en este último es principalmente debido a un incremento general en la actividad de todas las isoenzimas peroxidasa, aunque las isoenzimas A₁ y B₂ ofrecen el incremento más pronunciado. Estos incrementos en la actividad peroxidasa de las isoenzimas A₁ y B₂ eran completamente independientes de la posición de la hoja a lo largo de los internodos.

3.4.6. - LOCALIZACION SUBCELULAR DE LAS ISOENZIMAS PEROXIDASA.

Considerando los resultados anteriores se puede llegar a la conclusión que las isoenzimas peroxidasa, A₁ y B₂, pertenecientes a la fracción peroxidasa no-sedimentable, se expresaban diferencialmente en hojas de plantas en estado floral con respecto al vegetativo.

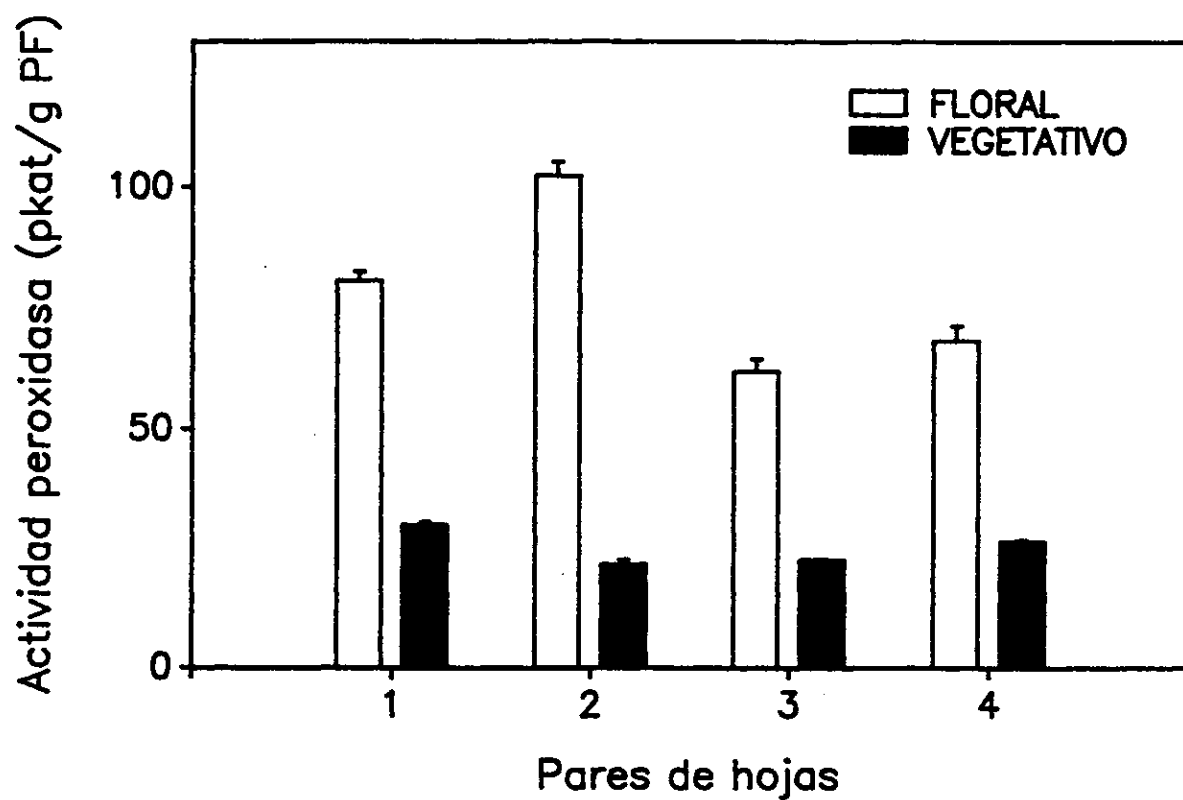


Figura III - 12.- Nivel de actividad peroxidasa soluble medida con 4-metoxi- α -naftol en hojas en estado floral y vegetativo teniendo en cuenta la posición de las hojas a lo largo de los cuatro primeros internodos desde el ápice.

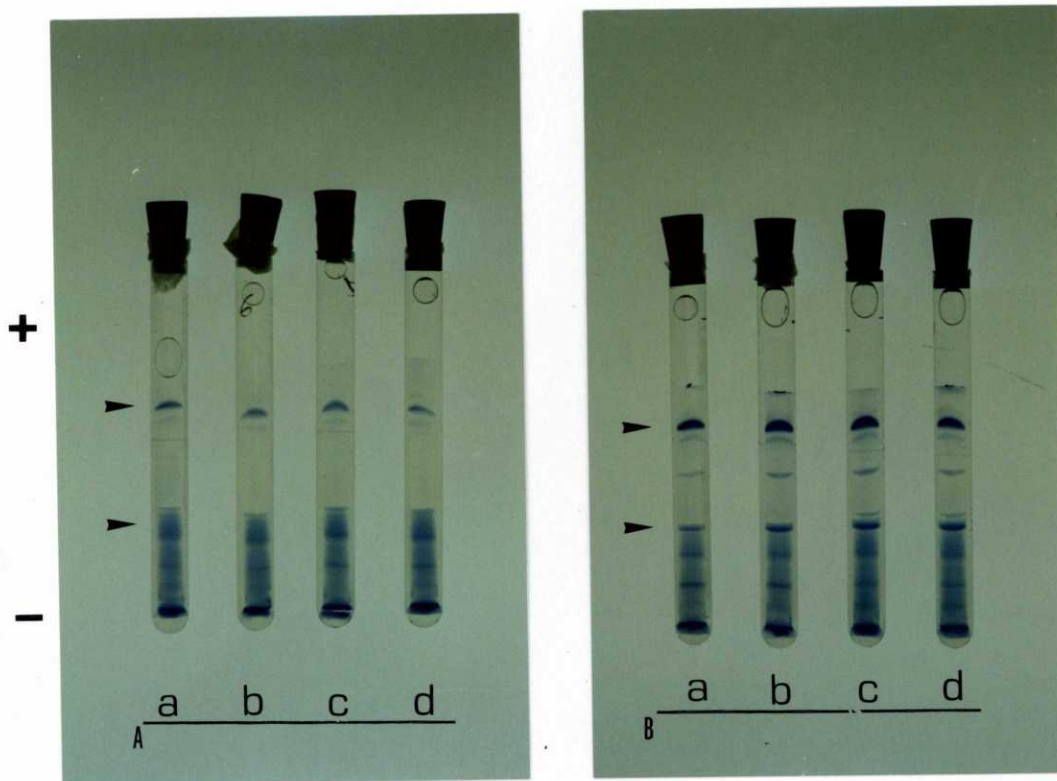


Figura III - 13.- Patrón de isoenzimas peroxidasas solubles teñidos con 4-metoxi- α -naftol, en plantas en estado vegetativo (A) y plantas en estado floral (B). a) 1º internodo, b), 2º internodo, c) 3º internodo y d) 4º internodo del ápice a la base.

La utilización de la técnica de infiltración a vacío, nos permitió confirmar la presencia de las isoenzimas peroxidasa A₁ y B₂ en el espacio libre de la pared celular de hojas de *Capsicum annuum* en equilibrio con las iónicamente enlazadas a la pared celular. Se utilizó glucosa-6-fosfato deshidrogenasa como marcadora citosólica, y se pudo establecer que la contaminación por citosol fue, en todos los casos, inferior al 0,1%.

Mediante el uso de esta técnica, fue posible recuperar 16 pkat g PF⁻¹ de actividad peroxidasa en la solución del espacio libre extraído con tampón, mientras que al utilizar tampón que contenía Cl₂Ca 100 mM, la cantidad de actividad peroxidasa recuperada fué de 39 pkat g PF⁻¹. Ya que el Cl₂Ca solubiliza la actividad peroxidasa del espacio libre de la pared celular y la iónicamente enlazada a la pared, podemos llegar a la conclusión que de los 39 pkat de actividad peroxidasa extraídos con tampón conteniendo Cl₂Ca, 23 pkat g PF⁻¹ de esta actividad se corresponden con la actividad real *in vivo* en la pared celular (Tabla III - 4).

Los patrones de isoenzimas de la actividad peroxidasa recuperada del espacio libre de la pared celular con tampón (Figura III - 14, línea a) y con tampón conteniendo Cl₂Ca (Figura III - 14, línea b) nos muestran la presencia de las nueve isoenzimas peroxidasa previamente establecidas en la fracción soluble (Figura III - 11, línea a). De estas, el nivel de las isoenzimas peroxidasa A₁ y B_{2,3,4,6} era mayor en el fluido del espacio libre de la pared celular recuperado por centrifugación a partir de hojas infiltradas con Cl₂Ca. Esto nos permite suponer que tales isoenzimas peroxidasa, las isoperoxidasas A₁ y B_{2,3,4,6} enlazadas iónicamente a la pared celular están en equilibrio con aquellas otras presentes en los espacios libres de la pared celular.

Considerando que la recuperación de la actividad peroxidasa presente en el

Tabla III - 4.- Distribución de las actividades peroxidasa y glucosa -6- fosfato deshidrogenasa en los fluidos intercelulares de *Capsicum annuum*. La actividad enzimática viene expresada en pkat/gr de tejido y los resultados son la media de dos experiencias independientes. La ruptura celular fue del 0.09%, según la medida de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.

Fracción	PRX	%	G6PDH	%
Soluble Protoplástica	67	63.2	8.7	99.8
Iónica de Pared	23	21.70	0.008	0.09
Soluble Apoplástica	16	15.09	0.008	0.09

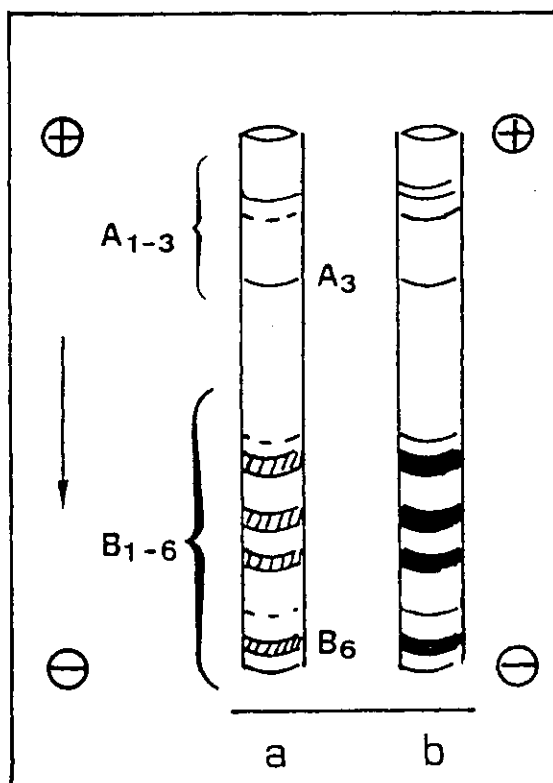


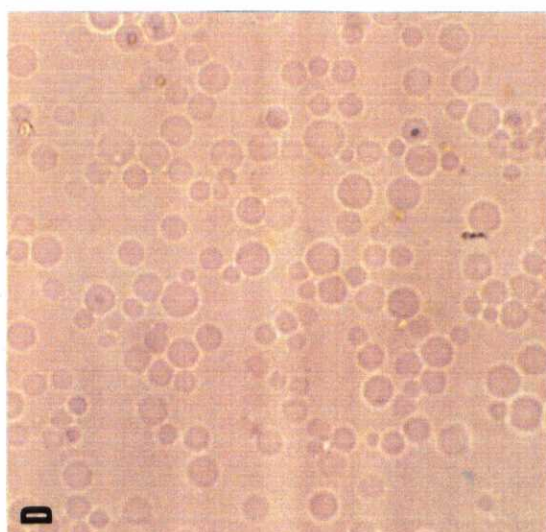
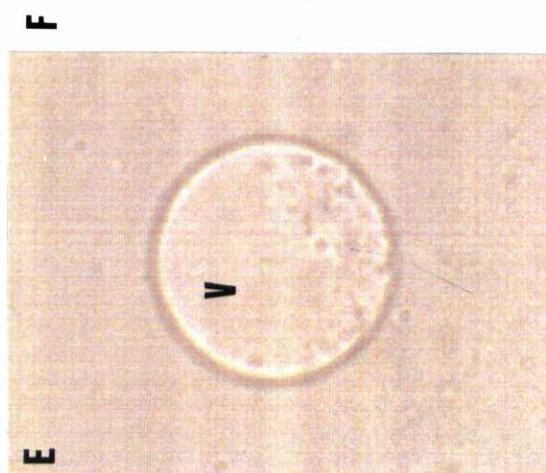
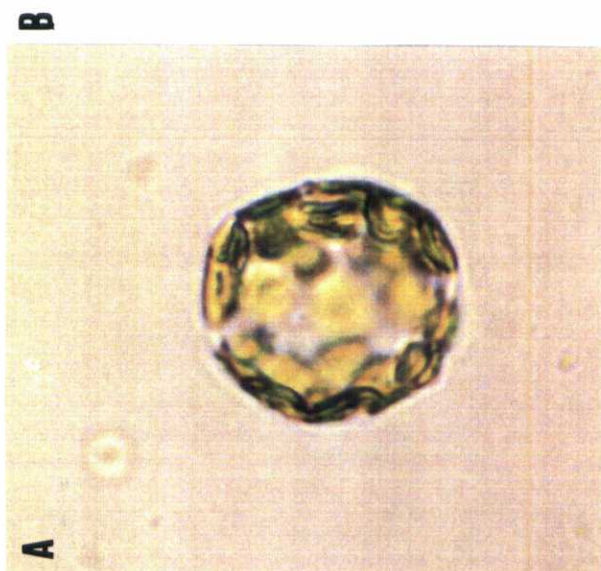
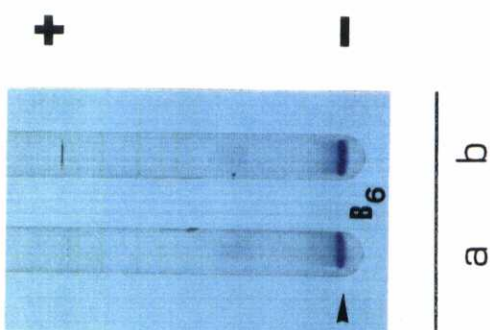
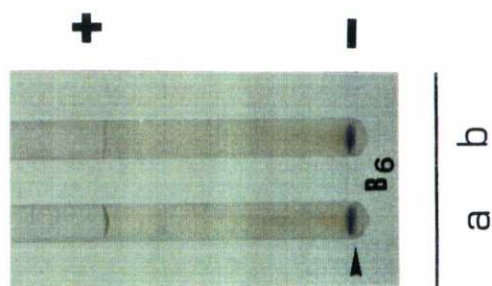
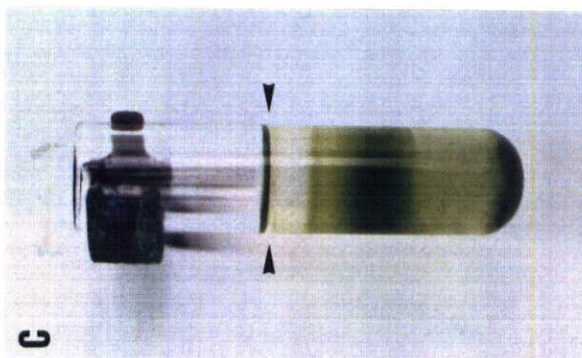
Figura III - 14.- Patrones de isoenzimas peroxidasa del espacio libre de la pared celular, extraídas con tampón (a) y con tampón conteniendo Cl_2Ca 100 mM (b) teñidos con 4-metoxi- α -naftol. Las flechas indican el sentido de la migración de la proteína durante el isoelectroenfoque. La intensidad del bandeo comparativo viene dada por el grado de sombreado.

infiltración, se estableció la naturaleza de la actividad peroxidasa intracelular (protoplástica) en hojas de *Capsicum* por medio del aislamiento y purificación de protoplastos. Estos protoplastos fueron recuperados a partir de las interfases 0-5% (fracción i_1) y 5-10% (fracción i_2) del gradiente de Ficoll empleado para su purificación. A nivel de microscopio óptico, aparecen como células esféricas sin daño aparente en las membranas o desintegración de la estructura interna (Figura III - 15A). Después del isoelectroenfoque, la actividad peroxidasa en la fracción de protoplastos del mesófilo en la i_1 (Figura III - 15B, línea a) e i_2 (Figura III - 15B, línea b) revela la única presencia de la isoenzima peroxidasa más básica, B₆.

Con el fin de establecer la localización en el protoplasto de esta isoenzima peroxidasa fuertemente básica, se prepararon vacuolas a partir de protoplastos del mesófilo sin purificar mediante choque osmótico, y se purificaron en un gradiente de Nycodenz por flotación (Figura III - 15C). La pureza de las vacuolas, se chequeó por observación al microscopio óptico y ensayos enzimáticos. La observación al microscopio de la preparación final de vacuolas, muestra la ausencia de protoplastos y de contaminación notable por cloroplastos (Figura III - 15D). Un mayor aumento, revela la no adherencia de membranas en el tonoplasto (Figura III - 15E). La pureza también se ensayó por métodos bioquímicos, esto es, la medida de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en la preparación de protoplastos y de vacuolas, nos muestra que la preparación de vacuolas está levemente contaminada por componentes citoplásmicos (Tabla III - 5). Esta contaminación citoplásmica fué establecida aproximadamente en un 10%.

Finalmente, el patrón de isoenzimas de la actividad peroxidasa vacuolar (Figura III - 15F, línea b), es similar al establecido en los protoplastos de partida (Figura

Figura III - 15.- A) Fotografía a microscopía óptica de protoplastos del mesófilo de *Capsicum annuum* después de la purificación en un gradiente discontinuo de Ficoll. B) Patrón de isoenzimas de actividad peroxidasa en protoplastos del mesófilo recuperados a partir de la interfase de Ficoll 0-5% (a, fracción i_1) y de la interfase de Ficoll 5-10% (b, fracción i_2) después de la tinción con 4-metoxi- α -naftol. C) Gradiente de Nycodenz empleado para la purificación de vacuolas del mesófilo por flotación. Las vacuolas están presentes en la capa superior (señalada). D) Fotografía a microscopía óptica de una población de vacuolas purificada por flotación, E) Visión ampliada de una vacuola del mesófilo de hojas de *Capsicum*. F) Patrón de isoenzimas de actividad peroxidasa en los protoplastos del mesófilo de partida (a) y vacuolas (b) de hojas de *Capsicum* después de la tinción con 4-metoxi- α -naftol.



III - 15F, línea a) lo que nos permite sugerir que la isoperoxidasa B₆ de los protoplastos del mesófilo está presumiblemente localizada en un 100% en el espacio vacuolar.

3.5. - DISCUSION

Los estudios electroforéticos en geles de almidón realizados en plantas de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* para determinar la actividad PRX, se caracterizan por presentar un patrón de isoenzimas con variaciones de tipo cualitativo y cuantitativo.

Si observamos el comportamiento del sistema peroxidasa en otras solanáceas, vemos como esta especie presenta un patrón similar a los que ofrecen *Nicotiana* y *Petunia*. Así, en *Nicotiana*, Mäder (1976) encuentra tres zonas de actividad, dos anódicas (G_1 y G_2) y una catódica (G_3). En *Petunia* Van den Berg y Wijsman (1981) también detectan tres zonas de actividad, PRX-a, PRX-b y PRX-c, de las cuales PRX-c es catódica.

En otros géneros de la familia, el comportamiento es diferente. Rick (1983) en *Lycopersicon* define genéticamente 7 loci de peroxidasas, 3 anódicos, 3 catódicos y 1 que bandea en las dos partes del gel. Quiros y McHalen (1985) en *Solanum* encuentran 6 peroxidasas anódicas y 2 catódicas. Concklin y Smith (1971), en *Datura* llegan a determinar un total de 19 peroxidasas en la hoja, 12 anódicas y 7 catódicas.

En el género *Capsicum* el único estudio realizado hasta el momento es el de Tanksley (1984). En él se refiere sólo a las peroxidasas catódicas que presentan una zona de actividad con dos bandas.

Ante la escasez de información referente a este género y en función de los resultados obtenidos en *Capsicum annuum* L. var. *annuum* por sus movilidades relativas, el comportamiento del sistema, y la expresión controlada por el desarrollo, podemos inferir que el sistema peroxidasa es homólogo al que presentan otras solanáceas y particularmente al de *Petunia* y *Nicotiana*.

3.5.1. - COMPORTAMIENTO DEL SISTEMA PEROXIDASA

Estudios electroforéticos en geles de almidón realizados en otras especies, muestran claramente que existe una elevada especificidad órgano-enzima. Así, se han detectado peroxidasas específicas de raíces, tallo, hojas, etc. en *Petunia* (Van den Berg y Wijsman, 1981). Sin embargo, el patrón de enzimas que presenta *Capsicum annum* L. var. *annuum* se caracteriza por repetirse en todos los órganos estudiados.

En función del estado de desarrollo en que se encuentre el órgano y de la técnica utilizada, este patrón presenta variaciones en cuanto al número e intensidad de las bandas. Dependiendo de la isoenzima, estas diferencias serán más o menos marcadas, siendo la PRX-a la que presenta alteraciones más notorias en cuanto al número de bandas presentes, lo cual nos hizo pensar en un principio que podría existir variabilidad en esta isoenzima.

En el sistema PRX-a se ha observado que dependiendo de la edad del tejido, pueden aparecer de 1 a 3 bandas, apareciendo el triplete completo en órganos adultos. Esto ha sido observado por Van den Berg y Wijsman (1981) en *Petunia* en donde PRX-a aparece como un triplete en hojas viejas, mientras que en hojas jóvenes sólo aparece la banda lenta a_1 . Como consecuencia de este hecho introducen el término de "mozima", sugiriendo que las dos bandas rápidas del triplete serían las formas modificadas de la banda lenta, explicándose de esta manera su presencia en tejidos adultos.

Anteriormente en *Lycopersicon*, Rick y col. (1979) habían mencionado la existencia de modificaciones post-transcripcionales responsables de la aparición de bandas que migran conjuntamente. En el caso de tomate, serían cuatro las bandas en lugar de tres. Mäder y col. (1980), estudiando las peroxidasas rápidas en *Nicotiana* (G_1), observan también este fenómeno.

Estudios realizados por Hendriks y Van Loon (1990) demuestran que la heterogeneidad de la PRX-a en *Petunia* está relacionada con la molécula de carbohidratos que forma parte de la enzima. Estas modificaciones que se observan, pueden estar causadas por la eliminación de residuos de manosa terminales después de su secreción al apoplasto. La eliminación podría tener lugar en dos etapas, generándose primero PRX-a₂ y luego PRX-a₃ a partir de PRX-a₁ por la acción de una manosidasa extracelular.

Por otra parte, los resultados obtenidos por isoelectroenfoque confirman el diferente peso molecular de las peroxidases ácidas de *Capsicum*, ya que estas isoenzimas aparecen en número de 5 en geles de almidón y de 3 en isoelectroenfoque. Este resultado coincide con el obtenido por Hendriks y col. (1990b) que purifican las variantes electroforéticas de PRX-a en *Petunia* y observan que presentan el mismo punto isoeléctrico pero tienen distinto peso molecular.

Las tres bandas observadas en órganos adultos en el sistema PRX-a, podríamos explicarlo en base a la existencia de mozimas también en *Capsicum annum* L. var. *annuum*. El hecho de que en órganos jóvenes aparezca una sola banda, y que según avanza el desarrollo aparezcan la segunda y la tercera, que en muchos casos alcanza una mayor intensidad en su tinción, nos hace suponer que esta especie se comporta de la misma manera que las otras solanáceas en las que se observa este fenómeno.

La existencia de mozimas lo podríamos hacer extensivo a las catódicas, ya que se trata igualmente de enzimas extracelulares y según Hendriks y col. (1985), la heterogeneidad de las PRX en cuanto a la molécula de carbohidratos parece estar restringida a aquellas localizadas extracelularmente. Aun cuando no se ha hablado de

mozimas en las peroxidases catódicas, podríamos sugerir que la PRX-c₂ que aparece sólo en órganos adultos, fuese también una modificación postranscripcional de la PRX-c₁, en la cual habría que determinar los azúcares responsables de estas modificaciones.

Los resultados con isoelectroenfoque nos muestran como el número de peroxidases básicas que aparecen, es mayor que las detectadas por medio de electroforesis en gel de almidón. Esto puede ser debido a que se trata de formas con diferente punto isoeléctrico que no se llegan a visualizar con los geles de almidón.

3.5.2. - ACTIVIDAD PEROXIDASA EN RELACION AL GRADIENTE DE CRECIMIENTO

En el proceso de diferenciación celular, existe una continua síntesis y degradación de enzimas específicas y proteínas estructurales. Un método muy utilizado para estudiar dichos cambios, es el de cortar en segmentos consecutivos un órgano (ejemplo: tallo) y observar la actividad enzimática en cada uno de los fragmentos. Según este método revisado por Heyes (1977), asumimos que la actividad de la enzima en el sistema ensayado, refleja la actividad en el tejido del cual la hemos extraído.

Existen diferentes ejemplos de diferenciación bioquímica, habiéndose detectado cambios en la actividad enzimática en enzimas pertenecientes a la glicolisis y al ciclo de Krebs (Fowler y Rees, 1970). No solo se han observado gradientes de actividad relacionados con la maduración de las células (Angelini y col., 1990) sino también otras enzimas, entre las que se encuentran la arginina descarboxilasa (Palavan y Galston, 1982), la invertasa ácida (Hatch y Glasziou, 1963) y la ascorbato oxidasa (Goldberg y col., 1989) que ofrecen un gradiente a lo largo del tallo.

También se ha observado la existencia de un gradiente de actividad en

peroxidasas a lo largo del eje de la planta, que podía estar correlacionado con las modificaciones que aparecen a través de su desarrollo, como por ejemplo, la rigidez de la pared o la capacidad de crecimiento. En general, se ha propuesto que las peroxidasas anódicas catalizan la síntesis de lignina y que las peroxidasas catódicas están involucradas en la oxidación del ácido indol-3-acético (Mäder y Amberg-Fisher, 1982; Mäder y Füssi, 1982).

En *Cicer arietinum* (Leguminosa) existe un gradiente de actividad peroxidasa paralelo a los depósitos de lignina que se caracteriza por un decrecimiento en sentido acropétalo con un ligero aumento en el ápice (Angelini y col., 1990). Algo semejante a lo que se observa en *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, aunque en nuestro caso la actividad en el ápice es algo mayor.

Goldberg y col. (1986) también encuentran un gradiente de actividad peroxidasa en hipocotilos de *Vigna radiata* y relacionan este gradiente con la distribución de las distintas isoenzimas a nivel celular. Observan que en las células jóvenes, la mayor parte de la actividad peroxidasa es intracelular, lo cual explicaría su mayor proporción en las partes apicales del hipocotilo, en la cual el citoplasma es la fracción celular más abundante.

También hemos podido observar en *Capsicum* la existencia de un gradiente que se prolonga a lo largo del tallo y a las hojas que salen de él. Pero queremos destacar que la existencia de este gradiente no se manifiesta sólo en el aumento o disminución de la actividad enzimática, sino que va acompañado de una variación en la intensidad de las isoenzimas y en el número de bandas de cada peroxidasa cuando utilizamos electroforesis en geles de almidón. Este comportamiento podemos explicarlo

en función de las posibles actividades peroxidasa y de su localización subcelular.

Respecto a la localización subcelular, en *Petunia* se ha visto que la PRX-a localizada extracelularmente, puede estar involucrada en la polimerización de lignina, lo cual explicaría el incremento de su actividad con la edad de la hoja (Hendriks y Van Loon, 1990). Eso también ha sido observado en las isoperoxidasa anódica más rápida (G₁) de *Nicotiana* (Mäder y col., 1980). La PRX-a de *Petunia* y la G₁ de *Nicotiana* se ha demostrado que son serológicamente homólogas (Hendriks y col., 1990b).

En *Capsicum* observamos como la PRX-a sufre un aumento paulatino a medida que nos acercamos a la base del tallo. Si esta isoenzima está implicada en el proceso de lignificación, puede explicarse su mayor intensidad en los tejidos más lignificados, base del tallo y hojas primarias y su escasa actividad en los tejidos en fase de crecimiento. Lógicamente, como en el caso de *Petunia* (Hendriks y Van Loon, 1990) también tendría una localización extracelular. Angelini y col. (1990) en Leguminosas confirman esta hipótesis indicando la estrecha relación entre la actividad peroxidasa y los depósitos de lignina. La técnica de infiltración a vacío de hojas a lo largo del eje de la planta, confirma esta preferente localización extracelular de la PRX-a.

En células jóvenes de *Vigna radiata* Goldberg y col. (1986), han encontrado que la mayor parte de la actividad peroxidasa, está localizada en el citosol. En la parte apical del tallo de *Capsicum*, hemos observado una gran actividad de la PRX-b. Dado que esta zona se caracteriza por estar constituida por células jóvenes, en las cuales predomina el citoplasma, cabe pensar que esta isoenzima estaría localizada intracelularmente como sucede en *Petunia* cuya peroxidasa anódica de movilidad intermedia, presenta esta localización (Hendriks y col., 1985).

Cuando hemos realizado la infiltración del 1^{er} par de hojas de una planta

(tanto en estado vegetativo como floral), hemos podido observar como la mayor parte de la actividad peroxidasa localizada intracelularmente, se correspondía en los geles de almidón con una mayor intensidad de la PRX-b. Si bien esta enzima también aparece en el fluido de los espacios libres de la pared recuperado con tampón y con tampón suplementado con Cl_2Ca , podemos suponer que se encuentra en ambos compartimentos, como forma soluble libre e iónicamente ligada a la pared, predominando su localización intracelular en las fases tempranas del desarrollo.

Estos dos máximos de actividad que se observan en los ensayos enzimáticos, estarían relacionados por lo tanto uno con la fracción intracelular y el otro con la fracción extracelular, predominando la actividad de ésta sobre la intracelular. Una observación de los scanings realizados, muestran como la superficie ocupada por las PRX-a en la base es considerablemente mayor a la ocupada por PRX-b en el ápice.

Respecto a las peroxidases catódicas, podemos explicar su comportamiento en relación a su participación en el catabolismo del ácido indol-3-acético. Se sabe que existe un gradiente de concentración de auxina en la planta, determinado por su elevada proporción en la parte apical y su transporte basipétalo, lo cual determina la existencia de un gradiente de crecimiento (Sánchez-Bravo y col., 1986).

El nivel de isoenzima catódico en los tejidos se encontrará inversamente correlacionado con la capacidad de este para crecer. De forma que en la parte basal del tallo, en la cual la capacidad de crecimiento ha dado paso al proceso de lignificación, la actividad catódica presenta una gran intensidad. A medida que avanzamos en el tallo, la actividad de las peroxidases disminuye. Estos bajos niveles de actividad peroxidasa catódica, están inversamente correlacionados con los altos niveles de hormona dados

por algunos autores en estos tejidos.

Ninguna de las bandas catódicas es visualizada cuando utilizabamos guaiacol como sustrato en las tinciones de los geles de almidón, en lugar de o-dianisidine o 3-amino-etil carbazol (resultados no presentados). Esto nos hace pensar que las peroxidasas catódicas pudieran no contribuir a la actividad medida mediante ensayo enzimático, como lo han observado también Hendriks y col. (1990b) en *Petunia*.

Hemos observado también, como la proporción de peroxidasas catódicas recuperadas de los espacios libres de la pared, aumenta al acercarnos a la base del tallo, presentando una preferente localización extracelular. A diferencia de las PRX-a, las PRX-c no incrementan su intensidad al infiltrar el tejido con tampón suplementado con Cl_2Ca , con lo cual podríamos suponer que su comportamiento, se correspondería con formas solubles libres en ambos compartimentos, predominando su localización extracelular.

Este estudio nos ha permitido observar la importancia del apoplasto como un compartimento específico, y cuyo complemento de enzimas refleja la distribución de las enzimas solubles e iónicamente ligadas a la pared, así como las variaciones que tienen lugar en el desarrollo. Se han realizado otras investigaciones de fraccionamiento para ayudar a determinar la localización subcelular de cada isoenzima y se ha relacionado con el estado de desarrollo de la planta, vegetativo y floral.

3.5.3. - LOCALIZACION SUBCELULAR DE LAS ISOENZIMAS PEROXIDASA Y SU RELACION CON EL ESTADO DE DESARROLLO DE LA PLANTA.

Durante la transición de la planta del estado vegetativo al estado floral, se ha observado frecuentemente la existencia de cambios en la actividad peroxidasa y en los

patrones de isoenzimas. Greppin y Penel (1991), sugieren que en la fase inductiva la actividad peroxidasa total en la hoja decrece debido a una disminución de la actividad peroxidasa básica, y aumenta posteriormente durante la fase de iniciación debido a un incremento de las peroxidasas ácidas y básicas. Por otra parte, se ha descrito una expresión específica de isoenzimas de peroxidasa durante el estado floral en las capas de células epidérmicas de diferentes internodos (Thorpe y col., 1978), o durante el cultivo de tiras de bandas epidérmicas que están inducidas para formar yemas florales (Thorpe y col., 1978; Kay y Basile, 1987), o por tratamientos con bases análogas al DNA, las cuales promueven la floración en *Arabidopsis thaliana* (Gotô y Hamada, 1988).

En todos los casos, se ha observado invariablemente un incremento de la actividad peroxidasa, acompañado con frecuencia de la expresión específica de algunas isoenzimas de peroxidasa, muchas veces consideradas como marcadoras de la diferenciación y la morfogénesis de la planta (Kahlem 1975; Trinh y col., 1981). Sin embargo, este comportamiento de las peroxidasas no ha estado acompañado por un estudio profundo de la localización subcelular de las isoenzimas de peroxidasa nuevamente expresadas.

Aunque en este estudio no se han investigado los cambios peroxidasa durante la evocación floral, en las hojas de *Capsicum annuum* se ha observado un incremento en la actividad peroxidasa en el estado floral con respecto al vegetativo. Estos incrementos están acompañados por la expresión diferencial de dos isoenzimas peroxidasa (una aniónica y una catiónica), previamente denominadas como A₁ y B₂, como componentes del medio de la fracción peroxidasa a partir de cultivos celulares de *Capsicum* (Cuenca y col., 1989). El incremento en la actividad total y en los isoenzimas peroxidasa A₁ y B₂ en las hojas de las plantas en estado floral no estaba relacionado

con la edad de la hoja ya que el incremento era específico de plantas en estado floral. Esto sugiere que los incrementos en las isoenzimas peroxidasa de la hoja A₁ y B₂ pueden ser considerados como marcadores del estado floral en la morfogénesis de *Capsicum annuum*.

Las isoperoxidasas de la hoja A₁ y B₂ están presentes en la pared celular y en el fluido del espacio libre de la pared recuperado por la centrifugación de discos de hoja. Estos resultados, y la observación de que la recuperación en el espacio libre de la pared celular de estas isoenzimas puede verse mejorada por infiltración con Cl₂Ca, sugiere que estas isoenzimas se están moviendo en los espacios libres de la pared celular probablemente en equilibrio con las enzimas enlazadas iónicamente a la pared celular, ya que uno de los principales orígenes de la actividad peroxidasa soluble (no sedimentable) es el espacio libre de la pared celular (Ros Barceló y col., 1989b). Como ha sido previamente establecido para las peroxidases de la pared de células de altramuz, este equilibrio puede estar controlado por la relación Ca⁺² / H⁺ (Ros Barceló y col., 1988b).

La isoperoxidasa B₂ está también presente en membranas. Aunque la localización subcelular de estas isoperoxidasas en membranas no ha sido estudiada, es probable que su presencia en esta fracción sea la consecuencia de la síntesis y secreción de las peroxidases extracelulares a la pared celular (Ros Barceló y col., 1988b).

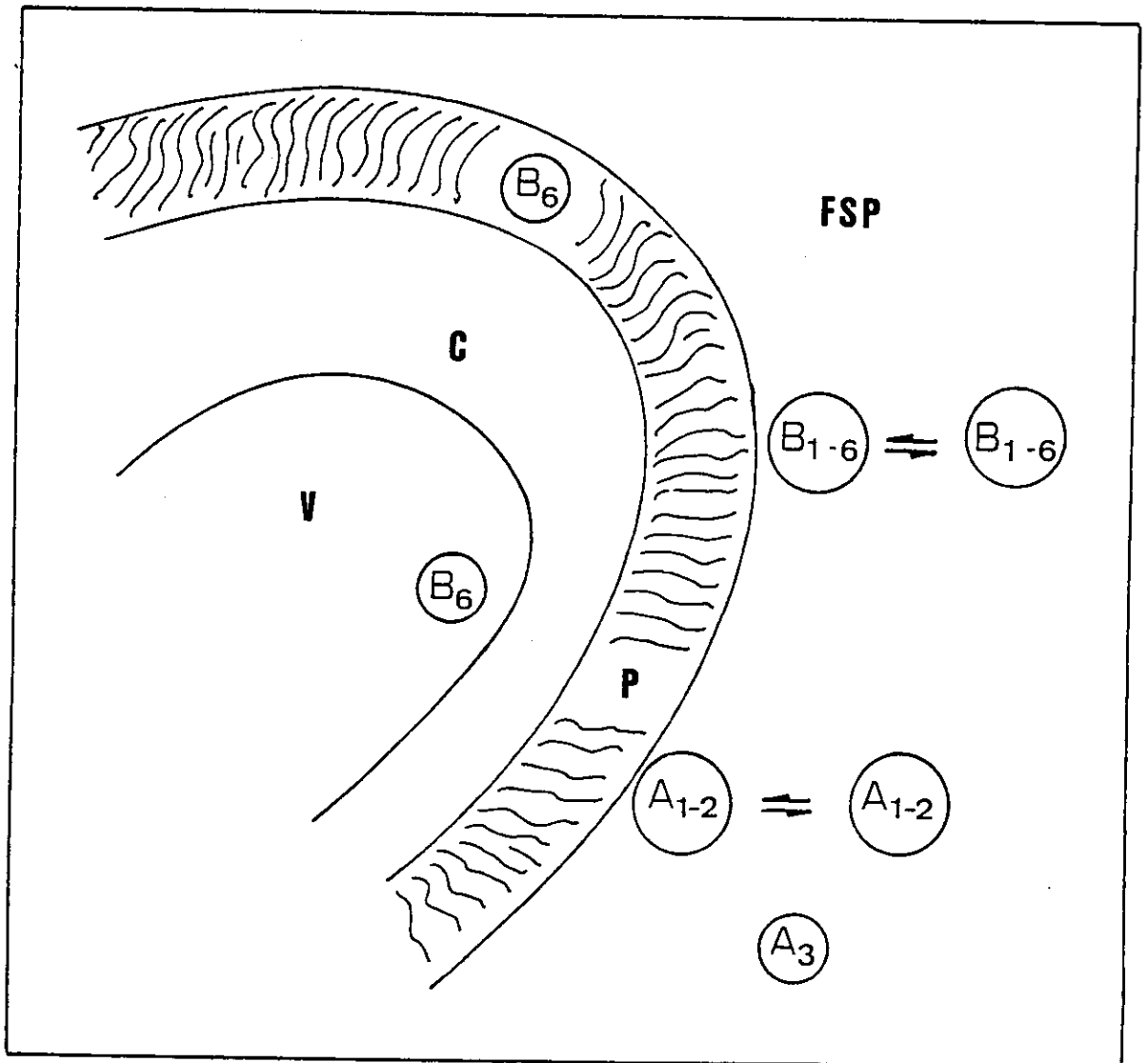
Asimismo, las isoperoxidasas A₁ y B₂ no están localizadas como formas solubles en los protoplastos del mesófilo o en las vacuolas del mesófilo, por esta razón, se podría esperar que estas isoenzimas estuviesen principalmente localizadas en la pared celular y en el espacio libre de la pared celular.

Estos estudios han permitido identificar la localización específica de las isoperoxidasas en hojas de *Capsicum* como se resume en la Figura III -16. A partir de esta figura, se podría concluir que la isoperoxidasa B₆ es la única isoenzima presente en las vacuolas y que está también covalentemente enlazada a la pared celular, mientras que las isoperoxidasas B₁₋₆ y las isoperoxidasas A₁₋₂ están iónicamente enlazadas a la pared celular, probablemente en equilibrio con las mismas isoenzimas presentes en el espacio libre de la pared celular. Por otra parte, la isoperoxidasa A₃ se ha encontrado moviéndose libremente a través de los espacios libres de la pared celular. Estos resultados están de acuerdo con los estudios previos acerca de la liberación de isoperoxidasas al medio de cultivos celulares en suspensión de *Capsicum* ya que todas estas isoenzimas se encuentran en el medio de células cultivadas (Cuenca y col., 1989) el cual, puede ser considerado como un gran espacio libre de la pared (Van Huystee y Tam, 1988).

Sin embargo la cuestión más importante concierne a la implicación fisiológica del incremento en la actividad peroxidasa en las hojas de plantas en estado floral y, en particular, del incremento en el espacio libre de la pared celular de las isoperoxidasas A₁ y B₂.

Este incremento de las isoperoxidasas A₁ y B₂ puede estar en parte relacionado con el control homeostático del catabolismo de la auxina. Recientemente Bernier (1988) ha verificado las conclusiones previas obtenidas por Zeevaart (1976) acerca de que la auxina exógena puede inhibir y promover la iniciación floral en las plantas con flores. Así, la auxina es promotora a bajas dosis e inhibidora a altas dosis, estando probablemente los efectos inhibidores relacionados con una inhibición general del crecimiento o una biosíntesis del etileno inducida por la auxina (Bernier, 1988).

Figura III - 16.- Representación esquemática del patrón de localización subcelular de isoperoxidasas de hoja de *Capsicum annuum* ofreciendo las principales características: i) la localización de la isoperoxidasa B₆ en vacuolas (V) y en la fracción covalentemente enlazada, ii) la presencia de las isoperoxidasas A₁₋₂ y B₁₋₆ en la fracción iónicamente enlazada a la pared en equilibrio con aquellas que están moviéndose en los espacios libres de la pared celular (FSP), y iii) la presencia de isoperoxidasa A₃ en los espacios libres de la pared celular. No se muestra la localización subcelular de las peroxidadas enlazadas a membrana. C, citosol; P, pared celular.



En este contexto, Jacobs (1985) propone que la auxina puede funcionar como un reservorio inhibitor general para la transición de la fase vegetativa a la reproductiva, bloqueando la evocación, el período de diferenciación celular en el ápice que permite el desarrollo floral, apareciendo la hoja como el lugar de la acción primaria de la auxina.

En este contexto, ya que las isoperoxidasas A₁ y B₂ de *Capsicum* están localizadas en los espacios libres de la pared, y es en este espacio en donde parece tener lugar principalmente el catabolismo de la auxina (Ros Barceló y Muñoz, 1992), se podría sospechar que un incremento en estas isoperoxidasas en las hojas es responsable de una disminución en el nivel de auxina lo suficientemente importante como para permitir el desarrollo floral.

CAPITULO IV

**Metabolismo oxidativo de la capsicina y dihidrocapsicina
por peroxidasas de rábano y de pimiento.**

4.1. Introducción.	166
4.2. Objetivos.	168
4.3. Material y métodos.	169
4.3.1. Reactivos	169
4.3.2. Material vegetal	169
4.3.3. Preparación de las muestras	169
4.3.4. Optimización de las reacciones para peroxidasas de rábano y pimiento	170
4.3.4.1. Ensayo de la actividad peroxidasa de rábano con capsicina y dihidrocapsicina	170
4.3.4.2. Ensayo de la actividad peroxidasa de pimiento con capsicina y dihidrocapsicina	170
4.3.5. Otros métodos	171
4.4. Resultados.	172
4.4.1. Caracterización cinética de la oxidación de capsicina y dihidrocapsicina catalizada por peroxidasas de rábano y de pimiento	172
4.4.1.1. Determinación del número de especies absorbentes en los medios de reacción	172
4.4.1.2. Coeficiente de absorción aparente de los productos de oxidación de la capsicina y dihidrocapsicina	172

4.4.2. Optimización de las reacciones para las peroxidasa de rábano y pimiento	177
4.4.2.1. Efectos del pH sobre la velocidad de oxidación de capsicina y dihidrocapsicina	177
4.4.2.2. Dependencia de la velocidad de oxidación con la concentración de sustratos	177
4.4.2.3. Efectos de la concentración de H ₂ O ₂ sobre la velocidad de oxidación de capsicina y dihidrocapsicina	186
4.4.2.4. Efectos de la concentración de enzima sobre la velocidad de oxidación de la capsicina y dihidrocapsicina	186
4.4.3. Análisis mediante isoelectroenfoque de las peroxidasa de fruto	186
4.5. Discusión.	192

4.1. - INTRODUCCION

El pimiento de Padrón presenta un peculiar gusto picante debido a la acumulación de la capsicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida) y de otros compuestos relacionados, entre ellos su derivado dihidro, la dihidrocapsicina (Leete y Louden, 1968).

La capsicina se usa principalmente como aditivo picante en una amplia variedad de preparados nutritivos, y en productos farmacéuticos estimuladores de la digestión, así como en el control de ciertos desórdenes reumáticos (Sooch y col., 1977). La demanda de capsicina por el mercado tanto alimenticio como farmacéutico, es muy alta, y existe la posibilidad de su producción por células de pimiento cultivadas *in vitro* (Johnson y col., 1990; Ochoa-Alejo y Salgado-Garciglia, 1992).

La capsicina y la dihidrocapsicina normalmente se encuadran dentro del grupo de los alcaloides y pertenecen a la subclase de los capsicinoides (Leete y Louden, 1968). Los capsicinoides se acumulan a medida que avanza el desarrollo de la planta en las vacuolas de las células del fruto, presentando su concentración más elevada cuando el fruto ha alcanzado su estado de madurez caracterizado por la adquisición de una coloración rojiza (Iwai y col., 1979a; Suzuki y col., 1980).

Al igual que otros compuestos fenólicos y alcaloides, estos compuestos están sometidos a un intenso recambio metabólico y degradación que constituye el último paso de su metabolismo (Iwai y col., 1979a; Suzuki y col., 1980). Esto es particularmente interesante en frutos de *Capsicum* (Iwai y col., 1979a; Suzuki y col., 1980) y en cultivos en suspensión (Salgado-Garciglia y Ochoa-Alejo, 1990; Johnson y col., 1990). La enzima principal de la biosíntesis de capsicina (capsicinoide sintetasa)

está localizada en el tonoplasma de las células epidérmicas (Fujiwake y col., 1982b), probablemente ligada a la cara citoplásmica de la membrana vacuolar, como se podría esperar del pH alcalino óptimo de actuación de las enzimas que intervienen en la síntesis de capsicinoides (Fujiwake y col., 1980b). Una vez sintetizada, la capsicina se acumula en las vacuolas de las células epidérmicas de la placenta del fruto (Fujiwake y col., 1980a; Suzuki y col., 1980) en dónde es metabolizada, para producir sus productos de degradación, hasta el momento desconocidos. El recambio y la degradación parece que son las últimas etapas en el desarrollo total del metabolismo de la capsicina.

Aunque la ruta biosintética de los capsicinoides está relativamente bien establecida, el conocimiento de la enzimología de su degradación es incompleto. Las peroxidasas pueden estar directamente implicadas en el metabolismo de estos compuestos ya que estas enzimas oxidan eficazmente al grupo vanillilo (Zapata y col., 1992), participan en el metabolismo de alcaloides (Perrey y col., 1989) y se localizan preferentemente en las vacuolas de los tejidos epidérmicos de frutos (Ros Barceló y Muñoz, 1992), incluyendo los de *Capsicum* (Cuenca y col., 1989).

4.2. - OBJETIVOS

El presente estudio tiene como objeto investigar la capacidad de las peroxidasas de frutos de *Capsicum* de catalizar la oxidación de la capsicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida), el principio picante del pimiento y de su derivado, la dihidrocapsicina (8-metil-N-vanillil-nonanamida), para obtener un mayor conocimiento de la ruta biosintética de los capsicinoides.

4.3. - MATERIAL Y METODOS

4.3.1. - REACTIVOS.

Los reactivos empleados fueron: capsicina (8-Metil-N-Vanillil-6-nonenamida), dihidrocapsicina (8-Metil-N-Vanillil-nonanamida), (Sigma, ST Louis, M.O., USA), H₂O₂ (Merck, Darmaskdt, FRG) y peroxidasa de rábano (HRP, tipo II Sigma P-8250).

4.3.2. - MATERIAL VEGETAL.

Los frutos de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* se compraron en un mercado local y se almacenaron a -4°C antes de su uso, pero nunca más de tres días.

4.3.3. - PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

Los frutos de *Capsicum* se homogeneizaron en un mortero con arena con acetona a -20°C. El homogeneizado se filtró inmediatamente a través de una capa de papel de filtro a 4°C en un embudo Buchner y los residuos se lavaron con acetona a -20°C hasta que se eliminaron todos los pigmentos. El precipitado de proteínas se resuspendió en Tris ClH 50mM pH 7,5 y se incubó en agitación durante 1 hora a 4°C. La solución de proteínas de pimiento se obtuvo cuando se clarificó por centrifugación a 3000xg durante 5 minuto, considerándose el sobrenadante como fracción de proteínas solubles y utilizándose de forma rutinaria sin una posterior purificación en todos los estudios enzimáticos.

4.3.4. - OPTIMIZACION DE LAS REACCIONES PARA PEROXIDASAS DE RABANO Y DE PIMIENTO.

Con el fin de optimizar la oxidación de la capsicina y dihidrocapsicina catalizada por peroxidasas de rábano y de pimiento, se estudió la tasa de oxidación en función del pH, concentración de H₂O₂, concentración de capsicina, dihidrocapsicina y concentración de enzima. Los rangos estudiados fueron los siguientes:

- pH -	3 - 9 (en tampón Tris acetato 0,1M)
- H ₂ O ₂ -	0,025mM - 1mM
- Capsicina -	0,3mM - 1mM
- Dihidrocapsicina -	0,05mM - 0,4mM

4.3.4.1. - Ensayo de la actividad peroxidasa de rábano con capsicina y dihidrocapsicina.

Los ensayos espectrofotométricos para peroxidasas de rábano se realizaron a 25°C en un medio de reacción que contenía capsicina 0,6mM (a partir de un stock 10mM en metanol de pureza HPLC), H₂O₂ 0,25mM y 16 pkat de peroxidasa de rábano en tampón Tris acetato 0,1M pH 7,00. Para la dihidrocapsicina, la composición del medio era de dihidrocapsicina 0,2mM (a partir de un stock 10mM en metanol de pureza HPLC), H₂O₂ 0,1mM y 16 pkat de enzima en tampón Tris acetato 0,1M pH 6,00.

4.3.4.2. - Ensayo de la actividad peroxidasa de pimiento con capsicina y dihidrocapsicina.

Los ensayos espectrofotométricos para peroxidasas de *Capsicum* se

realizaron a 25°C en un medio de reacción que contenía capsicina 1mM (a partir de un stock 10mM en metanol de pureza HPLC), H₂O₂ 0,1mM y tampón Tris acetato 0,1M pH 6,00. En el caso de la dihidrocapsicina, el medio de reacción estaba compuesto por dihidrocapsicina 0,2mM (a partir de un stock 10mM en metanol de pureza HPLC), H₂O₂ 0,1mM y tampón Tris acetato 0,1M pH 6,00. En ambos casos, la reacción era iniciada por la adición de 4,3 pkat de peroxidasa.

Un pkat de peroxidasa fue definido como la cantidad de proteína que oxida un pmol/s de 4-metoxi- α -naftol ensayado según Ferrer y col. (1990).

4.3.5. - OTROS METODOS.

El isoelectroenfoque en un gradiente de pH de 3,0-10,0 y la tinción zimográfica de las isoenzimas de peroxidasa de pimiento con 4-metoxi- α -naftol como sustrato, han sido descritos en el apartado 3.3.4.2.

4.4. - RESULTADOS

4.4.1. - CARACTERIZACION CINETICA DE LA OXIDACION DE CAPSICINA Y DIHIDROCAPSICINA CATALIZADA POR PEROXIDASA DE RABANO Y DE PIMIENTO.

4.4.1.1. - Determinación del número de especies absorbentes en los medios de reacción.

Los espectros consecutivos de los medios de reacción de la oxidación de la capsicina y la dihidrocapsicina por peroxidasas de rábano y de pimiento eran similares mostrándose en la Figura IV - 1 (A y B respectivamente) los espectros obtenidos con las peroxidasas de pimiento. Como puede observarse, los máximos cambios espectrales se obtuvieron a 262 nm. Estas variaciones de absorbancia corresponden a la transformación directa de los sustratos en sus productos de oxidación, ya que en ausencia de H₂O₂ no se apreciaron modificaciones espectrales, como se demuestra por la aplicación del análisis gráfico del test de Coleman y col. (1970) (Figura IV - 2 A y B).

4.4.1.2. - Coeficiente de extinción aparente de los productos de oxidación de la capsicina y dihidrocapsicina.

Los coeficientes de extinción a 262 nm de los productos de oxidación de la capsicina y de la dihidrocapsicina se calcularon por los cambios de absorbancia observados desde el inicio de la reacción hasta absorbancia constante a distintas concentraciones de sustratos. Dichos coeficientes de extinción resultaron ser $\epsilon_{262} = 5.3$

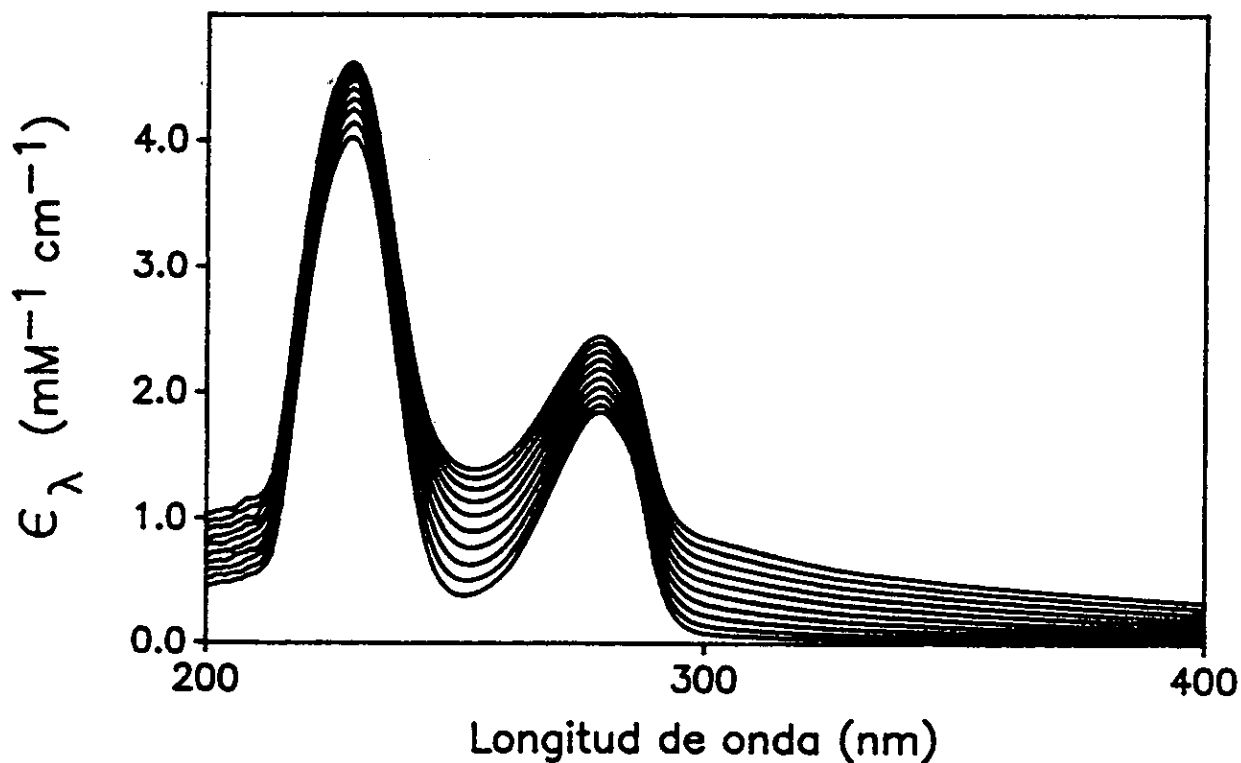


Figura IV - 1.- A. Espectros consecutivos de un medio de reacción conteniendo capsicina 1mM (a partir de una solución madre 10 mM en metanol), H_2O_2 0,1mM y Tris acetato 0,1M pH 6,00 y 4,3 pkat de peroxidasa de pimienta. Se utilizó una velocidad de 500 nm/min a intervalos de 1 min. Línea 1:30 s después de la adición de la enzima.

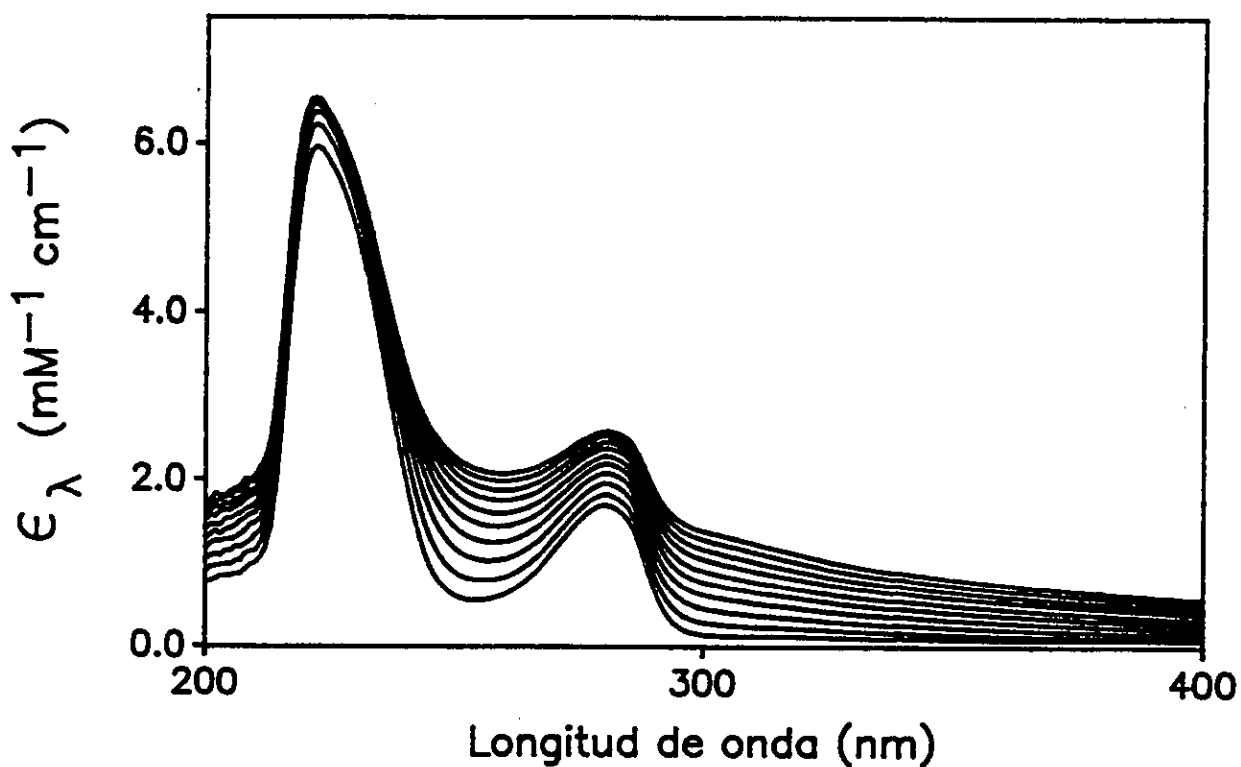
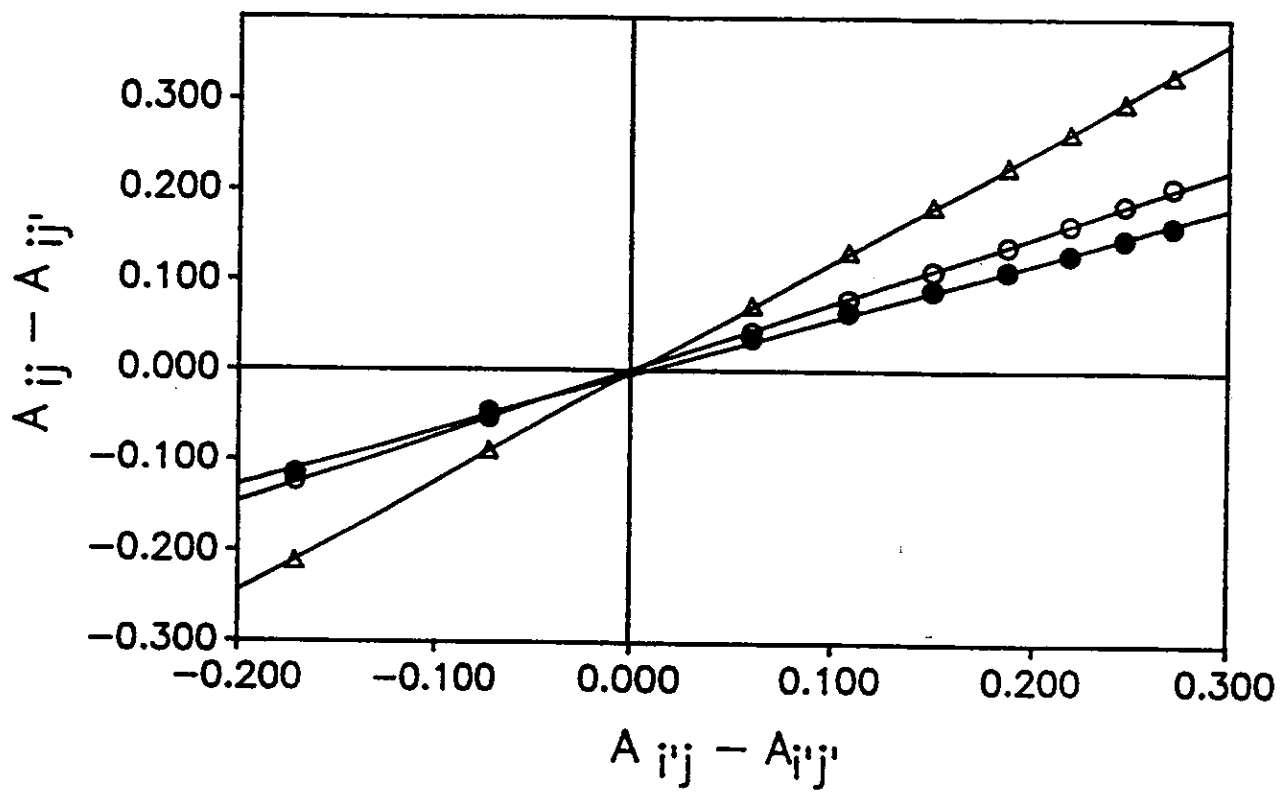
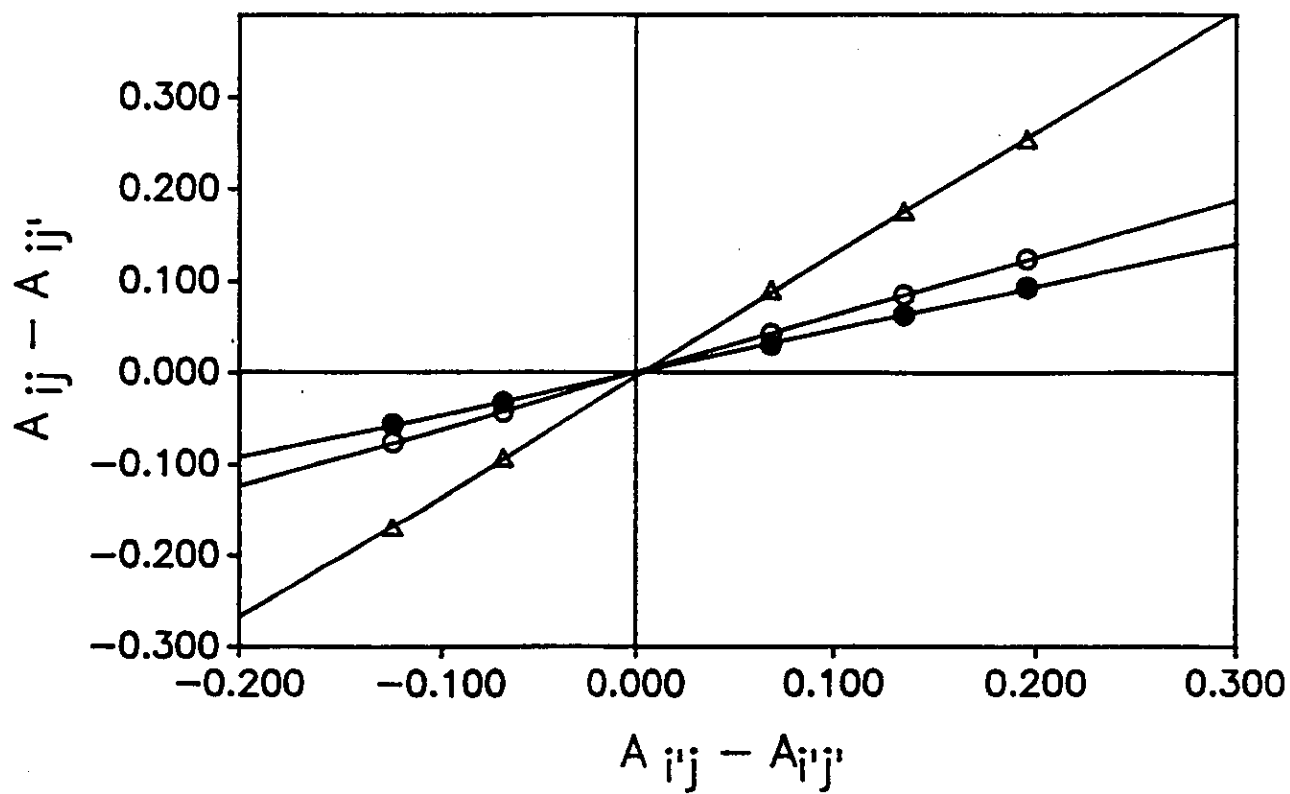


Figura IV - 1.- B. Espectros consecutivos de un medio de reacción conteniendo dihidrocapsicina 0,2mM (a partir de una solución madre 10 mM en metanol), H_2O_2 0,1mM y Tris acetato 0,1M pH 6,00 y 4,3 pkat de peroxidasa de pimiento. Se utilizó una velocidad de 500 nm/min a intervalos de 1 min. Línea 1:30 s después de la adición de la enzima.

Figura IV - 2.- A. Análisis gráfico de un espectro consecutivo de un medio de reacción conteniendo capsicina 0,6mM, H₂O₂ 0,25mM, 16 pkat de peroxidasa de rábano y Tris acetato 0,1 M pH 7,00 de acuerdo con Coleman y col. (1970). **B.** Análisis gráfico de un espectro consecutivo de un medio de reacción conteniendo dihidrocapsicina 0,2mM, H₂O₂ 0,1mM, 16 pkat de peroxidasa de rábano, y Tris acetato 0,1 M pH 6,00. Se utilizó una velocidad de 500 nm/min a intervalos de 1 min. En este análisis, A_{ij} es la absorbancia a la longitud de onda i obtenida durante el trazo j, así A₁₂ es la absorbancia a 250 nm durante el segundo trazo del espectro de absorción. Las longitudes de onda seleccionadas fueron: i₁= 250 nm (■), i₂= 280 nm (●), e i₃= 300 nm (▲); i' = 260 nm; j' = 3 (8 trazos), en dónde el valor de ordenadas (A_{250,2} - A_{250,3}) es la diferencia de absorbancias a 250 nm entre el segundo y tercer trazo; y el valor de abscisas (A_{260,2} - A_{260,3}) es la diferencia de absorbancias a 260 nm entre el segundo y tercer trazo, tomando el valor A_{260,3} como referencia en este análisis gráfico. Se aplicó el test de dos especies sin restricción.



$10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{262} = 4.7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, para los productos de oxidación de la capsicina y la dihidrocapsicina respectivamente.

4.4.2. - OPTIMIZACION DE LAS REACIONES PARA LAS PEROXIDASAS DE RABANO Y PIMIENTO.

4.4.2.1. Efectos del pH sobre la velocidad de oxidación de capsicina y dihidrocapsicina.

La influencia del pH sobre la velocidad de oxidación de la capsicina y de la dihidrocapsicina se muestra en las Figuras IV - 3. Como puede apreciarse el pH óptimo para la oxidación de los sustratos se encuentra, en el caso de las peroxidasas de rábano, en un valor de 7 para la capsicina y un valor de 6 para la dihidrocapsicina (Figura IV - 3 A y B). Sin embargo, las peroxidasas de pimiento muestran para ambos sustratos un valor próximo a 6 (Figura IV - 3 C y D).

4.4.2.2. - Dependencia de la velocidad de oxidación con la concentración de los sustratos.

La dependencia de la velocidad de oxidación variando la concentración de capsicina y dihidrocapsicina mostró en ambos casos una cinética de tipo Micaeliana con inhibición por exceso de sustrato, cinética por la que se determinaron unas concentraciones óptimas de 0,6mM para la capsicina y 0,2mM para la dihidrocapsicina en el caso de las peroxidasas de rábano (Figura IV - 4 A y B), y unos valores de 1mM para la capsicina y 0,2mM para la dihidrocapsicina, en el caso de las peroxidasas de pimiento (Figura IV - 4 C y D).

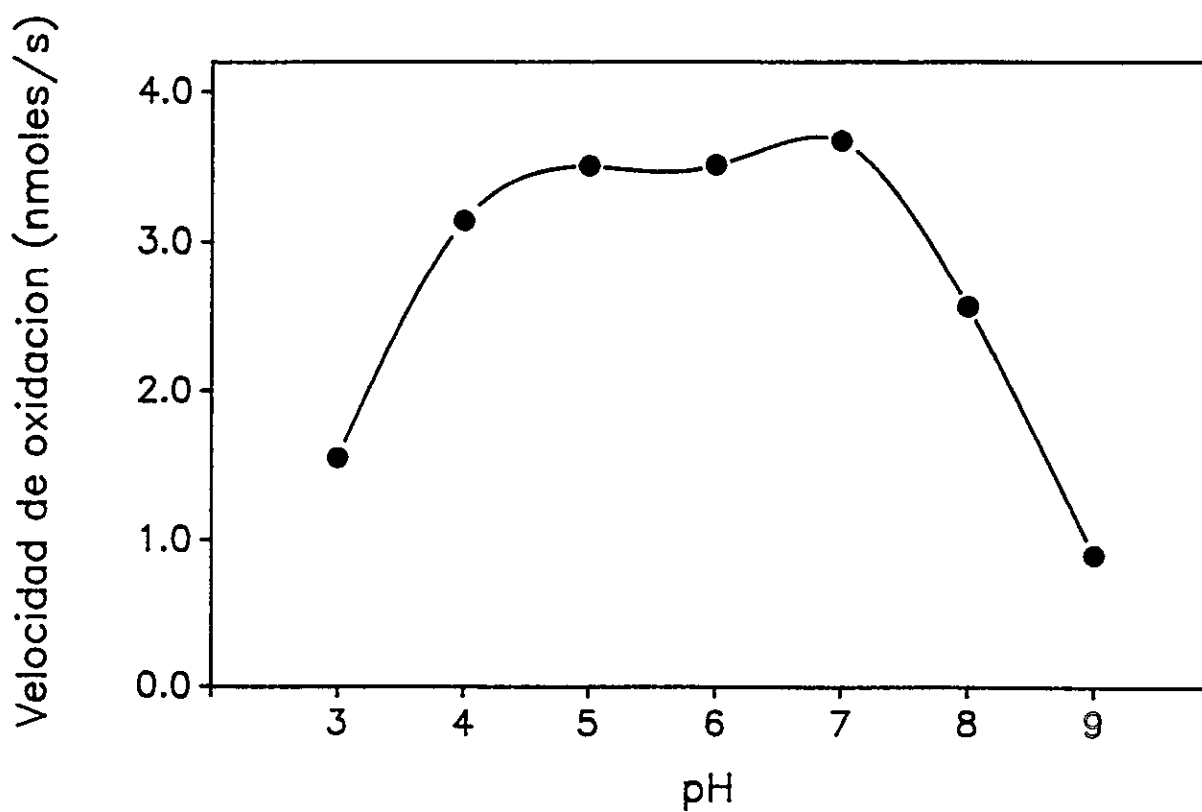


Figura IV - 3.- A.- Dependencia de la velocidad de oxidación de la capsicina con el pH. Los medios de reacción contenían las concentraciones óptimas de los sustratos (ver texto) y 16 pkat de peroxidasas de rábano, en tampón Tris acetato 0,1M de pH variable.

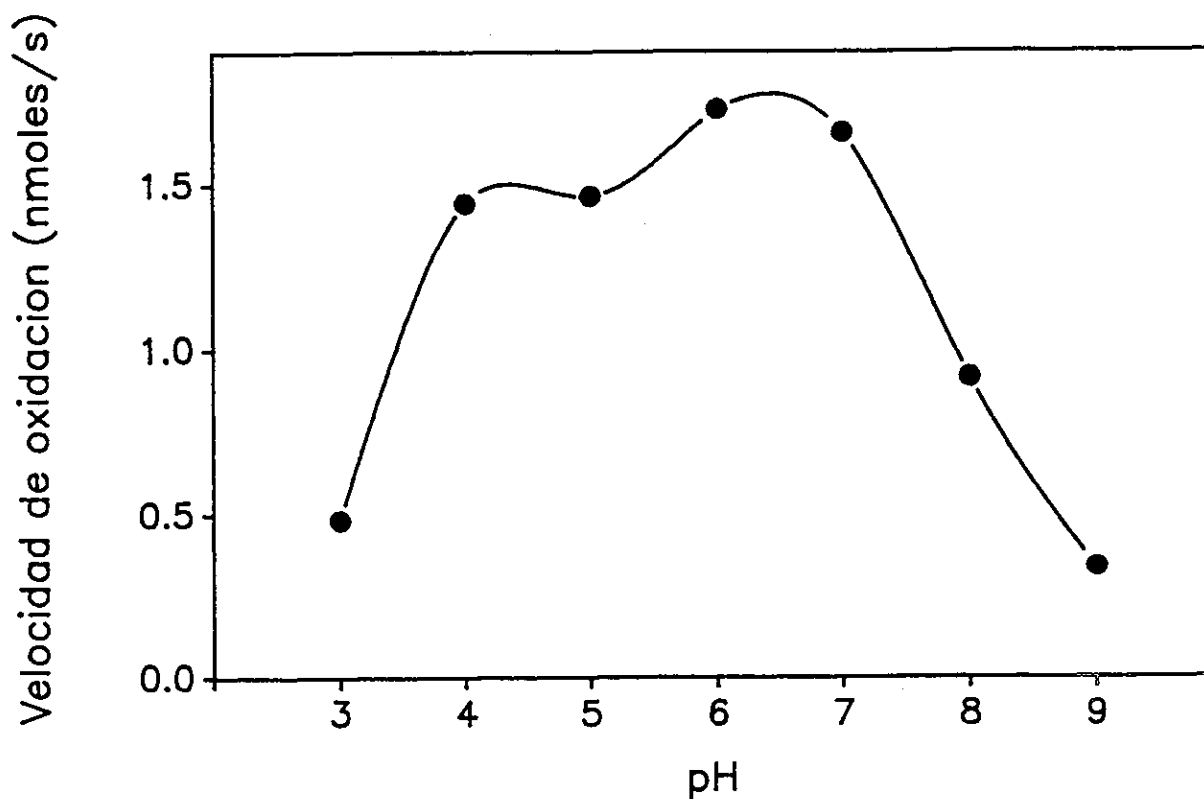


Figura IV - 3.- B.- Dependencia de la velocidad de oxidación de la dihidrocapsicina con el pH. Los medios de reacción contenían las concentraciones óptimas de los sustratos (ver texto) y 16 pkat de peroxidasas de rábano, en tampón Tris acetato 0,1M de pH variable.

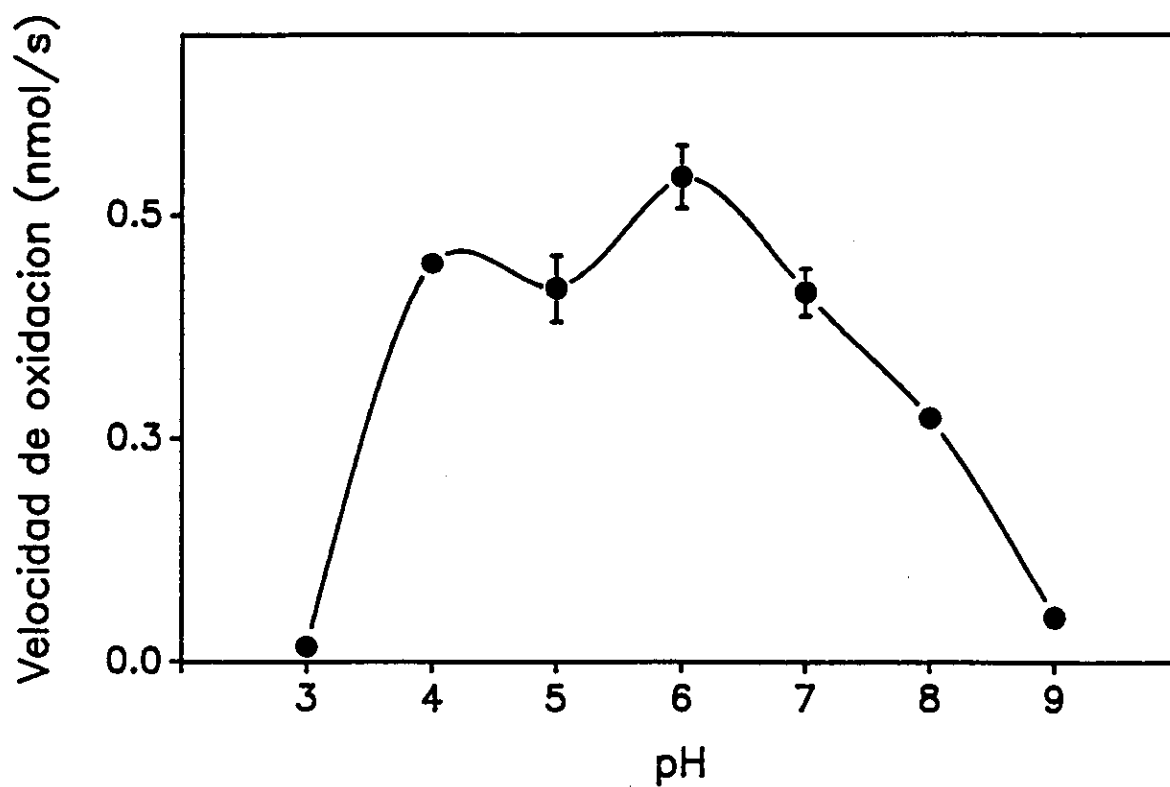


Figura IV - 3.- C.- Dependencia de la velocidad de oxidación de capsicina con el pH. Los medios de reacción contenían las concentraciones óptimas de los sustratos (ver texto) y 4,3 pkat de peroxidasas de pimienta, en tampón Tris acetato 0,1M de pH variable.

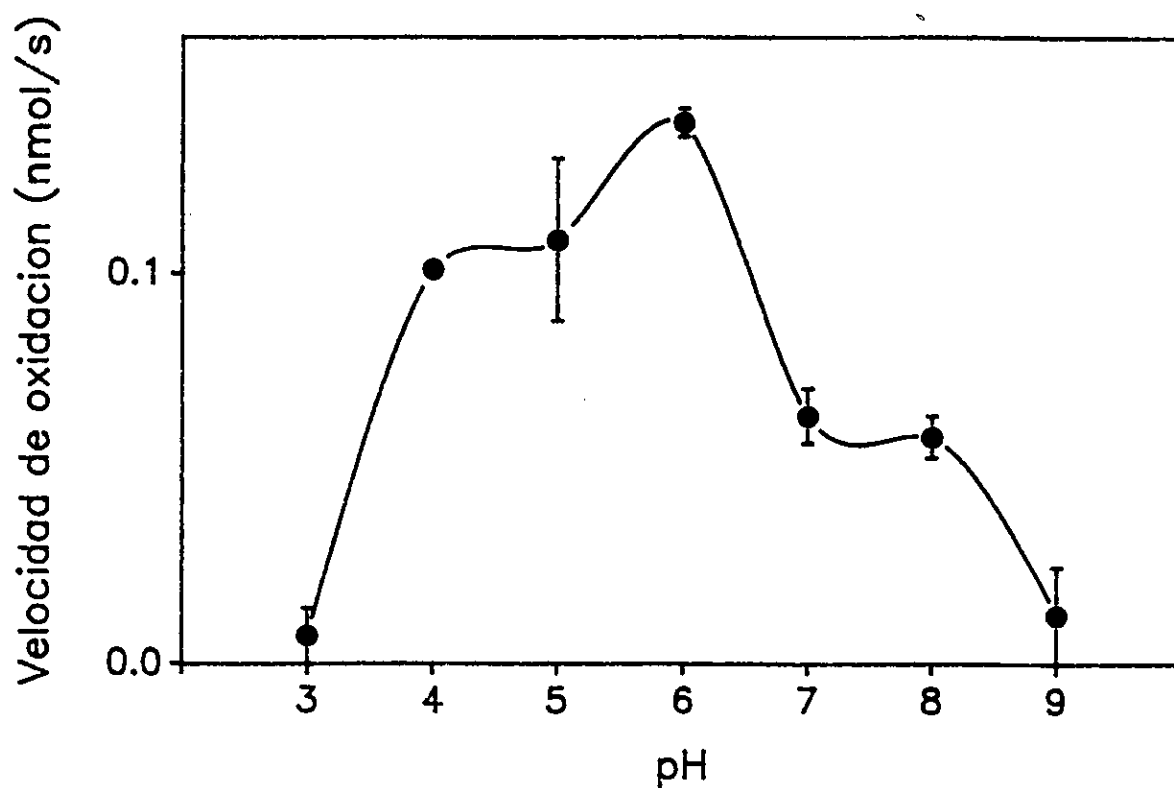


Figura IV - 3.- D.- Dependencia de la velocidad de oxidación de la dihidrocapsicina con el pH. Los medios de reacción contenían las concentraciones óptimas de los sustratos (ver texto) y 4,3 μ kat de peroxidasas de pimienta, en tampón Tris acetato 0,1M de pH variable.

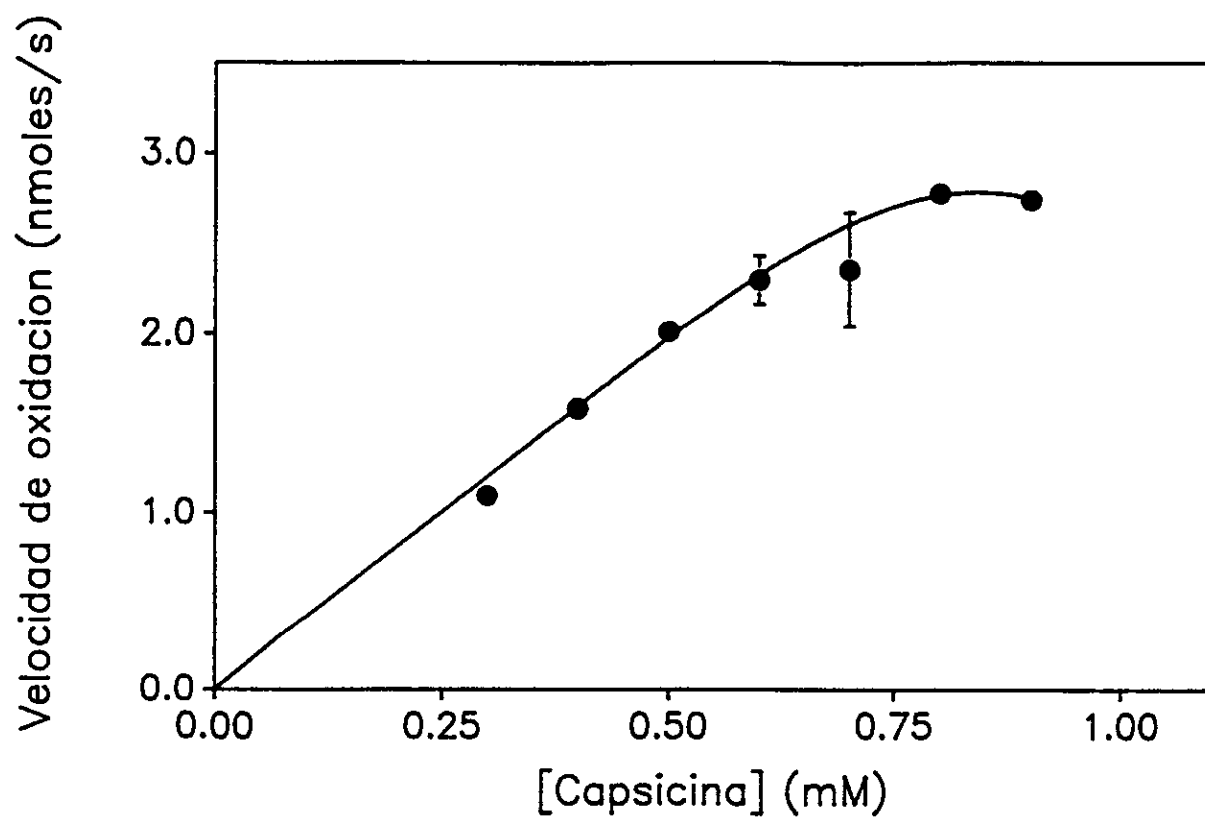


Figura IV - 4.- A.- Dependencia de la oxidación de la capsicina con la concentración de capsicina en medios de reacción compuestos por H_2O_2 0,1mM, 16 pkat de peroxidasa de rábano, tampón Tris acetato 0,1M pH 6,0 y concentración variable de capsicina.

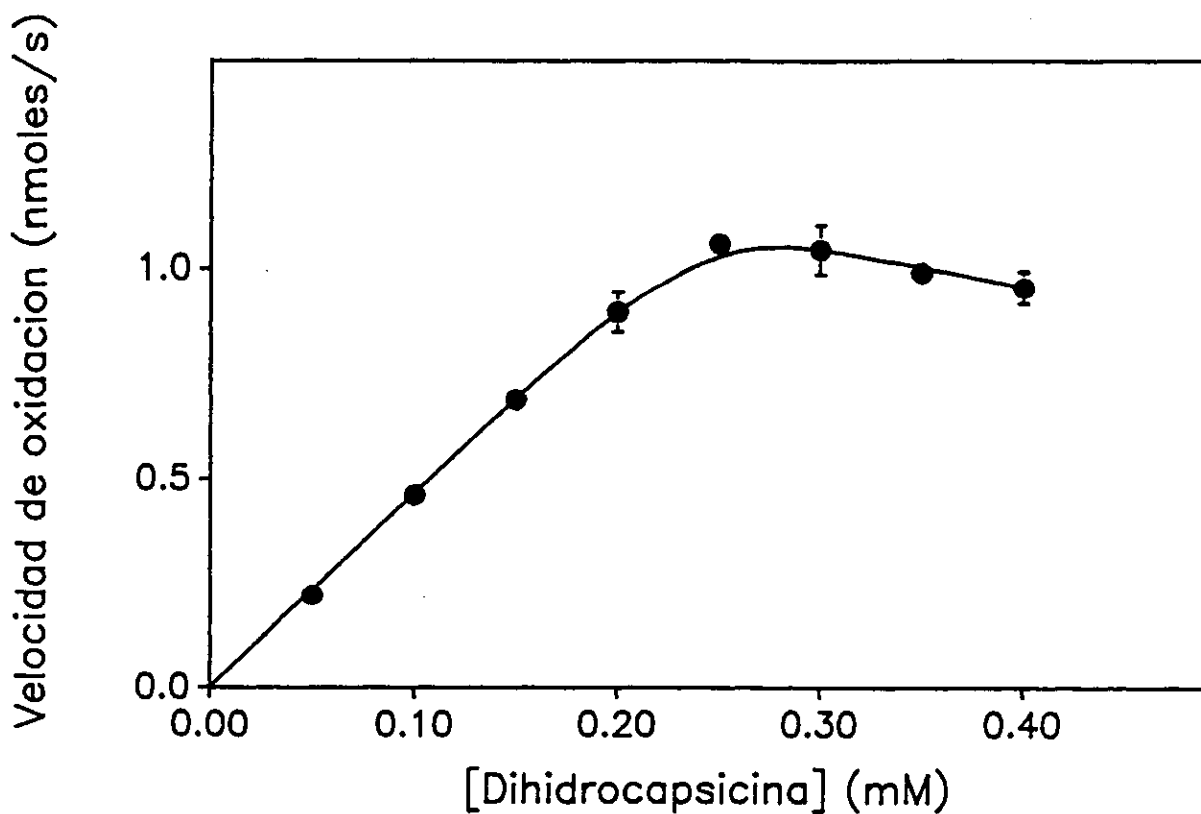


Figura IV - 4.- B.- Dependencia de la oxidación de la dihidrocapsicina con la concentración de dihidrocapsicina en medios de reacción compuestos por H_2O_2 0,1mM, 16 pkat de peroxidasa de rábano, tampón Tris acetato 0,1M pH 6,0 y concentración variable de dihidrocapsicina.

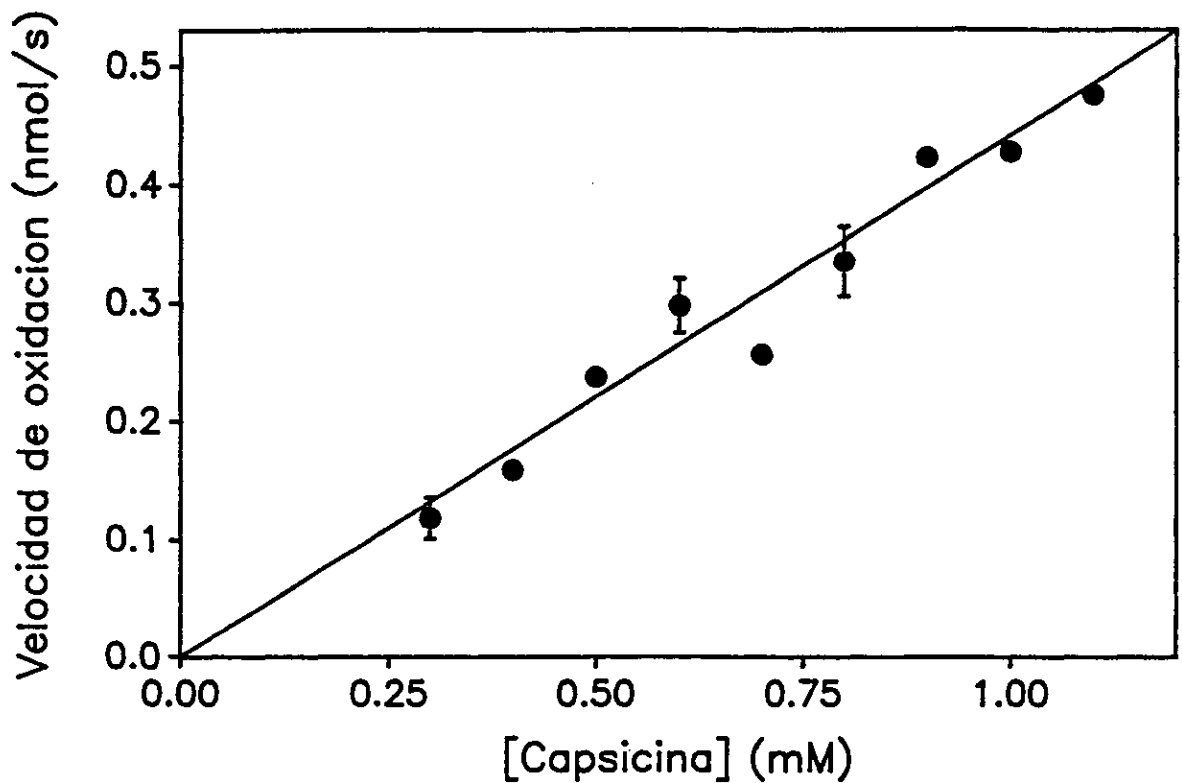


Figura IV - 4.- C.- Dependencia de la oxidación de la capsicina con la concentración de capsicina en medios de reacción compuestos por H_2O_2 0,1mM, 4,3 pkat de peroxidasa de pimiento, tampón Tris acetato 0,1M pH 6,0 y concentración variable de capsicina.

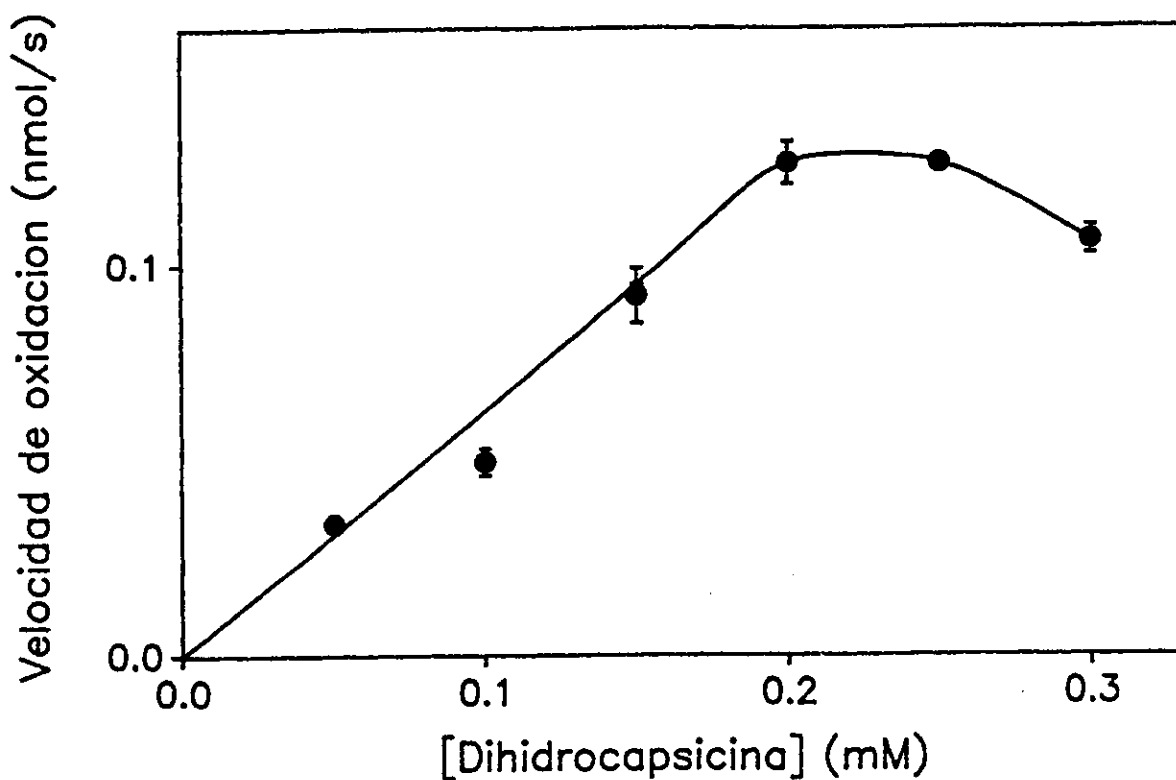


Figura IV - 4.- D.- Dependencia de la oxidación de la dihidrocapsicina con la concentración de dihidrocapsicina en medios de reacción compuestos por H_2O_2 0,1mM, 4,3 pkat de peroxidasa de pimiento, tampón Tris acetato 0,1M pH 6,0 y concentración variable de dihidrocapsicina.

4.4.2.3. - Efectos de la concentración de peróxido sobre la velocidad de oxidación de capsicina y dihidrocapsicina.

Este comportamiento cinético también fue observado cuando se varió la concentración de H_2O_2 manteniendo constantes las concentraciones de capsicina y dihidrocapsicina, obteniendo en ambos casos una concentración óptima para el H_2O_2 de 0,1mM cuando se trataba de las peroxidasas de pimiento (Figura IV - 5 C y D), mientras que la peroxidasa de rábano presentaba un óptimo para la capsicina de 0,25mM y de 0,1mM para la dihidrocapsicina (Figura IV - 5 A y B).

4.4.2.4. - Efectos de la concentración de enzima sobre la velocidad de oxidación de la capsicina y la dihidrocapsicina.

Finalmente, se estudió la velocidad de la oxidación de la capsicina y la dihidrocapsicina en función de la concentración de enzima. Se encontró que la formación del producto fué linealmente dependiente de la concentración de enzima en el rango de concentraciones comprendidas entre 0 - 6 μ kat/ml, en ambos tipos de sustratos.

4.4.3. - ANALISIS MEDIANTE ISOELECTROENFOQUE DE LAS PEROXIDASAS DE FRUTO.

El isoelectroenfoque de la fracción de peroxidasas solubles, obtenidas a partir del fruto y su posterior tinción con 4-metoxi- α -naftol, muestra la presencia de una sola peroxidasa ácida (A_3) y el total de las peroxidasas básicas (B_{1-6}), no presentando ninguna peroxidasa diferente a las ya observadas en la hoja. Sin embargo, es de destacar la gran intensidad de la peroxidasa básica B_6 (Figura IV - 6).

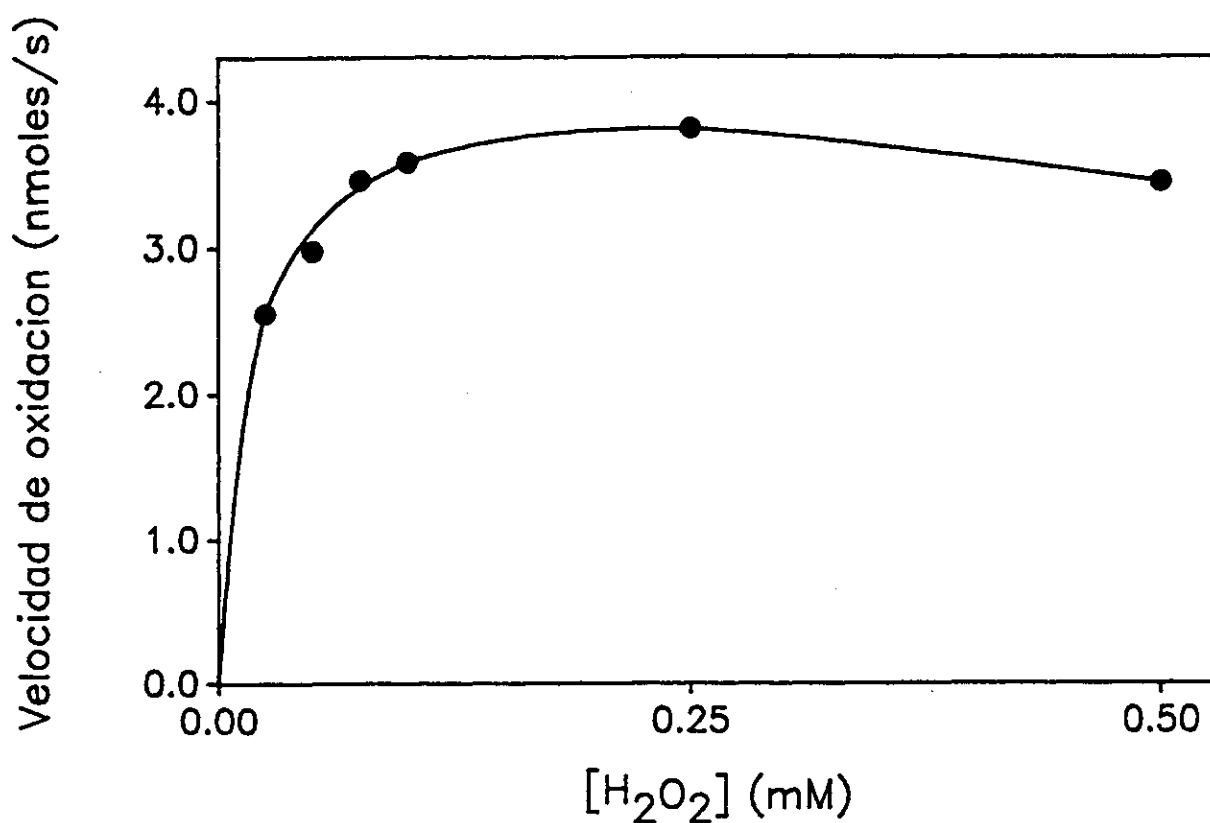


Figura IV - 5.- A.- Dependencia de la oxidación de la capsicina con la concentración de H_2O_2 en medios de reacción compuestos por capsicina 1mM, 16 pkat de peroxidasa de rábano, tampón Tris acetato 0,1M pH 6,0 y concentración variable de H_2O_2 .

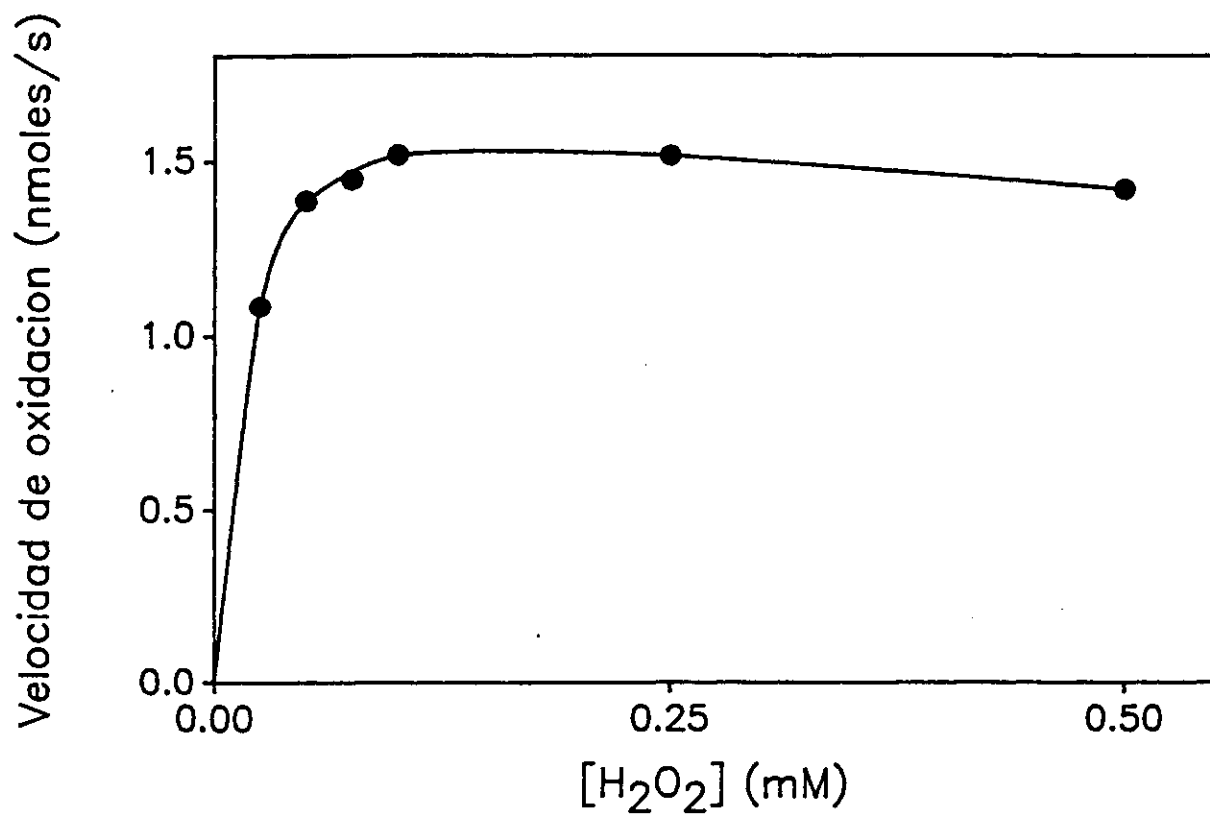


Figura IV - 5.- B.- Dependencia de la oxidación de la dihidrocapsicina con la concentración de H_2O_2 en medios de reacción compuestos por dihidrocapsicina 0,2mM, 16 pkat de peroxidasa de rábano, tampón Tris acetato 0,1M pH 6,0 y concentración variable de H_2O_2 .

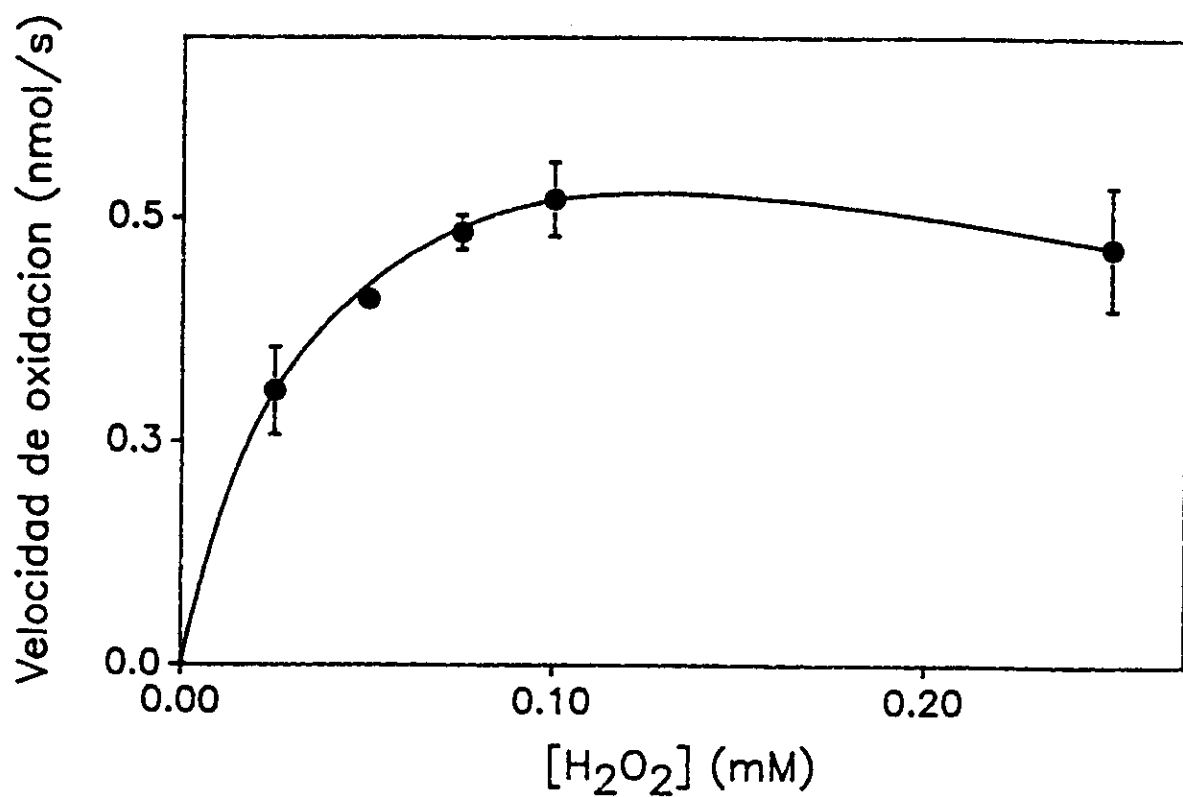


Figura IV - 5.- C.- Dependencia de la oxidación de la capsicina con la concentración de H_2O_2 en medios de reacción compuestos por capsicina 1mM, 4,3 pkat de peroxidasa de pimiento, tampón Tris acetato 0,1M pH 6,0 y concentración variable de H_2O_2 .

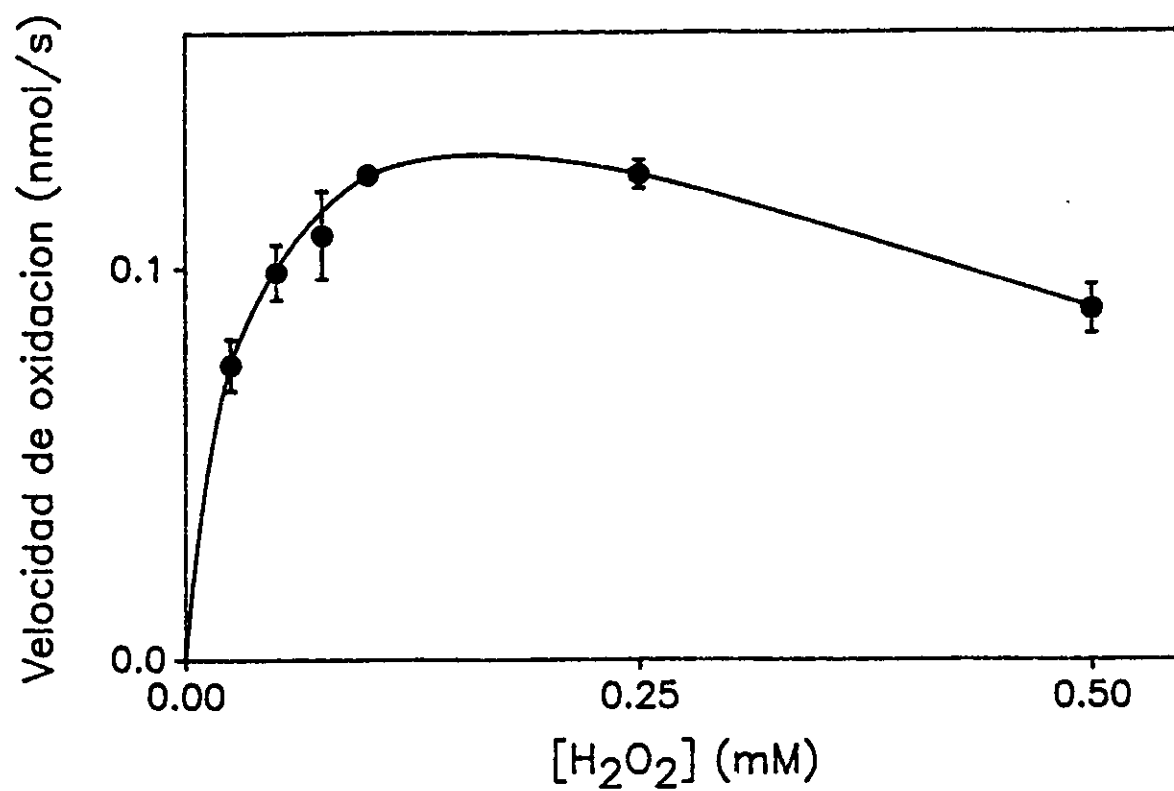


Figura IV - 5.- D.- Dependencia de la oxidación de la dihidrocapsicina con la concentración de H_2O_2 en medios de reacción compuestos por dihidrocapsicina 0,2mM, 4,3 pkat de peroxidasa de pimiento, tampón Tris acetato 0,1M pH 6,0 y concentración variable de H_2O_2 .

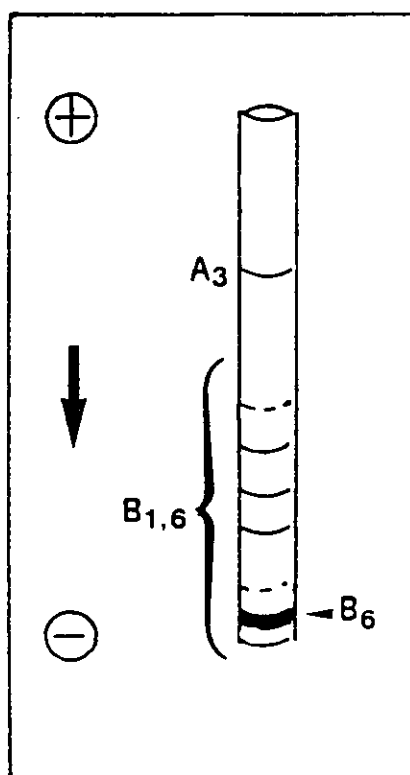


Figura IV - 6.- Patrón de isoenzimas de peroxidasas de fruto de pimiento separadas por isoelectroenfoque en un gradiente de pH de 3,0 - 10 y teñidas con 4-metoxi- α -naftol. Las flechas indican el sentido de la migración de las proteínas durante el isoelectroenfoque. La intensidad comparativa de las bandas se indica por el grado de sombreado.

4.5. - DISCUSION

Los espectros consecutivos de los medios de reacción de la oxidación de la capsicina y dihidrocapsicina por peroxidasas de rábano y de pimiento, mostraban que los máximos cambios espectrales obtenidos a 262 nm se correspondían con la transformación directa de los sustratos en sus productos de oxidación. Durante el curso de la reacción, parece que sólo se formaba un producto de oxidación estable absorbente. Esto se demostró por la aplicación del análisis gráfico de Coleman y col. (1970) en un conjunto de espectros consecutivos de medio de reacción conteniendo peroxidasa de rábano y peróxido de hidrógeno, ya que estos análisis permiten calcular el número de productos absorbentes en la solución (Ferrer y col., 1990). La coincidencia en el origen del eje de coordenadas de las tres familias de trazos que se corresponden con cada uno de los valores de longitud de onda mostraba la presencia de sólo dos especies cinéticamente correlacionadas en el mezcla de reacción: el sustrato y un producto de reacción estable absorbente.

Estos productos de reacción, de acuerdo con el mecanismo de la oxidación de los fenoles catalizada por el sistema peroxidasa - H_2O_2 , deben de ser los dímeros correspondientes a cada uno de los sustratos (Fry, 1986).

La oxidación de la capsicina y la dihidrocapsicina por la fracción peroxidasa de *Capsicum* era estrictamente dependiente de la presencia de peróxido de hidrógeno, lo cual es fácilmente observable por el estudio de los cambios espectrales en el medio de reacción a lo largo del tiempo. Los espectros consecutivos del medio de reacción conteniendo capsicina o dihidrocapsicina y H_2O_2 ofrecían los máximos cambios a 262nm, cambios que no tenían lugar en la ausencia de H_2O_2 . Resultados idénticos

fueron obtenidos cuando la oxidación de la capsicina y dihidrocapsicina se realizaba con peroxidasa de rábano.

Similarmente a lo observado con la peroxidasa de rábano, la dependencia de la tasa de oxidación de la capsicina y dihidrocapsicina por la peroxidasa de *Capsicum* con la concentración de ambos sustratos y de H₂O₂ ofrecía un comportamiento cinético de tipo Michaelis-Menten a una baja (no-inhibidora) concentración de sustrato, con inhibición a altas concentraciones.

El efecto del pH en la oxidación de la capsicina y dihidrocapsicina por peroxidases de *Capsicum* muestra como el pH óptimo de la reacción oxidativa está cercano a 6,0 con dos hombros a pH 4,0 y pH 8,0. Vemos por lo tanto como la gráfica de dependencia del pH de la oxidación de la capsicina y dihidrocapsicina por peroxidases de pimiento, ofrece una buena adaptación de la reacción enzimática al pH ácido establecido en la vacuolas (Boller, 1982).

Sabemos además que la peroxidasa del fruto de *Capsicum annuum* es rica en una isoenzima básica, previamente denominada B₆ (Cuenca y col., 1989), la cual está presumiblemente localizada en las vacuolas epidérmicas, similar a sus isoenzimas homólogas en otras plantas (Calderón y col., 1992a y 1992b) y a las observadas por nosotros, en la hoja.

A partir de estos resultados, se puede llegar a la conclusión de que la capsicina y la dihidrocapsicina pueden ser oxidadas por las peroxidases de pimiento, probablemente por esta isoenzima B₆ y por lo tanto se debería considerar el papel de estas enzimas, en el metabolismo de los capsicinoides en frutos de *Capsicum*, como partícipes de los procesos de recambio y degradación que acompañan al desarrollo completo de la capsicina.

CONCLUSIONES

1º.- Se ha estudiado el comportamiento de diez sistemas enzimáticos en diversas poblaciones de pimiento de Padrón, *Capsicum annuum* L. var. *annuum* y se ha podido demostrar que no existe variabilidad genética en dichos sistemas.

2º.- Se han realizado estudios con estos mismos sistemas enzimáticos, en otras variedades comerciales de pimiento de aspecto muy diferente. Tampoco hemos detectado variabilidad genética, ya que la variabilidad morfológica no siempre está relacionada con la variabilidad genética a nivel isoenzimático.

3º.- Estudios de fraccionamiento subcelular nos han permitido identificar las distintas isoenzimas de los sistemas 6-PGDH, PGI y PGM con su compartimento subcelular correspondiente. El comportamiento es el mismo en hojas y frutos siendo para los tres sistemas la isoenzima cloroplástica, la más anódica y la citosólica la menos anódica.

4º.- El patrón de peroxidasas obtenido por medio de electroforesis en geles de almidón, muestra tres zonas de actividad, dos anódicas y una catódica. En este patrón aparecen variaciones en cuanto al número e intensidad de las bandas, en función del estado de desarrollo del órgano estudiado. Destacamos la existencia de isozimas como unas modificaciones postranscripcionales, que aparecen en PRX-a y PRX-c de órganos maduros.

5°.- A lo largo del eje de la planta, se ha observado la existencia de un gradiente de actividad enzimática, y una variación en los patrones de peroxidasa. Este comportamiento lo hemos explicado en función de las posibles actividades peroxidasa y su localización subcelular, confirmado por las técnicas de infiltración a vacío.

6°.- Se han realizado medidas de la actividad peroxidasa en plantas en estado vegetativo y en estado floral, utilizando distintos sustratos. En todos los casos la actividad en el estado floral es considerablemente mayor que en el estado vegetativo.

7°.- El incremento de la actividad peroxidasa en el estado floral, con respecto al vegetativo, va acompañado por la expresión diferencial de dos isoenzimas peroxidasa, una aniónica la A_1 y otra catiónica, la B_2 . Estos incrementos de las isoenzimas A_1 y B_2 se pueden considerar como marcadores del estado floral en la morfogénesis de *Capsicum annum*.

8°.- Los estudios realizados con protoplastos y vacuolas, han permitido identificar a la isoperoxidasa B_6 como la única isoenzima presente en las vacuolas. El resto de las isoenzimas se mantienen en equilibrio entre la fracción soluble y la iónicamente ligada.

9°.- La peroxidasa de pimiento es capaz de catalizar la oxidación de la capsicina y dihidrocapsicina, interviniendo probablemente en los procesos de recambio y degradación de estas sustancias responsables del picante en los pimientos.

BIBLIOGRAFIA

AKAZAWA, T. y CONN, E.E. 1958. Oxidation of reduced pyridin nucleotides by peroxidase. *J. Biol. Chem.* **232**: 403-415.

AKAZAWA, T. y HARA-NISHIMURA, I. 1985. Topographic aspects of biosynthesis, extracellular secretion, and intracellular storage of proteins in plant cells. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 441-472.

ANDERSON, J.W. 1968. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochem.* **7**: 1973-1988.

ANGELINI, R., MANES, F y FEDERICO, R. 1990. Spatial and functional correlation between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick pea stems. *Planta* **182**: 89-96.

ARNON, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**: 1-15.

AVISE, J.C., SMITH, J.J. y AYALA, F.J. 1975. Adaptative differentiation with little genic change between two native Californian minnows. *Evol.* **29**: 411-426.

BAYER, R.J. y CRAWFORD, D.J. 1986. Allozyme divergence among five diploid species of *Antennaria* (*Asteraceae: Inuleae*) and their allopolyploid derivatives. *Amer. J. Bot.* **73**: 287-296.

BELLETTI, P., LANTERI, S. y SARACCO, F. 1992. Allozyme variability in *Capsicum*. VIII Meeting "Genetics and Breeding on *Capsicum* and *Eggplant*". Roma, 7-10 Septiembre. pp: 221-226.

BERNIER, G. 1988. The control of floral evocation and morphogenesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant. Mol. Biol.* **39**: 175-219.

BESFORD, R.T., WITHERS, A.C. y LUDWIG, L.J. 1985. Ribulose biphosphate carboxylase activity and photosynthesis during leaf development in the Tomato. *J. Exp. Bot.* **36 (171)**: 1530-1541.

- BLOM, T.J.M., SIERRA, M., VAN VLIET, T.B., FRANKE VAN DIJK, M.E.I., DE KONING, P., VAN IREN, F., VERPOORTE, R. y LIBENGA, K.R. 1991. Uptake and accumulation of ajmalicine into isolated vacuoles of cultured cells of *Catharantus roseus* L. G. Don. and its conversion into serpentine. *Planta* **183**: 170-177.
- BOLLER, Th. 1982. Enzymatic equipment of plant vacuoles. *Physiol. Veg.* **20**: 247-257.
- BOLLER, Th. y KENDE, H. 1979. Hydrolitic enzymes in the central vacuole of plant cells. *Plant Physiol.* **63**: 1123-1132.
- BOSWELL, V.R. 1949. Garden pepper, both a vegetable and a condiment. En: Our vegetable travelers. *Natl. Geogra.* **96**: 166-167.
- BOULTER, D., ELLIS, R.J. y YARWOOD, A. 1972. Biochemistry of protein synthesis in plants. *Biol. Rev.* **47**: 113-175.
- BRAUER, O. 1962. Untersuchungen über qualitatseigenschaften in F1-hybriden von paprika, *Capsicum annuum* L. *Zeitschr. Pflanzenz.* **48**: 259-276.
- BREWBAKER, J.L., NAGAI, Ch. y LIU, E.H. 1985. Genetic polymorphisms of 13 maize peroxidases. *J. Hered.* **76**: 159-167.
- BREWBAKER, J.L., UPADAHYA, M.D., MAKINEN, H. y McDONALD, T. 1968. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. III. Gel electrophoretic methods and applications. *Physiol. Plant.* **21**: 930-940.
- BROUQUISSE, R., NISHIMURA, M., GAILLARD, J. y DOUCE, R. 1987. Characterization of a cytosolic aconitase in higher plant cells. *Plant Physiol.* **84**: 1402-1407.
- BROWN, A.H.D., ZOHARY, D. y NEVO, E. 1978. Outcrossing rates and heterozygosity in natural populations of *Hordeum spontaneum* Koch in Israel. *Heredity* **41**: 49-62.

- CALDERON, A.A., GARCIA-FLORENCIANO, E., MUÑOZ, R. y ROS BARCELO, A. 1992a. The vacuolar localization of grapevine peroxidase isoenzymes capable of oxidizing 4-hidroxytilbenes. **Z. Naturforsch 47c**: 215-221.
- CALDERON, A.A., PEDREÑO, M.A., ROS BARCELO, A. y MUÑOZ, R. 1990. Zymographic screening of plant peroxidase isoenzymes oxidizing 4-hidroxytilbenes. **Electrophoresis 11**: 507-508.
- CALDERON, A.A., ZAPATA, J.M., MUÑOZ, R. y ROS BARCELO, A. 1992b. The histochemical localization of peroxidase in grapes (*Vitis vinifera*) using nitrocellulose blotting of freezing-thawing fruits. **HortScience 28**: 38-40.
- CARSON, H.L., JOHNSON, W.E., NAIR, P.S. y SENE, F.M. 1975. Allozymic and chromosomal similarity in two *Drosophila* species. **Proc. Nat. Acad. Sci. 72**: 4521-4525.
- CATESSON, A. M. 1980. Les tissus végétaux: ultrastructure biogénèse. En: Les polymeres Végétaux. Eds: Montres, B., Gauthier-Villars, Paris. pp: 129.
- CATESSON, A. M. 1980b. Localization of phloem oxidases. **Ber. Deutsch. Bot. Ges. 93**: 141-152.
- CATESSON, A.M., IMBERTY, A., GOLDBERG, R. y CZANINSKI, Y. 1986. Nature, localization and specificity of peroxidases involved in lignification processes. En: Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. Eds: Greppin, H., Penel, C. y Gaspar, Th.. Universite de Geneve. pp: 189-198..
- CHANCE, B. y MAEHLY, A.C. 1955. Assays of catalases and peroxidases. **Methods Enzymol. 2**: 764-775.
- CHU, Y.E. 1967. Variations in peroxidase isozymes of *Oryza perennis* and *Oryza sativa*. **Jap. J. Genetics 42**: 233-244.

CLEGG, M.T. 1983. Detection and measurement of natural selection. En: Isozymes in plant genetics and breeding Vol A. Eds: Tanksley, S.D. y Orton, T.J. Elsevier, Amsterdam. pp: 241-256.

COLEMAN, R. 1973. Membrane-bound enzymes and membrane ultrastructure. *Biochem. Biophys. Acta* 300: 1-30.

COLEMAN, J.S., VARGA, L.P. y MASTIN S.H. 1970. Graphical methods for determining the number of species in solution from spectrophotometric data. *Inorg. Chem.* 9: 1015.

CONKLE, M.T., HODOSKISS, P.D., NUNNALLY, L.B. y HUNTER, S.C. 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: A laboratory manual. *USDA Gen. Tech. Rep., PSW-64.*

CONKLIN, M E. y SMITH, H. H. 1971. Peroxidase isozymes: a mesure of molecular variation in ten herbaceous species of *Datura*. *Amer. J. Bot.* 58 (7): 688-696.

CRAWFORD, D.J. 1983. Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies. En: Isozymes in plant genetics and breeding Vol A. Eds: Tanksley, S.D. y Orton, T.J. Elsevier, Amsterdam. pp: 257-288.

CUENCA, J., GARCIA-FLORENCIANO, E., ROS BARCELO, A. y MUÑOZ, R. 1989. Sequential release of both basic and acidic isoperoxidases to the media of suspension cultured cells of *Capsicum annum*. *Plant Cell Rep.* 8: 471-474.

D'ARCY, W.G. y ESHBAUGH, W.H. 1974. New World peppers (*Capsicum* - *Solanaceae*) North of Colombia: A résumé. *Baileya* 19(3): 93-105.

ERWIN, A.T. 1932. The peppers. *Iowa. Agri. Exp. Sta. Bull.* 293: 121-152.

ESHBAUGH, W.H. 1978. The taxonomy of the genus *Capsicum* - *Solanaceae*. *Acta Horticulturae* 15: 13-26.

FEIERABEND, J. y MIKUS, M. 1977. Occurrence of a high temperature sensitivity of cloroplast ribosome formation in several higher plants. *Plant Physiol.* 59: 863-867.

FERRER, A., PEDREÑO, A., MUÑOZ, R y ROS BARCELO, A. 1991. Soluble peroxidase gradients in lupin hypocotyls and the control of the level of polarity transported indole-3-yl-acetic acid. **J. Plant Growth. Regul.** 10: 139-146.

FERRER, M.A., CALDERON, A.A., MUÑOZ, R. y ROS BARCELO, A. 1990. 4-Methoxy- α -naphthol as a specific substrate for kinetic, zymographic and cytochemical studies on plant peroxidase activities. **Phytochem. Anal.** 1: 63-69.

FERRER, M.A., PEDREÑO, M.A., ROS BARCELO, A. y MUÑOZ, R. 1992. The cell wall localization of two strongly basic isoperoxidases in etiolated *Lupinus albus* hypocotyls and its significance in coniferyl alcohol oxidation and indole-3-acetic acid catabolism. **J. Plant Physiol.** 139: 611-515.

FOWLER, M.W. y REES, T. 1970. Carbohydrate oxidation during differentiation in roots of *Pisum sativum*. **Biochem. Biophys. Acta.** 201: 33-44.

FRANKEL, O.H. y HAWHES, J.G. 1975. Crop genetic resources for today and tomorrow. University of Cambridge.

FREELING, M. y SCHWARTZ, D. 1973. Genetic relationships between the multiple alcohol dehydrogenases of maize. **Biochem. Genet.** 8: 27-36.

FRY, S.C. 1986. Polymer bound phenols as natural substrates of peroxidases. En: *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. Eds: Greppin, H., Penel, C., Gaspar, Th. Université de Genève. pp: 169-182.

FUJIWAKE, H., SUZUKI, T. y IWAI, K. 1980a. Intracellular localization of capsaicin and its analogues in *Capsicum* fruit. II. The vacuole as the intracellular accumulation site of capsacinoid in the protoplast of *Capsicum* fruit. **Plant Cell Physiol.** 21: 1023-1030.

FUJIWAKE, H., SUZUKI, T. y IWAI, K. 1982b. Intracellular distribution of enzymes and intermediates involved in biosynthesis of capsaicin and its analogues in *Capsicum* fruits. **Agric. Biol. Chem.** 46: 2685-2689.

FUJIWAKE, H., SUZUKI, T., OKA, S. y IWAI, K. 1980b. Enzymatic formation of capsaicinoids from vanillylamine and iso-type fatty acids by cell-free extracts of *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa. *Agric. Biol. Chem.* **44**: 2907-2912.

GASPAR, Th. 1986. Integrated relationship of biochemical and physiological peroxidase activities. En: *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. Eds: Greppin, H., Penel, C., Gaspar, Th. Université de Genève. pp: 455-468.

GASPAR, Th., PENEL, C., CASTILLO, F.J. y GREPPIN, H. 1985. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol. Plant.* **64**: 418-423.

GASPAR, Th., PENEL, C., HAGEGE, D. y GREPPIN, H. 1991. Peroxidases in plant growth, differentiation, and development processes. En: *Molecular, and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. Eds: Lobarzewski, J., Greppin, H., Penel, C. y Gaspar, Th.. University M. Curie-Sklodowska, Université de Genève, Lublin, pp: 249-280.

GASPAR, Th., PENEL, C., THORPE, T y GREPPIN, H. 1982. Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Université de Genève-Centre de Botanique. pp: 324.

GOFF, C.W. 1975. A light and electron microscopic study of peroxidase localization on the onion root tip. *Amer. J. Bot.* **62**: 280-291.

GOLDBERG, R., IMBERTY, A y CHU-BA, J. 1986. Development of isoperoxidases along the growth gradient in the mung bean hypocotyl. *Phytochem.* **25 (6)**: 1271-1274.

GOLDBERG, R., KEVERS, C y GASPAR, T. 1989. Guaiacol and ascorbate peroxidase compartmentation and gradient along the growing mung bean hypocotyl. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **184**: 155-161.

GOODMAN, M.M., STUBER, C.W., LEE, C.N. y JOHNSON, F.M. 1980. Genetic control of malate dehydrogenase in maize. *Genetics* **94**: 153-168.

GOTÔ, N. y HAMADA, M. 1988. Promotion of flowering by DNA base analogues and changes in acid phosphatase and peroxidase isoenzyme composition in dark-grown *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol.** 29: 683-688.

GOTTLIEB, L.D. 1977. Electrophoretic evidence and plant systematics. **Ann. Missouri Bot. Gard.** 64: 161-180.

GOTTLIEB, L.D. 1982. Conservation and duplication of isoenzymes in plants. **Science** 216: 373-380.

GRAWBOW, H.J. y LANGENBECK, Sch. 1983. The relationship between oxidase activity, peroxidase activity, hydrogen peroxide, and phenolic compounds in the degradation of indole-3-acetic acid *in vitro*. **Planta** 157: 131-137.

GREPPIN, H.R. y PENEL, C. 1991. Peroxidase photocontrol and flowering process. En: **Biochemical, Molecular, and Physiological Aspects of Plant Peroxidases**. Eds: Lobarzewski, J., Greppin, H., Penel, C. y Gaspar, Th. Université M. Curie-Sklodowska, Université de Genève. pp: 363-368.

GRIFFING, L.R. y FOWKE, L.C. 1985. Cytochemical localization of peroxidase in soybean suspension culture cells and protoplasts: intercellular vacuole differentiation and presence of peroxidase in coated vesicles and multivesicular bodies. **Protoplasma** 128: 22-30.

GURIES, R.P. y LEDIG, F.T. 1978. Inheritance of some polymorphic isoenzymes in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.). **Heredity** 40: 27-32.

HAMRICK, J.L., LINHART, Y.B. y MITTON, J.B. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **A. Rev. Ecol. Syst.** 10: 173-200

HATCH, M.D. y GLASZIOU, K.T. 1963. Sugar accumulation cycle in sugar cane. II. Relationship of invertase activity to sugar content and growth rate in storage tissue of plants grown in controlled environments. **Plant. Physiol.** 38: 344-348.

HATCH, M.D. y OSMOND, C.B. 1976. En: *Encyclopedie of Plant Physiology*. Eds: Stocking, C.R. y Heber, U. New Series. Vol. 3. Springer, Berlin. pp: 144-184.

HENDRIKS, T., DE JONG, A., WIJSMAN, H.J.W. y VAN LOON, L.C. 1990b. Antigenic relationships between *Petunia* peroxidase a and specific peroxidase isoenzymes in other *Solanaceae*. *Theor. Appl. Genet.* 80 (1): 113-121.

HENDRIKS, T., VAN DEN BERG, B.M. y SCHRAM, A. 1985. Cellular location of peroxidase isoenzymes in leaf tissue of *Petunia* and their affinity for Concanavalin A-Sepharose. *Planta* 164: 89-95.

HENDRIKS, T. y VAN LOON, L.C. 1990. *Petunia* peroxidase a is localized in the epidermis of aerial plant organs. *J. Plant Physiol.* 136: 519-525.

HERBERT, m., BURKHARD, K.H. y SCHNARRENBERGER, C. 1979. *Planta* 145: 95-104.

HEYES, J.K. 1977. Metabolic aspects of cell growth and development in the root. En: *Physiology of the Garden Pea*. Eds: Sutcliffe, J.F. y Pate, J.S. Academic Press, London, New York, San Francisco. pp: 153-181.

HOYLE, M.C. 1977. High resolution of peroxidase-indoleacetic acid oxidase isoenzymes from horseradish by isoelectric focusing. *Plant. Physiol.* 60: 787-793.

HUNTER, R.L. y MARKERT, C.L. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125: 1294-1295.

IWAI, K., SUZUKI, T. y FUJIWAKE, H. 1979a. Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. karayatsubusa at different growth stages after flowering. *Agric. Biol. Chem.* 43: 2493.

JACOBS, W.P. 1985. The role of auxin in inductive phenomena. *Biol. Plant.* 27: 303-309.

JENSEN, R.J., McLEOD, M.J., ESHBAUGH, W.H. y GUTTMAN, S.I. 1979. Numerical taxonomic analyses of allozymic variation in *Capsicum* (Solanaceae). *Taxon* 28: 315-327.

JOHNSON, B.L. y HALL, O. 1966. Electrophoretic studies of species relationships in *Triticum*. *Acta. Agr. Scand. Suppl.* 16: 222-224.

JOHNSON, T.S., RAVISHANKAR, G.A. y VENKATARAMAN, L.V. 1990. *In vitro* capsaicin production by immobilized cells and placental tissues of *Capsicum annuum* L. grow in liquid medium. *Plant Science*. 70: 223-229.

KACPERSKA, A. y KUBACKA-ZEBALSKA, M. 1985. Is lipoxygenasa involved in the formation of ethylene from ACC?. *Physiol. Plant.* 64: 333-338.

KAHLEM, G. 1975. A specific and general biochemical marker of stamen morphogenesis in higher plants: Anodic peroxidases. *Z. Pflanzenphysiol* 76: 80-85.

KAY, L.E. y BASILE, D.V. 1987. Specific peroxidase isoenzymes are correlated with organogenesis. *Plant Physiol.* 84: 99-105.

KLEMENT, Z. 1965. Method of obtaining fluid from the intercellular spaces of foliage and the fluids ment as substrate for phyto bacterial pathogens. *Phytopathology* 55: 1033-1034.

KORNFIELD, I.L. y KOEHN, R.K. 1975. Genetic variation and speciation in New World chilis. *Evol.* 29: 427-437.

LAMPOR, D.T.A. y CATT, J.W. 1981. Glycoproteins and enzymes of the cell wall. En: *Plant Carbohydrates. II. Extracelular Carbohydrates.* Eds: Tanner, W. y Loewus, F.A. *Encycl. Plant. Physiol.* vol. 13B, Springer-Verlag, Berlin. pp: 132-165.

LEECH, R.M. 1977. Subcellular fractionation techniques in enzyme distribution studies. En: *Regulation of Enzyme Synthesis and Activity in Higher Plants.* Ed: Smith, H. London, New York, San Francisco. Academic Press. pp: 289-327.

LEETE, E. y LOUDEN, M.C.L. 1968. Biosynthesis of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum frutescens*. *J. Amer. Chem. Soc.* 90: 6837-6841.

LI, Z.Ch., McCLURE, J.W. y HAGERMAN, A.E. 1989. Soluble and bound apoplastic activity for peroxidase, B-D-glucosidase, malate dehydrogenase, and nonspecific arylesterase, in barley (*Hordeum vulgare* L.) and oat (*Avena sativa* L.) primary leaves. *Plant Physiol.* 90: 185-190.

LILLEY, R.M., FITZGERALD, M.P., RIENITS, K.G. y WALKER, D.A. 1975. Criteria of intactness and the photosynthetic activity of spinach chloroplast preparations. *New Phytol.* 75: 1-10.

LÖRH, G.W. y WALLER, H.D. 1974. Glucose 6 phosphate dehydrogenase. En: *Methods of Enzymatic Analysis*, vol 2. Eds: Bergemeyer, H.U. Academic Press Inc. New York. pp: 636-643.

MADĚR, M. 1976. Die lokalisation der peroxidase-isoenzymgruppe G1 in der zellwand von Tabak-gewebe. *Planta (Berl)* 131: 11-15.

MADĚR, M. y AMBERG-FISHER, V. 1982. Role the peroxidase in lignification of tobacco cells. 1. Oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide and formation of hydrogen peroxide by cell wall peroxidases. *Plant Physiol.* 70: 1128-1131.

MADĚR, M. y BOPP, M. 1976. Neue vorstellungen zum problem der isoperoxidasen anhand der trennung durch disk-elektrophoresis und isoelektrische fokussierung. *Planta* 128: 247-253.

MADĚR, M. y FÜSSL, R. 1982. Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. 2. Regulation by phenolic compounds. *Plant Physiol.* 70: 1132-1134.

MADĚR, M., UNGEMACH, J. y SCHLOSS, P. 1980. The role of peroxidase isoenzyme groups of *Nicotiana tabacum* in hydrogen peroxide formation. *Planta* 147: 467-470.

- MADĚR, M. y WALTER, C. 1986. *De novo* synthesis and release of peroxidases in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum* L. **Planta** 169: 273-277.
- MAKINEN, Y. y BREWBAKER, J.I. 1967. Isoenzyme polymorphism in flowering plant. I. Diffusion of enzymes out of intact pollen grains. **Physiol. Plant.** 20: 477-482.
- MARGULIS, L. 1970. Origin of eukaryotic cells. Yale University Press, New Haven.
- MARKERT, C.L. y MOLLER, F. 1959. Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic and specific patterns. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 45: 753-763.
- McLEOD, M.J., ESHBAUGH, W.H. y GUTTMAN, S.I. 1979a. A preliminary biochemical systematic study the genus *Capsicum* - Solanaceae. En: The biology and taxonomy of the Solanaceae. Eds: Hawkes, J.G. Y Lester, R.N. Academic Press, New York. pp: 701-714.
- McLEOD, M.J., ESHBAUGH, W.H. y GUTTMAN, S.I. 1979b. An electrophoretic study of *Capsicum* (Solanaceae): the purple flowered taxa. **Bull. Torrey Bot. Club** 106: 326-333
- McLEOD, M.J., GUTTMAN, S.I., ESHBAUGH, W.H. y RAYLE, R.E. 1983. An electrophoretic study of evolution in *Capsicum* (Solanaceae). **Evolution** 37(3): 562-574.
- MIFLIN, B.J. y BEEVERS, H. 1974. Isolation of intact plastids from a range of plant tissues. **Plant Physiol.** 53: 870-874.
- MILLS, W.R. y JOY, K.W. 1980. A rapid method for isolation of purified physiologically active chloroplasts, use to study the intracellular distribution of amino acids in pea leaves. **Planta** 148: 75-83.
- MUHLBACH, H. y SCHNARRENBERGER, C. 1978. Properties and intracellular distribution of two phosphoglucomutases from spinach leaves. **Planta** 141: 65
- NAVOT, N. y ZAMIR, D. 1986. Linkage relationships of 19 protein coding genes in watermelon. **Theor. Appl. Genet.** 72: 274-278.

NI, W., ROBERTSON, E.F. y REEVES, H.C. 1987. Purification and characterization of cytosolic NADP specific isocitrate dehydrogenase from *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* **83**: 785-788.

OCHOA-ALEJO, N. y SALGADO-GARCIGLIA, R. 1992. Phenylalanine ammonia-lyase activity and capsaicin precursor compounds in p-fluorophenylalanine -resistant and sensitive variant cells of chili pepper (*Capsicum annuum*). *Physiol. Plant.* **85**: 173-179.

OLIVER, J.L. y MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. 1985. A genetic clasification of potato cultivars based on allozyme patterns. *Theor. Appl. Genet.* **69**: 305-311.

OTHA, Y. 1962a. Genetical studies in the genus *Capsicum*. *Kihara. Inst. Biol. Res.* : 1-94.

PALAVAN, N. y GALSTON, A.W. 1982. Polyamine biosynthesis and their titer during various developmental stages of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* **55**: 438-444.

PALMA, J.M., SANDALIO, L.M. y DEL RIO, L A. 1986. Manganese superoxide dismutase and higher plant chloroplasts: A reappraisal of a controverted cellular localization. *J. Plant Physiol.* **125**: 427-439.

PANDA, R.C., KUMAR, O.A. y RAO, K.G.R. 1986. The use of seed protein electrophoresis in the study of phylogenetic relationships in chili pepper (*Capsicum*). *Theor. Appl. Genet.* **72**: 665-670.

PEDREÑO, M.A., MUÑOZ, R., SABATER, F. GARCIA-CARMONA, F. 1988. Oxidase and peroxidase activities of a cell wall-bound peroxidase acting on indolacetic acid. Control by p-coumaric acid. *Biochem. Intern.* **16**: 465-475.

PENESFSKY, H.S. y TZAGOLOFF, A. 1971. Extraction of water-soluble enzymes and proteins from membranes. *Methods Enzymol.* **22**: 204-218.

PERREY, R., HAUSER, M.T. y WINK, M. 1989. Cellular and subcellular localization of peroxidases isoenzymes in plant and cell suspension cultures from *Lupinus polyphillus*. *Z. Naturforsch.* **44c**: 931-936.

PHARMACIA FINE CHEMICALS. 1980. Percoll methodology and applications. Upsala, Suecia.

PICKERSGILL, B. 1992. Barriers to interspecific hybridization in *Capsicum*. VIII Meeting Genetics and Breeding on *Capsicum* and *Eggplant*. Roma, 7-10 Septiembre. pp: 57-61.

PICKERSGILL, B. y HEISER, C.B.Jr. 1976. Cytogenetics and evolutionary change under domestication. *Trans. R. Soc. Soc. London B* **275**: 55-69.

PICKERSGILL, B., HEISER, C.B.Jr. y McNEILL, J. 1978. Numerical taxonomic studies on variation and domestication in some species of *Capsicum*. En: The biology and taxonomy of the Solanaceae. Eds: Hawkes, J.G. y Lester, R.N. Acad. Press, New York. pp: 679-700.

POUX, N. 1969. Localisation d'activités enzymatiques dans les cellules du meristeme radicaire de *Cucurbita sativus*. II. Activite peroxydasique. *J. Microscopie.* **8**: 855-866.

PRAKASH, S., LEWONTIN, R.C. y HUBBY, J.L. 1969. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genetic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **61**: 841-858.

QUAIL, P.H. 1979. Plant cell fractionation. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **30**: 425-484.

QUIROS, C.F. y McHALE, N. 1985. Genetic analysis of isozyme variants in diploid and tetraploid potatoes. *Genetics* **111**: 131-145.

RATHMELL, W.G. y SEQUEIRÁ, L. 1974. Soluble peroxidase in fluid from the intercellular spaces of tobacco leaves. *Plant Physiol.* **53**: 317-318.

- REINECKE, D.M. y BANDURSKI, R.S. 1988. Oxidation of indole-3-acetic acid to oxindole-3-acetic acid by an enzyme preparation from *Zea mays*. *Plant Physiol.* 86: 868-872.
- RENAUDIN, J.P., BROWN, S.C., BARBIE R-BRYGOO, H. y GUERN, J. 1986. Quantitative characterization of protoplasts and vacuoles from suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* *Physiol. Plant.* 68: 695-703.
- RICK, C. M. 1983. Tomato (*Lycopersicon*). En: Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part B. Eds: Tanksley, S.D. y Orton, T.J. Elsevier Scientific Publishers, New York. pp: 147-165.
- RICK, C.M., FOBES, J.F. y HOLLE, M. 1977. Genetic variation in *Lycopersicon pimpinellifolium*. Evidence of evolutionary change in mating systems. *Plant Syst. Evol.* 127: 139-170.
- RICK, C.M., TANKSLEY, S.D. y FOBES, J.F. 1979. A pseudoduplication in *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76 (7): 3435-3439.
- RICO, J. 1983. Cultivo del pimiento de carne gruesa en invernadero. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- RITLAND, K. 1983. Estimation of mating systems. En: Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A. Eds: Tanksley, S.D. y Orton, T.J. Elsevier Scientific Publishers, New York. pp: 289-302.
- ROOSE, M.L. y GOTTLIEB, L.D. 1976. Genetic and biochemical consequences of polyploidy in *Tragopogon*. *Evolution* 30: 818-830
- ROOSE, M.L. y GOTTLIEB, L.D. 1978. Stability of structural gene number in diploid species with different amounts of nuclear DNA and different chromosome numbers. *Heredity* 40: 159-163.

- ROS BARCELO, A. y MUÑOZ, R. 1992. Peroxidases: Their role in the control of plant cell growth. En: Peroxidases 1980-1990: Progress and Prospects in Biochemistry and Physiology. Eds: Greppin, H., Penel, C. y Gaspar, Th. Université de Genève. pp:71-90
- ROS BARCELO, A., MUÑOZ, R. y SABATER, F. 1987. Lupin peroxidases. I. Isolation and characterization of cell wall-bound isoperoxidase activity. *Physiol. Plant.* **71**: 448-454.
- ROS BARCELO, A., MUÑOZ, R. y SABATER, F. 1988a. Lupin peroxidases. III. Subcellular location of membrane-bound acidic isoperoxidases. *Plant Physiol. Biochem.* **26**: 575-583.
- ROS BARCELO, A., MUÑOZ, R. y SABATER, F. 1989b. Subcellular location of basic and acidic soluble isoperoxidases in *Lupinus*. *Plant Sci.* **63**: 31-38.
- ROS BARCELO, A., PEDREÑO, M.A., MUÑOZ, R. y SABATER, F. 1986. Specific binding and Ca²⁺-mediated binding of acidic isoperoxidases to lupin cells walls and membrane fractions, respectively. Note on the subcellular localization of acidic isoperoxidases. En: Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. Eds: Greppin, H., Penel, C. y Gaspar, Th. Université de Genève. pp: 165-168.
- ROS BARCELO, A., PEDREÑO, M.A., MUÑOZ, R. y SABATER, F. 1988b. Lupin peroxidases. II. Binding of acidic isoperoxidases to cell wall. *Physiol. Plant.* **73**: 238-244.
- SAFFORD, W.E. 1926. Our heritage from the American Indians. *Ann. Rep. Smithsonian Inst.* **405**: 410.
- SALGADO-GARCIGLIA, R. y OCHOA-ALEJO, N. 1990. Increased capsaicin content in PFP-resistant cells of chili pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant Cell. Reports.* **8**: 617-620.
- SANCHEZ-BRAVO, J., ORTUÑO, A., ACOSTA, M. y SABATER, F. 1986. Distribution of indole-3-acetic acid in relation to the growth of etiolated *Lupinus albus* hypocotyls. *Physiol. Plant.* **66**: 509-514.

SANDALIO, L.M. 1987. Superoxido Dismutasa en peroxisomas vegetales especializados: localización intraorganelar y estudio de la producción de radicales libres de oxígeno. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

SARI-GORLA, M.C., FROVA, G., BINELLI, G. y OTTAVIANO, E. 1986. The extent of gametophytic-sporophytic gene expression in maize. *Theor. Appl. Genet.* **72**: 42-47.

SAUDERS, B.C., SIEDLE, A.G.H. y STARK, B.P. 1964. En: Peroxidase. The properties and uses of a versatile enzyme and some related catalysts. Butterworths, London. pp: 271.

SCANDALIOS, J.G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plant: a review. *Biochem. Genet.* **3**: 37-79

SCANDALIOS, J. G. 1974. Isozymes in development and differentiation. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **25**: 225-258.

SCANDALIOS, J.G. y SORENSON, J.C. 1976. Isoenzymes in plant tissue culture. En: Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Eds: Reiner, J. y Bajaj, Y.P.J. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. pp: 719-730.

SCHLOSS, P., WALTER, C. y MÄDER, M. 1987. Basic peroxidases in isolated vacuoles of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* **170**: 225-229.

SCHNARRENBERGER, C. y OESER, A. 1974. Two isoenzymes of glucose phosphate isomerase from spinach leaves and their intracellular compartmentation. *Eur. J. Biochem* **45**: 77-82.

SCHNARRENBERGER, C., OESER, A. y TOLBERT, N.E. 1971. Development of microbodies in sunflower cotyledons and castor bean endosperm during germination. *Plant Physiol.* **48**: 566-574.

SCHNARRENBERGER, C., OESER, A. y TOLBERT, N.E. 1973. Two isozymes each of glucose-6-phosphate dehydrogenase in spinach leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* **154**: 438-448.

SCHNARRENBERGER, C., TETOUR, M. y HERBERT, M. 1975. Development and intracellular distribution of enzymes of the oxidative pentose phosphate cycle in radish cotyledons. *Plant Physiol.* **56**: 836-840.

SCHWITZGUEBEL, S.P. y SIEGENTHALER, P.A. 1984. Purification of peroxisomes and mitochondria from spinach leaf by Percoll gradient centrifugation. *Plant Physiol.* **75**: 670-674.

SEMBDNER, G., GROSS, D., LIEBISCH, H.W. y SCHNEIDER, G. 1980. Biosynthesis and metabolism of plant hormones. En: *Encyclopedia of Plant Physiology*, N.S. Vol. 9: Hormonal regulation of development: I. Molecular aspects of plant hormones. Ed: McMillan, J. Springer, Berlin Heidelberg, New York. pp: 281-444.

SHAW, C.R. 1970. How many genes evolve? *Biochem. Genet.* **4**: 275-283.

SHAW, C.R. y PRASAD, R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochem. Genet.* **4**: 297-320.

SICHER, R.C. 1989. Evidence for a light dependent increase of phosphoglucomutase activity in isolated, intact spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* **89**: 557-563.

SIMCOX, P.D. y DENNIS, D.T. 1978. Isoenzymes of the glycolytic and pentose phosphate pathways in proplastids from the developing endosperm of *Ricinis communis*. *Plant Physiol.* **61**: 871-877.

SOOCH, B.S., THAKUR, M.R. y KAUR, G. 1977. Evaluation of some chili (*Capsicum annum* L.) genotypes for capsaicin and ascorbic acid contents. *Indian. Food. Packer.* **31**: 9-11.

STEPHAM, D. y VAN HUUSTEE, R.B. 1980. Peroxidase biosynthesis as part of protein synthesis by cultured peanut cells. *Can. J. Biochem.* **58**: 715-719.

STRYER, L. 1988. Vía de las pentosas fosfato y gluconeogénesis. En: *Bioquímica*. Vol. I: Ed: Maraculla, J.M. Editorial Reverté, S.A. pp: 433-454.

SUZUKI, T., FUJIWAKE, H y IWAI, K. 1980. Intracellular localization of capsaicin and its analogues, capsaicinoid, in *Capsicum* fruits. 1. Microscopic investigation of the structure of the placenta of *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. *karayatsubusa*. *Plant Cell Physiol.* **21**: 839.

TAIZ, L. 1984. Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**: 585-657.

TAKAHAMA, U. y EGASHIRA, T. 1990. Peroxidases in vacuoles of *Vicia faba* leaves. *Phytochem.* **30** (1): 73-77.

TANKSLEY, S.D. 1983. Isozymes in plant genetics and breeding. Vol A. Eds: Tanksley, S.D. y Orton, T.J. Elsevier, Amsterdam. pp: 111-140.

TANKSLEY, S.D. 1984. Linkage relationships and chromosomal locations of enzyme-coding genes in pepper, *Capsicum annuum*. *Chromosoma (Berl.)* **89**: 352-360.

TANKSLEY, S.D. 1987. Organization of the nuclear genome in tomato and related diploid species. *Am. Nat.* **130** (S): 46-56.

TANKSLEY, S.D. y KUEHN, G.D. 1985. Genetics, subcellular localization, and molecular characterization of 6-phosphogluconate dehydrogenase isoenzymes in Tomato. *Biochem. Genet.* **23** (516): 441-454.

TANKSLEY, S.D. y ORTON, T.J. 1983. Isoenzymes in plant genetics and breeding. Vol A. Eds: Tanksley, S.D. y Orton, T.J. Elsevier, Amsterdam.

TANKSLEY, S.D. y RICK, C.M. 1980. Isozymic gene linkage map of the Tomato: applications in genetics and breeding. *Theor. Appl. Genet.* **57**: 161-170.

TANKSLEY, S.D., ZAMIR, D. y RICK, C.M. 1981. Evidence for extensive overlap of sporophytic and gametophytic gene expression in *Lycopersicon esculentum*. *Science* **213**: 453-455.

THORPE, T.A., TRAN THANH VAN, M. y GASPAR, T. 1978. Isoperoxidases in epidermal layers of Tobacco and changes during organ formation *in vitro*. *Physiol. Plant.* **44**: 388-394.

THRESH, J.C. 1876. Note on capsaicin, the active principle of Cayenne pepper. *Pharm. Jour. and Trans.* **7**: 473.

TOLBERT, N.E., OESER, A., KISAKI, T., HAGEMAN, R.H. y YAMAZAKI, R.K. 1968. Peroxisomes from spinach leaves containing enzymes related to glycolate metabolism. *J. Biol. Chem.* **243**: 5179-5184.

TOLBERT, N.E., YAMAZAKI, R.K. y OESER, A. 1970. Localization and properties of hydroxypyruvate and glyoxylate reductases in spinach leaf particles. *J. Biol. Chem.* **245**: 5129-5136.

TRINH, T.H., GASPAR, Th., TRAN THANH VAN, K. y MARCOTTE, J.L. 1981. Genotype, ploidy and physiological state in relation to isoperoxidases in *Nicotiana*. *Physiol. Plant.* **53**: 153-157.

VALLEJOS, C.E. 1983. Enzyme activity staining. En: *Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A.* Eds: Tanksley, S.D. y Orton, T.J. Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam. pp: 469-516.

VAN DEN BERG, B.M. y WIJSMAN, H.J.W. 1981. Genetics of the peroxidase isoenzymes in *Petunia*. Part 1. Organ specificity and general genetic aspects of the peroxidase isoenzymes. *Theor. Appl. Genet.* **60**: 71-76.

- VAN HUUSTEE, R.B. 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase: biosynthetic studies. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **38**: 205-219.
- VAN HUUSTEE, R.B. y CAIRNS, W.L. 1982. Progress and prospects in the use of peroxidase to study cell development. *Phytochem.* **21**: 1843-1847.
- VAN HUUSTEE, R.B. y TAM, A.S.K. 1988. Peptides released by peanut cells during growth. *J. Plant Physiol.* **133**: 645-647.
- VAN LOON, L.C. y CALLOW, J.A. 1983. Transcription and translation in the diseased plant. En: *Biochemical Plant Pathology*. Eds: Callow, J.A. John Wiley y Sons, Chichester, United Kingdom. pp: 385-414.
- VIGIL, E.L. 1983. Microbodies. En: *Isolation of membranes and organelles from plants cells*. Eds: Hall, J.L. y Moore, A.L. Academic Press, London. pp: 221-236.
- WAGNER, G. 1983. Higher plant vacuoles and tonoplast. En: *Isolation of membranes and organelles from plant cells*. Eds: Hall, J.L. y Moore, A.L. Academic Press Inc., London. pp: 83-118.
- WARWICK, S.I. y GOTTLIEB, L.D. 1985. Genetic divergence and geographic speciation in *Layia* (*Compositae*). *Evolution* **39**: 1236-1241.
- WEEDEN, N.F. y GOTTLIEB, L.D. 1980. Isolation of cytoplasmic enzymes from pollen. *Plant Physiol.* **66**: 400-403.
- WEEDEN, N.F. y GOTTLIEB, L.D. 1982. Dissociation, reassociation, and purification of plastid and cytosolic phosphoglucose isomerase isozymes. *Plant Physiol.* **69**: 717-723.
- WEEDEN, N.F. y MARX, G.A. 1984. Chromosomal locations of twelve isozyme loci in *Pisum sativum*. *J. Heredity* **75**: 365-370.
- WEEDEN, N.F. y WENDEL, J.F. 1990. Genetic of plant isozymes. En: *Isozymes in Plant Biology*. Eds: Soltis, D.E. y Soltis, P.S. Chapman and Hall, London. pp: 46-72.

WENDEL, J.F. y WEEDEN, N.F. 1990. Visualization and interpretation of plant isozymes. En: *Isozymes in Plant Biology*. Eds: Soltis, D.E. y Soltis, P.S. Chapman and Hall, London. pp: 5-45.

WIJSMAN, H.J.W. y HENDRIKS, T. 1986. Genetic analysis of structural and regulatory variation in isoperoxidases. En: *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. Eds: Greppin, H., Penel, C. y Gaspar, Th. Université de Genève. pp: 109-123.

WOMACK, J.E. y MOLL, Y.D. 1986. Gene map of the cow: conservation of linkage with mouse and man. *J. Heredity* **77**: 2-7.

WRIGLEY, C.W. 1969. Analytical fractionation of proteins according to isoelectric point by gel electrofocusing. En: *Shandon Instruments Applications N-29*. pp: 1-10.

WRIGLEY, C.W. 1971. Gel electrofocusing. *Methods Enzymol.* **22**: 559-564.

YOKOTA, K. y YAMAZAKI, J. 1965. Reaction of peroxidase with reduced nicotinamide adenine dinucleotide and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Biochem. Biophys. Acta.* **105**: 301-312.

ZAPATA, M., BAÑÓN, S. y CABRERA, P. 1992. *El pimiento para pimentón*. Ediciones Mundi-Prensa.

ZAPATA J.M., CALDERON, A.A., MUÑOZ, R. y ROS BARCELO, A. 1992. Oxidation of natural hydroxybenzoic acids by grapevine peroxidases: kinetic characteristics and substrate specificity. *Amer. J. Enol. Vític.* **43**: 134.

ZEEVAART, J.A.D. 1976. Physiology of flower formation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **27**: 321-348.

ZHENG, X. y VAN HUYSTEE, R.B. 1992. Anionic peroxidase catalysed ascorbic acid and IAA oxidation in the presence of hydrogen peroxide: a defense system against peroxidative stress in peanut plant. *Phytochem.* **31**: 1895-1889.

APENDICE

Análisis espectrofotométrico de los intermediarios de la reacción de oxidación de la capsicina y dihidrocapsicina mediante la aplicación del método de Coleman.

La espectrofotometría de absorción se ha utilizado para el análisis de los sistemas en disolución constituídos por varios componentes. La aplicación del método gráfico de Coleman y col (1970) permite obtener información acerca del número de especies presentes en una mezcla de reacción en función de la longitud de onda o de la composición de la disolución. Este método gráfico es una alternativa a la aproximación matricial utilizada para realizar tal determinación (Wallace, 1960; Ainsworth, 1961).

En la presente memoria, hemos utilizado el método de Coleman para determinar, a partir de experimentos de espectroscopía de barrido, el número de especies cinéticamente relacionadas que surgen en el transcurso de la reacción de oxidación enzimática de la capsicina y dihidrocapsicina por peroxidasa.

Para la aplicación del método de Coleman y col. se debe partir de una serie de disoluciones numeradas en orden creciente de tiempo de reacción, y del espectro de absorción de cada una de ellas. El valor de absorción de una disolución particular "j" a una longitud de onda específica "i" se denotará como A_{ij} , así A_{32} representará el valor de absorbancia de la disolución 2 correspondiente a la longitud de onda 3. La serie completa de datos de absorbancia vendrá dada por la matriz $// A_{ij} //$. Varios autores (Ainsworth, 1961; Katakis, 1965) han indicado que el rango de $// A_{ij} //$ puede interpretarse como el número de especies absorbentes. Wallace y Katz (1964) y Varga y Veatch (1967) han desarrollado diversos métodos para calcular dicho rango, pero tales procedimientos requieren sofisticados análisis computacionales. Sin embargo, el método gráfico de Coleman y col (1970), si bien se basa en las mismas relaciones numéricas que determinan el rango de $// A_{ij} //$, utiliza para ello cálculos más rápidos y sencillos, dando además, una visión de los cambios de rango de $// A_{ij} //$ (si los hubiera) en función de la longitud de onda o de la composición de la disolución.

El rango de una matriz se define como el orden del mayor determinante distinto de cero que se puede obtener de los elementos de la matriz. Puesto que el valor de un determinante es cero si sus filas o columnas son linealmente dependientes, el rango de una matriz define el número de elementos linealmente independientes de la misma. Así, para una matriz de absorbancia, el rango de la matriz es el número de especies que absorben en disolución. Si la matriz // A_{ij} // es de rango R, donde R es el número de especies independientes que absorben, entonces cada determinante / A_{ij} / de orden R+1 debe anularse. Esta será la condición de partida impuesta en cada caso.

Supongamos una disolución en la que hay únicamente una especie presente (R=1), entonces el determinante de segundo orden (A.1) debe anularse:

$$\begin{vmatrix} A_{11} & A_{12} \\ A_{21} & A_{22} \end{vmatrix} = 0 \quad (\text{A.1})$$

La ecuación (A.1) se puede interpretar como una serie de puntos (x,y) con coordenadas (A₁₁, A₂₁), (A₁₂, A₂₂), ó en general (A_{1j}, A_{2j}). El determinante requiere que estos puntos (x,y) estén en una línea recta que pase a través del origen de coordenadas, siempre que la absorbancia en la serie de espectros sea debida a una única especie.

De forma similar se procedería cuando fueran dos las especies presentes en disolución (R=2), y se debería cumplir la ecuación (A.2):

$$\begin{vmatrix} 1 & 1 & 1 \\ A_{21}/A_{11} & A_{22}/A_{12} & A_{23}/A_{13} \\ A_{31}/A_{11} & A_{32}/A_{12} & A_{33}/A_{13} \end{vmatrix} = 0 \quad (\text{A.2})$$

Esta ecuación sitúa a los tres puntos (x,y) de coordenadas (A₂₁/A₁₁, A₃₁/A₁₁), (A₂₂/A₁₂, A₃₂/A₁₂) y (A₂₃/A₁₃, A₃₃/A₁₃) en una única línea recta. La misma línea contendrá también los puntos (A_{2j}/A_{1j}, A_{3j}/A_{1j}). Una representación gráfica de las razones de absorbancia implicando a tres longitudes de onda diferentes, proporciona un test para comprobar si una serie de espectros se puede describir en términos de dos especies absorbentes.

De forma similar se procedería cuando fueran tres las especies presentes en disolución (R=3).

En resumen, se puede afirmar que cuando existe una única especie absorbente en disolución se obtiene, al representar los datos de absorbancia para dos longitudes de onda, una serie de líneas rectas que pasan por el origen de coordenadas. La existencia de dos especies absorbentes vendrá implicada por la obtención de una familia de rectas cuando se representen razones de absorbancia para varias combinaciones de tres longitudes de ondas distintas, de acuerdo con la ecuación (A.2)

Pero el cálculo se simplifica más, cuando se aplican las restricciones estequiométricas impuestas por la composición de la disolución a considerar. La restricción que se ha aplicado a los análisis de los espectros presentados en esta Memoria, consiste en considerar que la suma de las concentraciones de las especies absorbentes en disolución se mantiene constante. Para el caso de dos especies

presentes en disolución, aplicando una serie de cálculos matemáticos sencillos, se obtiene la ecuación (A.3):

$$(A_{ij} - A_{ij}') = \text{constante} \times (A_{i'j} - A_{i'j}') \quad (\text{A.3})$$

donde i' es una longitud de onda que se toma como referencia y j' una disolución (o un trazo del espectro) también de referencia. Una representación de $A_{ij} - A_{ij}'$, a una longitud de onda i , frente a la correspondiente diferencia $A_{i'j} - A_{i'j}'$, a otra longitud de onda i' dará por tanto una línea recta, que pasará por el origen de coordenadas, para cada i . Esta representación corresponde, por tanto, a la obtenida a partir de la ecuación (A.1) sustituyendo en ella las magnitudes A_{ij} por las correspondientes diferencias $A_{ij} - A_{ij}'$.

Cuando son tres especies las presentes en disolución, la situación es análoga a la descrita para dos especies.

Para averiguar el número de especies relacionadas que absorben en la reacción de oxidación de la capsicina y dihidrocapsicina se aplicó el método gráfico de Coleman. Para la aplicación del método se partió de una serie de espectros consecutivos en orden creciente de tiempo de reacción.

Las longitudes de onda escogidas en donde se observaron los mayores cambios de absorbancia fueron 300, 280, 260, 250 y 230 nm. Se realizaron 6 espectros en orden creciente de tiempo de reacción. Estos datos quedan reflejados en las siguientes Tablas:

(nm)	Valores de absorbancia con el tiempo				(Capsicina)	
300	0,146	0,178	0,221	0,263	0,306	0,345
280	0,724	0,749	0,780	0,811	0,843	0,873
260	0,419	0,474	0,543	0,611	0,678	0,738
250	0,420	0,497	0,590	0,680	0,765	0,843
230	1,845	1,947	2,054	2,152	2,241	2,317

trazos---> 1 2 3 4 5 6

(nm)	Valores de absorbancia con el tiempo				(Dihidrocapsicina)	
300	0,213	0,284	0,336	0,380	0,415	0,447
280	0,566	0,636	0,682	0,719	0,747	0,772
260	0,468	0,567	0,640	0,699	0,747	0,789
250	0,526	0,649	0,738	0,811	0,870	0,921
230	1,753	1,907	2,001	2,074	2,122	2,167

trazos ---> 1 2 3 4 5 6

A continuación, fijamos una longitud de onda (i') y un trazo o espectro del medio de reacción (j'). Así, $i' = 260$ nm y $j' =$ trazo 3. Posteriormente, se procedió al cálculo de $A_{i'j} - A_{ij'}$ y $A_{ij} - A_{ij'}$, que corresponderán al eje x y al eje y respectivamente.

(Capsicina)

(i) (nm) → 300 280 250 230

$A_{ij} - A_{ij}'$	$A_{ij} - A_{ij}'$				
j = 1	-0,124	-0,075	-0,056	-0,169	-0,208
j = 2	-0,068	-0,042	-0,031	-0,093	-0,107
j = 4	0,068	0,042	0,030	0,089	0,097
j = 5	0,134	0,084	0,062	0,175	0,186
j = 6	0,195	0,123	0,093	0,253	0,262

(DIhidrocapsicina)

(i) (nm) → 300 280 250 230

$A_{ij} - A_{ij}'$	$A_{ij} - A_{ij}'$				
j = 1	-0,171	-0,123	-0,115	-0,211	-0,248
j = 2	-0,072	-0,052	-0,046	-0,088	-0,093
j = 4	0,059	0,043	0,036	0,072	0,073
j = 5	0,107	0,078	0,065	0,132	0,120
j = 6	0,149	0,110	0,090	0,183	0,166

Representando gráficamente todos estos datos se obtuvo una familia de rectas que pasan por el origen (ver Figura IV - 2 A y B); luego sólo hay dos especies cinéticamente relacionadas e implicadas: el sustrato y el primer producto estable de la reacción

BIBLIOGRAFIA

AINSWORTH, S. 1961. Spectrophotometric analysis of reaction mixtures. *J. Phys. Chem.* **65**: 1968-1972.

COLEMAN, J.S., VARGA, L.P. y MASTIN, S.H. 1970. Graphical methods for determining the number of species in solution from spectrophotometric data. *Inorg. Chem.* **9**: 1015-1020.

KATAKIS, D. 1965. Matrix rank analysis of spectral data. *Anal. Chem.* **37**: 876-878.

VARGA, L.P. y VEATCH, E.C. 1967. Nature of hafnium-chloranilic acid metallchrome by matrix rank, contour mapping and iterative analysis of absorption spectra. *Anal. Chem.* **39**: 1101-1109.

WALLANCE, R.M. 1960. Analysis of absorption spectra of multicomponent systems. *J. Phys. Chem.* **64**: 899-901.

WALLANCE, R.M. y KATZ, S.M. 1964. Method for determination of rank in the analysis of absorption spectra. *J. Phys. Chem* **68**: 3890-3892.

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Servicio de Bibliotecas



1700744225