

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

"ACTIVIDAD AMIOLITICA Y MOVILIZACION DEL ALMIDON EN HOJAS DE NARANJO (Citrus sinensis L. Osbeck, cv. Washington-Navel), EN RELACION CON LA FRUCTIFICACION.

por

M. AMPARO SANZ GRAU

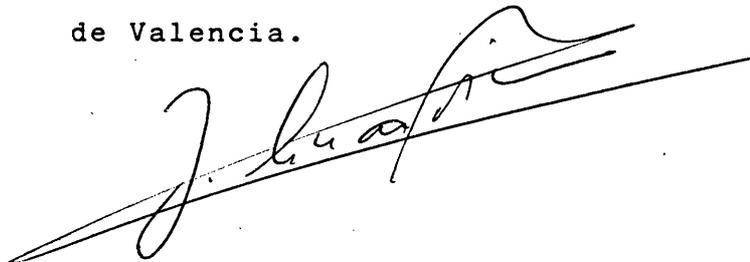
Licenciada en Ciencias Biológicas.

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia.

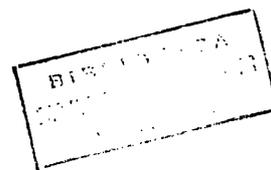
Firma de la autora:



Ejemplar revisado por el Director de la Tesis: Prof.Dr.D. José Luis Guardiola Bárcena, Catedrático del grupo XVIII, "Fisiología Vegetal", de la E.T.S.I.A. de Valencia.



Valencia, Marzo 1984.



UMI Number: U607628

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607628

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

R. 3918

Ri 18757029.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud al Director del presente trabajo, realizado en la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Valencia, Dr. D. José Luis Guardiola - Bárcena, por su constante orientación y ayuda durante el curso del mismo.

Quiero agradecer también a la Dr. Dña. Esther Simón Martínez Catedrática de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas, el haberme facilitado el compatibilizar mi trabajo como Profesora Ayudante de Clases Prácticas en la Facultad de Ciencias Biológicas con la realización de este estudio en la E.T.S.I.A.

Asimismo quiero hacer extensivo este agradecimiento a los miembros de las dos Cátedras por la desinteresada colaboración prestada en todo momento. Deseo hacer constar mi reconocimiento especial a la Dra. Dña. - Consuelo Monerri Huguet con la que he compartido muchos trabajos de laboratorio y discutido resultados, a D. José Gonzalez Ferrer por su inestimable colaboración en numerosos muestreos y análisis y a la Dra. Dña. Isabel Picazo Gonzalez por su ayuda en la realización de las fotografías.

También deseo mencionar particularmente a D. Manuel Serra - Galindo por su orientación en los análisis estadísticos y a Dña. Francisca Vila Sanz por su constante aliento y ánimo, así como a mi familia por la comprensión y el apoyo ofrecidos para llevar a término este trabajo.

Finalmente, mi agradecimiento a todas las cooperativas y propietarios de parcelas en las que se han llevado a cabo los experimentos. Merecen especial mención D. Joaquín Llusar, de Almenara, y el Ingeniero Técnico Agrícola de la Sociedad de Exportación INVICTO de Villarreal, D. Enrique Font.

I N D I C E

I. INTRODUCCION	7
I.1.- LOS CARBOHIDRATOS EN LAS PLANTAS PERENNES	8
I.1.1.- VARIACIONES ESTACIONALES	8
I.1.2.- CAMBIOS PROVCCADOS POR LA PRESENCIA DE SUMIDEROS ACTIVOS	10
I.1.3.- VARIACIONES DURANTE LA SE-NESENCIA	12
I.2.- CARBOHIDRATOS EN CITRICOS	14
I.3.- VIAS DEGRADATIVAS DEL ALMIDON	18
I.3.1.- GENERALIDADES	18
I.3.1.1.- VIA FOSFOROLITICA	21
I.3.1.2.- VIA AMIOLITICA	22
I.3.2.- IMPORTANCIA DE LAS DOS VIAS	26
I.3.2.1.- MOVILIZACION DEL ALMI- DON EN SEMILLAS Y FRUTOS	26
I.3.2.2.- MOVILIZACION DEL ALMI- DON EN HOJAS	27
I.3.3.- CARACTERIZACION DE LAS AMI- LASAS	31
I.4.- OBJETIVOS DEL TRABAJO	34

II. MATERIALES Y METODOS.-	36
II.1.- MATERIAL VEGETAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL	37
II.1.1.- INDUCCION DE LA SENESCENCIA	37
II.1.2.- VARIACION ESTACIONAL DE LA ACTIVIDAD AMIOLITICA Y DEL CONTENIDO EN CARBOHIDRATOS	38
II.1.3.- INFLUENCIA DE LA FRUCTIFICACION SOBRE LA ACTIVIDAD AMIOLITICA Y EL CONTENIDO EN CARBOHIDRATOS	40
II.2.- ESTIMACION DE LA ACTIVIDAD AMIOLITICA	42
II.2.1.- OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO	42
II.2.2.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD	42
II.2.2.1.- DETERMINACION CUANTITATIVA	42
II.2.2.2.- CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR	43
II.2.2.3.- ELECTROFORESIS EN GELES LAMINARES DE POLIACRIDAMIDA	44
A.- Preparación de los geles	44
B.- Electroforesis	46
C.- Incubación de los geles	46
D.- Tinción y fijación de los geles	46

E.- Fotografía	47
F.- Secado de los geles	47
II.2.3.- ESTIMACION INDEPENDIENTE DE LAS ACTIVIDADES ALFA- Y BETA-AMILOLI TICAS	48
II.2.3.1.- INACTIVACION CON CLORURO MERCURICO	48
II.2.3.2.- INACTIVACION POR ELIMINA CION DE IONES CALCIO	50
II.2.3.3.- INACTIVACION TERMICA	50
II.3.- DETERMINACIONES ANALITICAS	53
II.3.1.- CLOROFILA	53
II.3.2.- CARBOHIDRATOS	54
II.3.2.1.- EXTRACCION DE LAS MUES TRAS	54
A.- Azúcares	54
B.- Almidón	55
II.3.2.2.- ANALISIS DE LOS EXTRACTOS	55
A.- Azúcares reductores	55
B.- Azúcares solubles y almidón	56
II.4.- ANALISIS ESTADISTICOS	58

III.- RESULTADOS	59
III.1.- CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA	60
III.1.1.- EXTRACTOS CRUDOS	60
III.1.1.1.- ESTIMACION INDEPENDIENTE DE LAS DISTINTAS ACTIVIDADES AMIOLITICAS	69
A.- Inactivación por cloruro mercúrico	69
B.- Inactivación térmica	71
C.- Inactivación por secuestro de iones calcio	71
III.1.2.- EXTRACTOS SEMIPURIFICADOS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR	77
III.1.2.1.- SEPARACION DE LAS ENZIMAS	77
III.1.2.2.- CARACTERIZACION DE LAS - FRACCIONES ENZIMATICAS	80
A.- Fracción enzimática 1	80
B.- Fracción enzimática 2	87
III.1.3.- ENZIMAS SEPARADAS POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRIDAMIDA	91
III.1.3.1.- SEPARACION DE LAS ENZIMAS	91

III.1.3.2.- CARACTERIZACION DE LAS BANDAS DE ACTIVIDAD AMIOLITICA	94
A.- Inactivación por inhibidores selectivos	94
B.- Electroforesis de las fracciones cromatográficas	95
III.1.3.3.- AMILOFOSFORILASAS	123
III.2.- VARIACIONES DURANTE EL DESARROLLO	128
III.2.1.- VARIACION ESTACIONAL DEL CONTENIDO EN CARBOHIDRATOS	128
III.2.1.1.- ALMIDON	134
III.2.1.2.- AZUCARES	138
III.2.1.3.- CARBOHIDRATOS TOTALES	147
III.2.2.- VARIACION ESTACIONAL DE LA ACTIVIDAD AMIOLITICA	152
III.2.3.- INFLUENCIA DEL FRUTO SOBRE LA MOVILIZACION DE LOS CARBOHIDRATOS Y LA ACTIVIDAD AMIOLITICA	161
III.3.- VARIACIONES DURANTE LA SENESCENCIA	174
III.3.1.- COMPORTAMIENTO DE LAS HOJAS SEPARADAS DE LA PLANTA	174
III.3.2.- CAMBIOS EN EL CONTENIDO EN CARBOHIDRATOS	177
III.3.3.- CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD AMIOLITICA	188

IV.- DISCUSION	192
A.- NATURALEZA QUIMICA DE LAS RESERVAS	195
B.- DISPONIBILIDAD DE LOS CARBOHIDRATOS	198
C.- RELACION DE LOS CARBOHIDRATOS CON LA FRUCTIFICACION	200
D.- CONTROL DE LA MOVILIZACION Y DISTRI- BUCION DE LOS CARBOHIDRATOS EN LA PLANTA	206
E.- ASPECTOS METABOLICOS DE LA MOVILI- ZACION DEL ALMIDON	211
V.- CONCLUSIONES	216
VI.- BIBLIOGRAFIA	220

introducción

I.1.- LOS CARBOHIDRATOS EN LAS PLANTAS PERENNES.-

I.1.1.- VARIACIONES ESTACIONALES.-

En las plantas perennes el exceso de productos fotoasimilados durante las épocas de menor consumo es almacenado en distintas partes de la planta. La acumulación de carbohidratos y su disminución en la planta reflejan variaciones de la demanda para el crecimiento vegetativo y reproductivo. Los árboles que crecen mediante brotaciones intermitentes utilizan diversas cantidades de carbohidratos en cada una de ellas y a menudo muestran varios mínimos y máximos en el contenido de las reservas (Kozłowski y Keller, 1966). Variaciones estacionales del contenido de diversos carbohidratos han sido caracterizadas en una amplia variedad de plantas leñosas, incluyendo especies forestales, frutales, árboles tropicales y subtropicales, vides y arbustos (revisión de Kozłowski y Keller, 1966).

En las plantas caducifolias es obvia la necesidad de la acumulación de reservas durante el otoño, previamente a la abscisión de las hojas, dado que el comienzo del crecimiento en primavera deberá depender en gran medida de estas reservas hasta que las hojas recién formadas provean al árbol de nuevos fotoasimilados. En la mayoría de estos árboles las reservas de carbohidratos son máximas durante la primavera y disminuyen de forma abrupta durante el crecimiento que se da en esta época del año, alcanzándose los valores mínimos durante el periodo de crecimiento vigoroso de las hojas (finales de primavera, principios de verano). Posteriormente se produce una recuperación de las reservas hasta alcanzarse un nuevo máximo en otoño, previo a la caída de las hojas y, finalmente, aparece un mínimo de almidón (pero no de azúcares solubles) durante el invierno (Siminovitch et al., 1953; Sauter, 1966; Kozłowski y Keller, 1966; Worley, 1979).

Muchas plantas perennifolias de las zonas templadas presentan un modelo de crecimiento similar al de las caducifolias, con una fase principal de crecimiento en primavera. Durante esta época se utilizan grandes cantidades de carbohidratos y elementos nutritivos, principalmente componentes nitrogenados (Meyer y Splittstoesser, 1971) y aunque estos árboles podrían no requerir reservas de carbohidratos como las plantas caducifolias debido a que poseen la capacidad de realizar la fotosíntesis, Kozlowski y Keller señalan en su revisión de 1966 que diversos autores han descrito una pérdida neta de CO_2 durante el comienzo del periodo de crecimiento, indicando que los carbohidratos de reserva también son indispensables en esta fase del ciclo vital - de las plantas perennifolias.

La acumulación de las reservas comienza en los puntos más alejados de los lugares de producción -las hojas- para acercarse poco a poco a éstos. La movilización se produce en sentido inverso al de almacenamiento, es decir, se inicia en los lugares más cercanos al punto de utilización y progresa basipetalmente hacia las raíces (Kozlowski y Keller, 1966; Zimmermann, 1974), por lo cual las variaciones estacionales del contenido en carbohidratos de las raíces pueden estar ligeramente desplazadas en el tiempo con respecto a la parte aérea (Zimmermann, 1974).

En los árboles frutales la utilización de las reservas está muy relacionada también con el crecimiento del fruto. Grochowska (1973) indica que en el manzano el mínimo contenido en almidón se presenta unas cinco semanas después de la floración, y en el albaricoque, Bennett (1924) encuentra los niveles mínimos en el mes de Mayo, manteniéndose estos valores hasta el mes de Agosto, durante el que se inicia una recuperación, alcanzándose la acumulación máxima en el otoño.

La recuperación del contenido en carbohidratos se produce en la mayoría de los árboles antes de que se agoten las reservas acumuladas, volviendo a iniciarse el ciclo de acumulación tras el crecimiento del fruto.

1.1.2.- CAMBIOS PROVOCADOS POR LA PRESENCIA DE SUMIDEROS ACTIVOS.-

La presencia de sumideros activos (brotes en crecimiento, frutos en desarrollo) provoca modificaciones de la actividad metabólica de la fuente de elementos nutritivos. Así, el índice fotosintético puede verse modificado por la presencia de frutos en la planta, habiéndose descrito un descenso de la fotosíntesis en diversas especies al eliminar los frutos, como en Citrus madurensis y Solanum melongena (Lenz, 1978), manzano (Monselise y Lenz, 1980) o soja (Mondal et al., 1978). Thorne y Koller (1974) señalan que en soja, al aumentar la proporción de órganos que no fotosintetizan, iluminando una sola hoja de la planta, se produce un incremento del índice fotosintético. Esta correlación entre la fotosíntesis y el transporte de asimilados hacia los sumideros puede ser modificada por la degradación de los carbohidratos acumulados con anterioridad al aumento de la demanda en la planta (Moorby, 1977), produciéndose en algunos casos mayor transporte de carbohidratos de los que se fotosintetizan en esos momentos.

La existencia de sumideros potentes de elementos hidrocarbonados puede determinar una fuerte competencia entre los mismos. Crane et al. (1972) señalan que en Pistacia vera la presencia de fruto en el árbol cuando se están desarrollando las yemas florales produce la caída de éstas, lo cual se impide mediante la eliminación de los frutos o bien por anillado de las ramas entre frutos y yemas. Este mismo equipo de investigadores (Crane et al., 1973) comprobaron la necesidad de la presencia de las hojas en las ramas para evitar la abscisión de las yemas florales aún en el caso de que no se mantengan los frutos en el árbol. Estos trabajos indican la existencia de una competencia por algún compuesto producido por las hojas y transportado vía floema, presumiblemente fotoasimilados, aunque en un estudio posterior (Crane et al., 1976) no pudieron demostrar diferencias en el contenido en almidón entre ra-

mas con y sin fruto. En la interpretación de este último resultado hay que tener en cuenta que el grado de autonomía entre las distintas ramas de un árbol depende de la variedad (Monselise y Goldschmidt, 1982) y que en Pistacia vera los mismos autores detectaron movimiento de metabolitos entre ramas vecinas (Crane et al., 1973). Que se establece una competencia por los carbohidratos ha sido puesto de manifiesto mediante la utilización de ^{14}C , observándose que las yemas florales de árboles sin fruto acumulan el doble de carbohidratos - marcados que las de árboles con frutos (Takeda et al., 1980).

De todo ello parece desprenderse que la competencia por los carbohidratos es de gran importancia en determinados momentos del ciclo de desarrollo y puede llegar a ser la causa de la abscisión de estructuras reproductivas, limitando así la producción final de los árboles.

1.1.3.- VARIACIONES DURANTE LA SENESCENCIA.-

Durante la senescencia de las hojas se producen una serie de cambios metabólicos. Aunque se ha descrito en algún caso (Thomas y Stoddart 1975) que la senescencia foliar puede no estar asociada necesariamente a la pérdida de clorofila, la disminución del contenido de este pigmento, junto a la pérdida de proteínas y ARN durante el envejecimiento es un hecho ampliamente reconocido y que se utiliza de forma general como un indicador de la senescencia (revisión de Thomas y Stoddart, 1980). Durante este proceso se produce también la salida de metabolitos de las hojas senescentes hacia otras regiones de la planta. Numerosos autores han descrito la disminución de carbohidratos al mismo tiempo que desciende la cantidad de clorofila en hojas o discos de hojas de diversas especies en las que se ha inducido la senescencia artificialmente separándolas de la planta.

Beevers (1967) trabajando con Tropaeolum majus bajo un régimen de 12 horas de iluminación, y Kao (1981) con segmentos de hojas de arroz a la oscuridad, señalan que se produce un rápido descenso del contenido de azúcares solubles en los primeros días de permanencia en el invernadero. Por el contrario, Stewart (1971) indica que en hojas de judía en la oscuridad la cantidad de azúcares permanece constante durante las primeras 24 horas, mientras que el almidón disminuye en alrededor de un 70 % sobre el contenido inicial. Dwivedi y Mishra (1979) también describen un descenso de almidón en hojas de arroz (alrededor del 40 % en 72 horas), destacando el incremento en azúcares reductores que se produce en las primeras 24 horas para disminuir posteriormente por debajo del valor inicial. Este mismo hecho ha sido descrito por Thimann et al. (1974) y Tetley y Thimann (1974) en segmentos de hojas de avena en la oscuridad, en los que incrementa el contenido en azúcares reductores durante los dos primeros días, mientras disminuye drásticamente la cantidad de sacarosa. Spencer y Titus (1973) señalan que la variación en clo

rofila y azúcares en discos de hojas de manzano depende de la edad de las mismas y de las condiciones en que se mantienen. Así, mientras las hojas -- adultas pierden clorofila tanto a la luz como a la oscuridad aunque en mayor porcentaje en este último caso (2 % y 11 % respectivamente a los 7 días), en las hojas más jóvenes se produce un incremento de un 4 % a la luz y un descenso de un 10 % a la oscuridad. El contenido en azúcares solubles descende en todos los casos, siendo máximo en las hojas jóvenes a la oscuridad y no existiendo diferencias entre las dos condiciones externas para las hojas -- adultas.

Argüelles y Guardiola (1977) han estudiado el control de la senescencia en hojas de naranjo y, si bien no se han hecho en este trabajo análisis del contenido en carbohidratos, sí obtienen un claro aumento de hasta un 100 % en 10 días de la actividad amilolítica en hojas mantenidas a la luz, a la vez que el contenido en clorofila disminuye en un 50 % en ese mismo período de tiempo, comprobando además que los tratamientos con ácido giberélico, que retrasan la senescencia, inhiben también el aumento de la actividad amilolítica.

1.2.- CARBOHIDRATOS EN CITRICOS.-

Los frutos verdes con clorofila tienen capacidad de realizar la fotosíntesis, pero la mayor parte de los carbohidratos necesarios para la actividad biosintética de los frutos de los cítricos proceden de las hojas (McCready, 1977). Si bien el índice fotosintético de los cítricos es relativamente bajo comparado con otras especies de frutales ($12 \text{ mg CO}_2 / \text{dm}^2 \times \text{h}$, Kriedemann, 1968, 1971; Bieloraí y Mendel, 1969; Moss et al., 1972; Lenz, 1978, lo que representa entre un tercio y la mitad del índice fotosintético del manzano: Kriedemann, 1978), la producción de fotoasimilados durante el reposo vegetativo es superior a la demanda, produciéndose durante el invierno una acumulación de reservas hidrocarbonadas que alcanzan los valores máximos en las hojas justo antes de la brotación de primavera (Jones y Steinacker, 1951; Smith et al., 1952; Hilgeman et al., 1967; Smith, 1976). A partir del momento en que se alcanza el nivel máximo se produce la degradación continua de las reservas y los azúcares producidos son transportados hacia las zonas en desarrollo (Kriedemann, 1969a y b; Kubota y Motoyama, 1971; Moss et al., 1972), llegando a los niveles mínimos durante el verano (Erickson, 1968). La proporción de almidón y azúcares varía a lo largo del ciclo descrito. El contenido en almidón disminuye durante el invierno mientras que aumenta el nivel de azúcares solubles, hecho que se considera generalmente como una respuesta a las bajas temperaturas (Erickson, 1968; Yelenosky, 1979). Por el contrario, el nivel de almidón aumenta rápidamente durante la primavera, poco antes de la brotación, y va siendo degradado durante este periodo de crecimiento (Erickson, 1968). Según Jones y Steinacker (1951) también las brotaciones en otras épocas del año -- pueden estar precedidas por una acumulación de almidón en las hojas.

Otros factores, además de la temperatura, influyen en la acumulación de almidón en las hojas. Diversos autores (Lewis et al., 1964; Jones et al., 1964, 1970, 1973) indican que el nivel de sustancias hidrocarbonadas es-

tá influido por el número de frutos que soporta el árbol. La cuantía de la cosecha depende no sólo del número de estructuras reproductivas formadas durante la floración sino también del porcentaje de abscisión de las mismas antes de llegar a su desarrollo completo como frutos. Aunque el número de flores producidas por los cítricos es muy elevado, sólo un pequeño porcentaje de ellas llega a convertirse en frutos maduros ya que numerosas yemas florales y flores caen antes del cuajado y aún numerosos frutos pequeños se desprenden antes de llegar a la madurez. Erickson (1968) indica que para la variedad Washington-Navel el número de frutos que llega a formar parte de la cosecha final puede representar un porcentaje del número de flores inicialmente formadas tan bajo como el 0,2 %.

La coincidencia en el tiempo de los máximos porcentajes de caída de las hojas y de los frutos (Erickson y Brannaman, 1960) sugiere que entre las razones que pueden explicar la abscisión se encuentra la competencia por elementos nutritivos que se establece durante este periodo entre los distintos órganos en crecimiento, momento en que los requerimientos son máximos. Así, durante la época de floración tanto las flores como las nuevas hojas en desarrollo dependen críticamente del transporte de azúcares y elementos minerales del resto de la planta. Las hojas jóvenes en desarrollo son al principio una zona importante de atracción de metabolitos (Kriedemann, 1969a y b; Moss et al., 1972), compitiendo eficazmente con las flores de tal modo que, en las primeras fases del desarrollo de éstas su tamaño es inferior cuando se localizan en inflorescencias con hojas que en aquéllas situadas en inflorescencias sin hojas (Lenz y Cary, 1969). Pronto, sin embargo, el ritmo de crecimiento cambia, coincidiendo con la exportación de fotoasimilados desde las hojas jóvenes y, finalmente, el porcentaje de flores que se convierten en fruto es notablemente superior en las inflorescencias con hojas (Sauer, 1951, 1954; Lenz, 1966; Jahn, 1973). El efecto de las hojas de la inflorescencia en el porcentaje de fruto cuajado no parece ser de naturaleza hormonal sino exclusivamente nutri-

cional (Moss, 1970).

Aunque parte de esta competencia se establece por los elementos minerales (Guardiola et al., 1977), la competencia por los azúcares puede desempeñar un papel decisivo ya que se produce una caída importante de fruto durante la primavera (caída de Junio), cuando ya se ha restablecido el nivel de elementos minerales en las hojas (Guardiola y Gonzalez, 1982). La disminución de la competencia mediante la reducción de la floración estimula marcadamente el crecimiento inicial del fruto y, en determinadas condiciones de competencia extrema, aumenta la producción final hasta más de cuatro veces la de los árboles testigo (Guardiola et al., comunicación personal).

La relación entre el contenido en almidón antes de la brotación y el cuajado del fruto ha sido estudiada por diversos autores. Lewis et al. (1964), trabajando con la variedad "Wilking" indican que un contenido elevado en carbohidratos en las hojas durante la brotación favorece la producción, aunque afirman que no parece ser un factor limitante. Por otro lado, Jones et al. (1973) y Goldschmidt y Golomb (1982) señalan que en el Citrus reticulata la cuantía de la cosecha no está relacionada con la acumulación de almidón en las hojas pero sí con el contenido del mismo en las raíces. Sin embargo, en la variedad "Valencia" Jones y colaboradores (1970, 1974) sí han encontrado una correlación positiva entre el contenido en almidón de las hojas antes de la brotación y la cuantía de la cosecha producida. También se ha encontrado una relación entre la cuantía de la cosecha y la utilización del almidón, de modo que Jones et al. (1975) y Goldschmidt y Golomb (1982) señalan que en variedades particularmente veceras como "Kinnow" o "Murcott", la ausencia de cosecha el año siguiente de una abundante se correlaciona con el agotamiento de las reservas hidrocarbonadas. Monselise et al. (1982) han encontrado diferencias importantes en el contenido de almidón en las hojas de ramas del mismo árbol (var. "Michal") con y sin fruto, siendo de casi el doble en el segundo caso.

En vista de la importancia decisiva que en la producción de los agrinos puede tener la movilización del almidón y su transporte a los órganos en desarrollo, resulta sorprendente la limitada cantidad de estudios dedicados al problema. Las variaciones estacionales en el contenido en almidón en relación con el estado de desarrollo y la cuantía de la cosecha han sido estudiadas por Jones y Steinacker (1951) y Lewis et al. (1964) pero su estudio es meramente descriptivo, sin afrontar el problema de su regulación. Del mismo modo, Kriedemann (1969a) ha señalado la relativa estabilidad del almidón en las hojas de limonero pero sin un análisis de sus causas.

La movilización del almidón en las hojas adultas de los cítricos es más lenta que en las de otras plantas (Erickson, 1968). Así, el mantenimiento de plántulas de naranjo en la oscuridad durante varias semanas no produce la desaparición del almidón de las hojas. Según Sinclair y Bartholomew (1937) el cloroplasto aparentemente liga el almidón producido, por lo que es degradado muy lentamente por las enzimas de las hojas. La poca actividad enzimática que se manifiesta "in vivo" no parece ser debida a la ausencia de proteínas degradativas o su presencia en estado inactivado ya que según estos autores los extractos de hojas producen la degradación del almidón en azúcares en muy poco tiempo, lo que indica que las enzimas de las hojas son activas. Habría que pensar más bien en una compartimentación de las enzimas y el sustrato, que impide que se produzca de forma indiscriminada la movilización de las reservas hidrocarbonadas de las células.

1.3.- VIAS DEGRADATIVAS DEL ALMIDÓN.-

1.3.1.- GENERALIDADES.-

Los carbohidratos formados en la fase oscura de la fotosíntesis son rápidamente polimerizados en los cloroplastos de las hojas. Estos polisacáridos se encuentran en forma coloidal o en forma no hidrosoluble, permitiendo el almacenamiento de grandes cantidades en las células sin que influyan en el potencial osmótico de las mismas. El polisacárido de reserva mas importante y mas abundante del mundo vegetal, que se encuentra desde las algas inferiores a las plantas superiores, es el almidón, y se acumula en gránulos de diámetro variable entre 2 y mas de 100 micras, cuyo peso molecular puede alcanzar varios miles de daltons (McCready, 1977).

Los gránulos de almidón varían tanto en su tamaño como en su forma según el origen del que provengan. Sin embargo, en todos los casos está compuesto por dos tipos de moléculas, la amilosa y la amilopectina, siendo variable la proporción de ambas en los gránulos de las distintas plantas (10-30 % de amilosa, 70-90 % de amilopectina). La amilosa es una mezcla de cadenas lineales de glucosa unidas por enlaces alfa-1,4 y de cadenas ligeramente ramificadas (una ramificación por cada 1000 residuos de glucosa aproximadamente) (Banks y Muir, 1980) por enlaces alfa-1,6. La amilopectina, por su parte está formada por cadenas altamente ramificadas con los mismos tipos de enlaces (una ramificación por cada 24-30 residuos de glucosa) (McCready, 1977). Los enlaces alfa-1,4 existentes entre los monómeros de glucosa producen una torsión del plano en que se hallan las glucosas, dando como resultado moléculas helicoidales; distintos estudios realizados sobre modelos de difracción producidos por complejos de amilosa con alcoholes ramificados indican diámetros de hélice que corresponden a ciclohexoamilosa (Bear, 1944), ciclo-

heptoamilosa (Zaslow, 1963) y ciclooctoamilosa (Yamashita y Monobe, 1971).

El almidón presente en las plantas puede ser de dos tipos:

- 1.- Almidón de asimilación, que se deposita en las hojas verdes durante los periodos de actividad fotosintética, y
- 2.- Almidón de reserva, que se encuentra en los amiloplastos de órganos de almacenamiento como semillas, frutos, tubérculos o rizomas.

El almidón de asimilación es regularmente metabolizado, es decir, se produce durante el periodo luminoso y es degradado durante el periodo oscuro, transportándose sus productos a otros puntos del vegetal. Por otro lado, el almidón de reserva representa la fuente de energía para numerosos -- procesos fisiológicos que la requieren en gran cantidad como la germinación, brotación, floración o fructificación, por lo que permanece acumulado hasta -- que estos procesos tienen lugar, momento en que el almidón es movilizado y los azúcares resultantes son transportados a los órganos en crecimiento.

La movilización del almidón puede llevarse a cabo por dos vías -- bioquímicas distintas, en las que están implicadas diferentes enzimas. En la figura 1 puede observarse un esquema detallado de ambas vías.



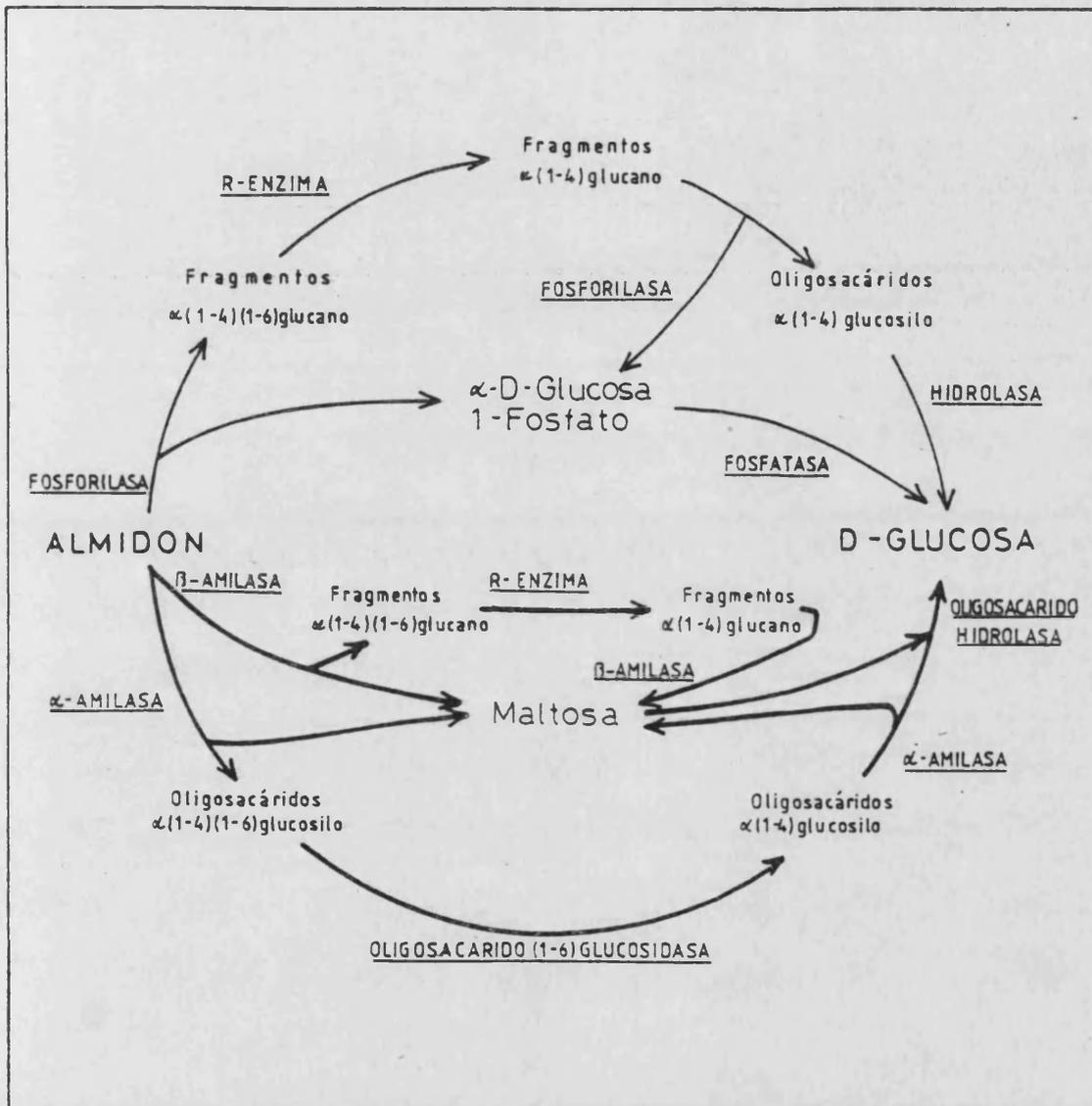


Figura 1.- Vías bioquímicas para la conversión de almidón en D-glucosa

El semicírculo superior, dibujado con trazo fino, corresponde a la vía fosforolítica. El inferior, representado con trazo grueso, a la amilolítica. (sacado de "Enzymes in synthesis and hydrolisis of starch", Pazur, 1965).

1.3.1.1.- VIA FOSFOROLITICA.-

La amilófosforilasa (1,4- α -D-glucano:ortofosfato α -glucosiltransferasa, E.C. 2.4.1.1.) forma parte de las α (1,4) glucano fosforilasas, que están ampliamente distribuidas tanto en animales y plantas como en células microbianas. La reacción que cataliza -separación de monómeros de glucosa a -- partir de un polímero- puede ocurrir también en dirección de síntesis depen-- diendo de una serie de factores; las concentraciones elevadas de fosfato inor-- gánico en el medio así como el pH alto favorecen la degradación del almidón , mientras que los pH bajos y la ausencia de fosfato favorecen la síntesis.

El proceso de degradación es conocido como fosforolisis ya que en él se elimina la glucosa terminal del extremo no reductor de la cadena por ata-- que del fosfato. La enzima actúa repetidamente sobre los extremos no reducto-- res, de forma que puede llegar a degradar totalmente las cadenas lineales de la amilosa, produciendo moléculas de glucosa-1-fosfato. Sin embargo, no ocu-- rre igual con la amilopectina debido a la presencia de sus ramificaciones con enlaces α -1,6 glucosídicos, no susceptibles de ser atacados por la fosfori-- lasa. De este modo, su acción sobre la amilopectina da lugar a la formación, por un lado, de moléculas de glucosa-1-fosfato que representan del 35 al 45 % del total de la molécula (ap Rees, 1974), y por otro, de moléculas de peso mo-- lecular relativamente alto y muy ramificadas, conocidas como dextrinas límite (fragmentos α -(1,4)-(1,6) glucano) y cuya degradación solo podrá ser conti-- nuada tras la acción de una enzima desramificadora (R-enzima), que actúa úni-- camente sobre los enlaces α -1,6, proporcionando a la amilofosforilasa nue-- vos extremos no reductores para proseguir la degradación. Las moléculas de glucosa-1-fosfato producidas son finalmente convertidas en glucosa por la ac-- ción de una fosfatasa.

1.3.1.2.- VIA HIDROLITICA.-

En la vía hidrolítica están implicadas las amilasas, por lo que se conoce también como degradación amilolítica. La denominación alfa y beta dada a estas enzimas indica la mutarrotación de los productos formados tras su acción sobre el almidón, y no la configuración de los enlaces que atacan, ya que ambas enzimas solo pueden hidrolizar las uniones de tipo alfa-1,4 (Gibbs, 1966).

La actuación de la alfa-amilasa (1,4-alfa-D-glucano glucanohidrolasa, E.C. 3.2.1.1.) sobre las poliglucosanas produce un rápido descenso del peso molecular de los substratos y, por tanto, de sus propiedades (coloración característica con iodo, descenso de la viscosidad, etc.). Sin embargo, estos cambios solo van acompañados por un aumento muy pequeño del poder reductor, lo que indica que la hidrólisis inicial de las moléculas grandes por esta enzima se lleva a cabo por rotura al azar de los enlaces. Por otra parte, los oligosacáridos relativamente pequeños son hidrolizados mas despacio que los grandes polímeros.

De este modo, la actuación de las alfa-amilasas sobre el almidón consta de dos fases. Una inicial, en la que se da un rápido descenso del tamaño de la molécula por hidrólisis al azar de los enlaces alfa-1,4 glucosídicos y otra final en la que se produce una degradación lenta de los productos formados en la primera fase y en la que tiene mayor importancia la acción no al azar de la enzima.

La diferente actuación de esta enzima no es debida a reacciones diferentes sino a cambios en su afinidad por los substratos. T. ap Rees (1974) señala que la afinidad y la velocidad de reacción son mayores para substratos de alto grado de polimerización; además de esto, también el grado de ramifi-

cación determina la velocidad de reacción, que disminuye marcadamente cuando las cadenas laterales se encuentran a una distancia menor de diez unidades de glucosa sobre la cadena principal (Schwimmer, 1950). Ello explica la menor velocidad de actuación sobre la dextrina beta-límite que sobre la amilopectina, ya que mientras las cadenas exteriores de ésta tienen una longitud media de 15 unidades, las interiores -que son las únicas presentes en las dextrinas límites-, tienen una longitud media de siete u ocho unidades.

Los productos finales que se obtienen de su actuación sobre la amilosa son maltosa, cuya unión no puede atacar, y glucosa. La existencia de enlaces alfa-1,6 en las ramificaciones de la molécula de amilopectina impide que ésta sea degradada totalmente por la actividad alfa-amilásica ya que este tipo de enlaces hace resistentes a la alfa-amilasa a las uniones alfa-1,4 cercanas. Por tanto, su hidrólisis sigue el mismo esquema que la de la amilosa pero los productos finales serán, además de maltosa y glucosa, una serie de oligosacáridos ramificados compuestos por unos cuatro a siete monómeros (dextrinas alfa-límite).

En contraste con la acción al azar de la alfa-amilasa, la beta-amilasa (1,4-alfa-D-glucano maltohidrolasa, E.C. 3.2.1.2.) cataliza la separación de forma sucesiva de moléculas de maltosa a partir del extremo no reductor de una poliglucosana.

Las cadenas lineales de amilosa pueden quedar totalmente degradadas en maltosa por beta-amilolisis si se trata de una cadena con un número - par de monómeros; en caso contrario aparecería también una molécula de maltotriosa, correspondiente a las tres moléculas de glucosa terminales del extremo reductor. Esta enzima tampoco puede sobrepasar los enlaces alfa-1,6 de la amilopectina, por lo que va separando moléculas de maltosa a partir del extremo no reductor de cada ramificación hasta llegar a las dos o tres moléculas

de glucosa anteriores a esos puntos, dejándolas sin hidrolizar. El resultado de la incubación de amilopectina con beta-amilasa es alrededor de un 60 % de maltosa y el resto dextrinas beta-límites, de alto peso molecular, aunque menores que las obtenidas por la acción de la fosforilasa (Akazawa, 1965; T. ap Rees, 1974).

La actuación de alfa y beta-amilasa tanto sobre la amilopectina como sobre la amilosa produce una serie de compuestos no utilizables directamente por las células. Necesitan una mayor degradación hasta convertirse en glucosa. Esta degradación se consigue gracias a la existencia en las células de enzimas desramificantes y de maltasa. Las dextrinas límite se convierten en moléculas lineales por acción de las enzimas desramificantes. En la cebada se han encontrado dos distintas (MacWilliams y Harris, 1959):

-La R-enzima (amilopectina-6-glucano hidrolasa, E.C. 3.2.1.69), que rompe los enlaces alfa-1,6 mas externos de la amilopectina, dextrinas - fosforilasa-límites y otros glucógenos atípicos, es decir, enlaces entre cadenas largas.

-La dextrinasa límite (dextrina-6-glucano hidrolasa, E.C. 3.2.1.10.), que cataliza la rotura de los enlaces alfa-1,6 externos entre cadenas cortas como las dextrinas alfa y beta límites.

Manners y Rowe (1969) también han identificado estas dos enzimas en el maíz. Por otra parte, Larner (1960) distingue dos enzimas que degradan los enlaces alfa-1,6 entre cadenas largas, la amilo-1,6-glucosidasa, que actúa como una exoglucosidasa y la R-enzima, que lo hace como una endoglucosidasa.

Los extremos no reductores libres proporcionados por estas enzimas son utilizados por las amilasas para acabar de degradar estas cadenas lineales en maltosa. Esta maltosa, producida por la acción conjunta de todas las enzi-

mas descritas anteriormente es finalmente convertida en glucosa por medio de un alfa-glucosidasa (alfa-D-glucósido glucohidrolasa, E.C. 3.2.1.20.), quedando así libre y fácilmente disponible para el metabolismo celular.

1.3.2.- IMPORTANCIA DE LAS DOS VIAS.-

1.3.2.1-MOVILIZACION DEL ALMIDON EN SEMILLAS Y FRUTOS.-

La importancia de cada una de estas dos posibles vías metabólicas no está aún suficientemente clara, puesto que el modelo de degradación puede ser distinto según la especie de que se trate y según la localización del almidón en la planta.

Existen una serie de factores que apoyan la degradación por una u otra vía. Así, si se considera la energía requerida para la síntesis de sacarosa, la ruta energéticamente mas favorable sería la fosforolítica ya que en ella no se pierde la energía del enlace glucosídico. Sin embargo, es un hecho ampliamente reconocido que la alfa-amilasa es la única enzima capaz de atacar los enlaces alfa-1,4 en gránulos de almidón intactos, por lo que la mayoría de los autores la consideran implicada siempre en los estados iniciales de la degradación del almidón, pudiendo ser posteriormente degradados los oligosacáridos formados por las enzimas de las dos vías.

La movilización del almidón en las semillas ha sido ampliamente estudiada tanto en cereales como en leguminosas. El método principal de investigación consiste en la comparación de los cambios en las velocidades de degradación del almidón con cambios en las actividades enzimáticas en los extractos vegetales. Con este sistema se ha observado una correlación importante de la degradación rápida del almidón en semillas con el aumento de la actividad amilolítica (Juliano y Varner, 1969; Fernández Tárrago y Nicolás, 1976).

Numerosos autores indican que la degradación en las semillas de cereales se produce por la vía hidrolítica, conociéndose bien su regulación por medio de hormonas del tipo giberelinas, producidas por el eje embriónico.

Los resultados de los análisis químicos de los componentes hidrocarbonados de las semillas de arroz en germinación apoyan esta vía y sugieren que la degradación fosforolítica no es muy importante en estas semillas (Nomura et al., 1969).

En semillas de leguminosas se han encontrado todas las enzimas necesarias para la degradación del almidón tanto por vía hidrolítica como por la fosforolítica (Juliano y Varner, 1969; Abbott y Matheson, 1972; Fernández Tárrago y Nicolás, 1976), con excepción de las semillas de soja en las que Adams et al. (1981) no pudieron detectar fosforilasa.

Del mismo modo, se han localizado también amilasas y fosforilasas en diversos frutos, tales como la pera (Latché et al., 1973), el plátano (Young et al., 1974) o la uva (Downton y Hawker, 1973).

1.3.2.2.- MOVILIZACION DEL ALMIDON EN HOJAS.-

Así como la vía hidrolítica parece predominante en las semillas, existe una considerable controversia respecto a la vía de degradación en hojas y en células no especializadas en el almacenamiento de almidón, puesto que existe menor información en este campo. Un estudio realizado por Gates y Simpson en 1968 con hojas de 79 especies de plantas dió como resultado la existencia de alfa-amilasa en todas ellas; Ull (1977) encontró la presencia de la alfa-amilasa estrechamente relacionada con la existencia de almidón, detectándola en todas las especies estudiadas (12) excepto en ajo y en hiedra, que no acumulan almidón. Además, algunos autores han encontrado ritmos diarios de actividad amilásica en hojas, que son inversos a la variación en el contenido en almidón en las mismas (Pongratz y Beck, 1978). Sin embargo, Vieweg y de Fekete (1977) encuentran una variación diaria paralela de la actividad enzimática y de la cantidad de almidón en las hojas de Kalanchoe daigre

montiana, aunque señalan que el método utilizado en este trabajo para la determinación del almidón incluye también los glucanos de longitud de cadena superior a 12-14 unidades de glucosa, que pueden ser productos de la degradación por alfa-amilasa.

También se ha encontrado actividad fosforolítica en hojas de diferentes especies vegetales, como guisante (Levi y Preiss, 1978; Steup y Lätzko, 1979), tabaco (Abbott y Matheson, 1972), espinaca (Pongratz y Beck, 1978; Okita et al., 1979; Preiss et al., 1980; Steup y Schächtele, 1981), maíz (de Fekete y Vieweg, 1973), plátano (Kumar y Sanwal, 1977) o vid (Downton y Hawker, 1973), no hallándose para esta enzima un ritmo diario como el señalado para las amilasas, aunque éste puede ser debido a que los experimentos se realizaron a una concentración saturante de fosfato (Pongratz y Beck, 1978).

Es obvia la posibilidad de una regulación entre la síntesis y la degradación que permita la actuación de esta enzima en ambos procesos. Se ha comprobado la existencia de un aumento de fósforo en los cloroplastos en hojas a la oscuridad (Thorne y Koller, 1974) y las concentraciones elevadas de fosfato inclinan la reacción catalizada por la fosforilasa en el sentido degradativo (Peavey et al., 1977); igualmente, existe una variación de pH, siendo mas ácido en la oscuridad, lo que también inclinaría la reacción hacia la degradación.

La regulación de la degradación también puede satisfacerse en el caso de que la movilización se produzca por la vía amilolítica ya que se conocen varios aspectos reguladores en esta vía, como son la conversión de la beta-amilasa latente en su forma activa por reducción reversible de sus grupos sulfhidrilos (Rowsell y Goad, 1962; Spradlin y Thoma, 1970), o la inhibición de la alfa-amilasa por su producto, la maltosa (Schwimmer, 1950; de Fekete y Vieweg, 1973; Vieweg y de Fekete, 1977). La posible regulación osmótica de

la actividad amilolítica indicada por Jones y Armstrong (1971) es cuestionada sin embargo por Gepstain e Ilan (1974, 1981) ya que estos autores indican - que no hay evidencias de su existencia tanto en cebada como en judía. Por otra parte, de Fekete y Vieweg (1973) señalan que parece improbable la regulación de estas enzimas por cambios de pH, basándose en que encuentran - una actividad amilásica óptima a un pH también óptimo para la síntesis del almidón.

Numerosos autores se inclinan por una vía u otra según la localización subcelular de las enzimas, puesto que parece lógico que su localización corresponda al lugar de síntesis del almidón, el cloroplasto. De este modo, Levi y Preiss (1978) no han encontrado amilasas en los cloroplastos de guisante y sugieren que la degradación se produce por la vía fosforolítica. El punto de vista mas generalizado es, sin embargo, el de una acción concomitante de las enzimas de las dos vías en la movilización del almidón en células fotosintéticas (Pongratz y Beck, 1978; Okita et al., 1979; Kombrink y Wöber, - 1980), ya que se han encontrado dichas enzimas tanto dentro como fuera de los cloroplastos (Tabla 1).

ORIGEN	ENZIMA	LOCALIZACION	REFERENCIA
<u>Dunaliella marina</u>	Fosforilasa Amilasa	cloroplasto	Kombrink y Wöber, 1960
<u>Nicotiana tabacum</u>	Fosforilasa	cloroplasto	Stocking, 1959
" "	"	citoplasma	Bird et al., 1965
<u>Pisum sativum</u>	Beta-amilasa	citoplasma	Levi y Preiss, 1978
" "	Fosforilasa	cloroplasto	Stitt et al., 1978
" "	"	cloroplasto y citoplasma	Levi y Preiss, 1978 Steup y Latzko, 1979
<u>Sacharum officinarum</u>	Alfa y beta amilasas	cloroplasto	Bourne et al., 1970
<u>Spinacia oleracea</u>	Fosforilasas	cloroplasto	Latzko y Gibbs, 1968
" "	"	cloroplasto y citoplasma	Steup y Latzko, 1979 Preiss et al., 1980 Steup et al., 1981
" "	Amilasas y Fosforilasas	cloroplasto	Pongratz y Beck, 1978
" "	Amilasas y Fosforilasas	cloroplasto y citoplasma	Peavey et al., 1977
" "	Amilasas, Fosforilasa R-enzima y D-enzima	cloroplasto y citoplasma	Okita et al., 1979
" "	Amilasas y R-enzima	cloroplasto y citoplasma	Okita y Preiss, 1980
<u>Stellaria media</u>	Alfa y beta amilasas	cloroplasto	Haapala, 1969
<u>Vicia faba</u>	Beta-amilasa	citoplasma	Chapman et al., 1972
<u>Zea mays</u>	Alfa-amilasa	cloroplasto	Davies, 1974
" "	Fosforilasa	cloroplasto	Davies, 1974

1.3.3.- CARACTERIZACION DE LAS AMILASAS.-

Existen muy pocas referencias previas de la presencia de actividad amilolítica en hojas de naranjo, no abordándose en estos trabajos el problema de la caracterización de las distintas enzimas. Sin embargo, existe bibliografía abundante a este respecto sobre amilasas de distintos orígenes, habiéndose descrito varios métodos distintos para su análisis.

Los métodos más utilizados para el análisis de la actividad amilolítica total están basados en distintas propiedades de los productos formados o de los sustratos parcialmente degradados, y son:

- 1.- Determinación del sustrato residual por precipitación con una mezcla de etanol-agua.
- 2.- Medida del incremento del poder reductor debido a la aparición de azúcares reductores como productos de degradación de las mezclas incubadas.
- 3.- Descenso de la coloración dada por el sustrato con el iodo a medida que avanza la hidrólisis.
- 4.- Disminución de la viscosidad del almidón con la degradación.

Sin embargo, ninguno de estos métodos es específico para cualquiera de las amilasas, por lo que es necesario separarlas previamente para detectar su presencia. Esta separación se efectúa según propiedades características de cada una, tales como:

- a) el requerimiento de iones calcio que presentan las endoamilasas. Las alfa-amilasas son inactivadas por agentes secuestrantes de calcio, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

No hay indicaciones de que el calcio participe directamente en la formación del complejo enzima-sustrato. Parece más probable que al formar una fuerte estructura intramolecular estabilice la estructura secundaria y ter

ciaria de la proteína, manteniéndola en su estructura biológicamente activa - (Fischer y Stein, 1960).

La estabilidad general de estas enzimas está determinada por el número de iones calcio unidos o por la fuerza con que son retenidos; estos dos factores varían mucho de una alfa-amilasa a otra, aunque se ha determinado que contienen al menos un átomo-gramo por mol (Vallee et al., 1959).

Al contrario de lo que sucede con la alfa-amilasa, una diálisis prolongada o el tratamiento con agentes quelantes no separa ninguna sustancia de bajo peso molecular que sea esencial para la actividad de la beta-amilasa.

b) Aunque los iones calcio unidos a la molécula de alfa-amilasa son suficientes para la actividad máxima de ésta, la presencia de calcio en exceso la protege además de la inactivación térmica. Este efecto no se presenta, sin embargo, para la beta-amilasa, que es rápidamente inactivada por el calor (Swain y Dekker, 1966b; Briggs, 1973).

c) La existencia de grupos sulfhidrilo en la estructura de la beta-amilasa de diversos orígenes vegetales (French, 1960) la hace sensible a los reactivos de estos grupos, como los metales pesados. Por el contrario, únicamente se ha encontrado una referencia en la bibliografía de una endoamilasa sensible a los reactivos de los grupos sulfhidrilo (Okita et al., 1979).

d) Según indican Fischer y Stein (1960), Ohlsson (1930) y Blom et al. (1936, 1937) demostraron que la alfa-amilasa de cebada es inactivada por tratamientos ácidos (pH alrededor de 3) a temperatura baja, sin que se destruya también la actividad beta-amilolítica. Esta resistencia a pH ácidos se ha comprobado también para beta-amilasa de otros orígenes, como la de trigo (Meyer et al., 1953), boniato (Balls et al., 1948), soja (Fukumoto y -- Tsujisaka, 1955) y tallo de guisante (Swain y Dekker, 1966b).

Las inactivaciones conseguidas según estas propiedades no deben entenderse, sin embargo, en el sentido absoluto sino en el de que la velocidad de inactivación es mucho menor en el caso de una amilasa que en el de la otra. Así, Pech et al. (1971) definen como alfa-amilasa la actividad inhibida en más de un 95 % por el EDTA y en menos de un 50 % por el cloruro -mercúrico o el calor en presencia de un exceso de iones calcio, y como beta-amilasa aquélla que se inhibe en menos de un 5 % por el EDTA y en más de un 80 % por calor o por cloruro mercúrico.

La inactivación de los extractos crudos con inhibidores selectivos producirá sin duda errores en la determinación cuantitativa de las amilasas por separado dado que no inactivan totalmente las amilasas de un grupo mientras que inhiben parte de la actividad debida al otro tipo de amilasas. De este modo, la detección de la existencia de alfa- o beta-amilasa en un extracto debe realizarse por métodos que impliquen su separación previa por cromatografía o electroforesis, observando posteriormente su comportamiento frente a los inhibidores o a los pH ácidos.

Aun así, existen referencias de endoamilasas que no muestran el requerimiento por calcio típico de las alfa-amilasas (Bulpin y ap Rees, 1978; Okita et al., 1979; Okita y Preiss, 1980), e incluso Okita et al. (1979) describen una endoamilasa en cloroplastos de espinaca que es inactivada por los reactivos de los grupos sulfhidrilo, propiedad considerada característica de las beta-amilasas.

Por tanto, parece necesario en último término la utilización de sustratos específicos (dextrinas límite) para la caracterización de una actividad amilolítica como perteneciente a una endo- (alfa) o a una exoamilasa (beta), o como indican Swain y Dekker (1966a) mediante la determinación de las formas alfa o beta de los productos de la reacción.

1.4.- OBJETIVOS DEL TRABAJO.-

De todo lo expuesto anteriormente parece obvia la necesidad de obtener un mejor conocimiento del metabolismo del almidón en este género, así como de su importancia en la fructificación puesto que, a pesar de la relativamente abundante bibliografía sobre estos temas, los estudios existentes abordan únicamente aspectos parciales del problema.

Para intentar dar respuesta a algunas cuestiones en relación con este tema, en el presente trabajo se estudian los puntos siguientes:

A) Las variaciones que se producen a lo largo del año en el contenido en carbohidratos de hojas de distintas brotaciones, en relación con el ciclo de crecimiento del fruto.

B) Los cambios que provoca la presencia del fruto sobre la pauta de movilización de estos carbohidratos. En este sentido, se hace un estudio comparativo del ritmo de degradación de las reservas hidrocarbonadas entre hojas adultas de ramas con y sin frutos durante el periodo de caída de fruto en primavera, estudiándose además en las hojas jóvenes si la eliminación del fruto del brote produce modificaciones en la movilización que la asemeje a la de las hojas de la misma brotación pero de brotes vegetativos.

C) Los aspectos metabólicos de la movilización del almidón en las hojas. Sin descartar la posible importancia de la vía fosforolítica, ya que en este trabajo se ha detectado la presencia de amilofosforilasas, este estudio se ha centrado en las enzimas de la vía amilolítica, y en él se distingue:

- La relación existente entre la movilización del almidón y los cambios en actividad de las enzimas de la vía amilolítica. Se han determinado las variaciones de la actividad amilolítica total durante el ciclo anu-

al de acumulación y degradación del almidón y en los experimentos de eliminación de fruto, así como durante el proceso de envejecimiento de las hojas, inducido mediante la separación de las hojas del árbol y su incubación en invernadero.

- La caracterización de las amilasas presentes en los extractos de hojas. Se realiza la separación cromatográfica y electroforética de las distintas isoenzimas, determinándose su carácter de alfa- o beta-amilasas por medio de la utilización de inhibidores selectivos de su actividad.

materiales y métodos

II.1.- MATERIAL VEGETAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL.-

El estudio se ha realizado en árboles de naranjo dulce (Citrus sinensis L. Osbeck) cv. Washington-Navel, injertados en naranjo amargo - (Citrus aurantium L.), de cinco parcelas sitas, cuatro de ellas en la provincia de Castellón (Almenara, Burriana, Vall de Uxó y Villarreal) y una en la de Valencia (Sagunto).

Las hojas se separaron del tallo en el punto de inserción del peciolo y se transportaron al laboratorio en un plazo máximo de dos horas, a 6-10 °C, en bolsas de plástico para evitar la pérdida de humedad. Hasta el momento de su utilización se mantenían en nevera a 4°C.

II.1.1.- INDUCCION DE LA SENESCENCIA.-

Alrededor de 500 hojas con peciolo, de edad comprendida entre 3 y 7 meses según los experimentos, se desinfectaron diez minutos en una solución de hipoclorito cálcico al 2 % para mantener la contaminación fúngica y bacteriana a niveles bajos. A continuación se lavaron con agua destilada y se eliminó el agua adherida en superficie, colocándose en un lecho de vermiculita húmeda apoyadas en el envés. La mitad de las hojas se mantuvo bajo iluminación constante (2500 luxes) y el resto en la oscuridad en una cámara húmeda con techo de plástico para evitar la pérdida de agua.

Periódicamente se muestrearon al azar 40 hojas de las cámaras con luz y 40 de las cámaras oscuras, haciéndose dos grupos de 20 hojas en cada caso. Los cuatro grupos de hojas fueron tratados del mismo modo: se hicieron seis discos con un sacabocados de 1,8 cm de diámetro (evitando el nervio central) y se separaron los de la mitad izquierda para analizar el contenido en almidón y azúcares tras su desecación en estufa, y los de la mitad

derecha para analizar el contenido en clorofila y la actividad amilolítica del tejido.

II.1.2.- VARIACION ESTACIONAL DE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA Y DEL CONTENIDO EN CARBOHIDRATOS

Se realizaron muestreos periódicos a lo largo del año de 36 árboles de la parcela de Almenara y de 20 árboles de las de Burriana y Villareal, tomándose dos muestras de 100 hojas cada una en el caso de Almenara y 200 en los demás. Para una de las muestras se eligieron hojas de brotes de otoño (figura 2, O); la otra estaba compuesta por hojas de la brotación de primavera de brotes con un fruto en su extremo (figura 2, C). El muestreo del primer tipo de hojas se inició un poco antes del comienzo de la primavera y se continuó, con distinta periodicidad según el año, hasta finales de verano.. Para las hojas del segundo grupo los muestreos se iniciaron a finales de Abril, cuando el desarrollo de las hojas lo permitió, continuándose hasta mediados de otoño.

La toma de muestras se realizó según se indica en la sección II.

1. Las hojas se lavaron con agua corriente y se secaron superficialmente, procediéndose a su desecación en estufa de aire forzado. Con las hojas muestreadas en la parcela de Almenara, tras su lavado, se hicieron tres grupos al azar dentro de cada muestra, dos grupos de 25 hojas y uno de 50. De cada grupo de 25 hojas se hicieron discos de 1,8 cm de diámetro, separándolos para análisis de almidón y azúcares y para la determinación de la actividad amilolítica como se indica en la sección anterior. El grupo restante, de 50 hojas, fue despeciolado y se determinó a continuación el peso fresco. Inmediatamente se calculó su superficie dibujando el contorno de las hojas sobre papel y pesando éste. El peso seco de las hojas se determinó eliminando toda el agua mediante liofilización de las mismas, determinándose el porcentaje

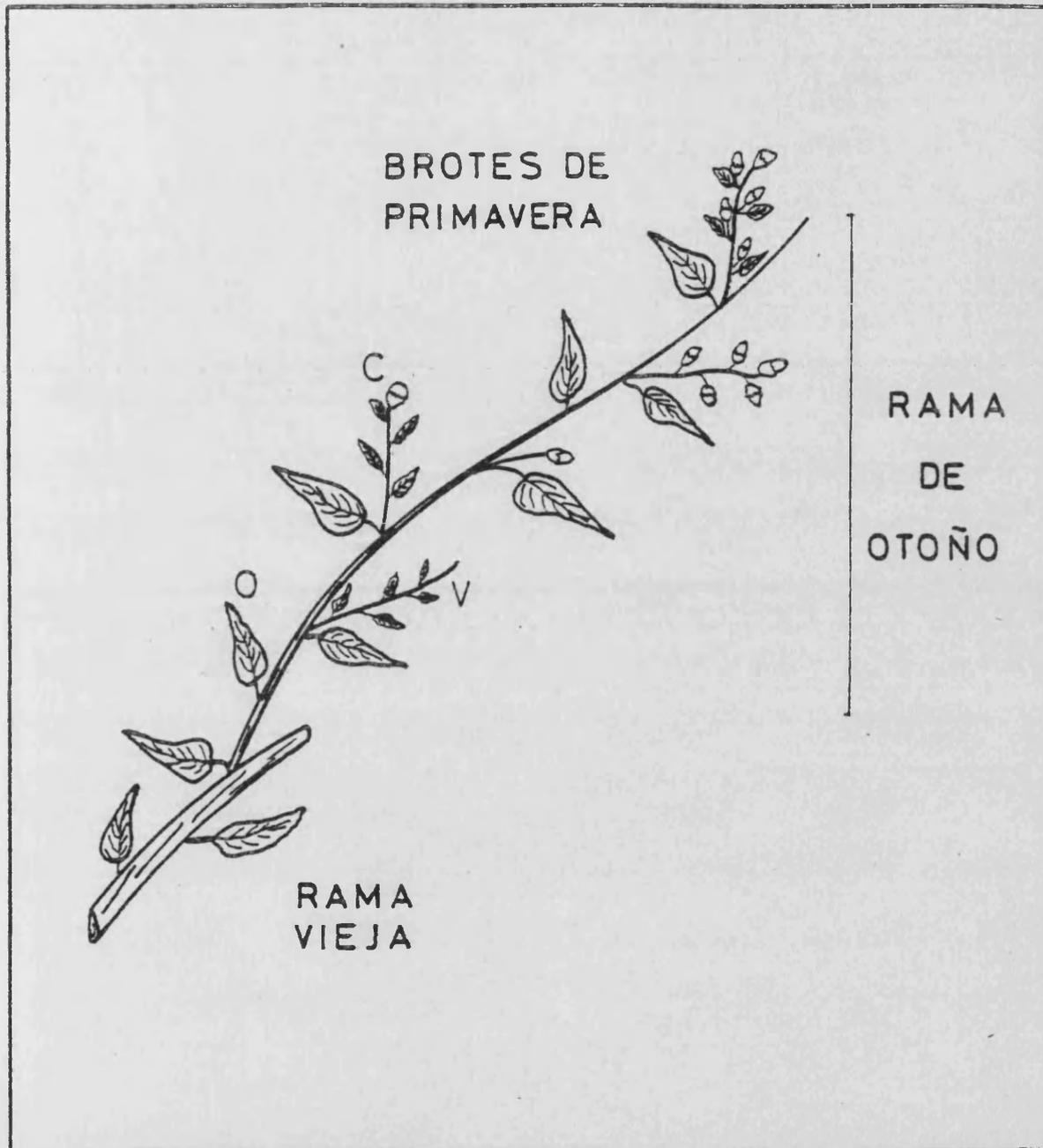


Figura 2.- Material vegetal utilizado. Hojas adultas de la brotación de otoño (O) y hojas jóvenes de la brotación de primavera: de brotes fructíferos (C) y de brotes vegetativos (V).

de peso seco de cada muestra.

II.1.3.- INFLUENCIA DE LA FRUCTIFICACION SOBRE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA Y EL CONTENIDO EN CARBOHIDRATOS .-

La influencia del fruto sobre la movilización de los hidratos de carbono desde las hojas se estudió con los árboles de la parcela de Almendra, en dos sistemas modelo: desde las hojas de la brotación de otoño del año anterior hacia el fruto que se desarrolla a partir de sus yemas axilares, y desde las hojas de brotes de primavera hacia el fruto situado en el mismo brote.

En el primero de los modelos se comparó el contenido en azúcares y almidón y la actividad amilolítica en las hojas adultas de ramas intactas y de ramas en las que se eliminaron manualmente todos los frutos cuando tenían aproximadamente 5-6 mm de diámetro, estando el estilo todavía unido al ovario (7 de Junio). De cada tratamiento se marcaron dos ramas por árbol, en un total de 36 árboles y se tomaron muestras de hojas hasta principios del mes de Julio, momento en el que el fruto había alcanzado un diámetro de 3 cm y se produce la abscisión de gran número de ellos (caída de Junio).

En el segundo modelo se marcaron en cada árbol tres brotes vegetativos de primavera (Figura 2, V) y seis brotes con un solo fruto terminal (Figura 2, C) de la misma brotación. El 7 de Junio (frutos de 5 a 6 mm de diámetro) se eliminaron manualmente los frutos de la mitad de los brotes del segundo tipo. La toma de muestras se realizó según lo descrito para el primer modelo.

El traslado al laboratorio se llevó a cabo como se indica en la

sección II.1. Las hojas se lavaron con agua corriente y se secaron superficialmente, dividiéndose por la mitad y despreciando el nervio central. Como en los restantes experimentos, la mitad derecha se utilizó para analizar la actividad amilolítica y la izquierda para analizar el almidón y los azúcares.

II.2.- ESTIMACION DE LA ACTIVIDAD AMIOLITICA.-

II.2.1.- OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO.-

Una cantidad de tejido foliar, variable según los experimentos, se troceó con tijeras y se trituró en mortero con ayuda de arena de cuarzo como abrasivo y en un medio tamponado. El proceso se realizó entre 0 y 4 ° C y con el material preenfriado.

El macerado se filtró a través de una doble capa de muselina y se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos. Posteriormente se aforó el sobrenadante claro obtenido con el tampón de extracción y se utilizó como extracto enzimático crudo para los análisis cuantitativos. Una parte alícuota del extracto se concentró mediante la adición de sulfato amónico hasta el 100 % de saturación. Tras una nueva centrifugación de 10 minutos a 10.000 g, se resuspendió el precipitado con un volumen adecuado (0,5-1 ml) de tampón de extracción. Una centrifugación adicional del resuspendido, de las mismas características que las dos anteriores, produjo un sobrenadante limpio que fue el utilizado en las electroforesis, para lo cual se le añadió sacarosa 2,4 M en proporción 1:5 con objeto de que la muestra no flotara en los pocillos.

El mismo procedimiento fue utilizado para la obtención de extractos destinados a cromatografía de exclusión molecular. En este caso no se añadió sacarosa.

II.2.2.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD.-

II.2.2.1.- DETERMINACION CUANTITATIVA.-

Se ha seguido básicamente el método de Jones y Varner (1967), modificado por García Luis (1972), consistente en la incubación del extracto

enzimático, convenientemente diluido para cada prueba, en un tubo de ensayo con 1 ml de solución de almidón (140 mg de almidón soluble y 29 mg de $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua) y 1 ml de tampón a pH 5,0.

La incubación se realizó en un baño termostatzado a 25 °C durante un tiempo variable acorde con la actividad del extracto. La reacción se detuvo añadiendo 1 ml de solución de iodo (3 g de iodo resublimado y 30 g de yoduro potásico en 50 ml de agua, diluido 1:10 en ClH 0,05 N). A los 10 minutos se añadieron 10 ml de agua destilada y se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro a 620 nm al menos 15 minutos después de haber añadido el agua, restándose de los blancos, en los que la solución de iodo se añadió antes que la del extracto enzimático.

El descenso en densidad óptica respecto a los blancos, es decir, la actividad enzimática se expresa en incremento de la densidad óptica a 620 nm por gramo de tejido fresco y por minuto, según la fórmula:

$$\Delta \text{D.O.}_{620} / \text{g} \times \text{min.} = \frac{(\Delta \text{D.O.})_m \times V}{V' \times t \times \text{PF}}, \text{ en donde}$$

$(\Delta \text{D.O.})_m$ = densidad óptica del blanco menos la de la muestra incubada

V = volumen aforado (en ml)

V' = volumen de extracto añadido al medio de incubación (en ml)

t = tiempo de incubación (en minutos)

PF = peso fresco triturado (en g).

11.2.2.2.- CROMATOGRAFIA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.-

El extracto enzimático crudo preparado del modo señalado en la sección 11.2.1. se introdujo en una columna de Sephadex G-100 mediante una bomba peristáltica que proporcionaba un flujo constante y se eluyó con tampón acetato 0,1 M, pH 5,0 con Cl_2Ca 1 mM, en cámara fría a 4 °C. En las cro-

matografías destinadas a determinar el pH óptimo de las enzimas separadas se eluyó con agua destilada que contenía Cl_2Ca 1 mM.

El flujo del eluyente fue variado según las experiencias así como el tamaño de la columna, obteniéndose las mejores separaciones con la columna de 65 cm de longitud por 2,5 cm de diámetro y con un flujo de 0,5 ml / min.

El eluato se hizo pasar por un detector ultravioleta con registrador, midiéndose la densidad óptica del mismo a 280 nm, recogiénose con un colector de fracciones y utilizándose posteriormente en los análisis como extracto enzimático.

II.2.2.3.- ELECTROFORESIS EN GELES LAMINARES DE POLIACRILAMIDA.-

A.- Preparación de los geles.-

Se siguió el método de Ornstein (1964) ligeramente modificado. Los geles laminares, de 0,4 mm de espesor, se prepararon formando un sistema discontinuo de dos capas, el gel de resolución y el gel de concentración. Para ello se utilizaron las siguientes soluciones, que deben mantenerse en frío:

Solución A: Acrilamida 30 % (p/v) y bisacrilamida 0,8 % (p/v)

Solución B : tampón tris-ClH 0,5 M pH 6,8

Solución C : : tampón tris-ClH 1,5 M pH 8,8

Solución D : persulfato amónico 10 % (p/v), preparado recientemente.

La mezcla de polimerización se obtuvo vertiendo en un kitasato las cantidades correspondientes (indicadas más adelante) de las soluciones A, B (o C), agua y solución D. Después de agitar la mezcla, se desgasificó me-

diante la aplicación de vacío durante 7 minutos, después de lo cual se añadió TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina). La mezcla final se agitó suavemente y se introdujo con ayuda de una pipeta pasteur en el molde formado por dos placas de cristal separadas por un marco constituido por tres cintas de teflón de 0,4 mm de grosor.

Para obtener una interfase lisa y horizontal entre las dos capas se depositó cuidadosamente una capa de agua destilada de aproximadamente un centímetro de altura inmediatamente después de verter la mezcla de polimerización correspondiente a la primera capa (capa de resolución). Dicha capa de agua se eliminó antes de depositar la mezcla gelificante correspondiente a la capa de concentración.

La composición de las dos capas es la siguiente:

1.- Gel de resolución (8 % de acrilamida, pH 8,8).

Es una capa de 9,5 cm de altura, de una mezcla compuesta de 2,625 ml de solución A; 2,438 ml de solución C; 4,688 ml de agua; 82,5 microlitros de solución D y 4,5 microlitros de TEMED.

En lugar de agua, en esta capa se añadió una solución de amilopectina azure (131 mg/25 ml), de almidón (262,5 mg/25 ml) o de glucógeno (105 mg/25 ml) para preparar los geles para electroforesis con tinción específica para actividad enzimática, lo que representa un 0,25 %, un 0,50 % y un 0,20 % respectivamente en el volumen final de la mezcla de polimerización.

2.- Gel de concentración (4 % de acrilamida, pH 6,8).

Esta capa, de 1,2 cm está compuesta por 0,498 ml de solución A; 0,938 ml de solución B, 2,31 ml de agua; 22,5 microlitros de solución D y 3,75 microlitros de TEMED.

Antes de añadir esta última capa se introdujo en el molde un peine de teflón (de dientes de 1 cm de anchura y 3 mm de separación) hasta la

altura que indicaba la profundidad de la capa. Esto permitió que una vez polimerizada la mezcla se formasen pocillos donde se depositaron las muestras.

B.- Electroforesis.-

Un volumen variable de extracto, entre 25 y 75 microlitros, se introdujo en los pocillos con ayuda de un microjeringa Hamilton. La electroforesis se llevó a cabo a 4 °C en una cámara fría, a corriente constante (20 mA) y voltaje variable, haciéndose avanzar las proteínas hacia el polo positivo. El tampón de electroforesis utilizado estaba compuesto por tris-glicina a pH 8,5 (6 g de tris y 28,8 g de glicina por litro).

C.- Incubación de los geles.-

Tras separar el gel del molde de cristal, se sumergió en tampón acetato 0,1 M pH 5,0 con Cl_2Ca 1 mM y se incubó durante dos horas en una estufa a 31 °C para la visualización de la actividad amilolítica. En aquellas electroforesis en las que no se incorporó amilopectina o almidón al gel, se añadió éste al medio de incubación.

La actividad amilofosforolítica se detectó incubando el gel en tampón citrato 0,1 M a pH ácido con glucosa-1-fosfato 0,7 % durante un tiempo variable entre 5 horas y toda la noche, a 30 °C, para la reacción de síntesis. Para la reacción de degradación se utilizó tampón fosfato a pH neutro con almidón 0,5 %, incubándose en este caso durante 2 horas, a 30 °C.

D.- Tinción y fijación de los geles.-

Inmediatamente después de la incubación, los geles se tiñeron con la solución iodo-iodurada descrita en la sección II.2.2.1., manteniéndolo

los inmersos en ella durante unos minutos. A continuación se trasladaron a otras bandejas con solución fijadora compuesta de una solución acuosa de ácido acético 12 % e isopropanol 25 %.

E.- Fotografía.-

Los geles teñidos y fijados se extendieron sobre un soporte de cristal velado sobre una caja de iluminación para realizar las fotografías. Estas se hicieron con una cámara Minolta srT 101 provista de objetivo M.C. macro Rokkor 1:3,5f , 50 mm y con película Agfapan 25.

La operación de fotografía no debe prolongarse, debido a que el calor emitido por el foco luminoso produce la aparición de burbujas y ondulaciones que impiden un buen enfoque de todo el gel.

F.- Secado de los geles.-

Después de fotografiado el gel se sumergió en una solución acuosa de ácido acético 12 %, isopropanol 25 % y glicerina 2,5 % durante la noche. Utilizando como soporte una placa de vidrio, se envolvió el gel en papel de celofán previamente mojado en la solución anterior y se dejó secar a temperatura ambiente durante dos o tres días.

II.2.3.- ESTIMACION INDEPENDIENTE DE LAS ACTIVIDADES ALFA- Y BETA-AMILOLITICAS.-

La separación de las actividades alfa- y beta-amilolíticas en extractos crudos se realiza en base a propiedades características de cada una de ellas tales como la termorresistencia de la alfa-amilasa en presencia de iones calcio y su inactivación por agentes secuestradores de estos iones, y la termolabilidad de la beta-amilasa, aún en presencia de calcio, su resistencia a los secuestradores de calcio y su inactivación por bajas concentraciones de metales pesados, particularmente por mercurio.

Aunque la mayor parte de los autores se basan en estas propiedades indicadas para hacer análisis específicos de las amilasas, existe una gran diversidad en cuanto a las condiciones en que se efectúan las inactivaciones (Tablas 1, 2 y 3).

Las condiciones de inactivación utilizadas en este trabajo se describen a continuación.

II.2.3.1.- INACTIVACION CON CLORURO MERCURICO.-

Se realizó añadiendo al extracto crudo Cl_2Hg (reactivo de los grupos -SH) en solución acuosa a concentración variable entre 0,01 y 1 mM en proporción igual al extracto y utilizando directamente esta solución en la determinación de la actividad. Para la detección de la actividad por métodos electroforéticos y en los extractos semipurificados por cromatografía, la concentración de Cl_2Hg utilizada fue siempre de 0,04 mM, dando una concentración final en el extracto de 0,02 mM.

T A B L A 1

INACTIVACION DE LA ENZIMA BETA-AMILASA
POR CLORURO MERCURICO.

Referencia	Concentracion	Material vegetal	Parte de la planta
Gates y Simpson, 1968	1×10^{-3} mM	ssp	hojas
Shain y Mayer, 1968	5×10^{-2} mM	<u>Pisum sativum</u>	semilla
Pech et al., 1971	2×10^{-3} mM	<u>Pirus communis</u>	fruto
F. Tárrago et al., 1976	1×10^{-1} mM	<u>Lens esculenta</u>	semilla
Hildebrand et al., 1981	2×10^{-6} mM	<u>Glycine max</u>	semilla
Doehlert y Duke, 1983	1×10^{-2} mM	<u>Hordeum vulgare</u>	semilla

II.2.3.2.- INACTIVACION POR ELIMINACION DE IONES CALCIO.-

Los iones calcio unidos en las proteínas del extracto, se secuestraron mediante la adición de la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a una concentración final de 100 mM y preincubándolo distintos tiempos con el extracto. Este proceso se realizó a una temperatura de 4 °C con el fin de evitar la acción de las proteasas que se encuentran en los extractos crudos.

Los extractos semipurificados por cromatografía y los destinados a electroforesis se preincubaron durante 30 minutos o durante toda la noche en presencia del agente secuestrante, indicándose el procedimiento seguido en cada experimento.

II.2.3.3.- INACTIVACION TERMICA.-

Los tubos con el extracto se sumergieron en un baño termostático a 70 °C durante tiempos variables, colocándose inmediatamente en hielo para evitar que la inactivación continuase después del tiempo fijado. A continuación se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos y se desechó la proteína precipitada, utilizándose el sobrenadante directamente en la determinación amilolítica.

Se estudió en este apartado el posible efecto protector de distintas concentraciones (de 0 a 45 mM) de Cl_2Ca sobre la actividad.

T A B L A 2
=====

INACTIVACION DE LA ENZIMA ALFA-AMILASA
POR EDTA

Referencia	Concent.	Tpo preinc.	Material vegetal	Parte planta
Shain y Mayer, 1968	10 mM	30 min	<u>Pisum sativum</u>	semilla
Jacobsen et al, 1970	5 mM	20 min	<u>Hordeum vulgare</u>	semilla
Baun et al., 1970	7 mM	30 min	<u>Oryza sativa</u>	semilla
Bilderback, 1971	5 mM	30 min	<u>Hordeum vulgare</u>	semilla
Thorpe y Meier, 1974	25 mM	45 min	<u>Nicotiana tabacum</u>	callos
F. Tárrago et al, 1976	5 mM	60 min	<u>Lens esculenta</u>	semilla
Levi y Preiss, 1978	12,5 mM	*	<u>Pisum sativum</u>	hoja
Davis, 1979	10 mM	*	" "	semilla
Gepstein e Ilan, 1979	10 mM	4 días	<u>Phaseolus vulgaris</u>	semilla
Okita et al., 1979	10 mM	*	<u>Spinacia oleracea</u>	hoja

* sin especificar

T A B L A 3
=====

INACTIVACION TERMICA DE LA ENZIMA BETA-AMILASA.

Referencia	Tª	Tiempo	Cl ₂ Ca	Material vegetal	Parte planta
Swain y Dekker, 1966a	70°C	15 min	20 mM	<u>Pisum sativum</u>	semilla
Juliano et al., 1969	70°C	15 min	*	" "	semilla
Tanaka et al., 1970	70°C	15 min	5 mM	<u>Oryza sativa</u>	semilla
Pech et al., 1971	60°C	10 min	50 mM**	<u>Pirus communis</u>	fruto
F. Tárrago et al, 1976	70°C	5 min	1,5 mM	<u>Lens esculenta</u>	semilla
Levi y Preiss, 1978	70°C	5 min	20 mM	<u>Pisum sativum</u>	hoja
Okita et al., 1979	70°C	10-20min	10 mM	<u>Spinacia oleracea</u>	hoja
Adams et al., 1980	70°C	20 min	10 mM	<u>Glycine max</u>	semilla
Adams et al., 1981	70°C	15 min	20 mM	" "	semilla
Hildebrand et al, 1981	70°C	20 min	10 mM	" "	semilla
Koshiha et al., 1981	70°C	30 min	5 mM	<u>Vigna mungo</u>	semilla
Doehlert y Duke, 1983	70°C	20 min	3 mM	ssp	semillas, ho jas y raíces.

*. sin especificar

** concentración en la extracción

II.3.- DETERMINACIONES ANALITICAS.-

II.3.1.- CLOROFILA.-

Se ha seguido el método colorimétrico descrito en los "Official Methods of Analysis" (1970). Un peso aproximado de 3 gramos de hojas se trocearon con tijeras, tomándose una alícuota de 0,3 gramos. Esta fue triturada en mortero, a 0-4 °C y en penumbra para evitar la alteración de la clorofila, con arena de cuarzo como abrasivo y acetona 80 %.

El triturado obtenido se filtró a través de papel Whatman nº 2 a un kitasato con ayuda de succión, lavando con acetona (80 %) hasta que la pulpa retenida sobre el papel fuese incolora o ligeramente amarillenta, - para lo cual se hicieron reextracciones si fueron necesarias. El filtrado se aforó a 50 ml con acetona 80 %, 25 de los cuales se pasaron a un embudo de decantación en donde se había añadido previamente 20 ml aproximadamente de éter etílico. Tras añadir el extracto acetónico al embudo, se vertió asimismo igual cantidad de agua destilada para favorecer el paso de los pigmentos al éter. Cuando se separaron las dos fases se desechó la inferior -de acetona-agua-. La fase éter se lavó tres veces con agua destilada haciendo salir el extracto por el extremo del embudo, inmerso en el agua contenida en otro embudo de decantación colocado debajo.

Después de eliminar el agua del último lavado, se aforó a 25 ml con éter etílico y se añadió sulfato sódico anhidro (en proporción 3 g/10 ml) para eliminar los últimos restos de agua.

Las lecturas espectrofotométricas se realizaron a 662 y 644,5 nm, utilizando éter etílico como blanco.

Los resultados se expresan como miligramos de clorofila por centímetro cuadrado de tejido, según las fórmulas:

$$\text{Clorofila total (mg/l)} = 7,12 \times \text{D.O.}_{662} + 16,8 \times \text{D.O.}_{644,5} \quad (1)$$

y transformando estos valores en:

$$\text{mg / cm}^2 = \frac{(1) \times V \times V''}{V''' \times \text{superficie}} \quad \text{siendo}$$

V = volumen aforado de acetona (ml)

V' = volumen de acetona añadido al embudo de decantación (ml)

V'' = volumen aforado de éter etílico (ml)

Superficie del tejido triturado, en cm^2 .

11.3.2.- CARBOHIDRATOS.-

El material vegetal desecado en una estufa de aire forzado a 60 °C, durante al menos tres días, se trituró con un molino de paletas y se pasó a través de un tamiz de 60 mallas, guardándose en bolsas de plástico herméticamente cerradas hasta el momento de su utilización.

11.3.2.1.- EXTRACCION DE LAS MUESTRAS.-

A.- Azúcares.-

Una muestra de 100 mg se colocó en un tubo de centrifuga y se añadió un volumen aproximado de 15 ml de alcohol etílico 80 % a 75 °C, calentándose a esta temperatura durante 10 minutos con agitación ocasional. Después se centrifugó a 10.000 g 10 minutos y se decantó el sobrenadante a un erlenmeyer. El precipitado se reextrajo tres veces del modo citado.

De los extractos alcohólicos combinados se eliminó el alcohol por evaporación a 50 °C con un evaporador rotatorio y el extracto acuoso resultante se aforó a 50 ml con agua destilada, filtrándose a continuación a través de papel Whatman nº 2.

Este extracto fue utilizado en los análisis de azúcares totales y reductores.

B.- Almidón.-

Al residuo sólido precipitado después de la cuarta centrifugación en la extracción de azúcares se le añadieron 25 ml de ácido perclórico al 35 %, se agitó y se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla fue llevada a volumen lavando el tubo de centrifuga varias veces con agua destilada.

El contenido del matraz fue filtrado a través de papel Whatman nº 2 y el filtrado se utilizó en el análisis de almidón.

II.3.2.2.- ANALISIS DE LOS EXTRACTOS.-

A.- Azúcares reductores.-

Se siguió el método de Park y Johnson (1949). A 1 ml de extracto, convenientemente diluido y colocado en un tubo de ensayo, se añadió 1 ml de solución carbonato-cianuro (5,3 g de CO_3Na_2 y 0,65 g de CNK por litro) y 1 ml de solución ferricianuro (0,5 g de $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$ por litro), agitándose la mezcla y calentándola durante 15 minutos en un baño de agua hirviendo. Los tubos de ensayo se enfriaron, después de este tiempo, en un baño con agua a temperatura ambiente, tras lo cual se añadieron 5 ml de solución férrica (1,5 g de $(\text{SO}_4)_2\text{FeNH}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 50 ml de SO_4H_2 1 N y 1 g de dodecil sulfato sódico), y se leyeron las densidades ópticas en un espectrofotómetro a 690 nm después de 15 minutos.

Al mismo tiempo que se analizaron las muestras, se hizo una curva patrón con 0, 4 y 8 microgramos de glucosa, curva en la que se interpolaron los valores obtenidos para las muestras.

Los resultados se expresan en forma de porcentaje de azúcares reductores sobre peso seco, según la fórmula:

$$\% \text{ azúcares} = \text{microgramos glucosa} \times \frac{V}{V'} 10^{-3} \times 100 \times \frac{1}{\text{PS}}$$

siendo:

microgramos de glucosa = valor obtenido en la interpolación

V = volumen aforado (ml)

V' = volumen analizado (ml)

10^{-3} = conversión de microgramos a miligramos

100 = conversión a porcentaje

PS = peso seco analizado (mg)

B.- Azúcares totales y almidón.-

Los azúcares totales y el almidón se determinaron con el reactivo antrona-sulfúrico (McCready et al., 1950).

Se añadieron 5 ml de extracto, convenientemente diluido, a tubos pirex con tapón de rosca y se colocaron en una bandeja con hielo hasta que alcanzaron 0 °C. En este momento se añadieron 10 ml del reactivo antrona-sulfúrico (0,4 g de antrona en 200 ml de ácido sulfúrico 95 %, frío) preenfriado en la nevera y medidos con bureta. Los tubos se agitaron enérgicamente y se abrió el tapón un cuarto de rosca para permitir la salida de gases, cerrándose de nuevo y calentando los tubos en un baño de agua hirviendo durante siete minutos y medio exactamente. A continuación se enfriaron en un baño con agua a temperatura ambiente y se midió su densidad óptica con un espectrofotómetro a 630 nm.

Del mismo modo que se hizo en los análisis de azúcares reductores, se preparó también una curva estándar de glucosa, usándose las concentraciones 0, 50 y 100 microgramos de glucosa.

Los valores de densidad óptica de las muestras se interpolaron en la curva patrón y los miligramos de glucosa obtenidos se transformaron en porcentaje sobre peso seco utilizándose la misma fórmula que en el caso de azúcares reductores, excepto para el cálculo del porcentaje de almidón en que se multiplicó el resultado obtenido en la fórmula por 0,9 para compensar la pérdida de una molécula de agua en la polimerización de la glucosa.

$$\% \text{ almidón} = \text{microgramos glucosa} \times \frac{V}{V'} \times 10^{-3} \times 100 \times \frac{1}{PS} \times 0,9$$

II.4.- ANALISIS ESTADISTICOS.-

Los datos obtenidos se sometieron al análisis de la varianza, indicándose el modelo seguido en la sección correspondiente. En los casos en los que los datos representan porcentajes se realizó la transformación $y = \text{arc sen } \sqrt{p}$. En consecuencia, los efectos que han llegado a establecerse lo fueron mediante pruebas F de Snedecor (Sokal y Rohlf, 1969).

La caracterización de los grupos de niveles o tratamientos dentro de cada efecto, generadores de diferencias significativas, se realizó mediante la prueba secuencial de Student-Newman-Keuls, al nivel de probabilidad del 95 % (Sokal y Rohlf, 1969). Los resultados así obtenidos se presentan de forma simplificada como diagramas en los que "1" representa la existencia de diferencias significativas y "0" los casos en que no han podido demostrarse. Una visualización inmediata de los resultados se obtiene de la parte inferior de los diagramas, donde se representan como barras los distintos grupos obtenidos del test secuencial.

En los casos en que los distintos niveles de un efecto, previamente establecido por análisis de la varianza que genera, poseen una naturaleza cuantitativa, el análisis estadístico se ha completado mediante análisis de regresión mínimo cuadrática. Se ha explorado el ajuste lineal, el cuadrático y el cúbico, y la significación de la información asociada a los distintos ajustes se ha estudiado mediante el análisis de la varianza sobre la partición generada por la regresión y a un nivel de significación del 1 %.

En todas las gráficas se representa el error estándar de los puntos mediante barras verticales.

resultados

III.1.- CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

III.1.1.- EXTRACTOS CRUDOS.-

Como paso previo al estudio de las características de las enzimas hidrolíticas del almidón, se realizaron una serie de experimentos encaminados a la determinación de las condiciones óptimas de estimación de su actividad. Este estudio preliminar consistió en la comprobación de la linealidad de la actividad amilolítica frente al tiempo de incubación y frente a la concentración relativa de enzima en el medio. Se obtuvo asimismo el pH óptimo de incubación que presentan los extractos enzimáticos en diferentes tampones y la influencia de los iones calcio sobre la actividad de los extractos obtenidos con tampón citrato-fosfato.

El resultado obtenido al incubar distintas concentraciones relativas de extracto enzimático se presenta en la figura 3. Hay un cambio de pendiente para una variación de densidad óptica de 0,125 ud., que se observa también para el mismo valor de densidad óptica en la gráfica que representa la actividad amilolítica frente al tiempo de incubación (figura 4), no alcanzándose en este caso el límite de significación debido al menor número de puntos en esta gráfica. Cuando se compara la actividad en las dos condiciones (tiempo constante, concentración constante) se comprueba que los puntos se solapan (figura 5), lo que indica que el cambio de pendiente que se produce no es debido a la presencia de una determinada concentración de enzima o a un tiempo de incubación de la mezcla, sino a cambios producidos en la relación enzima - sustrato, es decir, en la actividad enzimática. En todos los experimentos realizados se han corregido los valores de densidad óptica superiores a 0,125 ud. para que los porcentajes de actividad recuperada no se vean afectados por el cambio de la razón de proporcionalidad que se da a partir de ese punto.

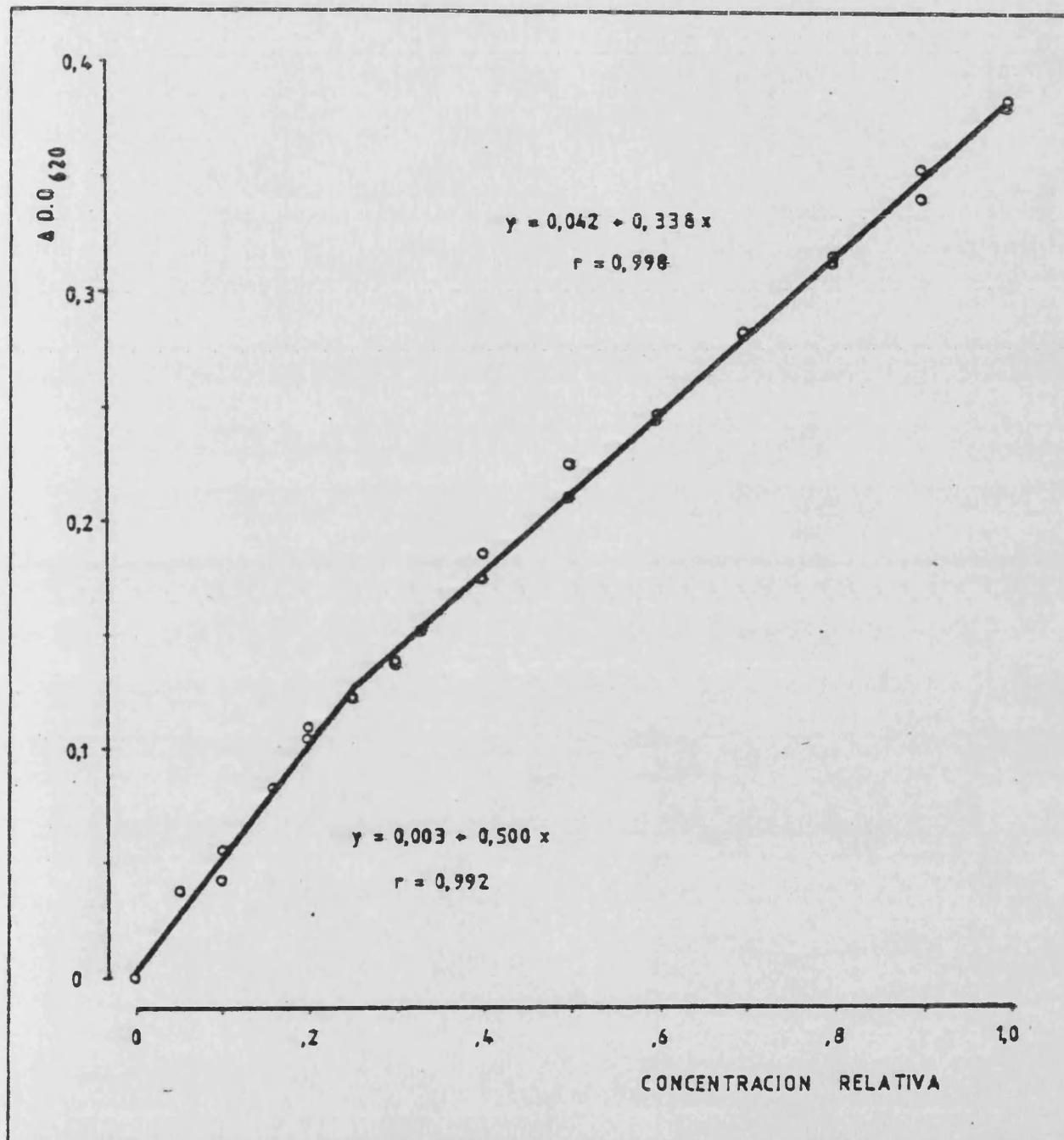


Figura 3.- Relación entre el descenso en densidad óptica a 620 nm y la concentración relativa de extracto enzimático crudo. Tampón acetato 0,1 M a pH 5,5, con Cl_2Ca 1 mM, como medio de incubación.

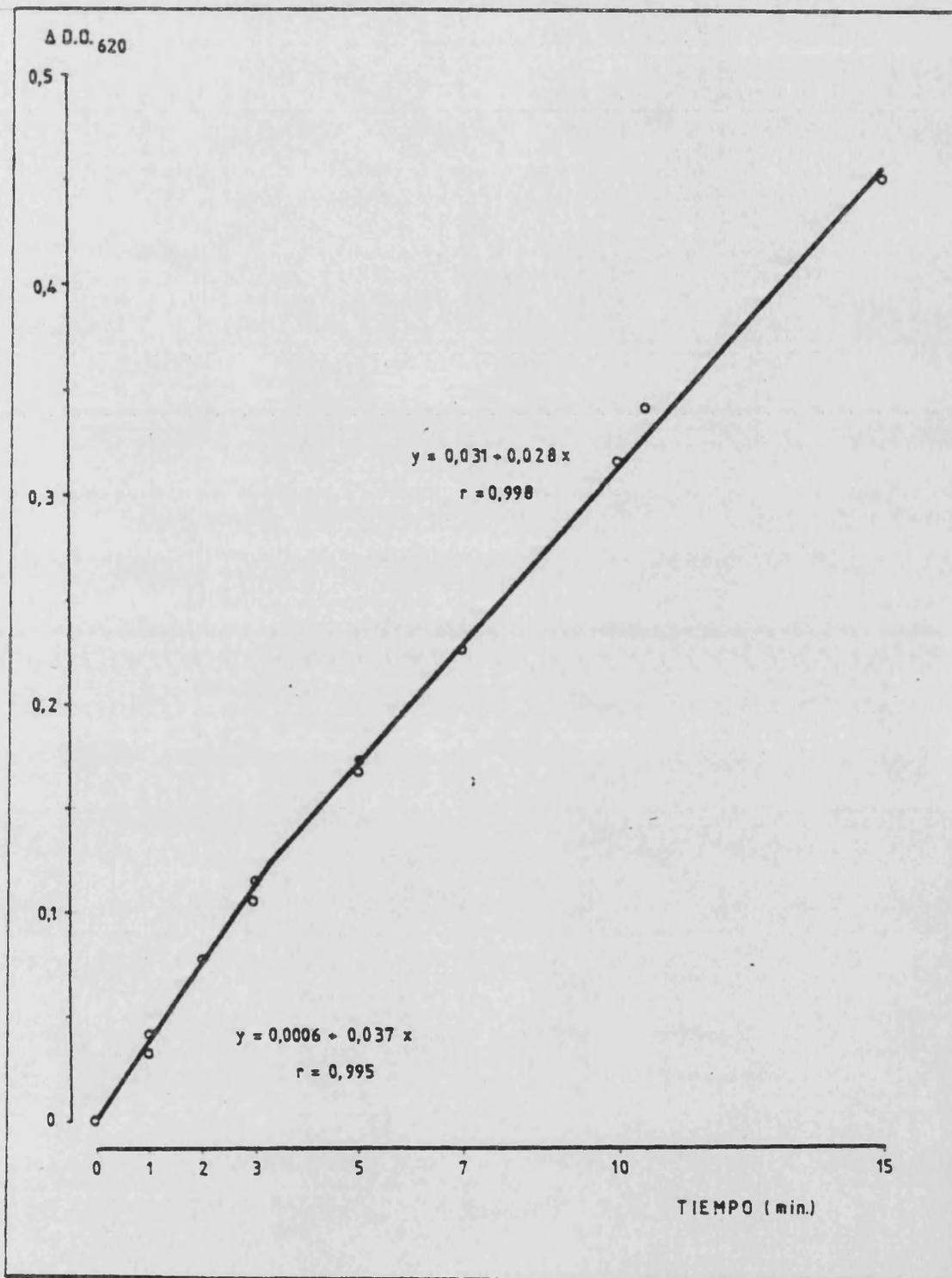


Figura 4.- Relación entre el descenso en densidad óptica a 620 nm y el tiempo de incubación. Tampón acetato 0,1 M a pH 5,5, con Cl_2Ca 1 mM, como medio de incubación.

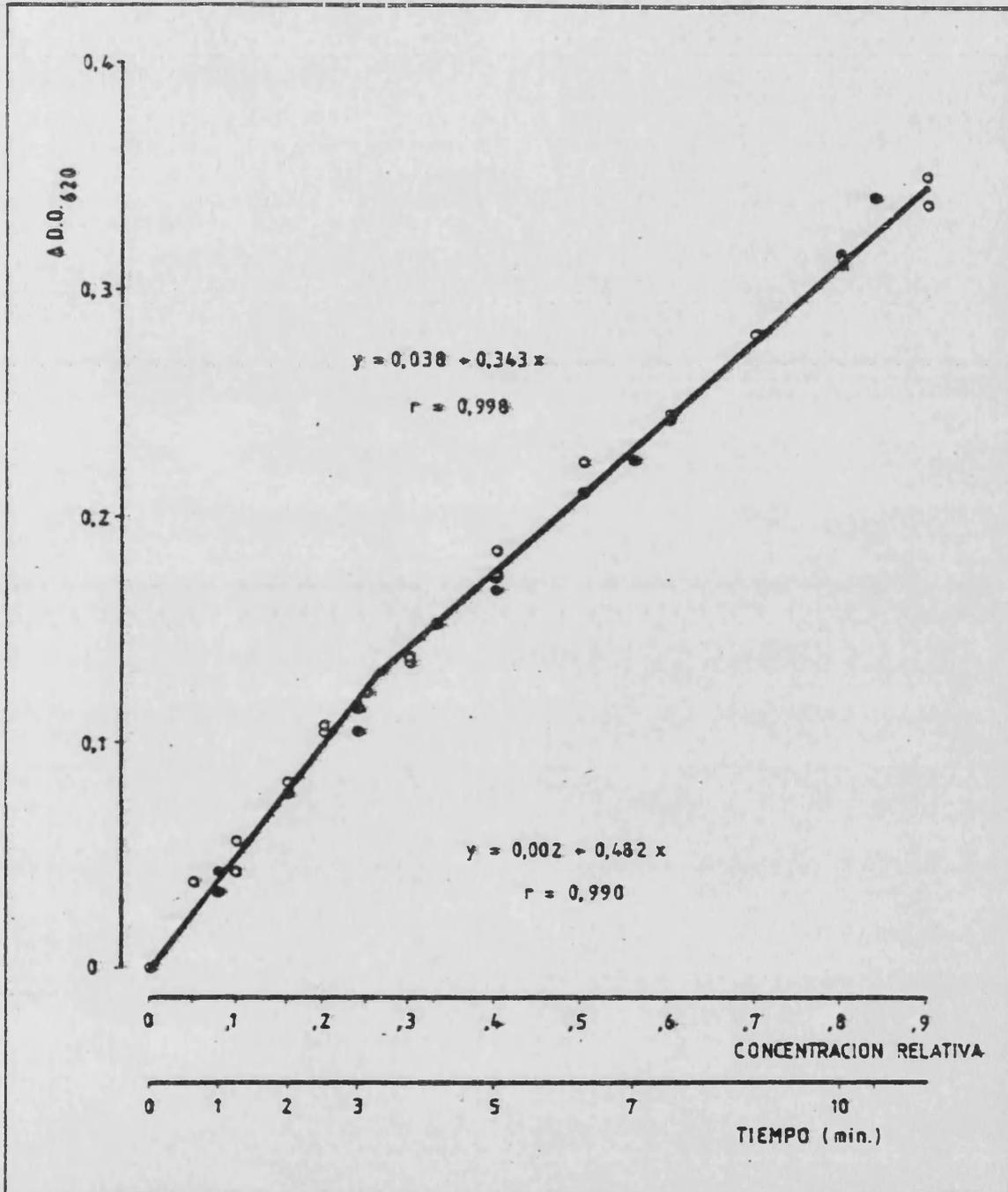


Figura 5.- Variación de la densidad óptica a 620 nm a tiempo constante (●) y a concentración relativa de enzima constante (o). Incubación en tampón acetato 0,1 M. a pH 5,5, con Cl_2Ca 1 mM. (Datos de las figuras 3 y 4). La adecuación de las escalas de las abscisas permite observar que ambas rectas de regresión son comunes para las determinaciones a tiempo constante y a concentración relativa constante.

Los extractos crudos utilizados para la determinación del pH - óptimo se obtuvieron por trituración con agua destilada o con un tampón de baja fuerza iónica. Al medio de incubación se añadió 1 ml de tampón al pH deseado en cada caso, utilizándose el tampón ácido acético-acetato sódico 0,25 M con un rango de pH entre 3,75 y 5,50, tampón tris-maleato 0,25 M para pH comprendidos entre 6,0 y 8,5 y tampón citrato 0,01 M - fosfato 0,02 M para pH entre 3,2 y 7,0. Los resultados de actividad enzimática, - representados en las figuras 6, 7 y 8 respectivamente, se expresan como porcentaje sobre el valor máximo de actividad obtenido en cada determinación.

Con los tres sistemas tampón utilizados se observa un descenso acusado de la actividad a los pH extremos, tanto ácidos como básicos, y una meseta en la zona comprendida entre pH 5,0 y 6,5. Con tampón acetato la actividad aumenta hasta el valor de pH de 5,5 (figura 6), límite de utilización de este tampón, existiendo además un hombro alrededor de pH 4,5. Con tampón tris-maleato (figura 7) la actividad máxima se alcanza a pH 6,25. Para el tampón citrato - fosfato se obtiene el máximo de actividad entre los pH 5,5 y 6,5, zona en la que la actividad es igual o superior al 95 % de - la máxima. Se observa también un hombro entre pH 4,5 y 5,0, lo que indica la existencia de distintas amilasas en los extractos crudos (figura 8).

A pH 5,5 la actividad amilolítica es muy similar con los tres - tampones utilizados, en presencia de Cl_2Ca 1 mM, produciéndose una actividad máxima con tampón acetato y siendo 94 ± 2 y 89 ± 2 los valores relativos que se obtienen con tampón citrato-fosfato y tris-maleato, respectivamente.

La adición de iones calcio al medio de incubación no aumenta - la actividad amilolítica de los extractos crudos, aún en el caso en que se obtuvieron con tampón citrato-fosfato (figura 9), condiciones en que se pro

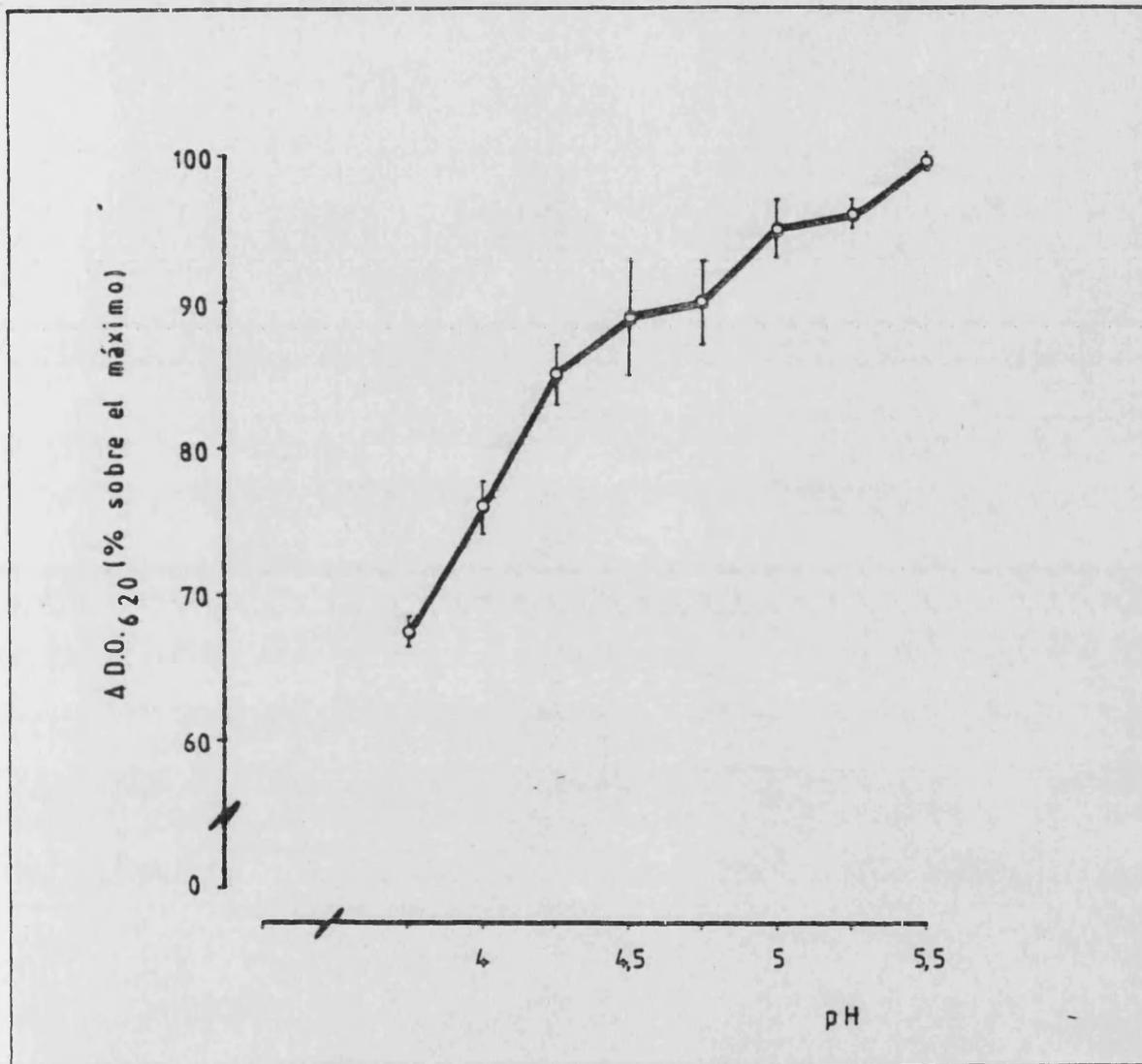


Figura 6.- Actividad amilolítica relativa (porcentaje sobre el valor máximo) a los distintos pH, con tampón acetato. La curva es el valor medio de cuatro repeticiones distintas.

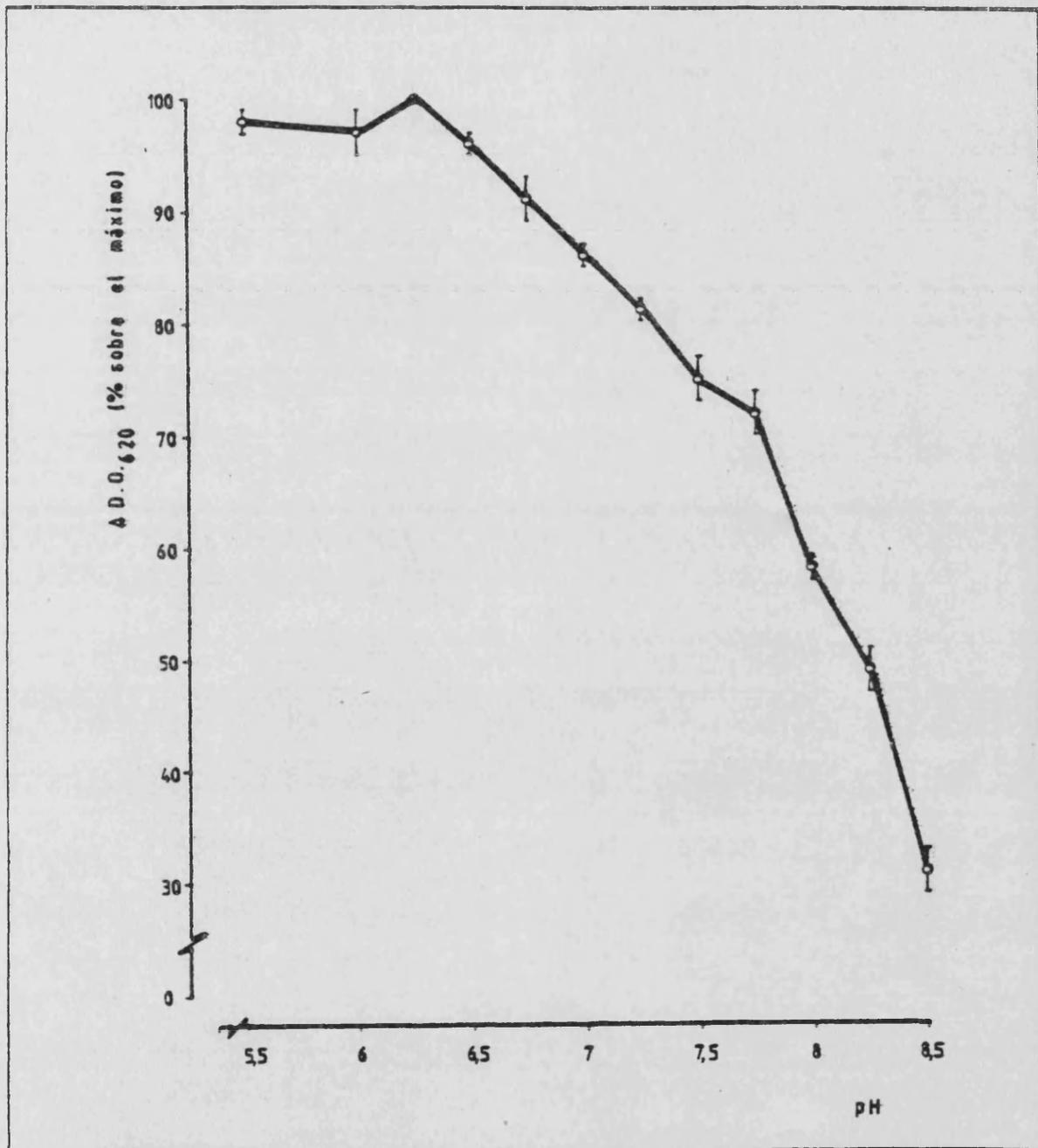


Figura 7.- Actividad amilolítica relativa (porcentaje sobre el valor máximo) a los distintos pH, con tampón tris-maleato. La curva es el valor medio de seis repeticiones distintas.

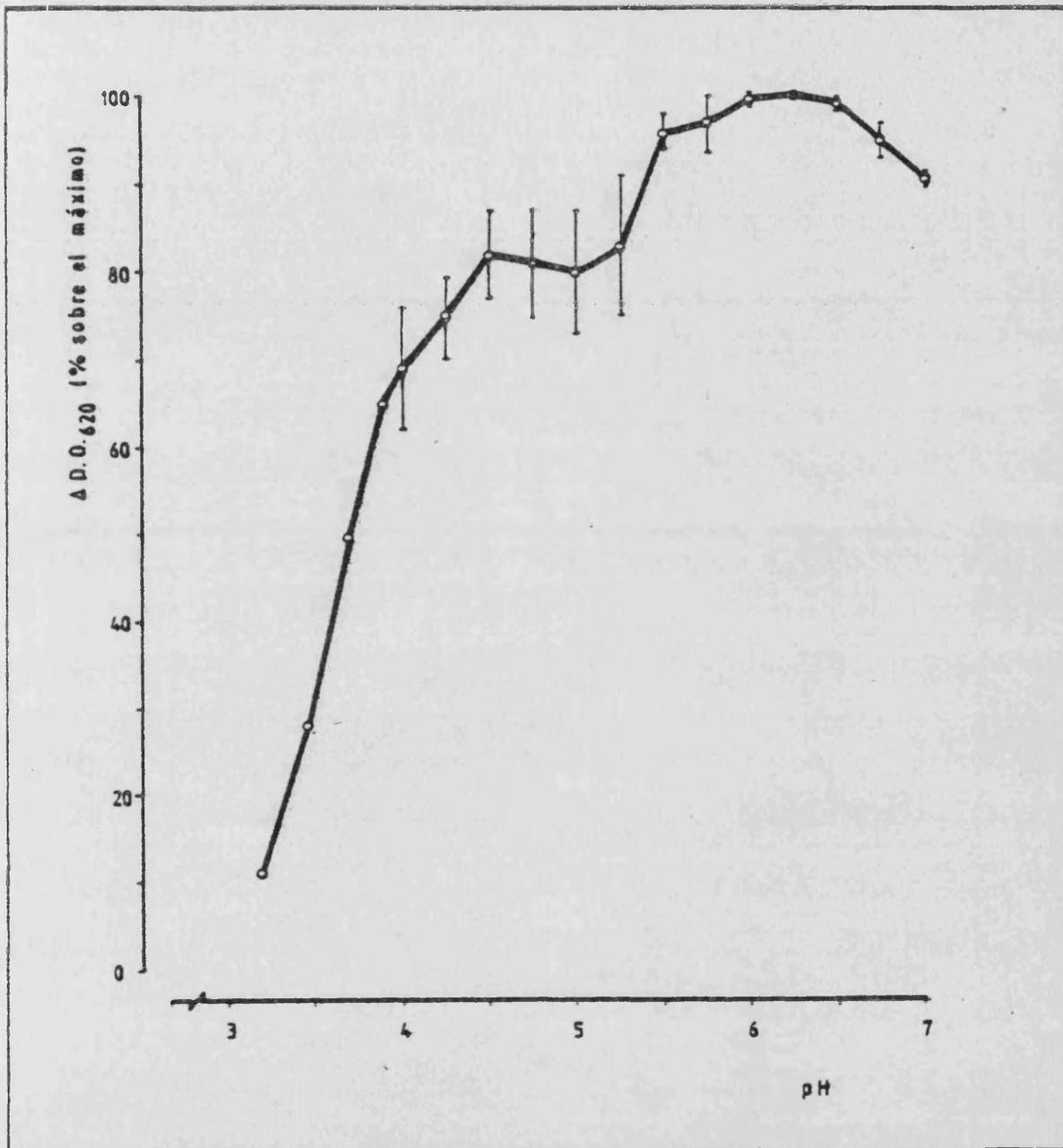


Figura 8.- Actividad amilolítica relativa (porcentaje sobre el valor máximo) a los distintos pH, con tampón citrato-fosfato. Para cada valor de pH superior a 3,75 la curva representada es la media de dos repeticiones distintas.

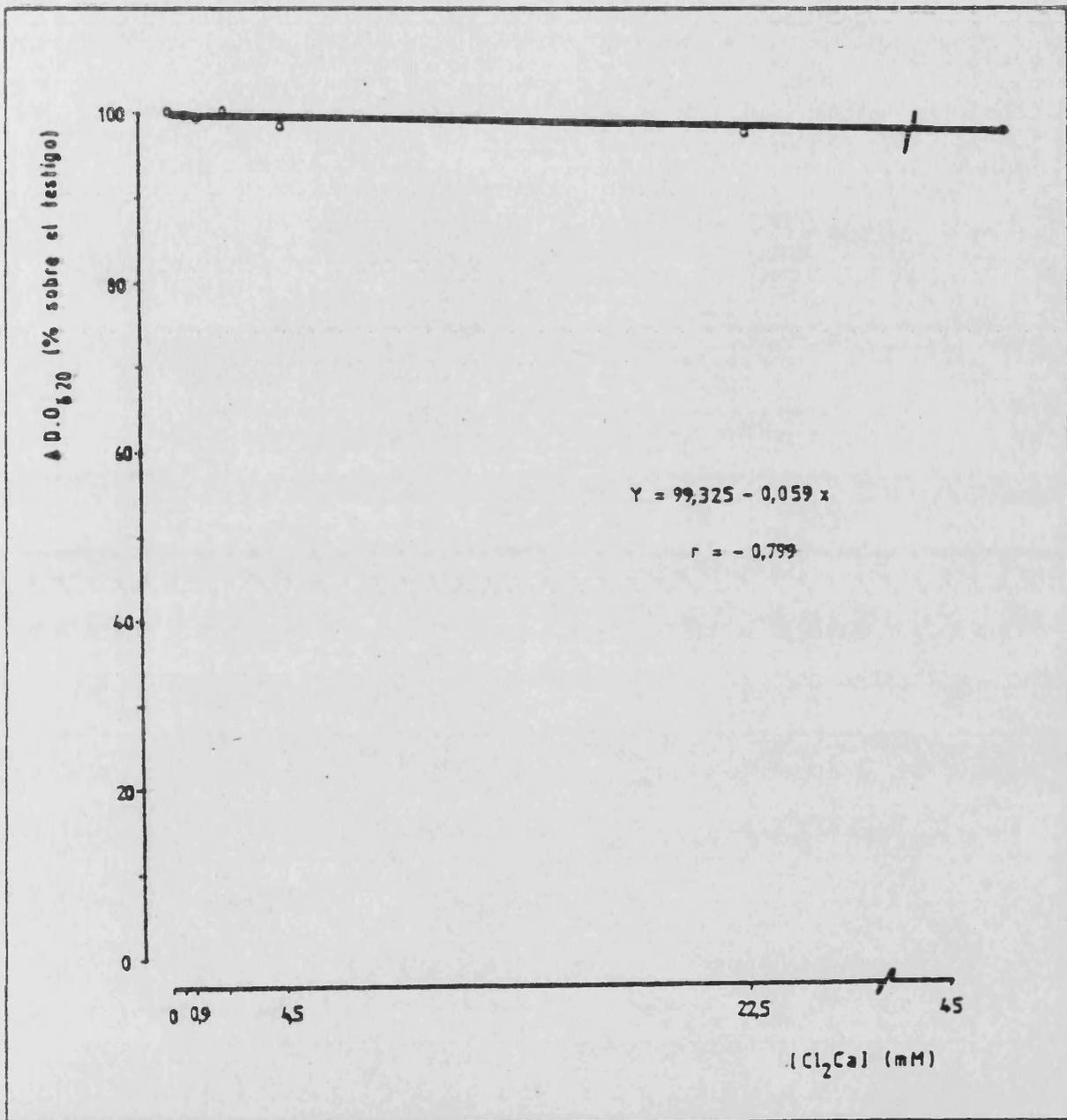


Figura 9.- Actividad amilolítica (porcentaje sobre el valor máximo) en presencia de diversas concentraciones de Cl₂Ca en el medio de incubación. Tampón citrato-fosfato, pH 6,25.

duce una notable activación en los extractos de cotiledones de guisante (Swain y Dekker, 1966a).

III.1.1.1.- ESTIMACION INDEPENDIENTE DE LAS DISTINTAS ACTIVIDADES AMILOLITICAS.-

Los extractos crudos se sometieron a la acción de inhibidores específicos para separar las distintas actividades amilolíticas presentes. Los experimentos se realizaron a dos pH, 4,5 y 6,25, para determinar qué inhibidores actúan preferentemente a cada pH y comprobar así si estas dos zonas de pH corresponden a máximos de actividad de distintas amilasas como sucede en el guisante (Shain y Mayer, 1968).

A.- Inactivación por cloruro mercúrico.-

La inhibición de la actividad beta-amilolítica se realizó utilizando Cl_2Hg a distintas concentraciones entre 5×10^{-3} y 5×10^{-1} mM. Los pH a los que se realizaron los experimentos se obtuvieron con el tampón acetato (pH 4,5) y citrato-fosfato y tris maleato (pH 6,25).

Los resultados no se ven influidos por las condiciones de pH en las que se realiza la determinación; en todos los casos se obtienen resultados similares para las distintas concentraciones de inhibidor. El cloruro mercúrico produce la inactivación progresiva de la amilasa del tejido foliar de naranjo (tabla 4), siendo muy pequeña a concentraciones bajas (a 10^{-2} mM queda más del 90 % de la actividad inicial) y aumentando con la concentración hasta obtenerse una inactivación de alrededor del 45 % con cloruro mercúrico 0,1 mM.

Puesto que no se han encontrado diferencias significativas entre la inhibición obtenida bajo las distintas condiciones de pH, se ha hecho un ajuste por regresión con todos los datos de los distintos experimentos,

T A B L A 4

MODELO.- $x_{ij} = \mu + A_i + B_j + (A * B)_{ij} + \epsilon_{k(ij)}$

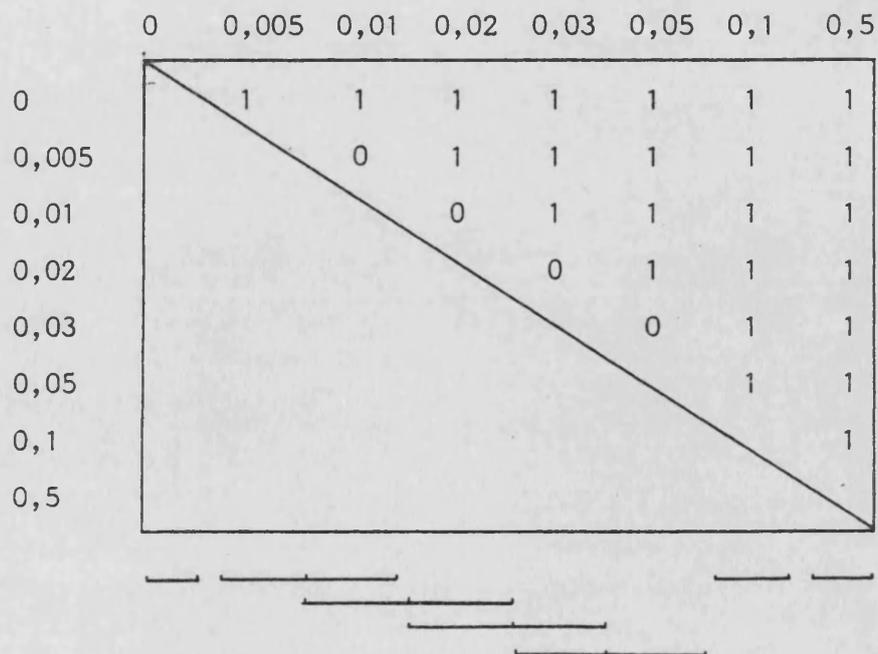
siendo A = pH y B = concentración de inhibidor

TABLA DEL ANALISIS DE LA VARIANZA.-

Fuente	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrados medios	F
pH	24,23	1	24,23	-
Concentración de inhibidor	18477,29	7	2639,61	48,26**
pH * concentración	548,43	7	78,35	1,43 ns
residual	2625,23	48	54,69	

** significativo al 1 %

DIAGRAMA DEL TEST.-



obteniéndose la curva representada en la figura 10.

B.- Inactivación térmica.-

Los experimentos de inactivación térmica se llevaron a cabo calentando los extractos crudos a 70 °C, a los dos pH mencionados, con y sin la adición de calcio (Cl_2Ca) 25 mM (concentración final).

No se obtiene protección de la actividad por la presencia de iones calcio a ninguno de los dos pH ensayados (Tabla 5).

A pH 4,5 (figura 11-A) se produce una inactivación casi total desde el primer minuto de tratamiento, que deja una actividad del 10 % del testigo y que se mantiene constante alrededor de este valor hasta los 30 minutos de calentamiento.

A pH 6,25 el efecto del calor es más gradual y menos acusado (figura 11-B). El descenso de la actividad es menos importante que a pH 4,5, en especial durante los primeros minutos de calentamiento, quedando alrededor de un 50 % de la actividad después del primer minuto y más de un 30 % a los 10 minutos de tratamiento.

C.- Inactivación por secuestro de iones calcio.-

La inactivación de la enzima alfa-amilasa se llevó a cabo utilizando EDTA a una concentración final de 100 mM, que se ha demostrado más efectiva en la inactivación de extractos crudos de guisante (Sanz, 1978) que las utilizadas por otros autores (Tabla 2) y preincubando la mezcla a 4 °C durante distintos tiempos, de 0 a 60 minutos. Los experimentos se realizaron bajo las mismas condiciones de pH que con los demás inhibidores.

Existen diferencias entre los distintos experimentos en la inactivación obtenida durante los primeros minutos de preincubación. Sin embargo

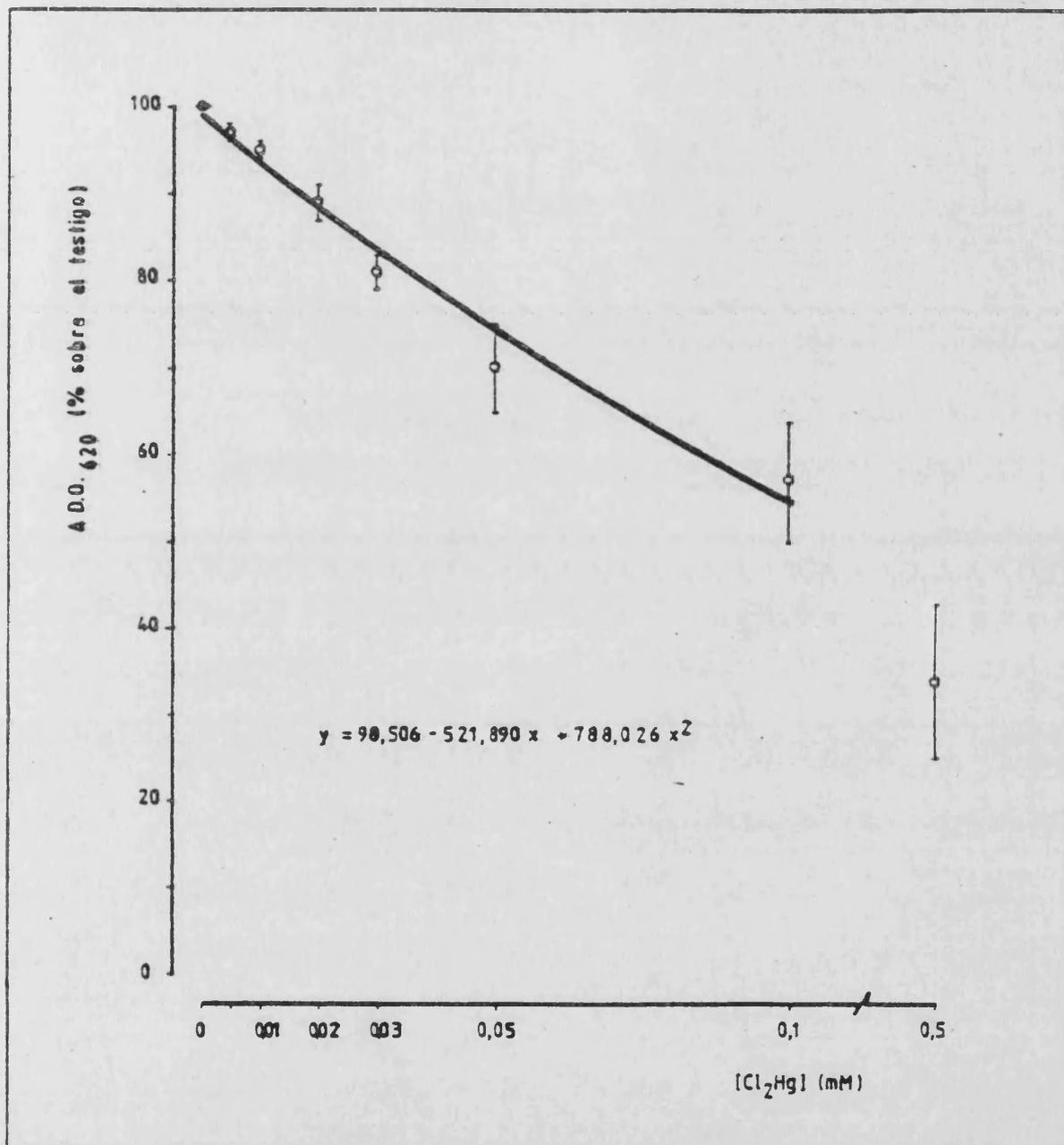


Figura 10.- Inactivación de extractos crudos por distintas concentraciones de Cl_2Hg . La actividad se representa como porcentaje sobre el valor del extracto sin inhibidor. La curva es el valor medio de ocho repeticiones distintas.

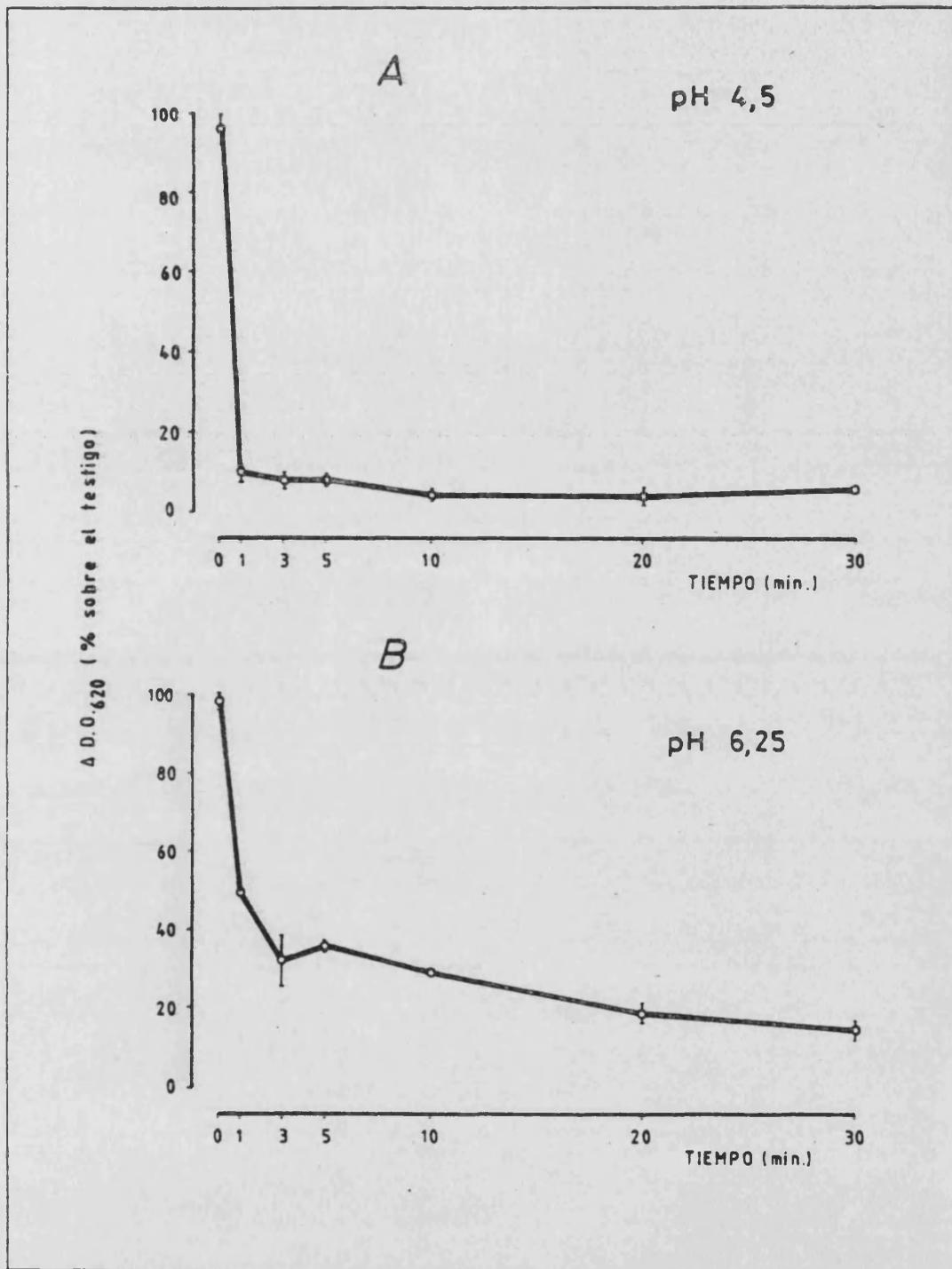


Figura 11.- Inactivación térmica a 70 °C de los extractos crudos a pH 4,5 (A) y a pH 6,25 (B). La actividad se presenta como porcentaje sobre el valor del extracto sin calentar. Las curvas son el valor medio de dos repeticiones distintas.

T A B L A 5

MODELO.- $x_{ijk} = \mu + A_i + B_j + C_k + (A*B)_{ij} + (A*C)_{ik} + (B*C)_{jk} + (A*B*C)_{ijk}$

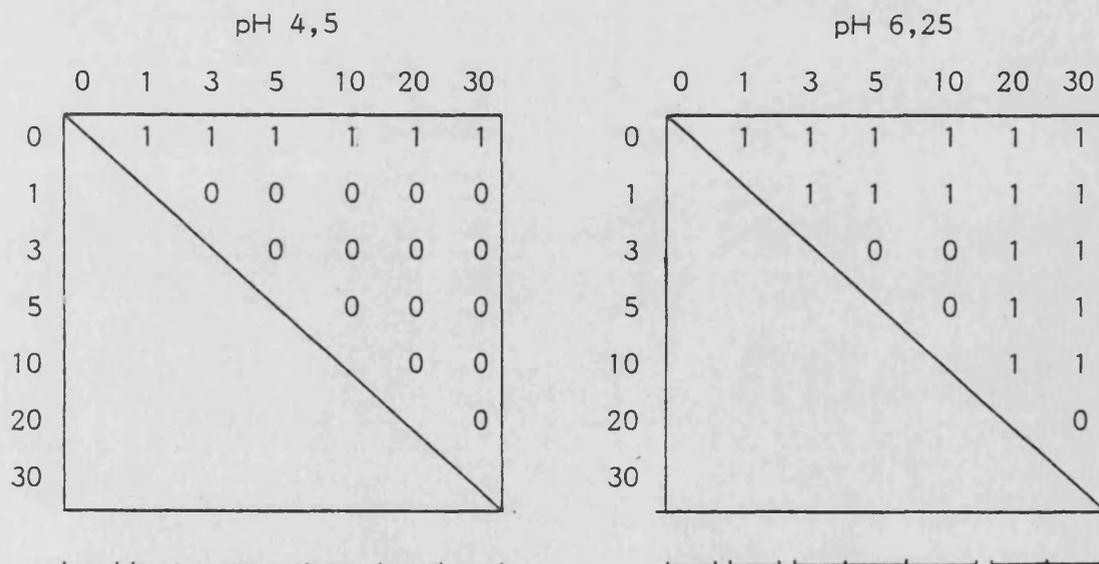
siendo A = tiempo de calentamiento; B = presencia de calcio y C = pH

TABLA DEL ANALISIS DE LA VARIANZA.-

Fuente	Suma de cuadrados	grados libertad	Cuadrados medios	F
Tiempo	12438,91	6	2073,15	291,53**
Calcio	15,93	1	15,93	2,24 ns
pH	1816,73	1	1816,73	255,47**
Tiempo*calcio	267,03	6	44,50	6,26*
Tiempo*pH	410,57	6	68,43	9,62**
Calcio*pH	13,25	1	13,25	1,86ns
Residual	42,67	6	7,11	

* significativo al 5 % ; ** significativo al 1 %

DIAGRAMAS DE LOS TESTS SECUENCIALES.-



go, las inactivaciones finales son similares en todos los casos, estando en general alrededor del 40 %, independientemente del pH al que se preincuba la mezcla (figura 12).

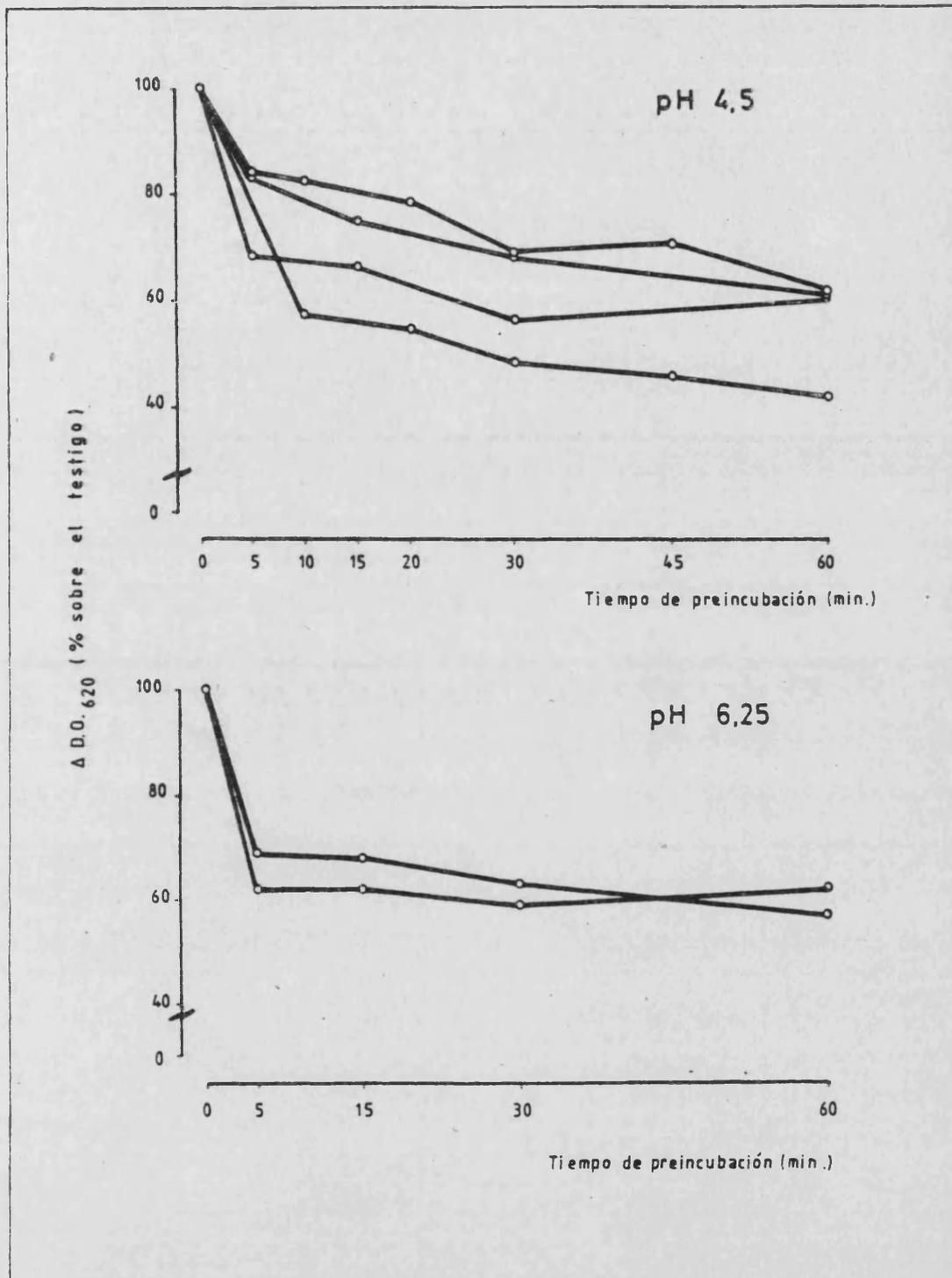


Figura 12.- Inactivación de los extractos crudos por EDTA, a pH 4,5 (A) y a pH 6,25 (B). La actividad se presenta como porcentaje sobre el valor del extracto sin inhibir. Cada una de las repeticiones realizadas se representa por separado.

III.1.2.- EXTRACTOS SEMIPURIFICADOS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR.-

III.1.2.1.- SEPARACION DE LAS ENZIMAS.-

La separación de un extracto crudo de proteínas en una columna de Sephadex G-100 de 31 x 2,5 cm, con un flujo de eluyente de 1,6 ml/min permitió separar la actividad amilolítica de la fracción mayor de proteínas del extracto. Solamente se encontró actividad enzimática en las fracciones entre 74 y 133 ml de volumen de elución, con un máximo para 92 ml y un hombro alrededor de 84 ml (correspondiente a los volúmenes relativos de elución, V_e/V_o , de 1,62 y 2,00), lo que sugiere una multiplicidad de enzimas (figura 13).

Alargando la columna hasta una longitud de 65 cm y reduciendo el flujo hasta un valor de 0,5 ml/min se optimizó la resolución, separándose dos picos claramente entre los volúmenes de elución de 155 a 200 ml ($V_e/V_o=1,66$) el primero y de 200 a 270 ml el segundo ($V_e/V_o=2,05$), y que denominaremos como Fracción enzimática 1 y Fracción enzimática 2 según el orden en que son eluidas. La proporción relativa de ambas fracciones fue variable para cada cromatografía, aunque de forma general puede decirse que cada una representa alrededor del 50 % de la actividad total recuperada tras el proceso de purificación, con el método de estimación utilizado.

La separación de las dos fracciones enzimáticas sin embargo no fue total, ya que no existen entre ellas fracciones cromatográficas sin actividad (figura 14), y no pudo mejorarse variando las condiciones de la cromatografía. En los experimentos subsiguientes de caracterización de estas fracciones enzimáticas se eligieron por tanto las fracciones cromatográficas extremas de cada una de las zonas para evitar la presencia de los dos tipos de enzimas.

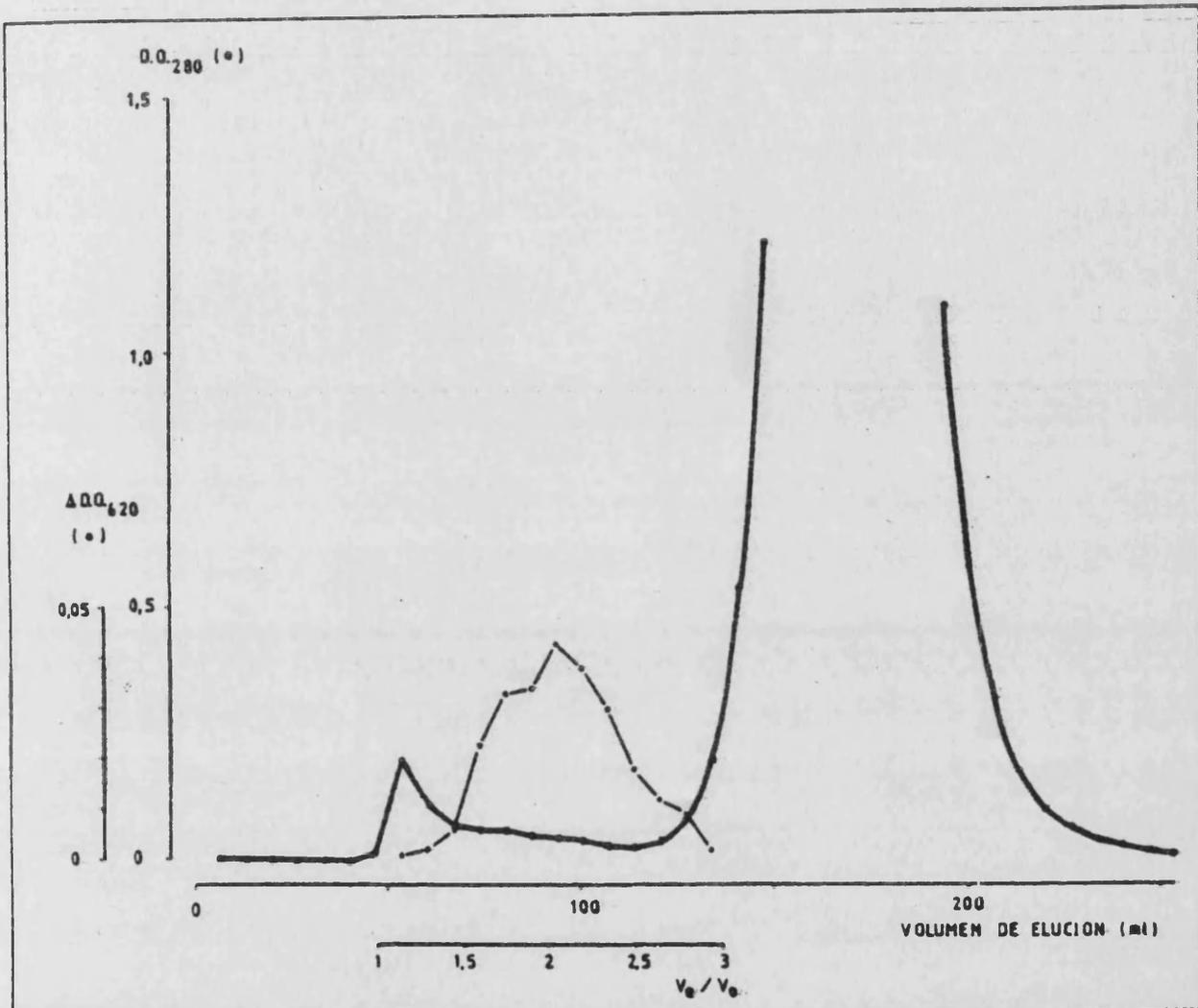


Figura 13.- Absorbancia a 280 nm (o) y actividad amilolítica ($\Delta D.O._{620}$) (●) que presenta el eluato de la columna de 31 x 2,5 cm. Volumen de las fracciones, 7,4 ml; flujo, 1,6 ml/min.; eluyente, tampón acetato 0,1 M a pH 5,0, con Cl_2Ca 1 mM.

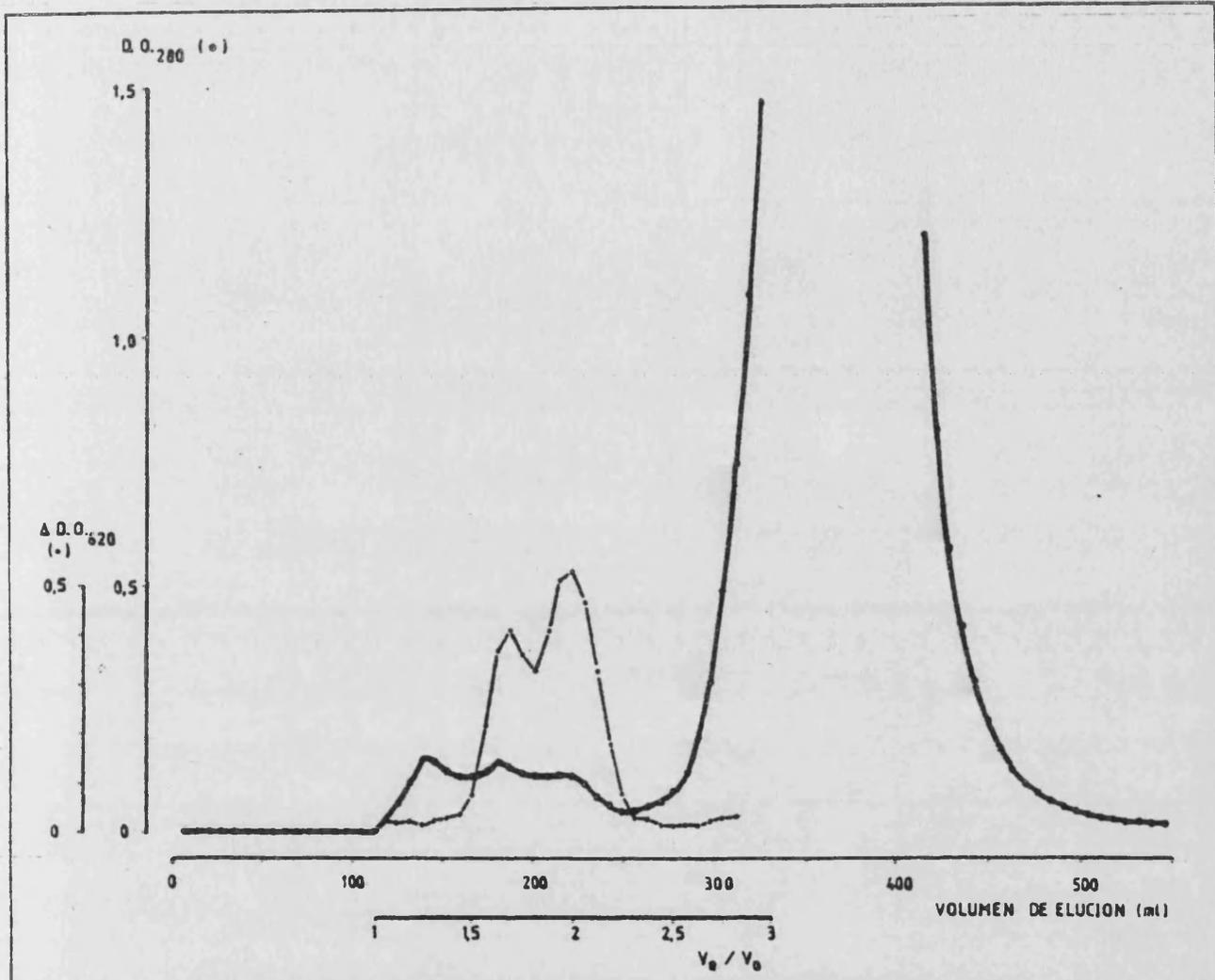


Figura 14.- Absorbancia a 280 nm (o) y actividad amilolítica (Δ D.O.₆₂₀) (●) que presenta el eluato de la columna de 65 x 2,5 cm. Volumen de las fracciones, 6,9 ml; flujo, 0,575 ml/min.; eluyente, tampón acetato 0,1 M a pH 5,0, con Cl₂Ca 1 mM.

La disminución del volumen de cada fracción cromatográfica sí permitió poner de manifiesto la falta de homogeneidad de la fracción enzimática 2, apareciendo hasta 5 subpicos, pero no la de la fracción enzimática 1 en la que sigue observándose un solo pico (figura 15).

III.1.2.2.- CARACTERIZACION DE LAS FRACCIONES ENZIMATICAS.-

Del mismo modo que con el extracto crudo, se realizaron estudios del comportamiento frente a distintos inhibidores de las dos fracciones enzimáticas, con la finalidad de caracterizar su actividad como perteneciente a alfa- o a beta-amilasa. Se llevó a cabo además un estudio de su pH óptimo, realizándose la extracción de las enzimas con agua destilada, - que se utilizó también como eluyente. Las cromatografías se realizaron en una columna de 65 cm de altura y el flujo fue de 0,5 ml/min. Para la consecución de los pH deseados se utilizaron los tres sistemas tampón mencionados en la sección III.1.1.

A.- Fracción enzimática 1.-

En la curva de pH obtenida para la fracción enzimática 1 (figura 16) se observa que en un rango muy amplio de valores de pH no influye éste en la actividad, no encontrándose diferencias significativas (Tabla 6) entre la actividad obtenida de pH 4,0 a pH 6,5. Se observa también que - esta fracción enzimática no es muy afectada por los pH bajos, recuperándose más del 70 % de la actividad máxima a pH 3,0. Para todo el rango de pH estudiado no se encuentran diferencias entre los distintos tampones para el mismo pH, con la única excepción del pH 5,5 entre los tampones citrato-fosfato y tris-maleato.

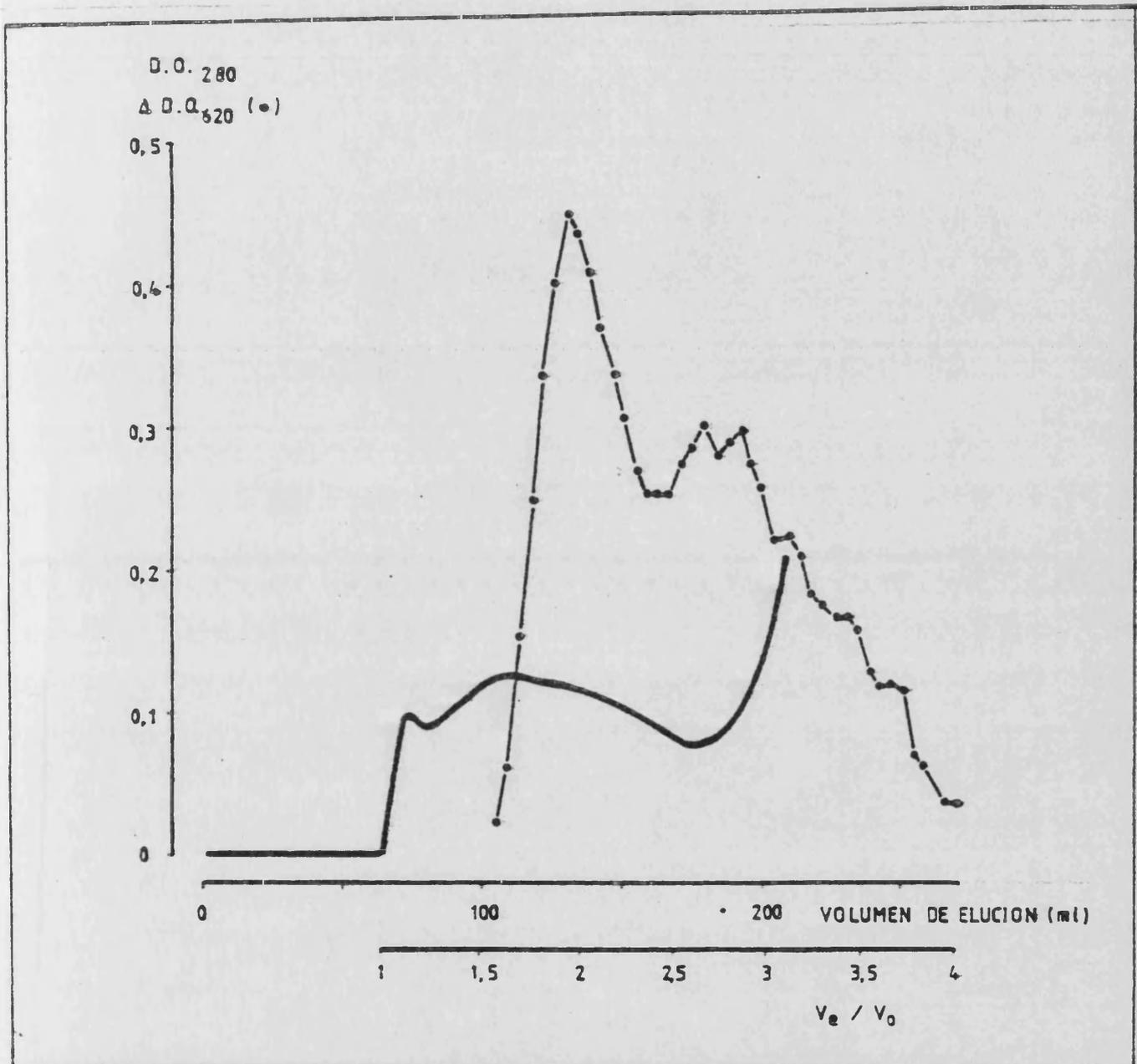


Figura 15.- Absorbancia a 280 nm (trazo grueso) y actividad amilolítica (ΔD_{620}) (●) que presenta el eluato de la columna de 65 x 2,5 cm.

Volumen de las fracciones, 4,4 ml. Elución con tampón acetato 0,1 M a pH 5,0 con Cl_2Ca 1 mM, a un flujo de 0,46 ml/min. Los volúmenes relativos de elución son mayores que en los otros casos debido a un distinto empaquetamiento de la columna.

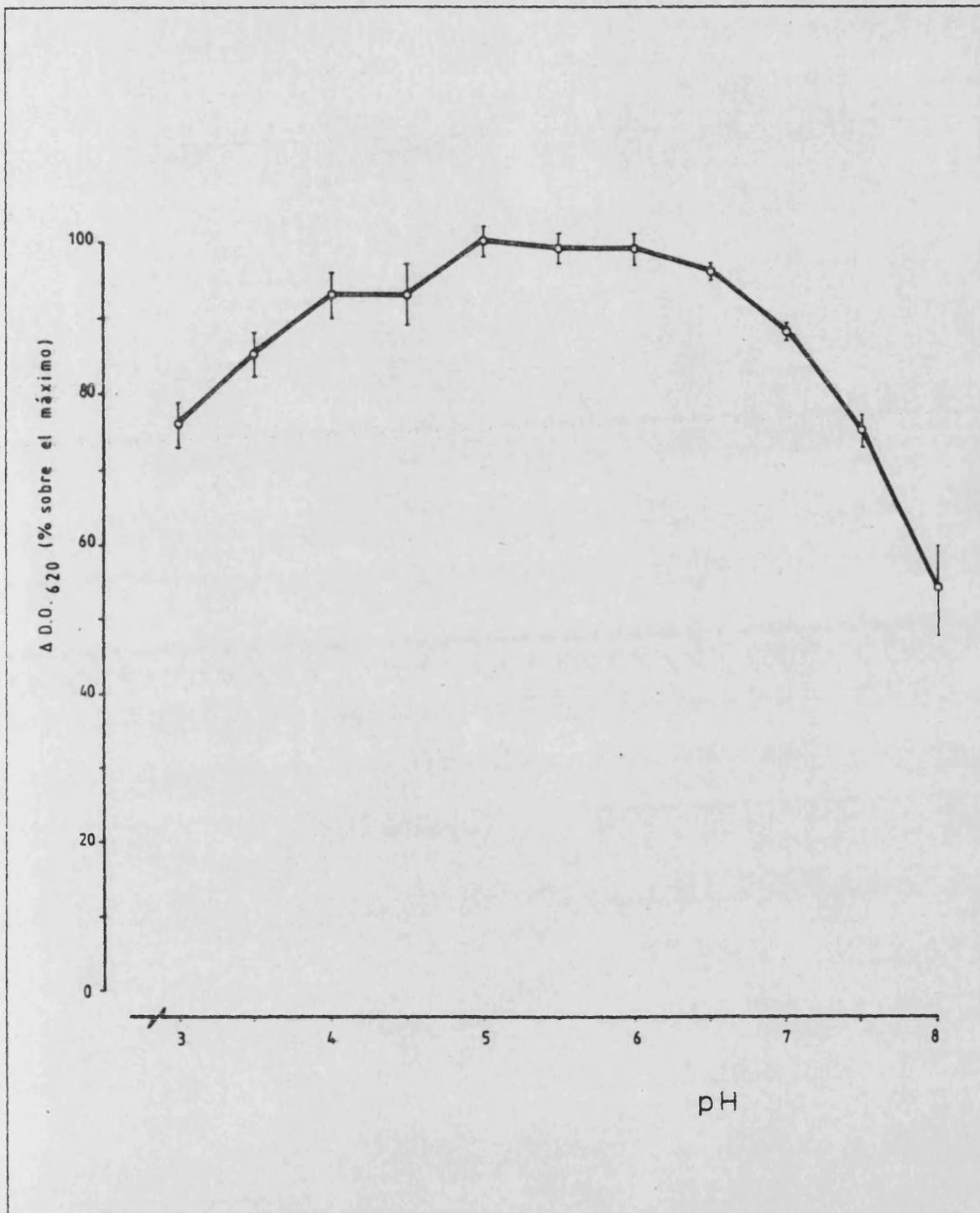


Figura 16.- Curva de pH de la fracción enzimática 1. La curva representa la media de tres repeticiones distintas con cada tampón. Se utilizaron los tampónes acetato, citrato-fosfato y tris-maleato.

Las fracciones cromatográficas elegidas se sometieron a tratamiento con los dos inhibidores específicos utilizados con los extractos crudos: EDTA y Cl_2Hg , a concentraciones finales de 100 mM y 2×10^{-2} mM, respectivamente. Ambos agentes se dejaron en contacto con el extracto durante media hora antes de proceder al análisis de la actividad.

La fracción enzimática 1 es drásticamente inhibida por el Cl_2Hg quedando menos de un 10 % de la actividad original, mientras que el EDTA la afecta muy poco (Tabla 7), recuperándose el 90 % de la actividad inicial. La preincubación del extracto enzimático durante toda la noche con los inhibidores no varía los resultados.

T A B L A 7

	Preincubación, 30 min.	Preincubación, toda la noche
EDTA 100 mM	90 ± 4 *	96,1
Cl_2Hg 2×10^{-2} mM	9 ± 3	6,3

* los datos de esta columna son la media de cinco repeticiones distintas.

La cromatografía de beta-amilasa de cebada comercial (E.C. 3. 2.1.2.; Merck, nº de catálogo 1327) en la misma columna y bajo las mismas condiciones que las realizadas para los extractos de tejido foliar de naranjo (figura 14) permitió comparar los volúmenes de retención respectivos. En la figura 17 están representados los valores de absorbancia a 280 nm del eluato de la cromatografía de la beta-amilasa de cebada; en ella aparecen varios máximos de absorción. De cada uno de ellos se analizó la actividad enzimática de la fracción cromatográfica que presenta mayor absorción a 280 nm, obteniéndose actividad amilolítica únicamente en el primer pico, y siendo los restantes debidos a proteínas contaminantes o bien a productos de degradación. Como puede observarse, la beta-amilasa de cebada tiene un

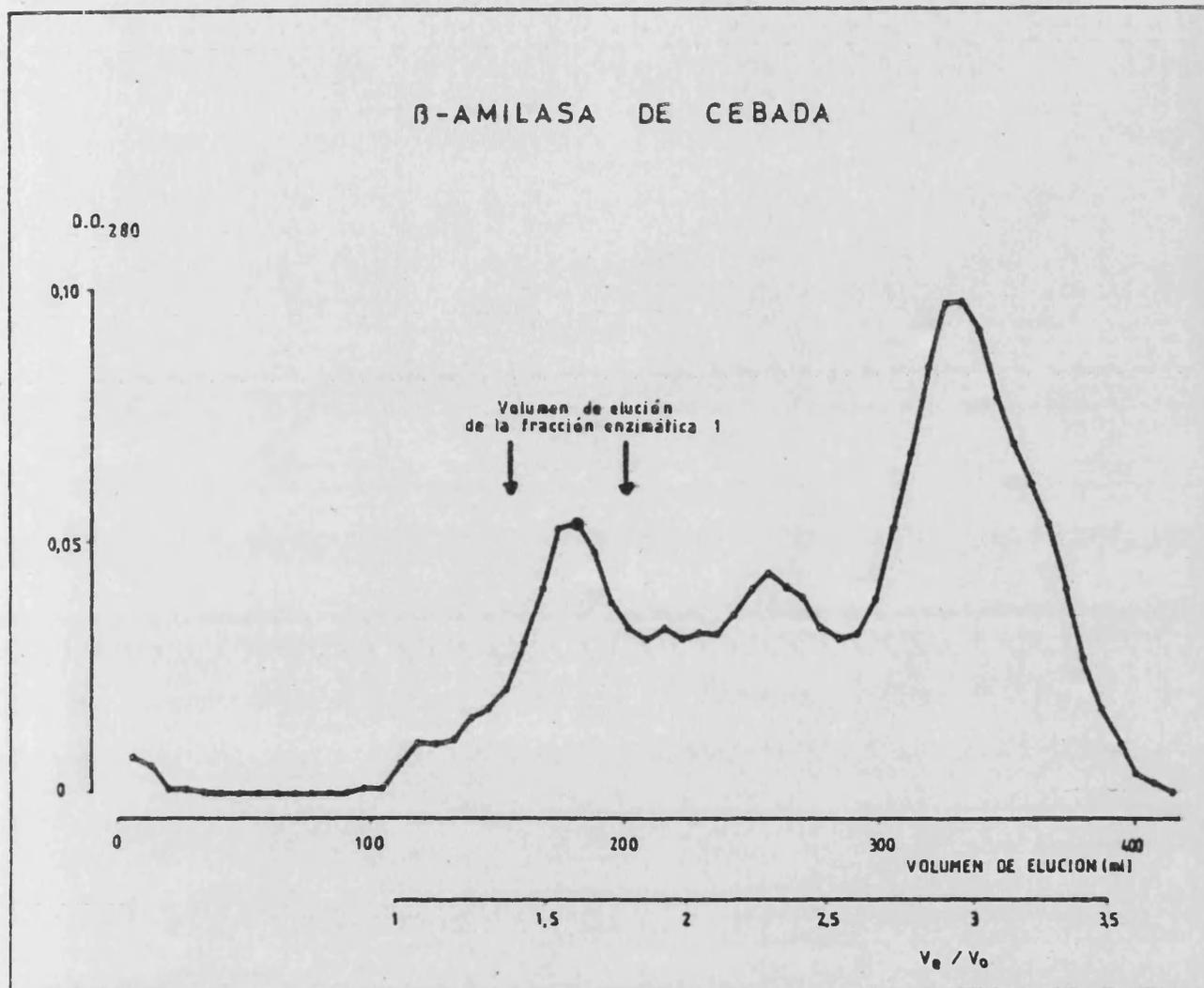


Figura 17.- Absorbancia a 280 nm del eluato de la cromatografía de beta-ami-
lasa de cebada. La fracción que presenta actividad amilolítica se
señala con un círculo. Columna y condiciones iguales a las de la figura 14.

volumen de retención de 175 ml, volumen que se encuentra centrado entre los márgenes obtenidos para la fracción enzimática 1 de los extractos de naranjo y que se indican en la figura.

B.- Fracción enzimática 2.-

El rango de pH en el que la actividad de la fracción enzimática 2 no se ve influenciada por éste es igual de amplio que para la fracción enzimática 1, aunque se encuentra desplazado media unidad hacia la región más alcalina (4,5-7,0) (Figura 18). La principal diferencia con la fracción enzimática 1 se encuentra en su comportamiento frente a los pH más ácidos ensayados puesto que la actividad de la fracción 2 está fuertemente influenciada por los pH 3 y 3,5. A pH 3,0 la actividad es inferior al 20 % del máximo, y a pH 3,5 es inferior al 25 %. Por el contrario, las dos fracciones enzimáticas no presentan diferencias de actividad entre sí a los pH básicos. Al igual que en la fracción enzimática 1, no se encuentran diferencias entre los distintos tampones a los mismos pH (Tabla 8).

La actividad de esta fracción enzimática está fuertemente influenciada por el EDTA 100 mM, aunque el porcentaje de inhibición es variable según los experimentos. Existe también un claro efecto del Cl_2Hg sobre su actividad que produce una inactivación parcial de alrededor del 50 % en las condiciones de experimentación. Cuando la preincubación se alargó toda la noche, la actividad en presencia de Cl_2Hg disminuyó drásticamente, quedando menos de un 10 % de la actividad original. (Tabla 9).

T A B L A 9

	<u>Preincubación, 30 min.</u>	<u>Preincubación, toda la noche</u>
EDTA 100 mM	23 ± 8 *	15,5
Cl_2Hg 2 x 10 ⁻² mM	47 ± 4	6,0

* los datos de esta columna son la media de cinco repeticiones distintas.

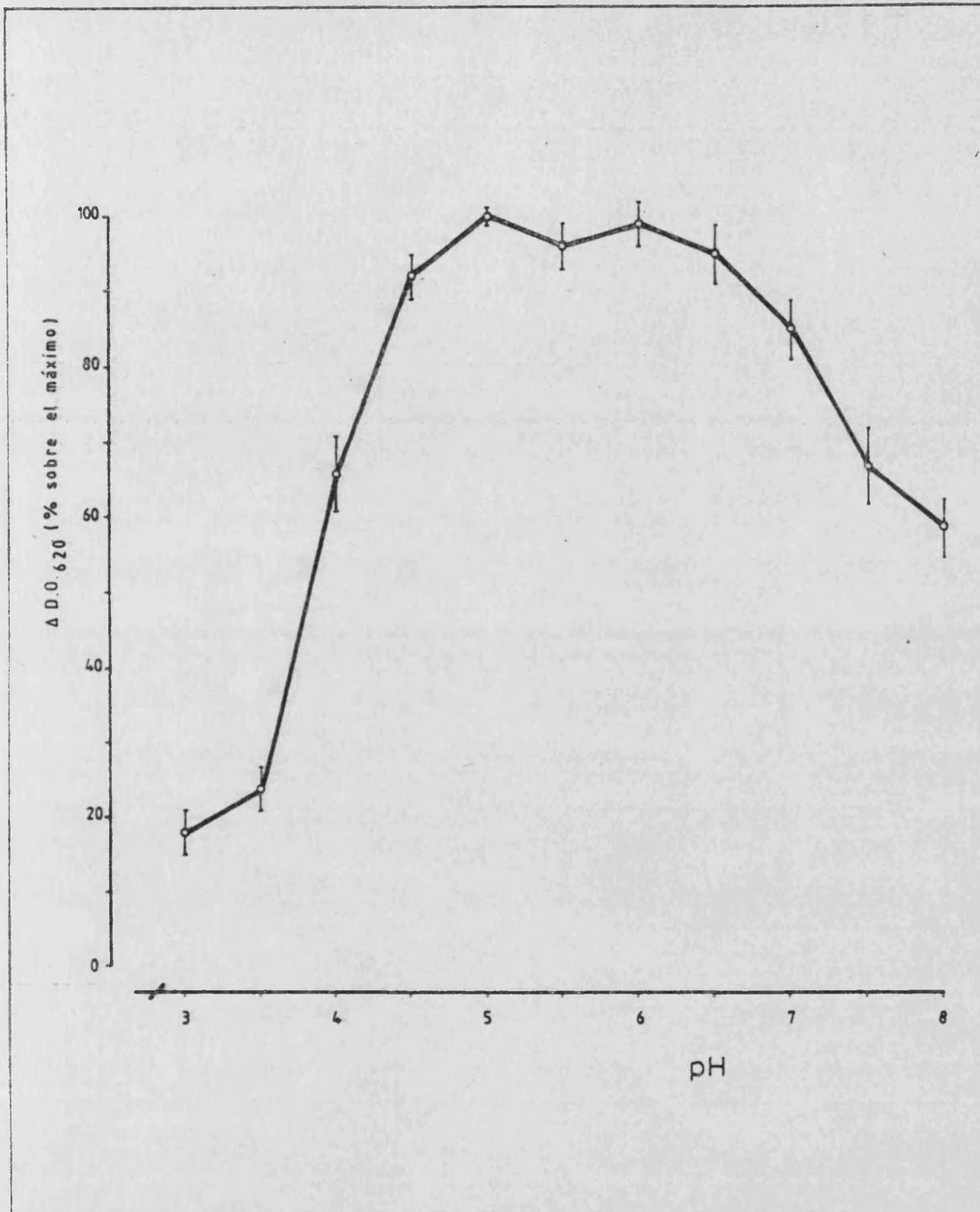


Figura 18.- Curva de pH de la fracción enzimática 2. La curva representa la media de dos repeticiones distintas con cada tampón. Se utilizaron los tampones acetato, citrato-fosfato y tris-maleato.

En la cromatografía de alfa-amilasa de Bacillus subtilis (E.C. 3.2.1.1.; Merck nº de catálogo 1329) en las mismas condiciones que las demás cromatografías realizadas (figura 19) aparecen dos picos de proteínas, detectándose actividad amilolítica únicamente en el primero. El volumen de retención de esta proteína es de 205 ml, lo que indica un ligero desplazamiento respecto a la fracción enzimática 2 de los extractos de naranjo. Hay que señalar a este respecto, que según Fischer et al. (1960), la alfa-amilasa de B. subtilis tiene un peso molecular de 100.000 daltons, valor superior a los pesos moleculares de las alfa-amilasas de otros orígenes, que oscilan entre 45.000 y 60.000 daltons.

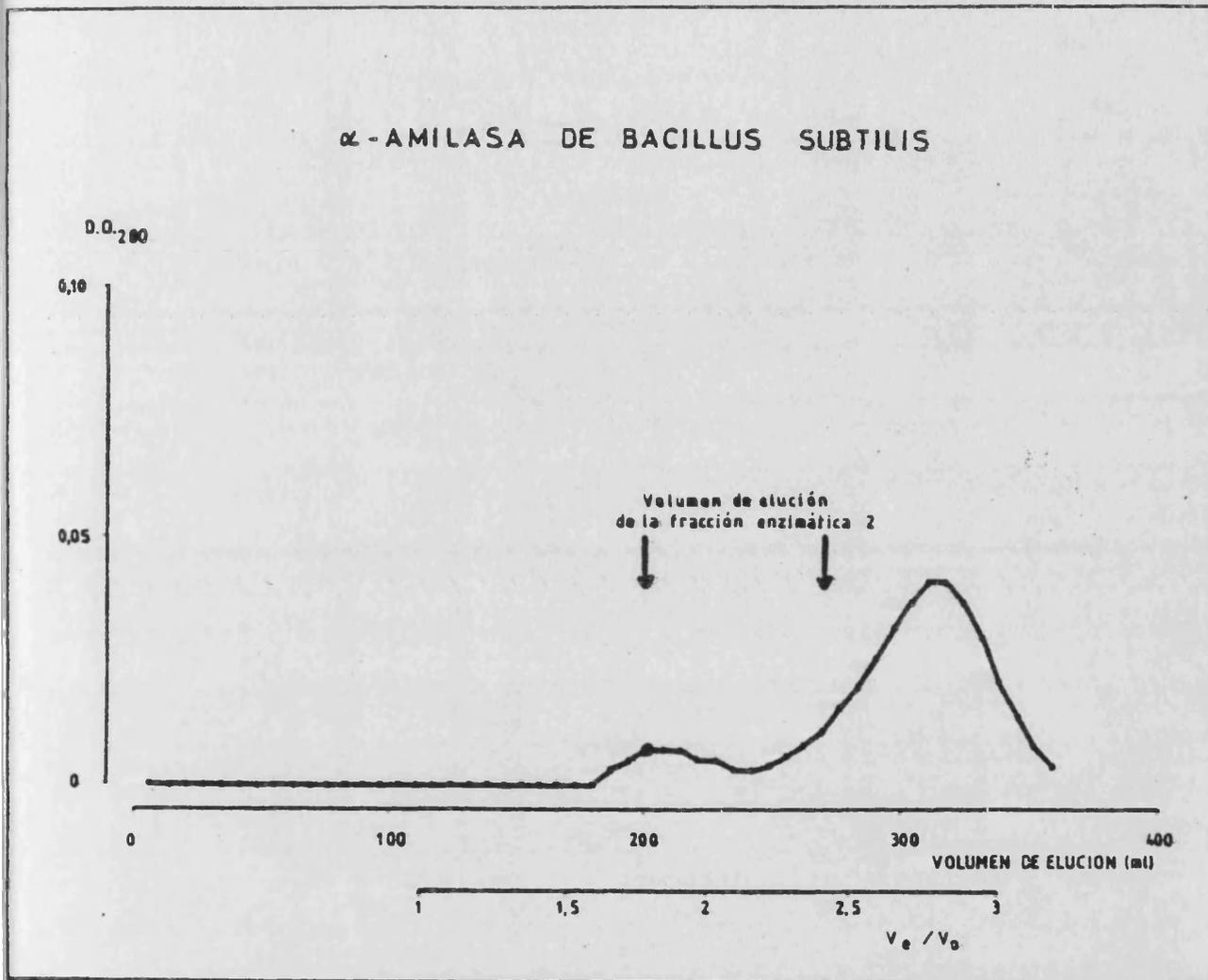


Figura 19.- Absorbancia a 280 nm del eluato de la cromatografía de α -amila-
sa de Bacillus subtilis. La fracción que presenta actividad ami-
lolítica se señala con un círculo. Columna y condiciones iguales a las de la
figura 14.

III.1.3.- ENZIMAS SEPARADAS POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.-

III.1.3.1.- SEPARACION DE LAS ENZIMAS.-

La electroforesis en geles de poliacrilamida permitió la separación a partir de extractos crudos de dos zonas de actividad enzimática. Los límites de estas dos zonas de actividad están bien definidos, llegando a producirse una separación en bandas que en ocasiones no es completa, lo que impide realizar el estudio de las características de cada banda.

La incorporación del sustrato de la reacción enzimática a los geles previamente a la separación electroforética mejoró notablemente la resolución obtenida, reduciendo la movilidad relativa de las enzimas, mejorando la nitidez de las bandas y permitiendo la detección de bandas adicionales en algunos extractos. Los resultados obtenidos son mejores cuando se incorpora amilopectina azure a una concentración final de 0,25 % que con almidón soluble, por lo que la mayor parte del trabajo se realizó en aquellas condiciones.

El número total de bandas separadas es de 13, que se numeran en el texto correlativamente según su movilidad relativa y siendo la número 1 la más cercana al origen. Su detección depende críticamente de la cantidad de extracto introducido en el gel así como de su actividad específica y las condiciones de incubación. Debido a las diferencias notables de actividad, la demostración simultánea de todas ellas no es posible ya que las condiciones adecuadas para las más intensas no permiten la visualización de las menos activas, que exigen tiempos de incubación con el sustrato muy superiores y provocan la difusión excesiva de las anteriores (figura 20). Seis de estas bandas, de gran intensidad, se encuentran invariablemente en to-

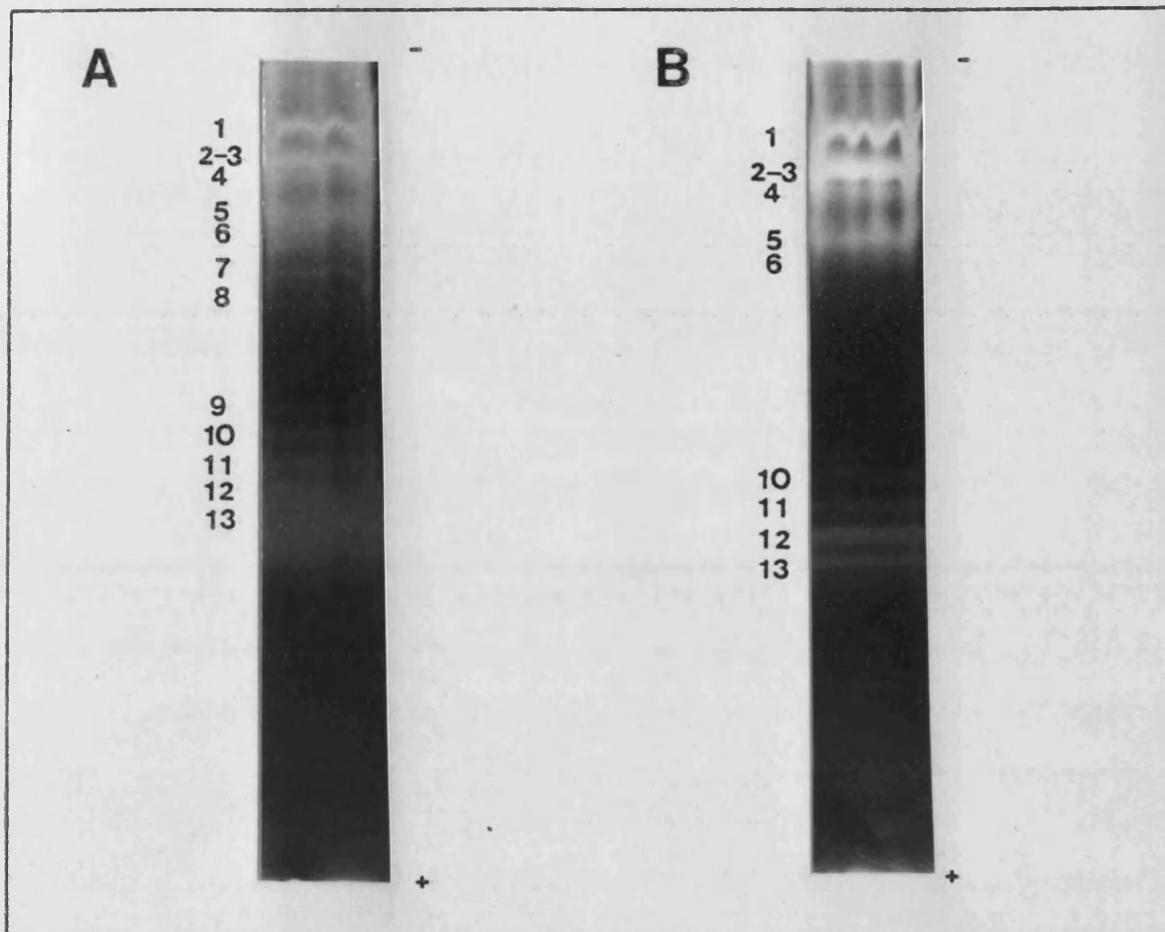


Figura 20.- Electroforegramas de extractos crudos de hojas adultas en gel de poliacrilamida con amilopectina azure 0,25 % como sustrato incorporado al gel. Extractos enzimáticos obtenidos con tampón acetato 0,1 M, pH 5,0, con Cl_2Ca 1 mM. Geles incubados durante 2 horas en tampón de extracción, a 30 °C. A.- Actividad del extracto: 0,053 ud. / cm^2 x min. B.- Actividad del extracto: 0,022 ud. / cm^2 x min.

dos los extractos (números 1, 2-3, 5, 12 y 13). Junto a éstas hay otras bandas menos intensas pero que también se encuentran en todos los electroforegramas (números 4, 10 y 11). Las bandas 6, 7, 8 y 9 sólo se detectan ocasionalmente.

Según su movilidad electroforética se distinguen dos grupos de bandas. Las de menor movilidad son 8, de las cuales hay tres principales: a) la número 1, que se presenta siempre con ondulaciones típicas; b) en segundo lugar aparecen siempre dos bandas muy próximas (números 2 y 3), que en ocasiones resulta difícil delimitar entre sí, y c) la número 5, que es la banda más ancha. Además de éstas se encuentran cuatro bandas más en esta zona del gel: en primer lugar la banda número 4 que se encuentra en prácticamente todas las electroforesis y se trata de una banda difusa - con límites menos claros que las mencionadas anteriormente. Lo mismo puede decirse de la banda número 6 salvo que ésta no se encuentra siempre. Respecto a las dos restantes (números 7 y 8), se trata de bandas muy estrechas que se han detectado únicamente en electroforesis en geles con amilopectina, principalmente en extractos de hojas jóvenes.

El grupo de bandas de mayor movilidad está formado por cinco, observándose dos principales (números 12 y 13), dos de menor actividad - (números 10 y 11) y una última banda (número 9) de actividad mucho menor y que, a diferencia de las otras cuatro, no se detecta en todas las electroforesis. Tanto estas cinco bandas como las números 7 y 8 degradan la amilopectina azure dejando un color residual en el gel, a diferencia de las - otras seis bandas, que degradan el sustrato totalmente, por lo que aparecen bandas blancas sin color residual.

En la tabla 10 se presentan los r_f medidos así como los errores estándar correspondientes, en buena parte debidos a diferencias en actividad. Si bien el modelo de separación no cambia, la menor actividad del

extracto produce una ligera variación en la localización de las bandas, obteniéndose R_f mayores para los extractos de mayor actividad. Los R_f calculados para electroforesis con almidón como sustrato son mayores que los correspondientes a amilopectina; la equivalencia de las bandas en los dos sustratos se obtiene fácilmente por comparación de los distintos electroforegramas.

La precipitación fraccionada de los extractos con sulfato amónico no permite separar las distintas bandas o grupos de bandas en fracciones determinadas, si bien se observa una intensificación de las bandas de menor movilidad en la fracción proteica que precipita entre el 25 y el 45 % de saturación y de las de mayor movilidad con las que precipitan del 45 al 60 % (figuras 21 y 22).

III.1.3.2.- CARACTERIZACION DE LAS BANDAS DE ACTIVIDAD AMIOLITICA.-

A.- Inactivación por inhibidores selectivos.-

La caracterización de la actividad de las distintas bandas se llevó a cabo, al igual que con los extractos crudos y las fracciones cromatográficas, por medio de inactivaciones específicas con las mismas concentraciones de inactivador, aunque la preincubación se prolongó toda la noche. El estudio se realizó con extractos proteicos fraccionados con el fin de aumentar la actividad específica. La fracción precipitada entre 25 y 45 % de saturación se utilizó para la caracterización de las bandas de menor movilidad y la que precipita entre 45 y 60 % para las de mayor movilidad.

La preincubación de los extractos con EDTA 100 mM dió como resultado la desaparición de las bandas numeradas del 2 al 6, produciéndose una disminución muy importante de la banda número 1 de la que sólo queda un rastro tenue (figuras 23, 24 y 25, geles con almidón y figuras 26, 27 y

28, geles con amilopectina). Las bandas 10 a 13 no se ven afectadas por este tratamiento, permaneciendo inalteradas.

El tratamiento de los extractos con Cl_2Hg 2×10^{-2} mM produce la desaparición de las bandas 10 a 13, provocando además una disminución de la intensidad de las seis primeras.

Por último, el calentamiento de los extractos durante 15 minutos a 70°C en presencia de Cl_2Ca 19 mM y a pH 7,4 (tampón tris-ClH' 0,025 M) produce la disminución de la actividad de las bandas 1 a 6 mientras que desaparecen totalmente las restantes, con excepción de la número 12 que mantiene una pequeña actividad que se ve prácticamente eliminada cuando el extracto calentado se dializa toda la noche frente a tampón tris-ClH 0,0125 M a pH 7,4 (figura 29).

B.- Electroforesis de las fracciones cromatográficas.-

En las electroforesis de la fracción enzimática 1 de la cromatografía se observa la aparición de las bandas de mayor movilidad y en ocasiones se detecta un resto de las bandas números 1 y 2-3, debido a la existencia de solapamientos entre los dos picos cromatográficos (figuras 30 y 31).

Las inactivaciones específicas de la actividad amilolítica de las bandas correspondientes a esta fracción enzimática ponen de manifiesto en la electroforesis con almidón en el gel que el comportamiento de las mismas es idéntico al encontrado en las electroforesis de extractos crudos, no siendo afectadas por el EDTA mientras que son totalmente inhibidas por el Cl_2Hg (figura 32).

En las electroforesis de la fracción enzimática 2 se observan también los dos grupos de bandas, aunque se visualizan preferentemente las

de menor movilidad (figuras 30 y 31). Estas bandas desaparecen de forma casi total con EDTA, quedando un resto de la número 1 y siendo afectadas en menor medida por el Cl_2Hg (figura 33).

T A B L A 10

rf de las bandas de actividad amilolítica en electroforegramas con amilopectina o con almidón incorporado al gel como sustrato.

Banda	Amilopectina	Almidón
1	0,078 ± 0,003	0,130 ± 0,013
2-3	0,125 ± 0,002	0,170 ± 0,013
4	0,159 ± 0,003	0,179 ± 0,008
5	0,206 ± 0,004	0,230 ± 0,013
6	0,240 ± 0,009	
7	0,300 ± 0,013	
8	0,33 ± 0,03	
9	0,44 ± 0,04	
10	0,500 ± 0,008	0,55 ± 0,02
11	0,530 ± 0,008	0,59 ± 0,02
12	0,570 ± 0,008	0,630 ± 0,004
13	0,610 ± 0,010	0,67 ± 0,02

Figura 21.- Electroforegramas y densitogramas de las fracciones proteicas que precipitan entre el 25 y 45 % y entre 45 y 60 % de saturación con sulfato amónico. Gel con almidón soluble 0,5 % incorporado al gel como sustrato.

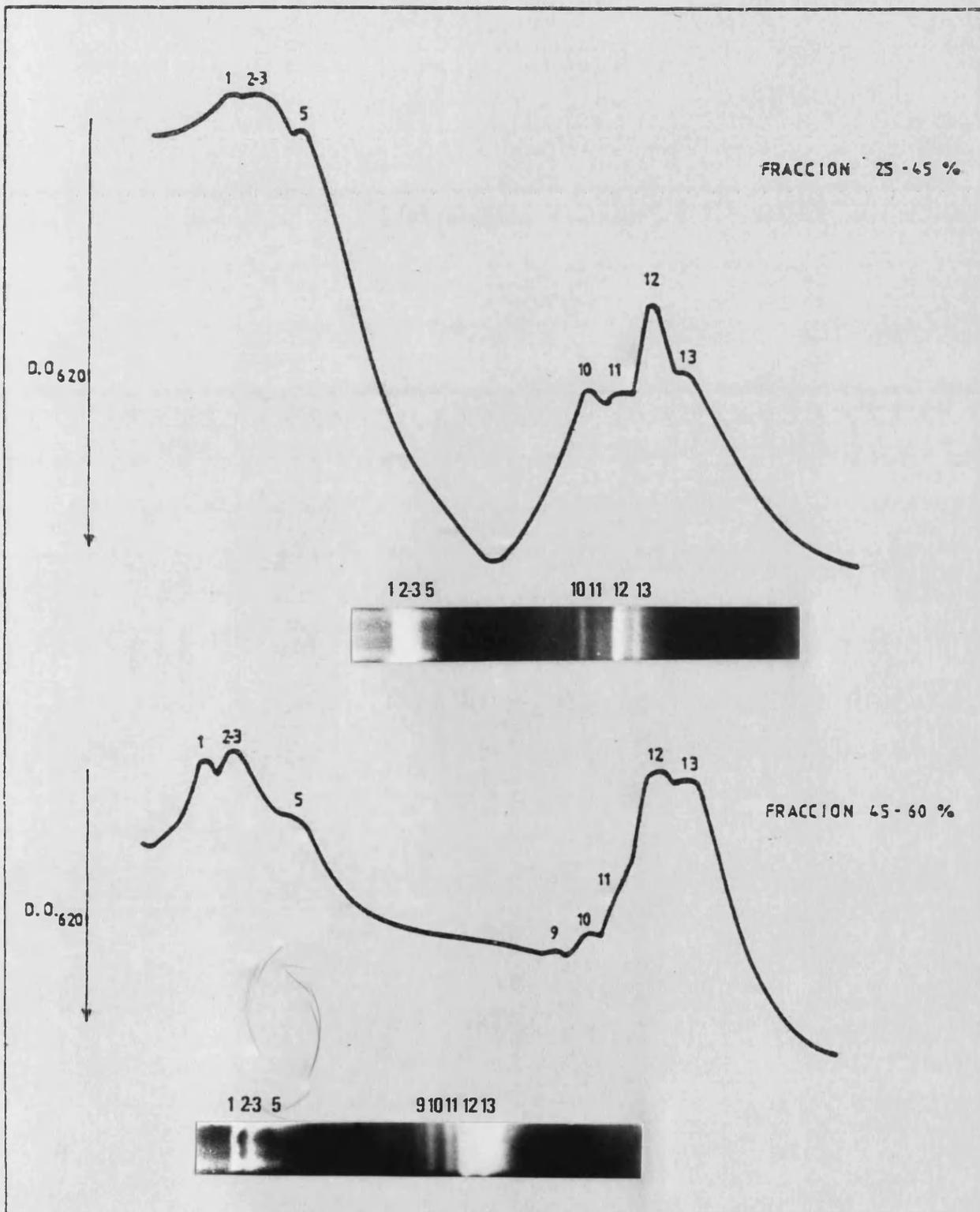
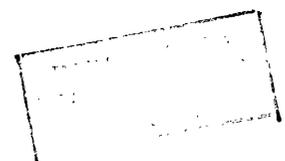


Figura 22.- Electroforegramas y densitogramas de las fracciones proteicas que precipitan entre 25 y 45 % y entre 45 y 60 % de saturación con sulfato amónico. Gel con amilopectina azure 0,25 % incorporado como sustrato.



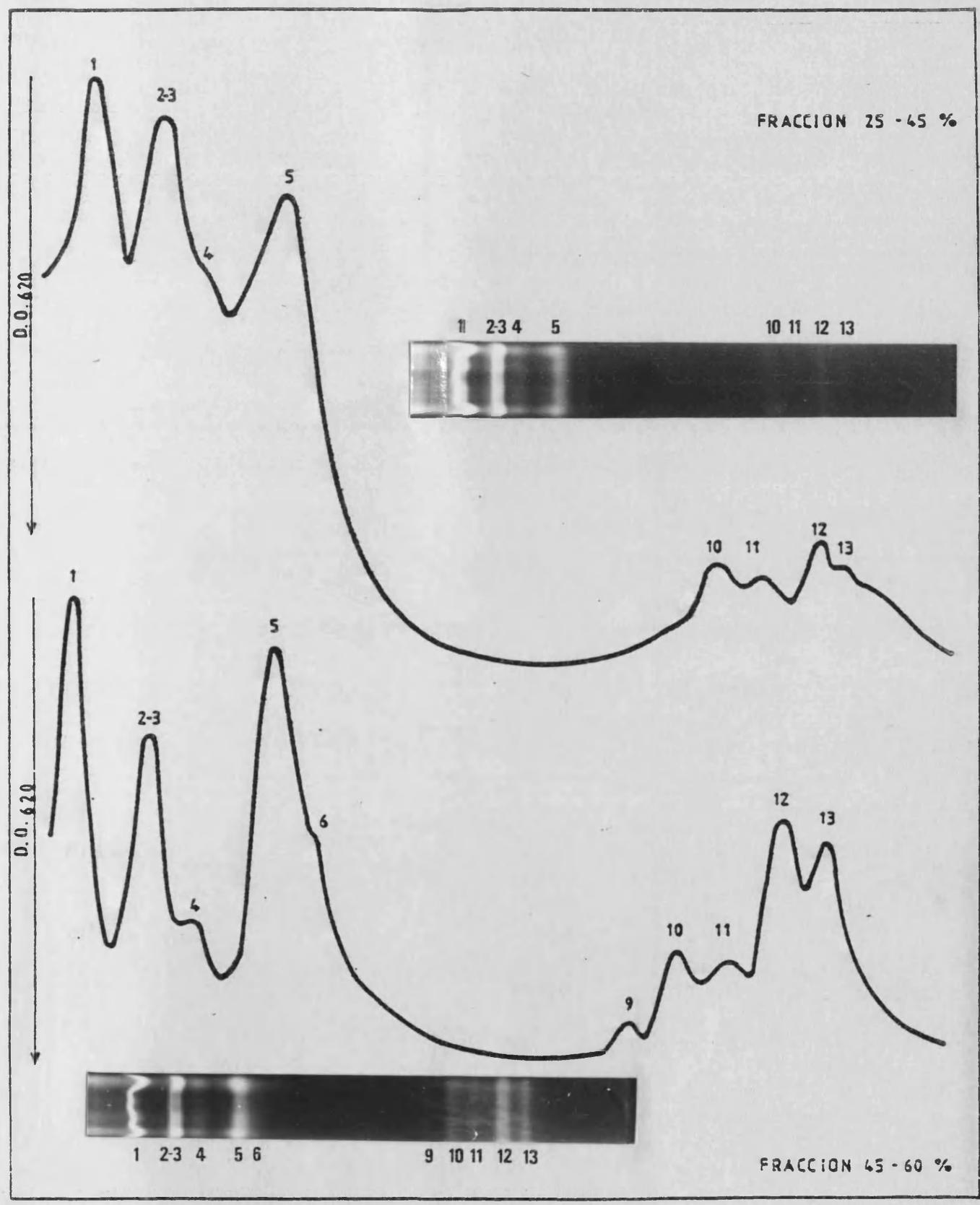


Figura 23.- Electroforegramas y densitogramas de las fracciones proteicas que precipitan entre 25 y 45 % y entre 45 y 60 % de saturación con sulfato amónico. Gel con almidón soluble 0,5 % como sustrato.

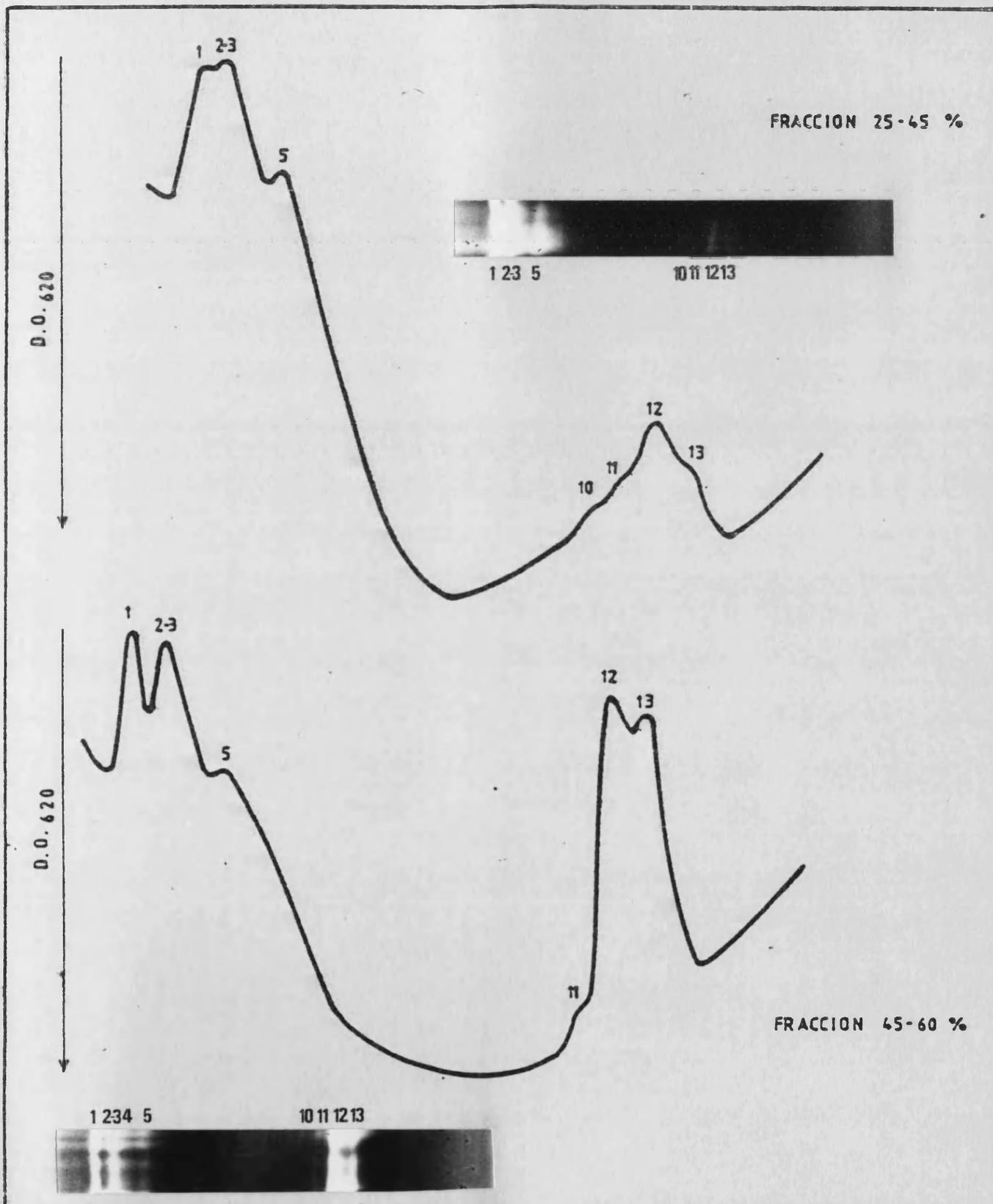


Figura 24.- Electroforegramas y densitogramas de la fracción 25-45%, inactivada con EDTA 100 mM y con Cl_2Hg 2×10^{-2} mM. Gel con almidón soluble 0,5 % como sustrato.

INACTIVACIONES DE LA FRACCION 25-45 %

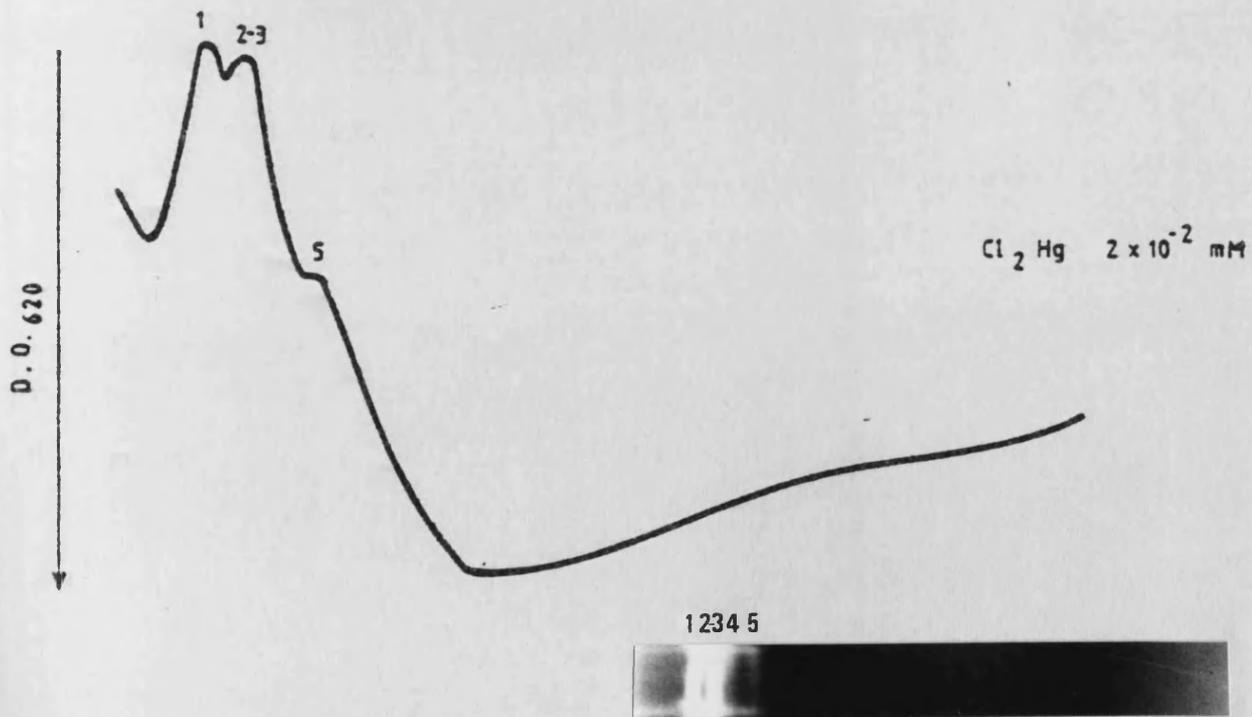
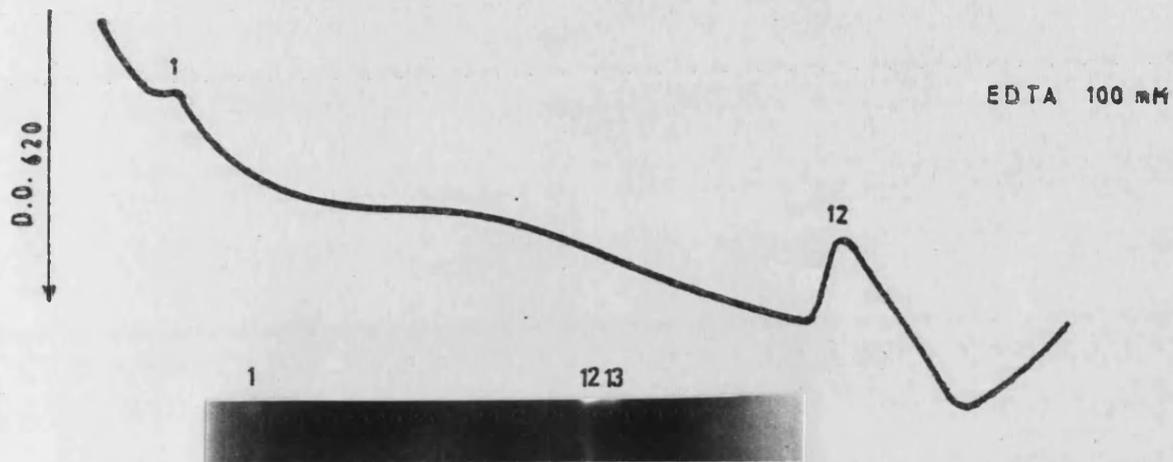


Figura 25.- Electroforegramas y densitogramas de la fracción 45-60 %, inactivada con EDTA 100 mM y con Cl_2Hg 2×10^{-2} mM. Gel con almidón soluble 0,5 % como sustrato.

INACTIVACIONES DE LA FRACCION 45 - 60 %

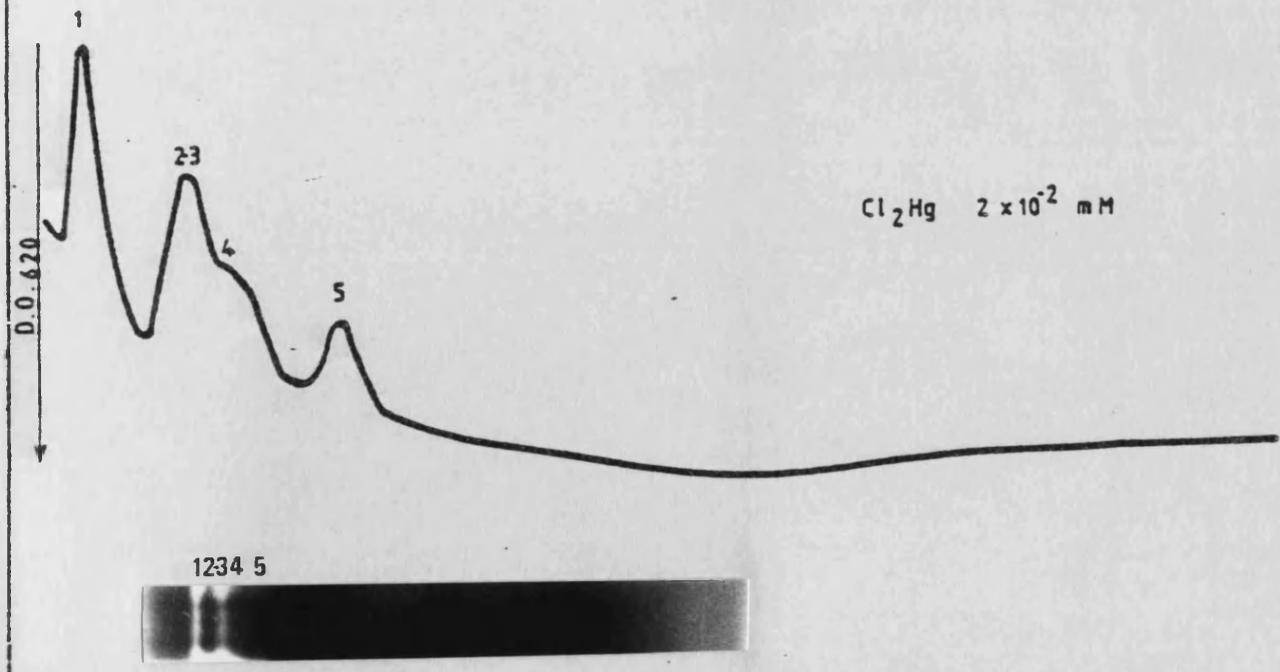
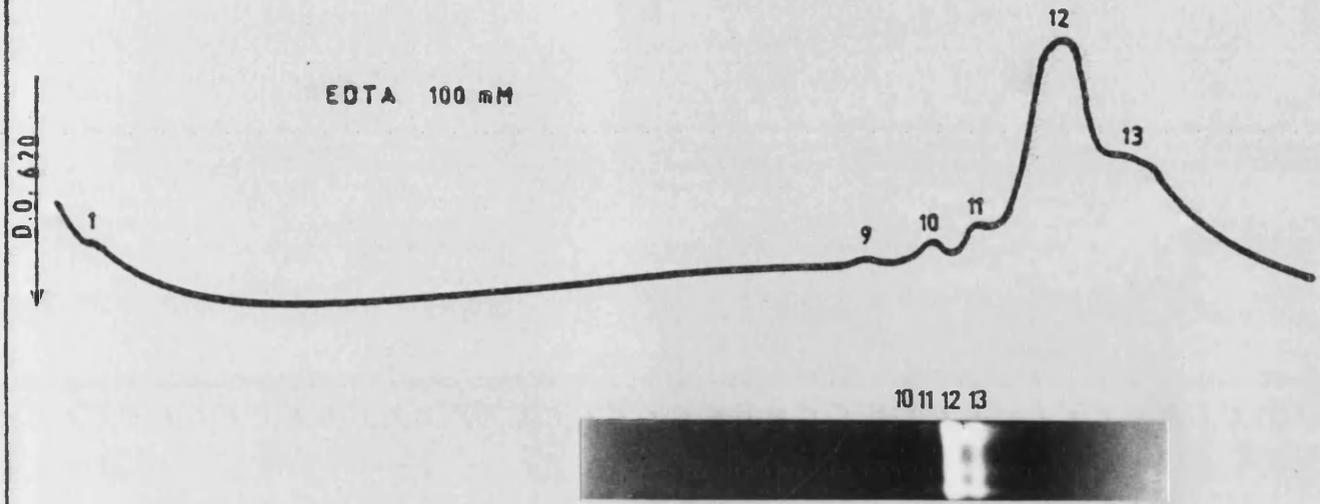
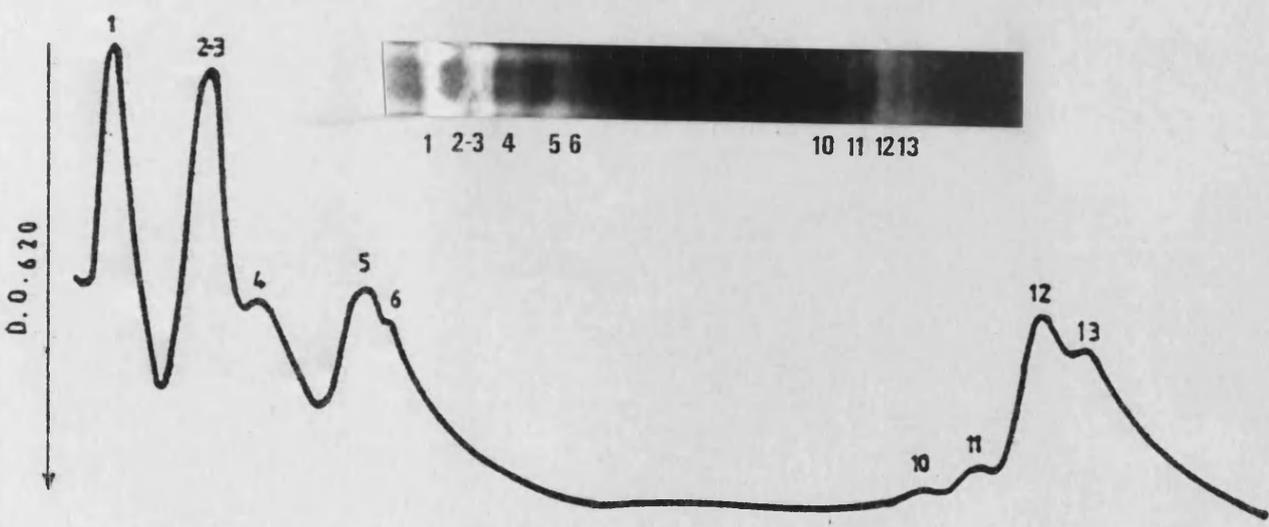
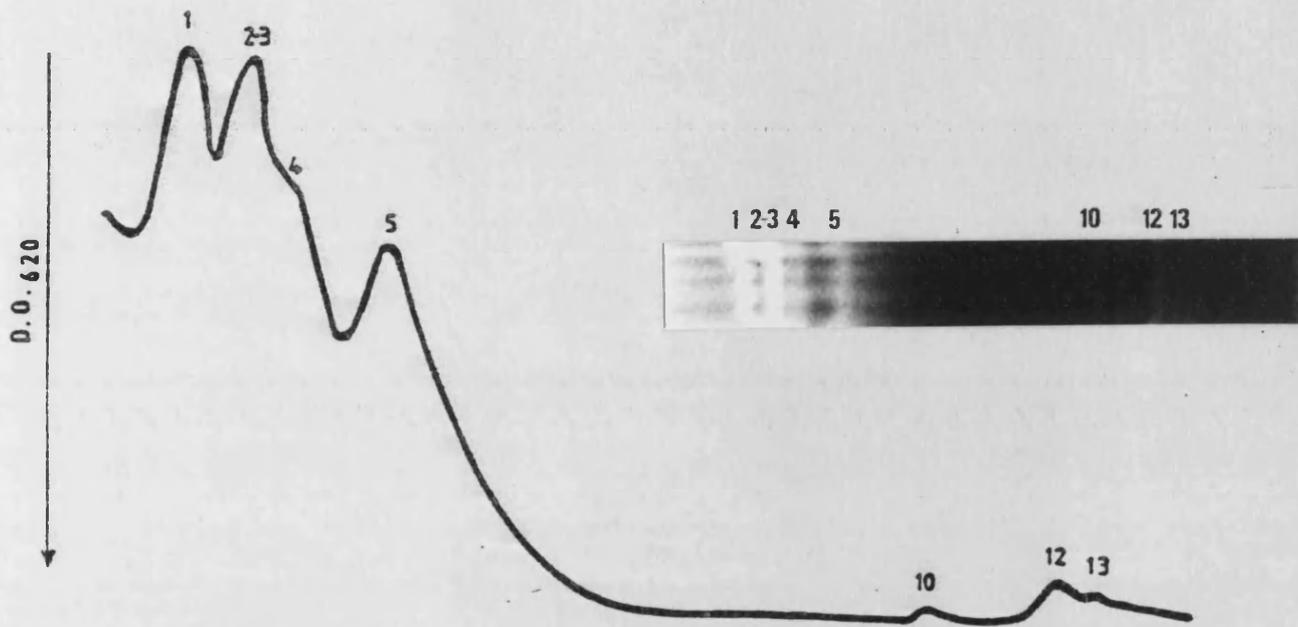


Figura 26.- Electroforegramas y densitogramas de las fracciones proteicas que precipitan entre 25 y 45 % y entre 45 y 60 % de saturación con sulfato amónico. Gel con amilopectina azure 0,25 % como sustrato.

FRACCION 25-45 %



FRACCION 45 - 60 %

Figura 27.- Electroforegramas y densitogramas de la fracción 25-45 %, inactivada con EDTA 100 mM y con Cl_2Hg 2×10^{-2} mM. Gel con amilopectina azure 0,25 % como sustrato.

INACTIVACIONES DE LA FRACCION 25 - 45 %

EDTA 100 mM

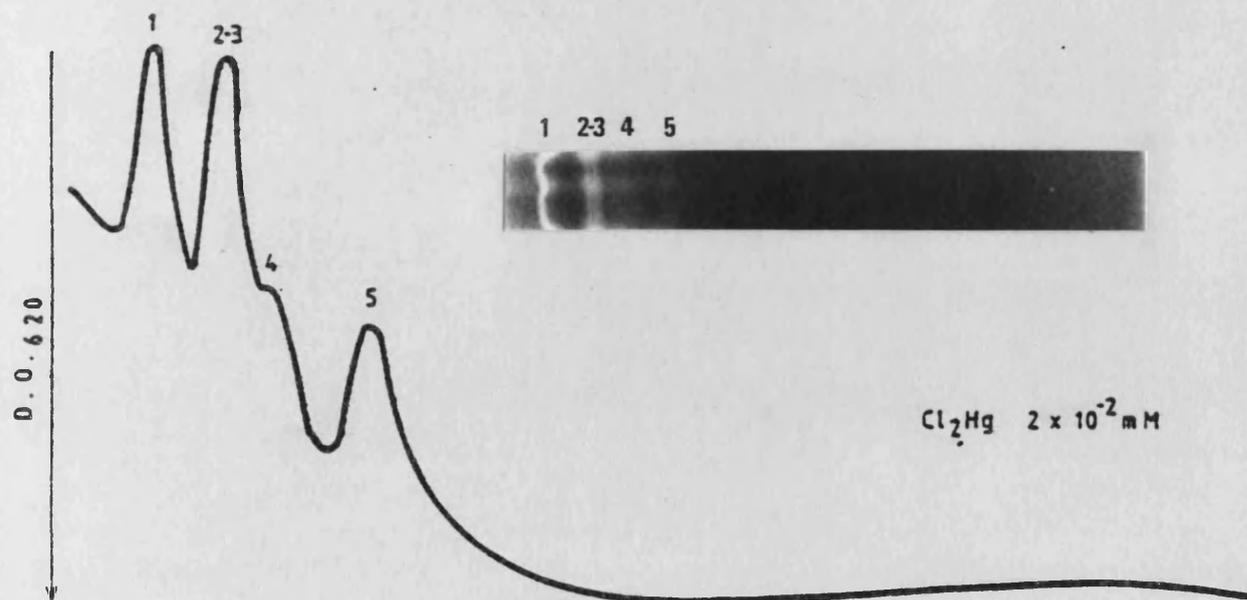
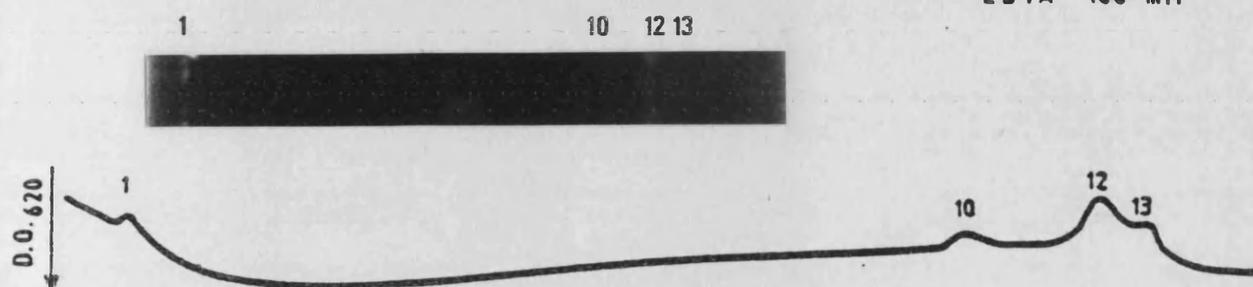
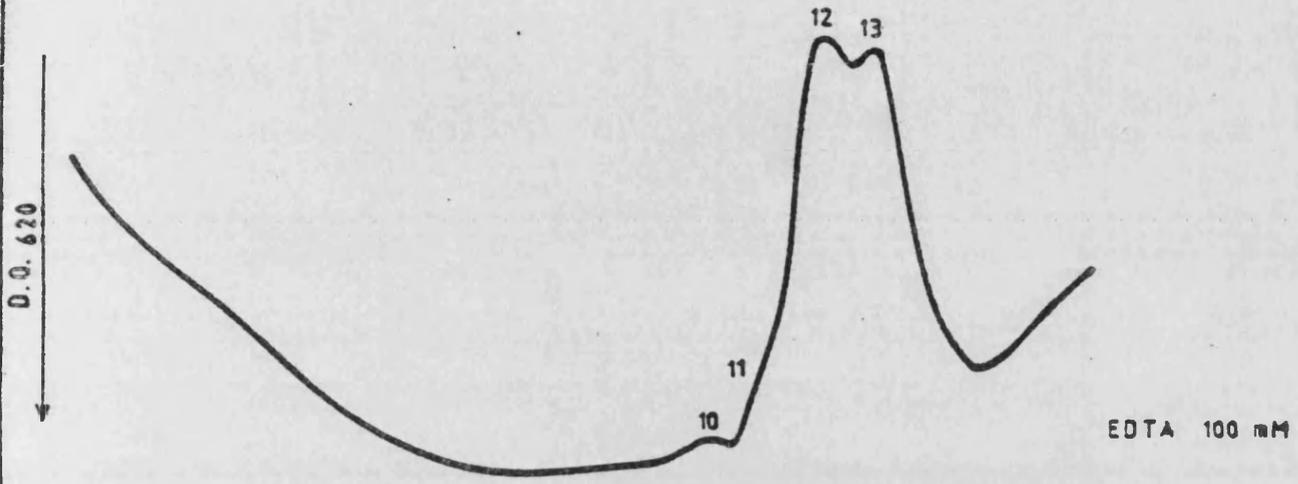
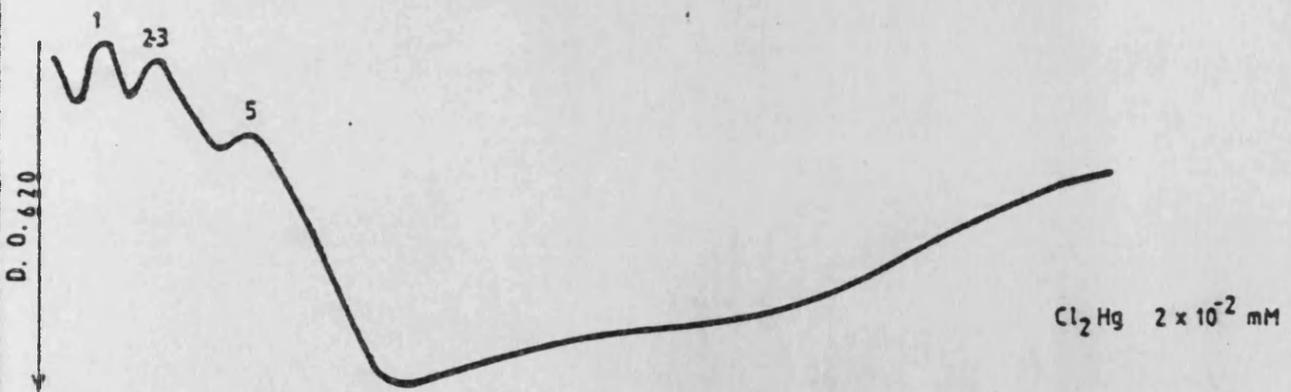


Figura 28.- Electroforegramas y densitogramas de la fracción 45-60 %, inactivada con EDTA 100 mM y con Cl_2Hg 2×10^{-2} mM. Gel con amilopectina azure 0,25 % como sustrato.

INACTIVACIONES DE LA FRACCION 45 - 60 %



10 11 12 13



1 2 3 4 5

Figura 29.- Electroforegramas y densitogramas de un extracto proteico precipitado al 100 % de saturación con sulfato amónico. Gel con amilopectina azure 0,25 % como sustrato.

A.- Extracto crudo.

B.- Extracto calentado a 70 °C durante 15 minutos.

C.- Extracto calentado y dializado frente a tampón tris-Cl.

INACTIVACION TERMICA

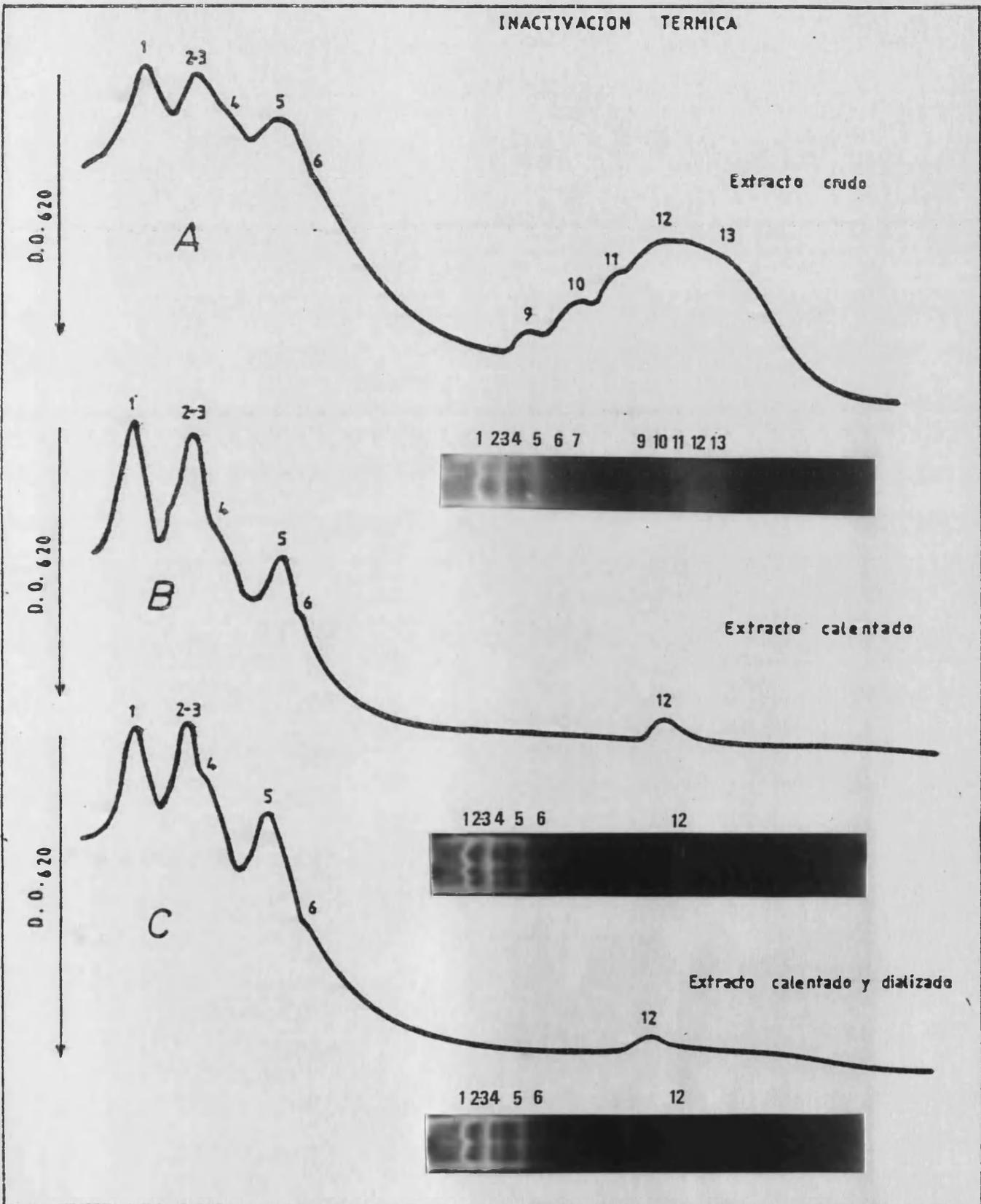


Figura 30.- Electroforegramas y densitogramas de las fracciones enzimáticas separadas por cromatografía, en gel con amilopectina azure 0,25 % como sustrato.

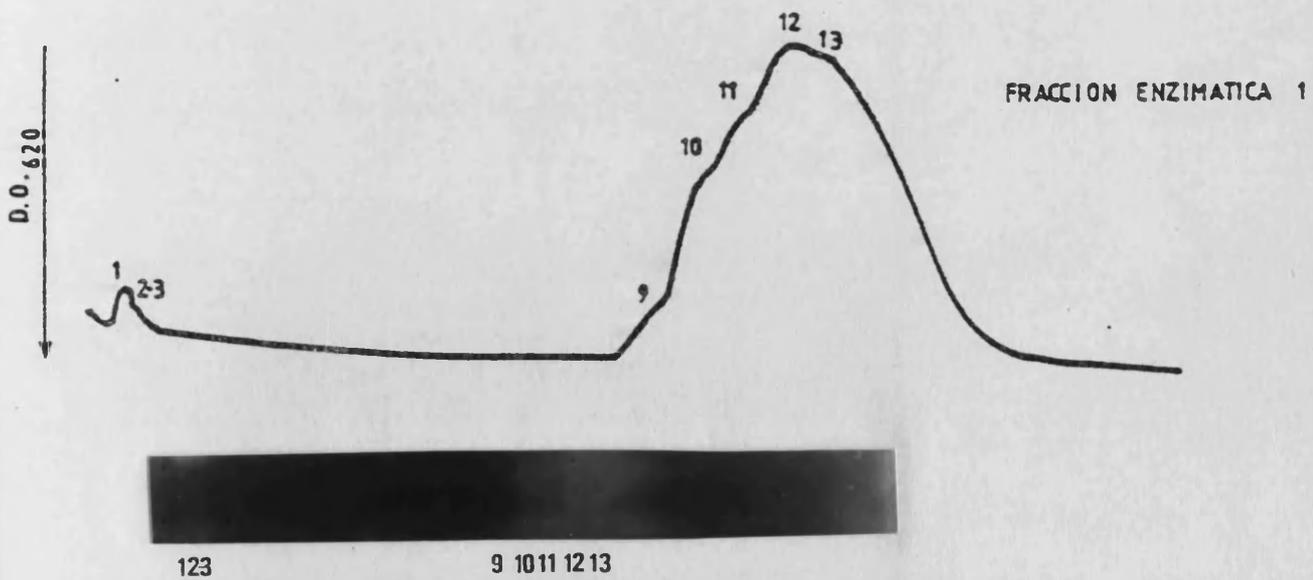
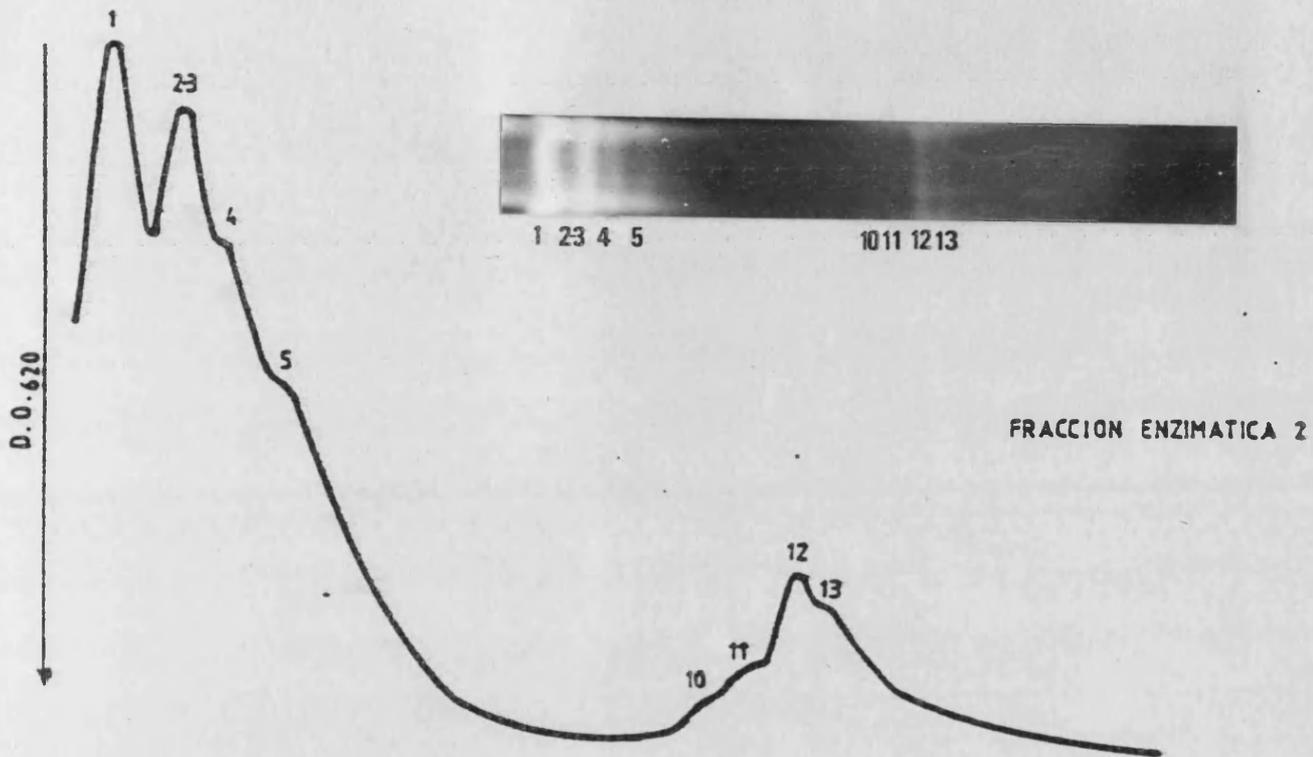
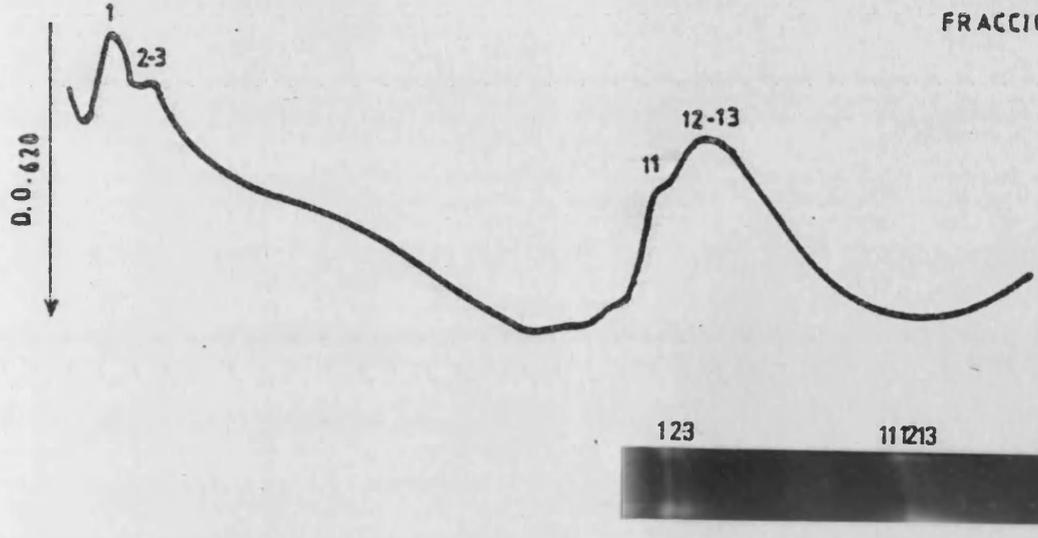


Figura 31.- Electroforegramas y densitogramas de las fracciones enzimáticas separadas por cromatografía, en gel con almidón soluble 0,5 % como sustrato.

FRACCION ENZIMATICA 2



FRACCION ENZIMATICA 1

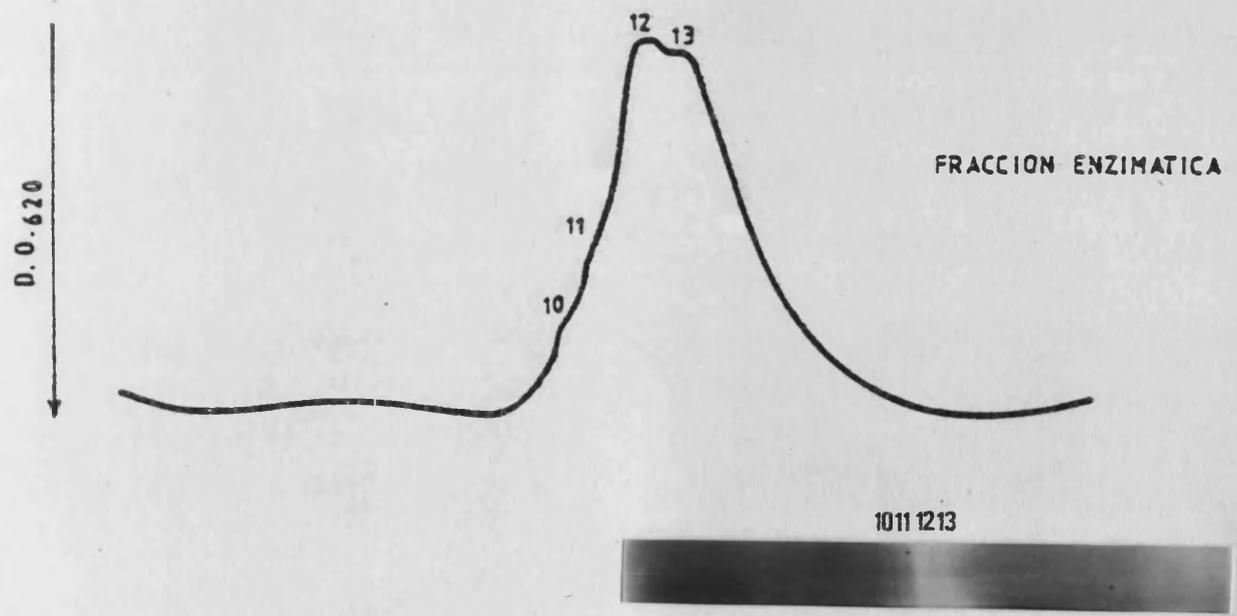
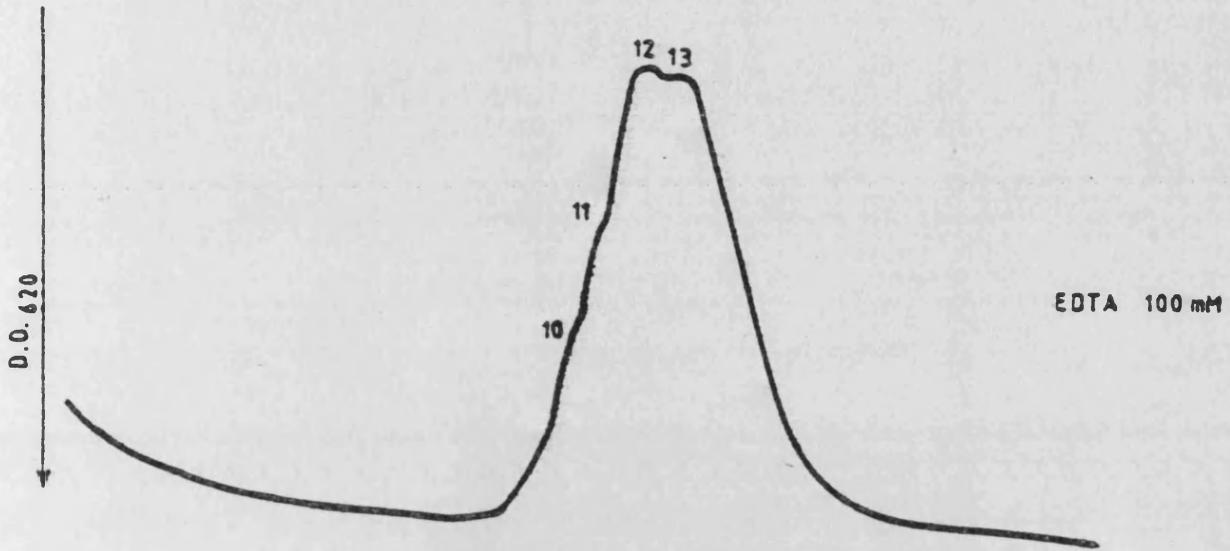


Figura 32.- Electroforegramas y densitogramas de la fracción enzimática 1, inactivada con EDTA 100 mM y con Cl_2Hg 2×10^{-2} mM. Gel con almidón soluble 0,5 % como sustrato.

FRACCION ENZIMATICA 1

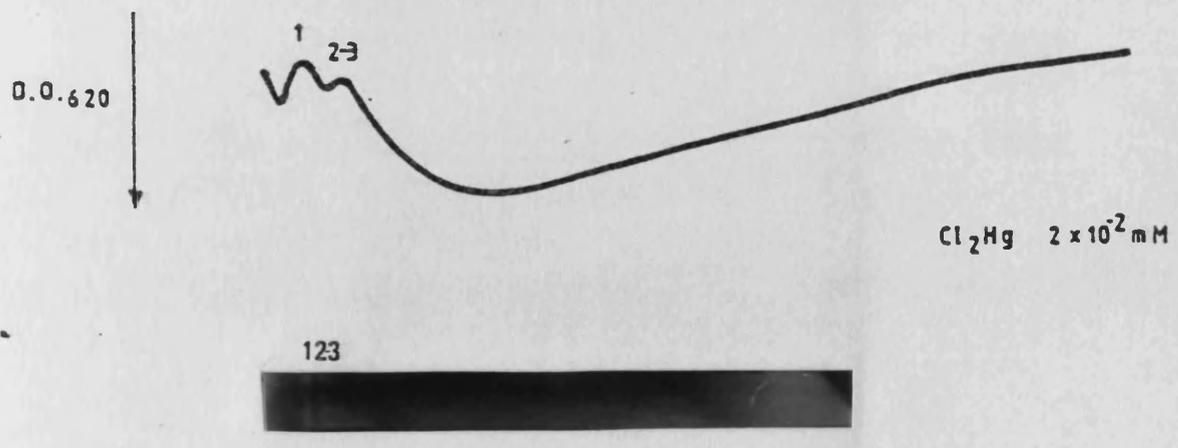
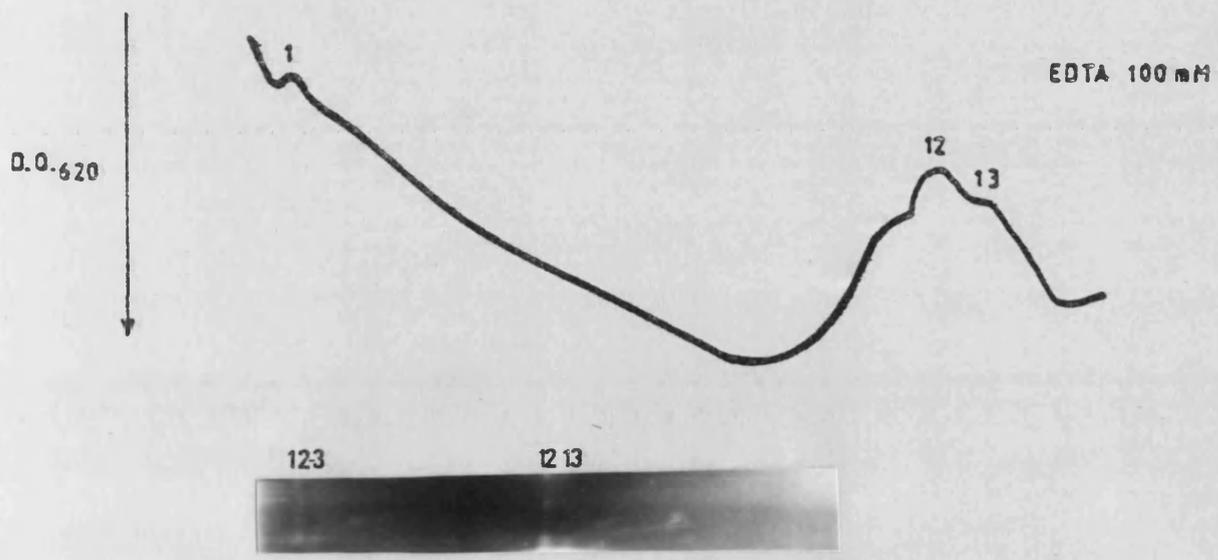


1011213



Figura 33.- Electroforegramas y densitogramas de la fracción enzimática 2, inactivada con EDTA 100 mM y Cl_2Hg 2×10^{-2} mM. Gel con almidón soluble 0,5 % como sustrato.

FRACCION ENZIMATICA 2



III.1.3.3.- AMILOFOSFORILASAS.-

La posibilidad de que parte de la actividad detectada pudiera ser debida a amilofosforilasas se comprobó estudiando su presencia en los geles mediante la reacción de síntesis de almidón, mucho más sensible y específica para detectar su presencia que la hidrólisis. Se incorporó en este caso glucógeno al gel como iniciador de la síntesis; la presencia de actividad hidrolítica en estos geles se detectó añadiendo almidón soluble al medio de incubación (materiales y métodos) ya que el color del glucógeno con el iodo es muy tenue e insuficiente para caracterizar la actividad enzimática degradativa.

Los resultados de un experimento típico se presentan en la figura 34. No se encuentran diferencias en los zimogramas obtenidos mediante incubación en tampón fosfato y en tampón acetato cuando se estudia la hidrólisis del almidón soluble, lo que excluye la posibilidad de que alguna de las bandas estudiadas fuera debida exclusivamente a una amilofosforilasa. La posibilidad de que la actividad resistente al EDTA asociada a la banda 1 fuera una amilofosforilasa es incompatible no sólo con el hecho de que no requiere fosfato inorgánico (aparece en tampón acetato) sino también con la ausencia de actividad sintética a ese rf. Sólo se encuentra actividad de síntesis de almidón a un rf similar al de la banda número 4, pero su actividad hidrolítica es inapreciable como se demuestra cuando se inhibe la actividad amilolítica por acción del EDTA.

La baja actividad obtenida para las amilofosforilasas es debida a las condiciones de determinación en este estudio y no refleja el contenido real de esta enzima en las hojas. Una actividad sustancialmente superior se obtiene cuando la extracción se realiza a pH más alcalinos (6,5 y 7,0) y cuando la incubación se realiza a pH 6,0, frente al pH 5,0 normalmente utilizado en el estudio de las amilasas (figura 35).

En conjunto, se ha puesto de manifiesto la existencia de tres formas distintas de la enzima amilofosforilasa. Una de ellas queda retenida en el límite del gel de concentración, sin desplazarse de modo detectable - dentro del gel de resolución en el que está incorporado el glucógeno. Las otras dos tienen una movilidad relativa similar y aparecen como dos bandas bastante próximas que pueden separarse parcialmente mediante un fraccionamiento con sulfato amónico; en la fracción que precipita entre 25 y 45 % de saturación sólo se detecta la banda de menor movilidad, mientras que parte de la actividad correspondiente a esta enzima y toda la actividad de la iso-enzima de mayor movilidad se recupera en la fracción que precipita entre 0 y 25 % de saturación, (figura 35). En algunos casos las dos bandas que penetran en el gel de resolución no son distinguibles, sin que se haya hecho un estudio crítico de la ausencia de alguna de ellas o si es un artefacto de bido a la utilización de condiciones poco favorables para su separación. El tratamiento de los extractos con detergente (Tween 80) reduce la actividad retenida en la interfase entre las dos capas del gel y parece aumentar la presente en las bandas de mayor movilidad (figura 36).

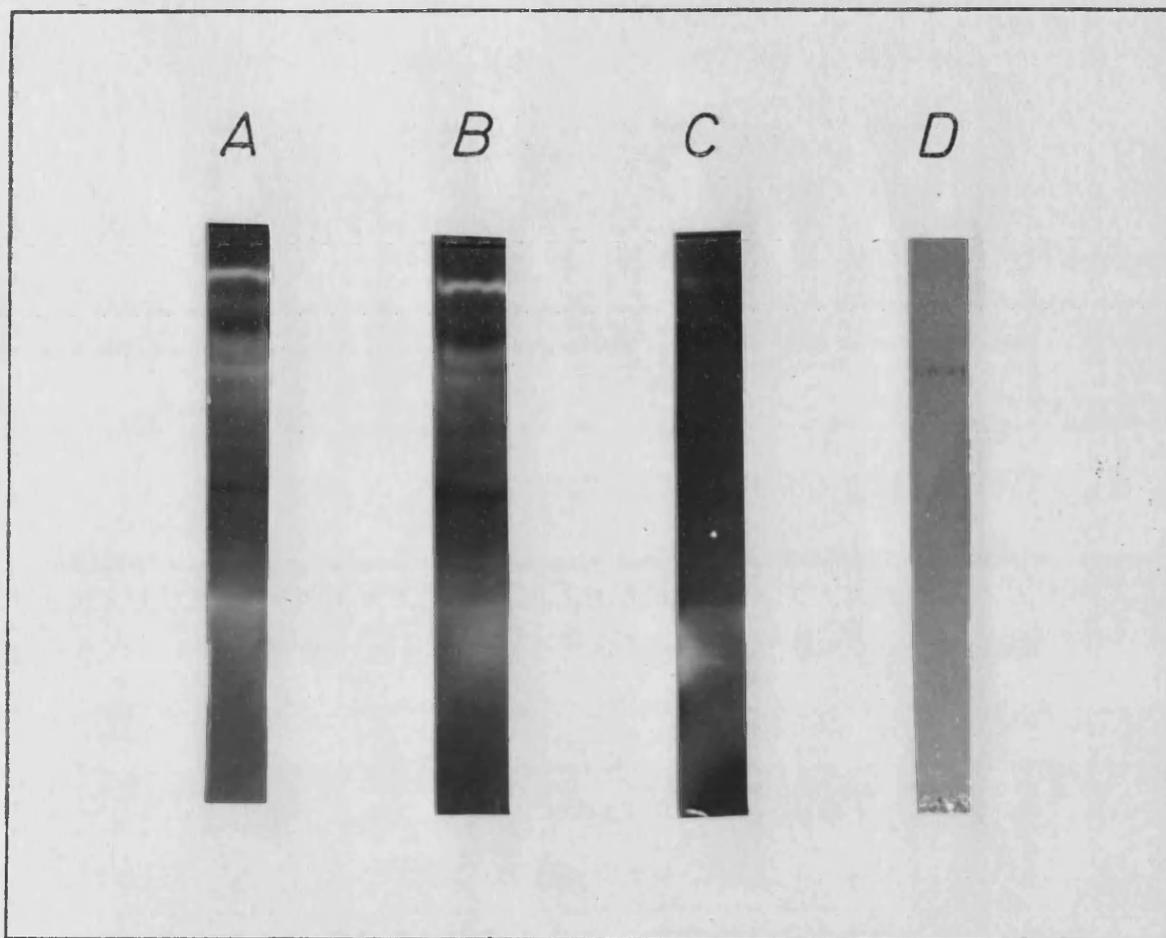


Figura 34.- Electroforegramas de extractos crudos obtenidos con tampón acetato 0,1 M, pH 5,0, con Cl_2Ca 1 mM. Para la reacción de degradación los geles se incubaron durante 2 horas a 30 °C en presencia de almidón soluble 0,5 % como sustrato, en tampón de extracción (A), tampón fosfato 0,07 M, pH 7,0 (B) y tampón fosfato 0,07 M, pH 7,0, con EDTA 100 mM (C). Para la reacción de síntesis (D) la incubación se realizó durante 5 horas a 30 °C en tampón citrato 0,1 M, pH 5,1, en presencia de glucosa-1-fosfato 0,7 %. Gel con glucógeno 0,2 % incorporado como iniciador de la síntesis.

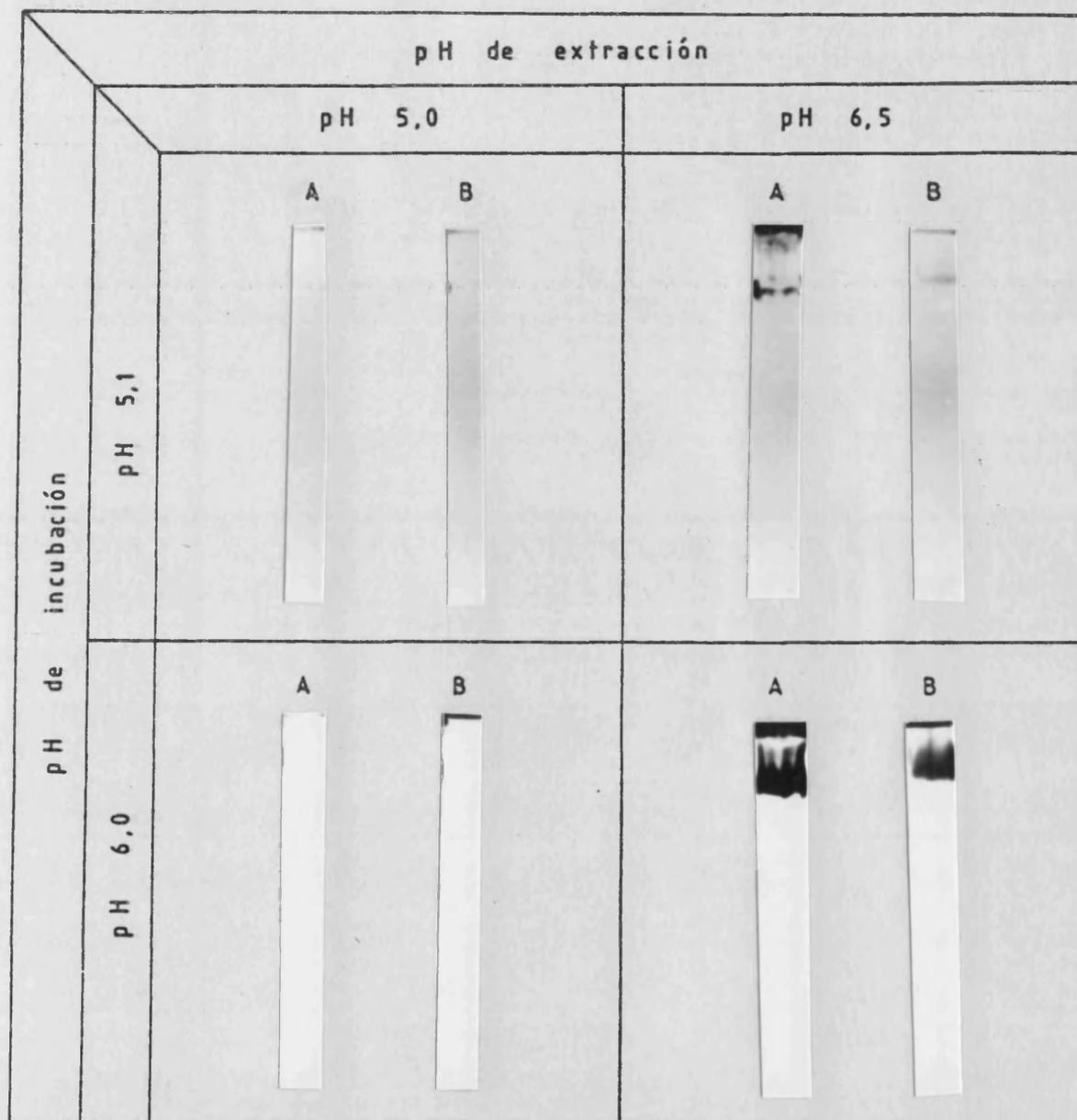


Figura 35.- Electroforegramas de extractos fraccionados con sulfato amónico entre el 0 y el 25 % (A) y el 25 y el 45 % de saturación (B), - obtenidos con tampón acetato 0,1 M a pH 5,0 y tampón citrato 0,1 M a pH - 6,5. Incubación durante 5 horas a 30 °C en tampón citrato 0,1 M a pH 5,1 y a pH 6,0, en presencia de glucosa-1-fosfato 0,7 %. Gel con glucógeno 0,2 % incorporado como iniciador de la síntesis.

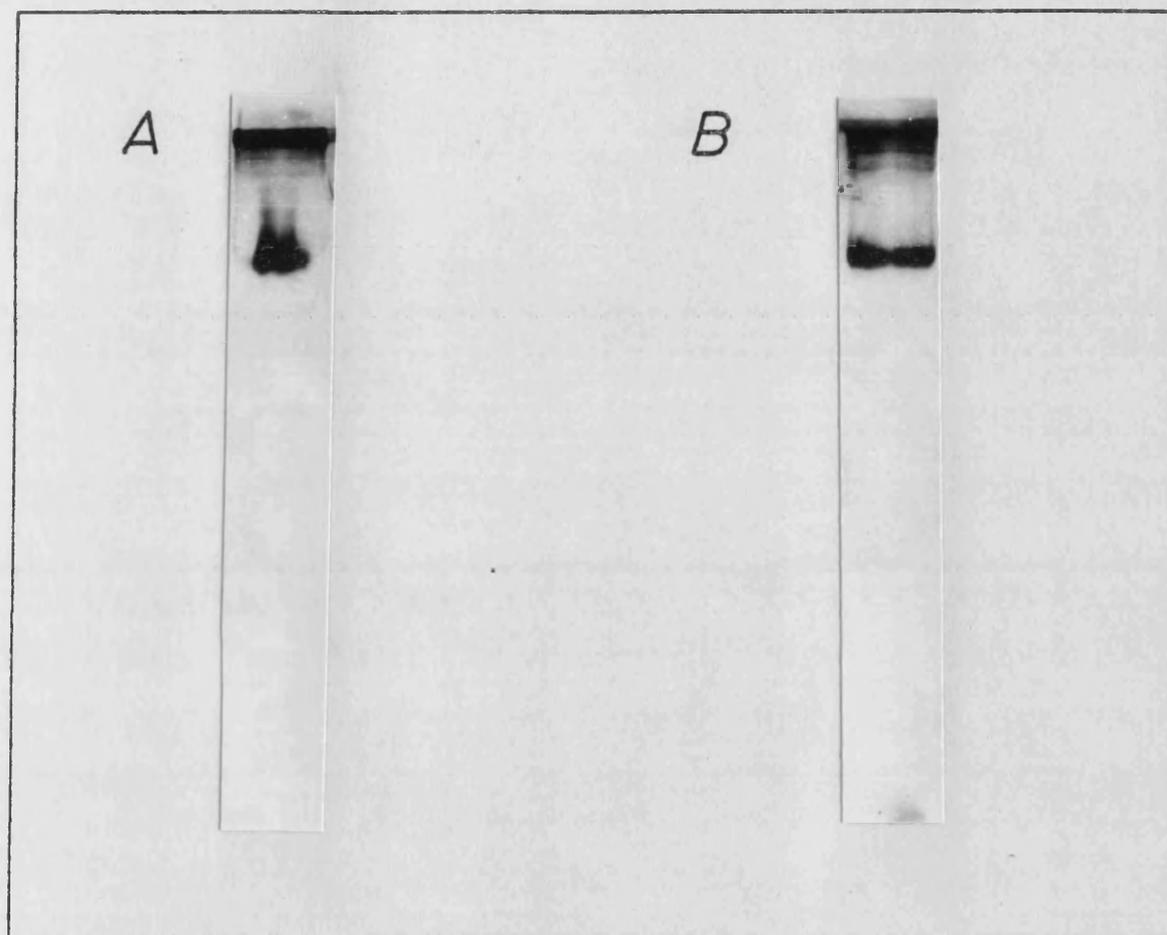


Figura 36.- Electroforegramas de extractos obtenidos con tampón citrato 0,1 M a pH 6,5 (A) y con el mismo tampón más Tween 80 al 1 % (B). Incubación durante 5 horas a 30 °C en tampón citrato 0,1 M a pH 6,0, en presencia de glucosa-1-fosfato 0,7 %. Gel con glucógeno 0,2 % incorporado como iniciador de la síntesis.

III.2.- VARIACIONES DURANTE EL DESARROLLO.-

III.2.1.- VARIACION ESTACIONAL DEL CONTENIDO EN CARBOHIDRATOS.-

Las muestras tomadas para el estudio de la variación estacional del contenido en carbohidratos presentaron oscilaciones muy amplias tanto en el peso fresco como en el peso seco (figura 37), que no se corresponden con cambios reales en las hojas sino que son originadas por el error del muestreo. Las variaciones en el peso se corresponden fielmente con el tamaño de las hojas tomadas en cada caso (figura 38) y, al menos para las hojas adultas, resulta evidente que no representan una situación real ya que completaron su expansión mucho antes de que se iniciaran las determinaciones. Algún aumento en superficie tuvo lugar indudablemente en las hojas jóvenes durante las primeras semanas de muestreo -principios de Abril a mediados de Junio- pero las variaciones en superficie debidas al crecimiento no son separables de los errores de muestreo con los datos de este estudio, si bien estos errores fueron en este caso mucho menores durante los muestreos iniciales (semanas 15 a 25) que posteriormente, debido a que al comienzo se muestrearon las hojas mas grandes de la brotación. mientras que mas adelante los muestreos se realizaron al azar.

Los resultados analíticos se expresan como contenido por unidad de superficie de la hoja, procedimiento que compensa las diferencias provocadas por el distinto tamaño de las hojas (Monselise et al., 1953; Monselise, 1980) y que se ha mostrado mas sensible para detectar variaciones en el contenido en elementos minerales de las hojas que el contenido por hoja (Guardiola y Gonzalez, 1982). En el caso de las hojas adultas, ambos sistemas de expresión de resultados son proporcionales; la razón de proporcionalidad, la superficie de la hoja, es además constante durante todo el periodo experimento

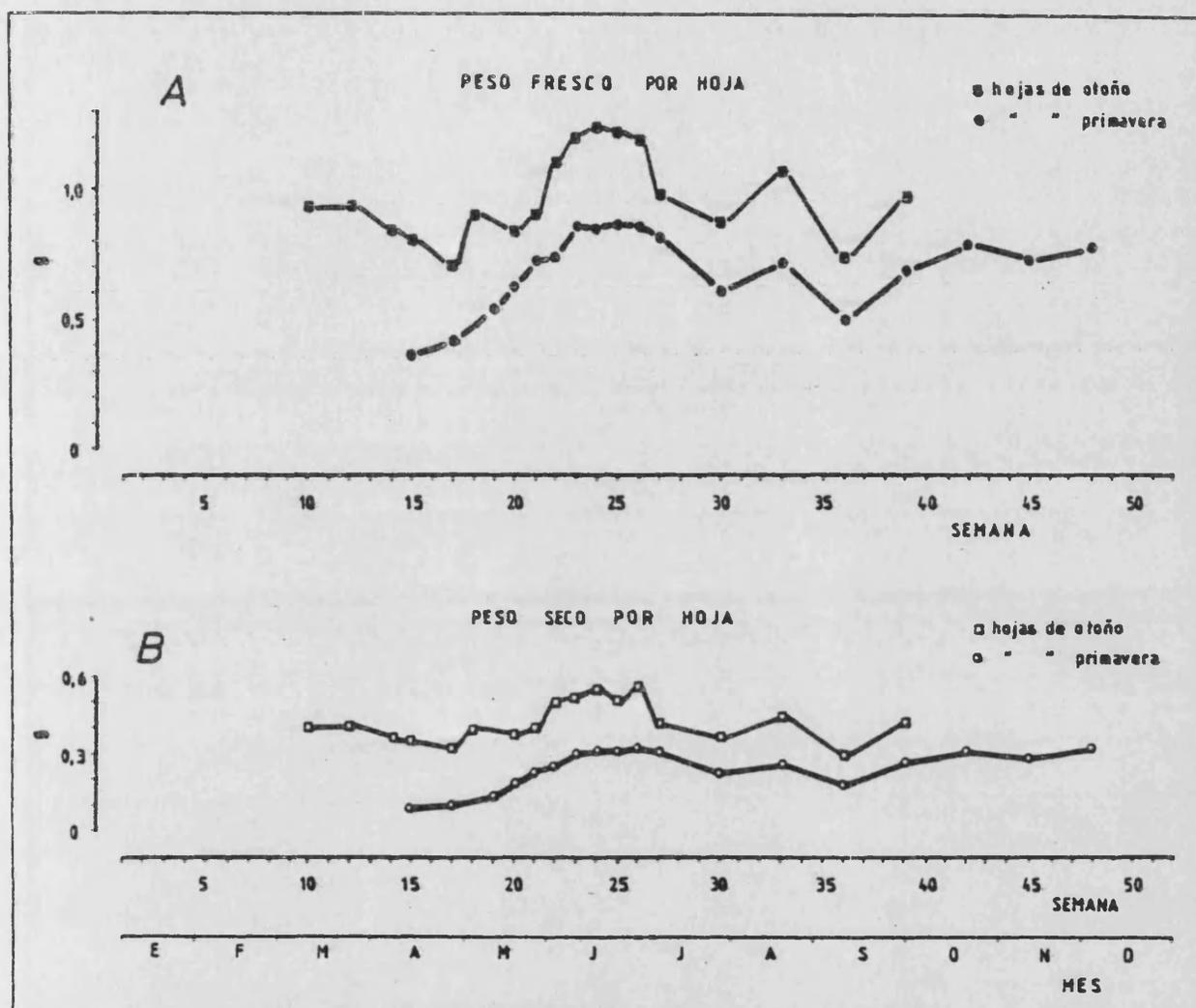


Figura 37.- Variación del peso fresco (A) y del peso seco (B) por hoja a lo largo del año. Muestras de la parcela de Almenara.

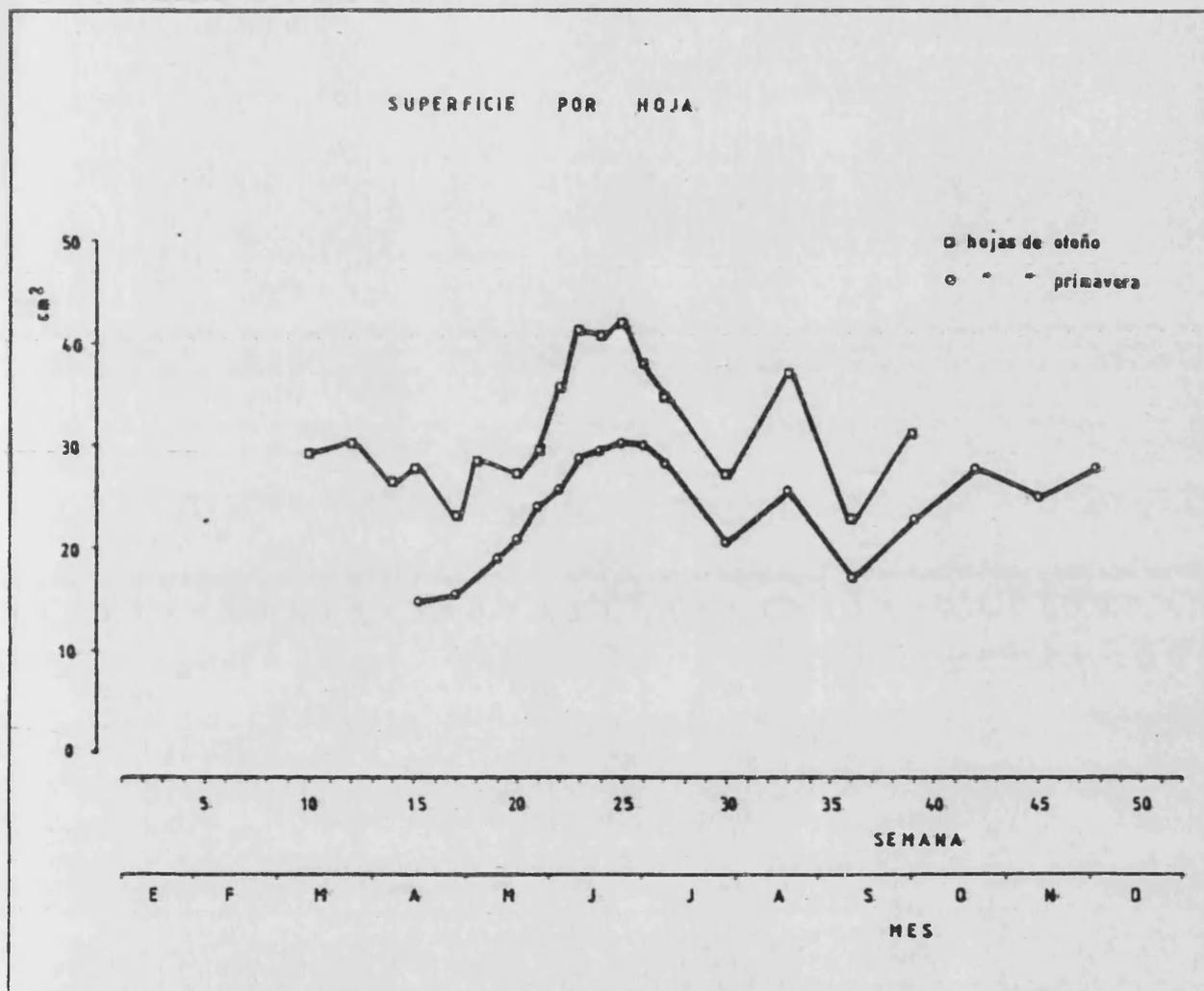


Figura 38.- Variación de la superficie por hoja a lo largo del año. Muestras de la parcela de Almenara.

tal. No ocurre lo mismo en las hojas jóvenes durante la fase de crecimiento, no pudiendo evaluarse cuantitativamente la influencia del mismo en la acumulación de metabolitos con los datos de este estudio.

Los cambios en el peso de las hojas por unidad de superficie a lo largo del año se representan en la figura 39. El peso seco de las hojas viejas se mantuvo razonablemente constante, siendo la máxima desviación respecto al valor medio de todos los muestreos inferior al 10 % del peso de la hoja. En las hojas jóvenes, el peso seco aumenta durante los primeros muestreos; como coincide con el aumento en superficie de la hoja ésta acumula durante estas semanas iniciales una cantidad importante de metabolitos. Hay una detención en el aumento en el peso alrededor de la semana 25, para proseguir a continuación, aunque a un ritmo más lento, hasta el final del periodo experimental pero sin llegar a igualar el peso de las hojas adultas.

Las variaciones en el peso fresco siguen una pauta similar, si bien la variabilidad es mayor, a lo que contribuye indudablemente la influencia del estado hídrico de la planta en el momento del muestreo y las pérdidas de agua durante el transporte al laboratorio. El máximo peso fresco de las hojas jóvenes se alcanza la semana 21, antes que el máximo peso seco y es del mismo orden que el encontrado en las hojas adultas. Consecuencia de ello es el menor porcentaje en peso seco de las hojas jóvenes durante todo el periodo experimental (figura 40), con una pauta de variación similar a la señalada para el peso seco, si bien las diferencias son relativamente mayores.

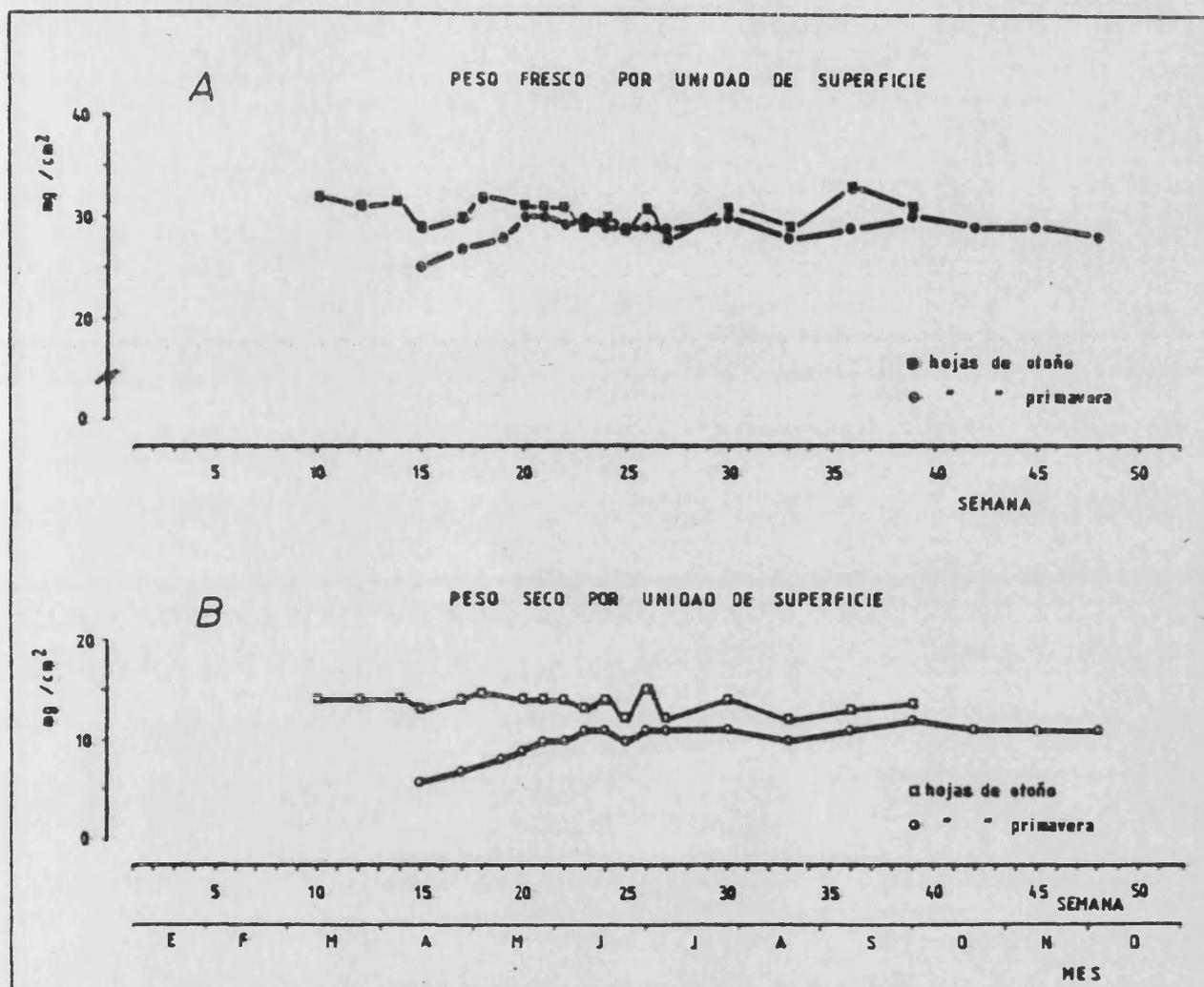


Figura 39.- Variación del peso fresco (A) y del peso seco (B) por unidad de superficie a lo largo del año. Muestras de la parcela de Almenara.

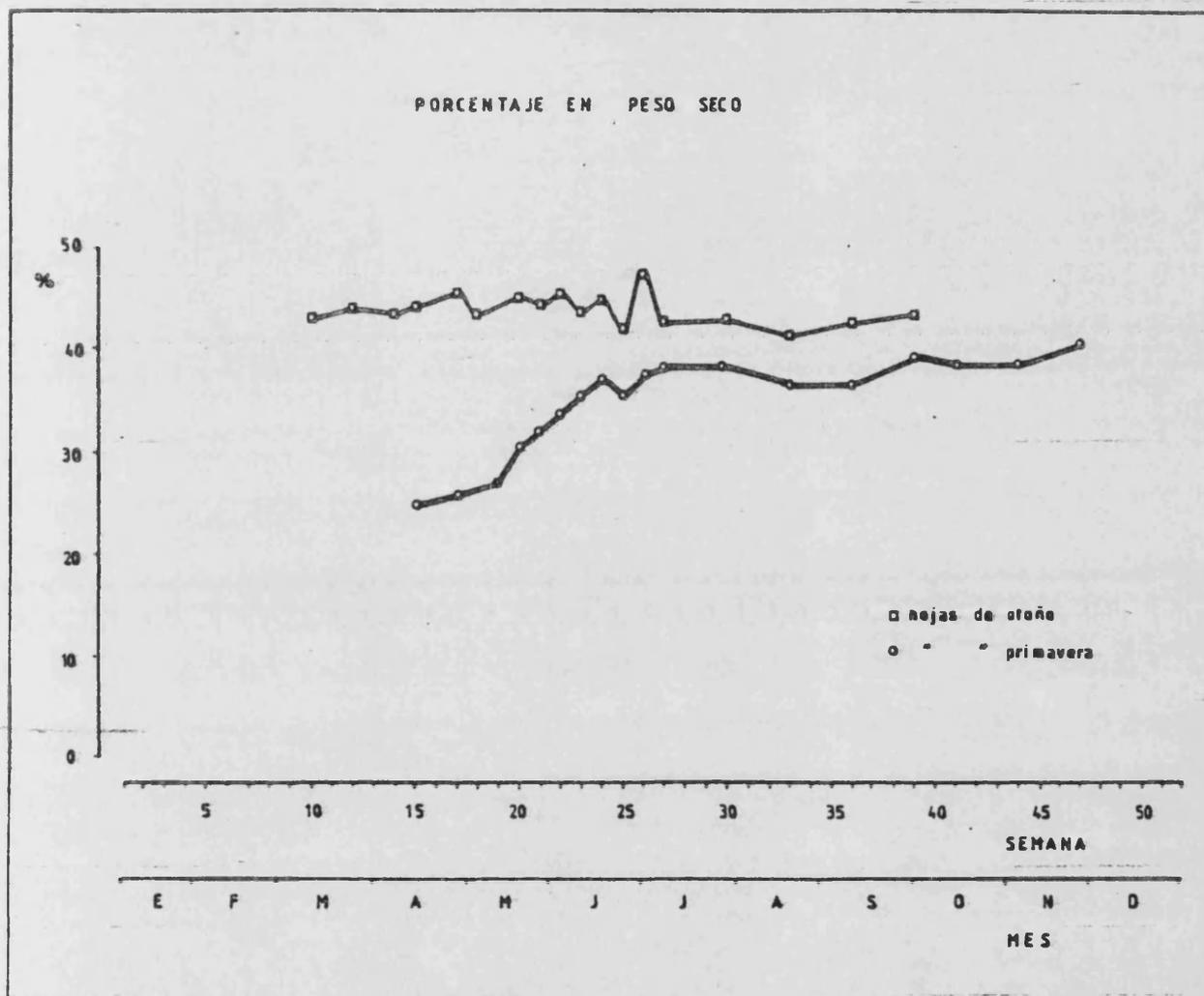


Figura 40.- Variación del porcentaje en peso seco a lo largo del año. Muestras de la parcela de Almenara.

III.2.1.1.- ALMIDON.-

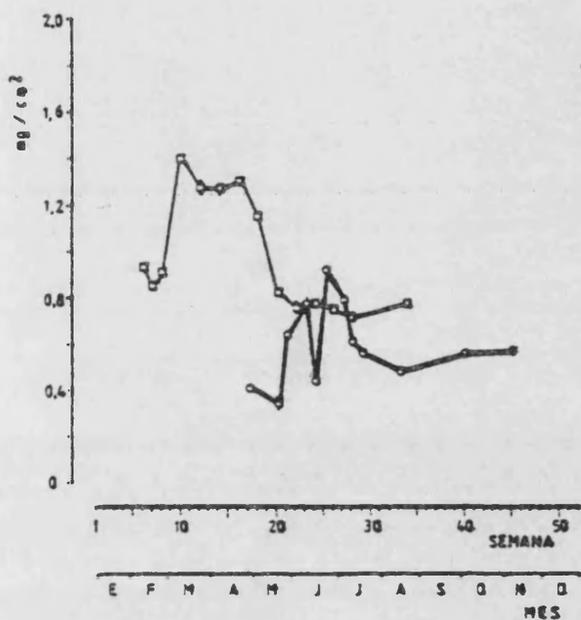
El contenido en almidón de las hojas adultas varía de modo característico durante el periodo considerado, si bien la magnitud absoluta de este contenido así como la iniciación de los cambios varía tanto con el año como con la parcela (figura 41). En las hojas adultas se observan tres fases bien diferenciadas. Una inicial, de acumulación, durante el comienzo de la primavera con contenidos máximos en las semanas 10 a 15 y que no presentan un perfil regular posiblemente debido a las oscilaciones climáticas en esta época del año. Sigue a continuación una fase de desaparición rápida del almidón en la que se pierde alrededor del 50 % del contenido máximo en las hojas de 1980 en un plazo de unas diez semanas y más de un 75 % en 1981 y 1982, manteniéndose los valores a partir de ese momento hasta que se interrumpieron los muestreos. El contenido final no guarda una relación evidente con el contenido máximo y así, es inferior en 1981 ($0,38 \text{ mg/cm}^2$) que en 1980 ($0,60 \text{ mg/cm}^2$) a pesar de que el contenido máximo es notablemente mayor en 1981 ($2,38 \text{ mg/cm}^2$ frente a $1,30 \text{ mg/cm}^2$).

La pauta de variación cambia con la parcela estudiada pero la influencia del año parece ser de mayor importancia. Aunque los datos experimentales para la parcela de Villarreal en 1982 no son suficientes para caracterizar la pauta de variación descrita, sí bastan para establecer un mayor contenido máximo ($1,94 \text{ mg/cm}^2$ frente a $1,47 \text{ mg/cm}^2$) y un menor contenido mínimo ($0,48 \text{ mg/cm}^2$ frente a $0,60 \text{ mg/cm}^2$) que en el año 1980.

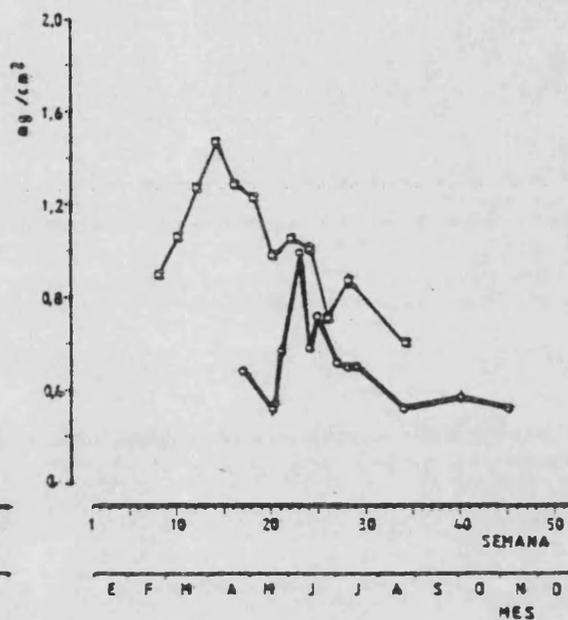
El contenido en almidón en las hojas de la brotación de primavera es muy bajo inicialmente ($0,42 \pm 0,05 \text{ mg/cm}^2$ en la semana 17) aumentando rápidamente durante las primeras semanas, coincidiendo con la desaparición del almidón en las hojas adultas. Alcanzan un primer máximo al que sigue de modo inmediato un mínimo relativo (semana 24, año 1980 y 25 en 1981) seguido de una recuperación muy rápida, en el plazo de una semana, para -

Figura 41.- Variación del contenido en almidón por unidad de superficie a lo largo del año en las distintas parcelas estudiadas. Las hojas jóvenes se representan mediante círculos unidos con trazo grueso; las adultas, con cuadrados unidos por trazo fino.

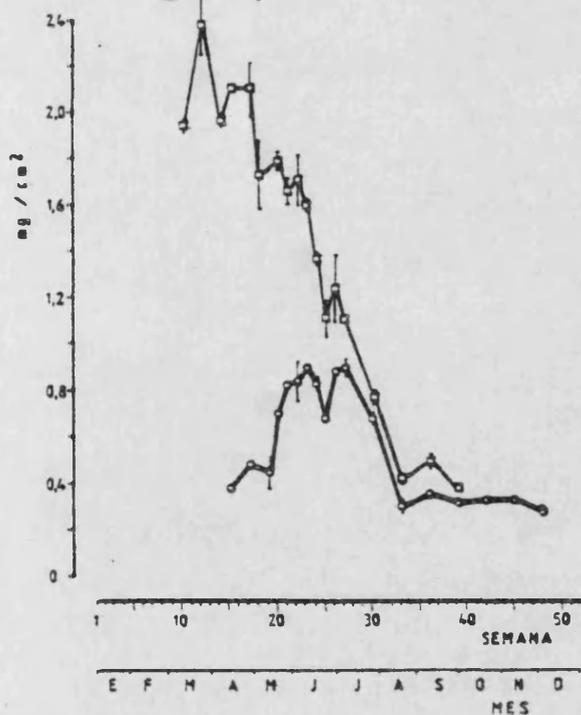
BURRIANA 1980



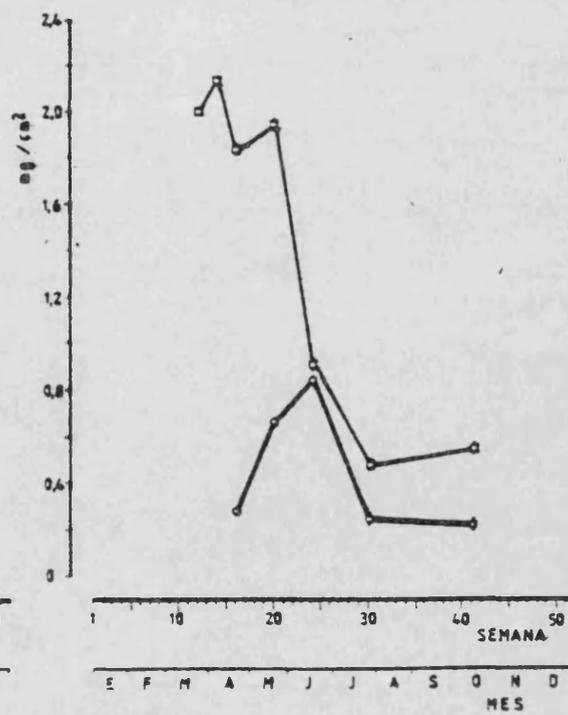
VILLARREAL 1980



ALMENARA 1981



VILLARREAL 1982



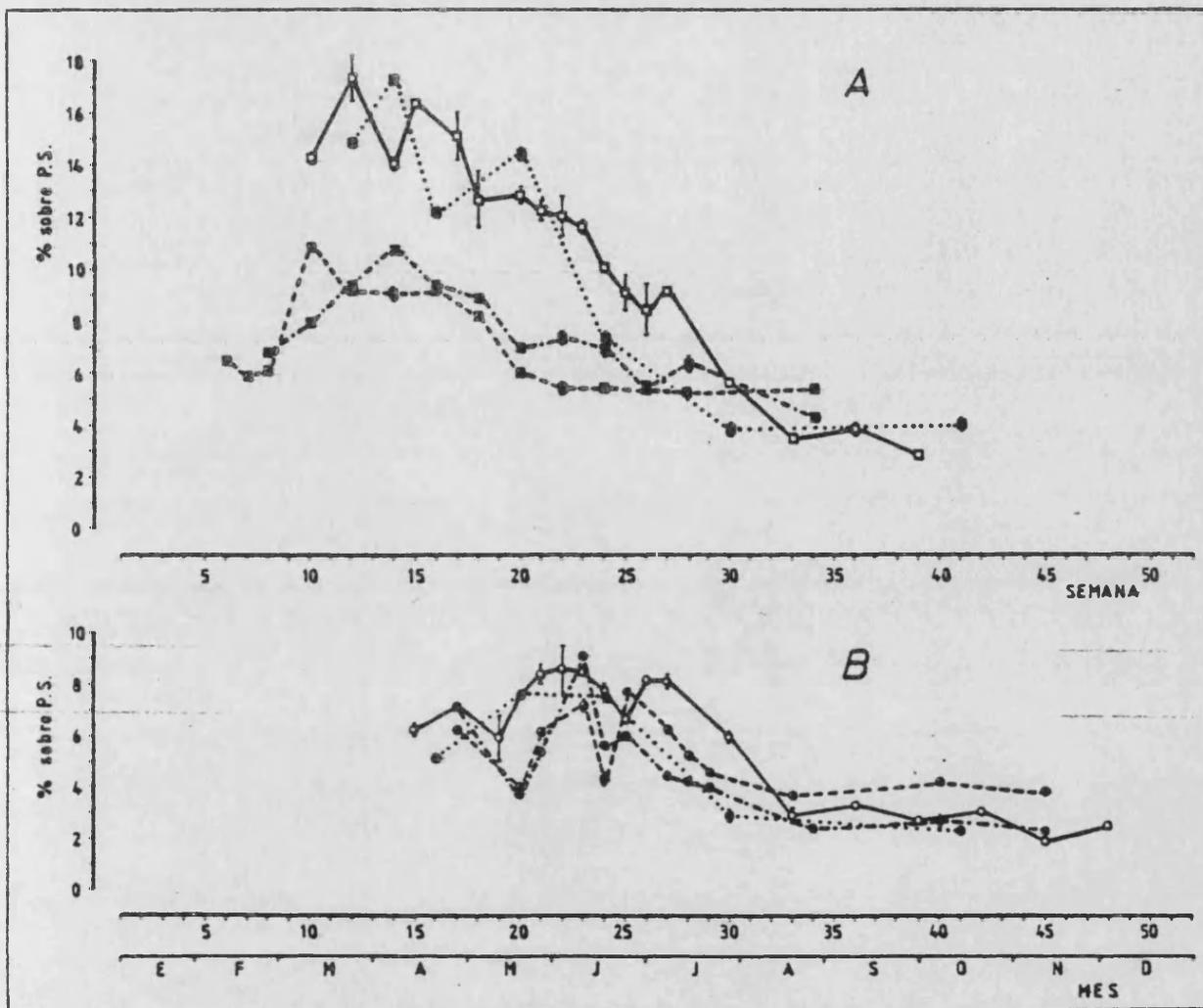


Figura 42.- Variación del contenido en almidón como porcentaje sobre el peso seco de las hojas adultas (A) y jóvenes (B) a lo largo del año.

- parcela de Burriana (1980)
- parcela de Villarreal (1980)
- parcela de Almenara (1981)
- parcela de Villarreal (1982)

descender a continuación de un modo paralelo al de las hojas adultas hasta un contenido similar al inicial e inferior en un 50 % aproximadamente al contenido final de las hojas adultas, sin que aumente de modo significativo hasta el final del muestreo.

En ambos tipos de hojas el contenido en almidón representa un porcentaje relativamente pequeño del peso seco total de la hoja, con un valor máximo para este parámetro en las hojas adultas del 17,4 % y del 9,1 % en las hojas jóvenes. Después de la semana 35 el contenido en almidón referido al peso seco de la hoja es del orden del 5 % en las hojas adultas y ligeramente inferior en las hojas de primavera (alrededor del 3 %; figura 42). Es notable la velocidad de los cambios en el contenido en almidón, con variaciones drásticas en el plazo de una semana y que en las hojas jóvenes parece estar relacionado con la proximidad a las flores y/o el fruto. Las hojas de brotes vegetativos presentan unos límites de variación acusados (figura 43), con contenidos más bajos hasta la semana 27 y más elevados posteriormente, que las hojas de la misma edad de brotes fructíferos, tendiendo a igualarse ambos valores (semana 41).

III.2.1.2.- AZUCARES.-

El contenido en azúcares solubles en las hojas adultas desciende gradualmente desde las primeras determinaciones experimentales a un ritmo constante, para el valor medio de las cuatro parcelas estudiadas, hasta el mes de Julio a partir del cual su valor se estabiliza alrededor de 0,8 mg/cm² (figura 44), contenido notablemente superior al del almidón en ese momento.

En las hojas jóvenes el contenido en azúcares solubles representa un porcentaje del peso seco total de la hoja mayor que en las hojas adultas (figura 45) y que el almidón (figura 42). Su contenido por unidad de superficie aumenta durante las primeras semanas de muestreo (figura 44), para al-

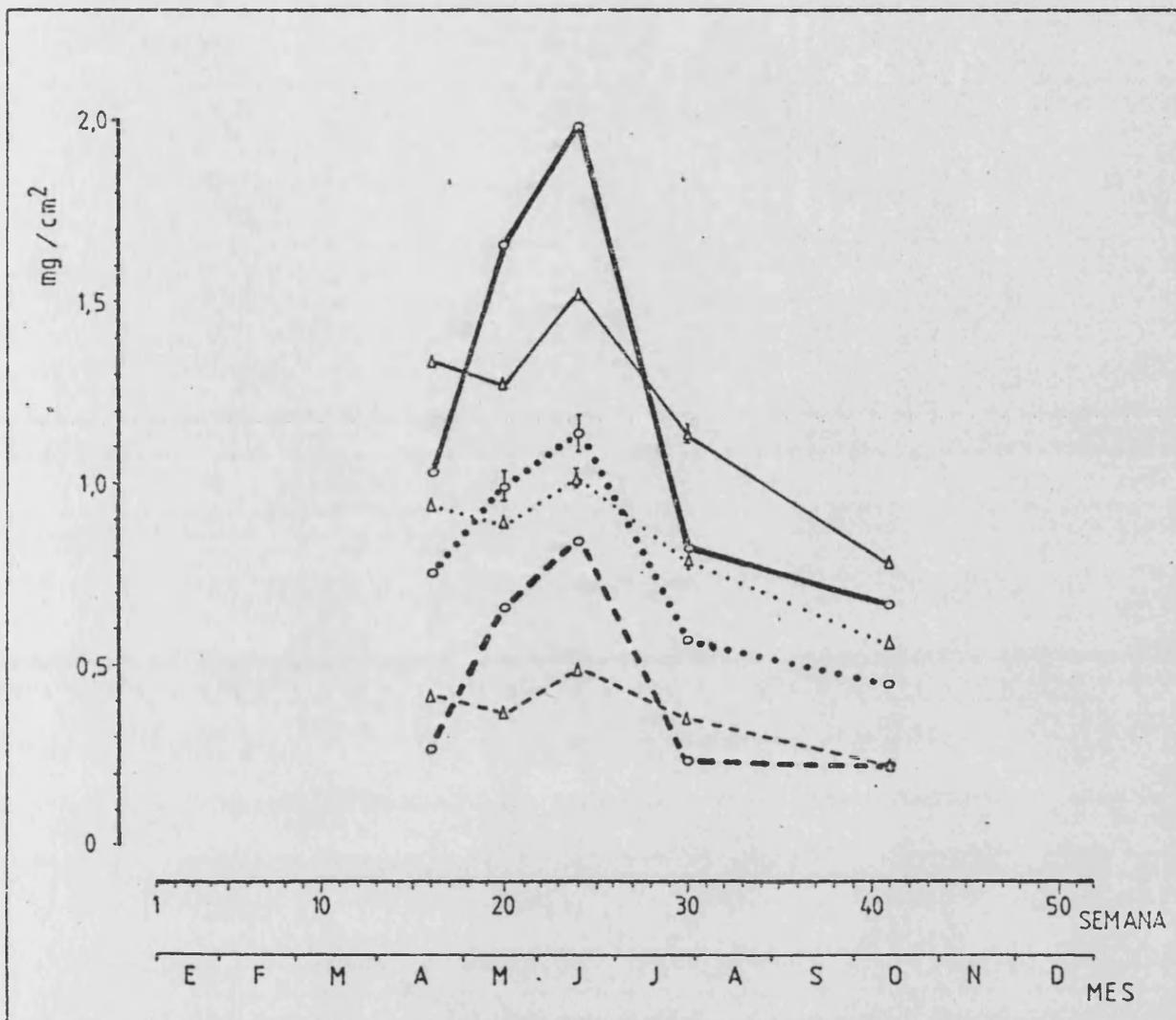
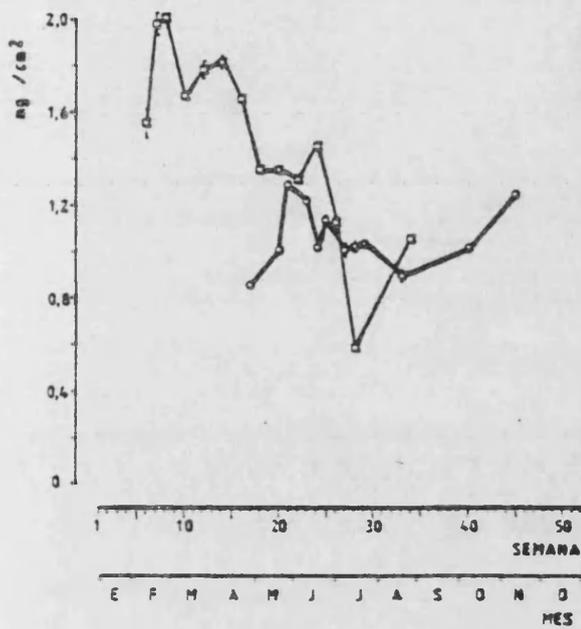


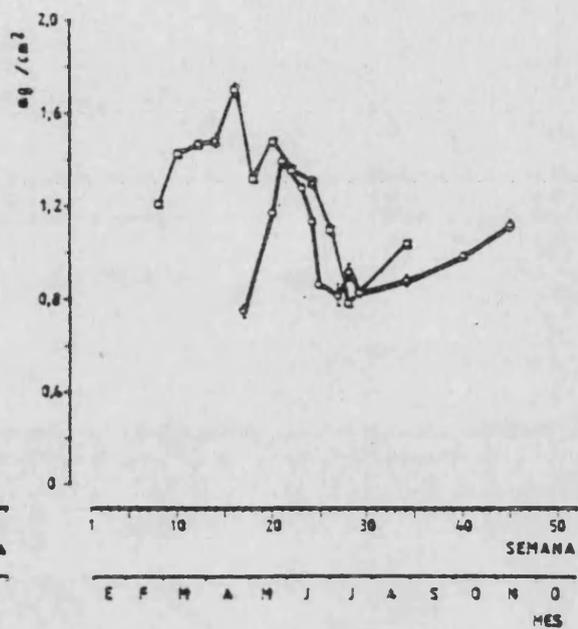
Figura 43.- Contenido en almidón (---), azúcares solubles (···) y carbohidratos totales (—) por unidad de superficie de las hojas jóvenes de brotes fructíferos (círculos unidos por trazo grueso) y de brotes vegetativos (triángulos unidos por trazo fino) en los muestreos realizados en 1982 en la parcela de Villarreal.

Figura 44.- Variación del contenido en azúcares solubles por unidad de superficie a lo largo del año en las distintas parcelas estudiadas. Las hojas jóvenes se representan mediante círculos unidos por trazo grueso; las adultas, con cuadrados unidos por trazo fino.

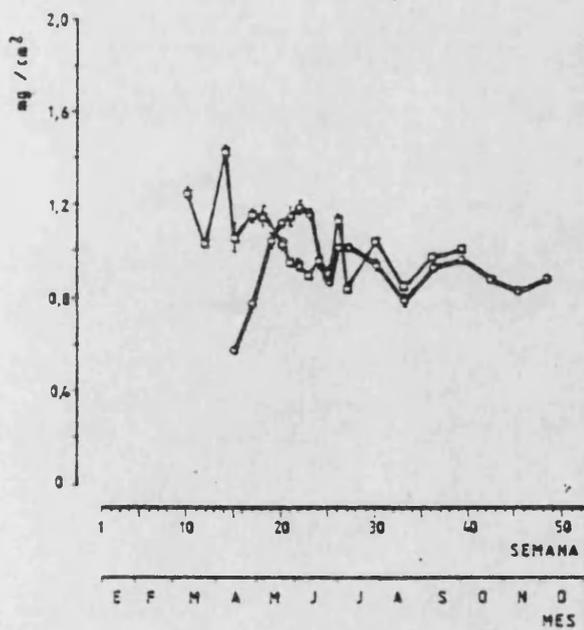
BURRIANA 1980



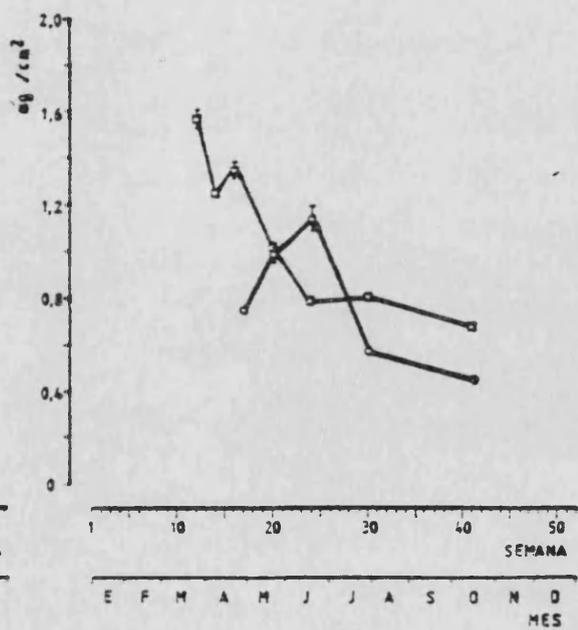
VILLARREAL 1980



ALMENARA 1981



VILLARREAL 1982



canzar el valor máximo entre las semanas 19 a 21; se presenta un segundo máximo relativo a finales de Junio o principios de Julio, para descender ligeramente a un valor próximo a $0,8 \text{ mg/cm}^2$ durante la semana 33, a partir de la que su contenido puede permanecer constante (parcela de Almenara, 1981), disminuir (parcela de Villarreal, 1982) o aumentar de modo significativo (parcelas de Burriana y Villarreal, 1980).

Los cambios en el contenido en azúcares durante las semanas 5 a 35 son paralelos a los cambios en el contenido en almidón, tanto en las hojas adultas como en las jóvenes. Durante el año 1980 el contenido en azúcares de las hojas adultas permanece elevado hasta la semana 16, al mismo tiempo que acumulan almidón y el descenso en su contenido sólo se inicia con la hidrólisis de este compuesto. En las hojas jóvenes, el máximo contenido en azúcares coincide con (1980, parcela de Villarreal; 1981, parcela de Almenara) o precede a (1980, parcela de Burriana, semanas 21 y 23) los máximos en el contenido de almidón. Sin embargo, no existe una relación directa en el contenido de estos dos grupos de sustancias y si el contenido de azúcares solubles es superior en 1980 que en 1981 tanto en hojas jóvenes como en hojas adultas (figura 44), lo contrario sucede para el contenido en almidón (figura 41).

La mayor parte de los azúcares solubles son de un bajo grado de polimerización como indican los valores para el contenido en azúcares reductores -expresados en equivalentes de glucosa- que siguen una pauta de variación similar aunque no idéntica a la de los azúcares totales (figura 46). El grado de polimerización, obtenido mediante el cociente entre ambas determinaciones, es en las hojas jóvenes inicialmente próximo a la unidad para aumentar gradualmente hasta un valor máximo de 2,5 en 1980 (semana 28) y de 3 en 1981 y 1982 (semana 24); posteriormente se mantiene entre 2 y 2,5 hasta el final de las determinaciones (figura 47-B).

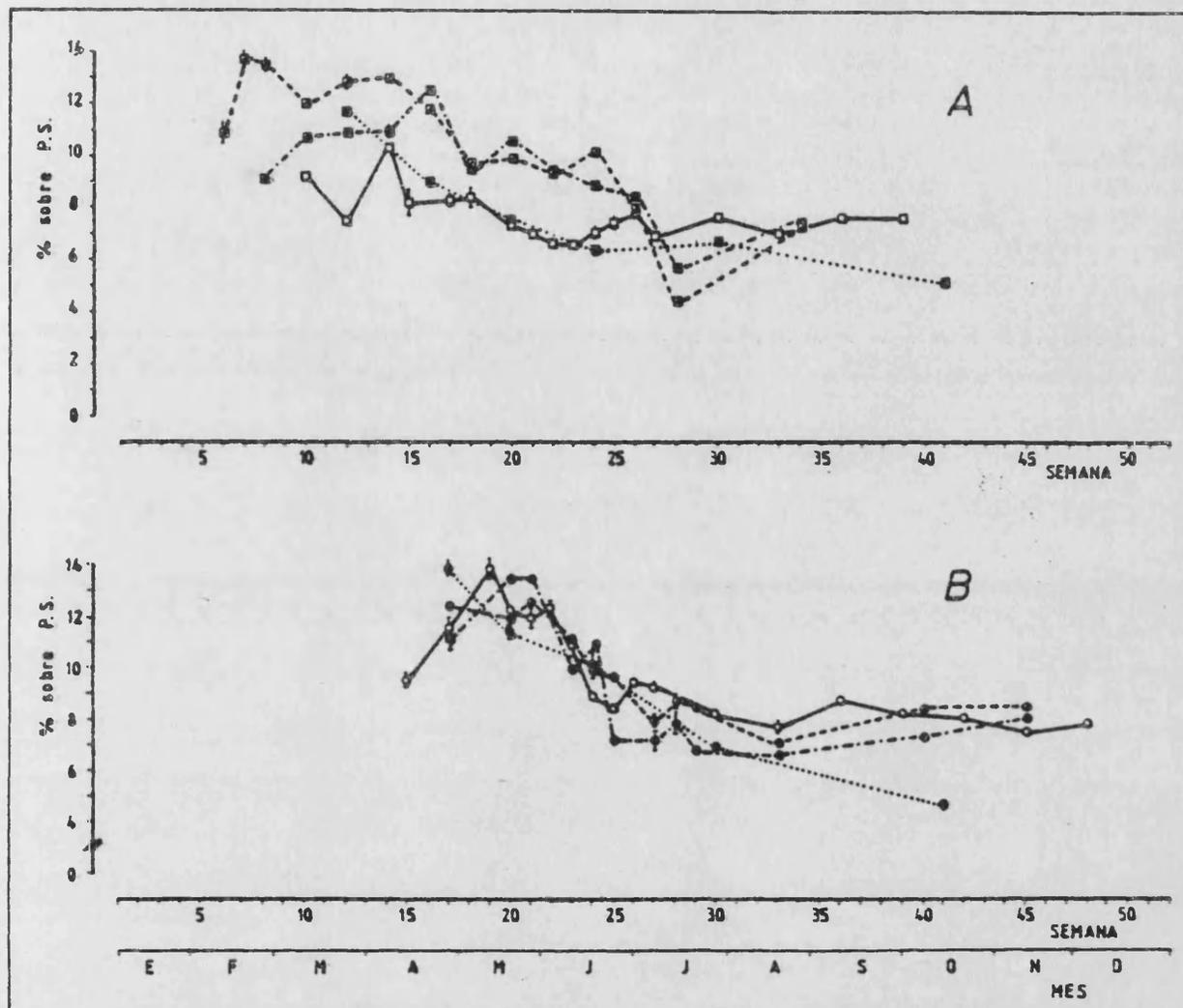
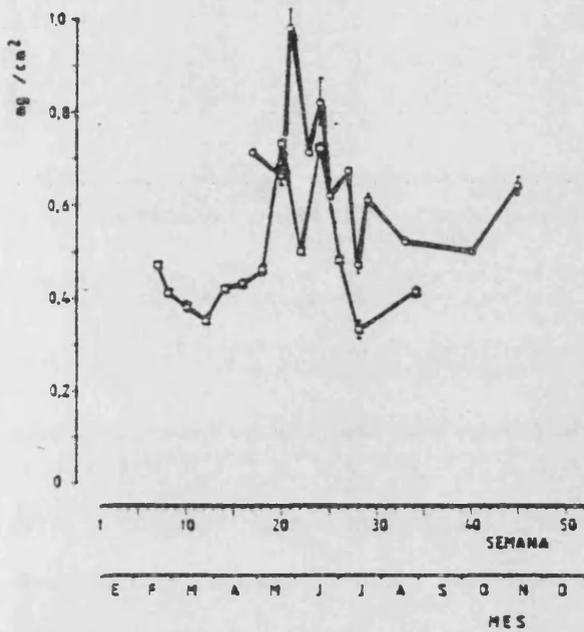


Figura 45.- Variación del contenido en azúcares solubles como porcentaje sobre peso seco de las hojas adultas (A) y jóvenes (B) a lo largo del año.

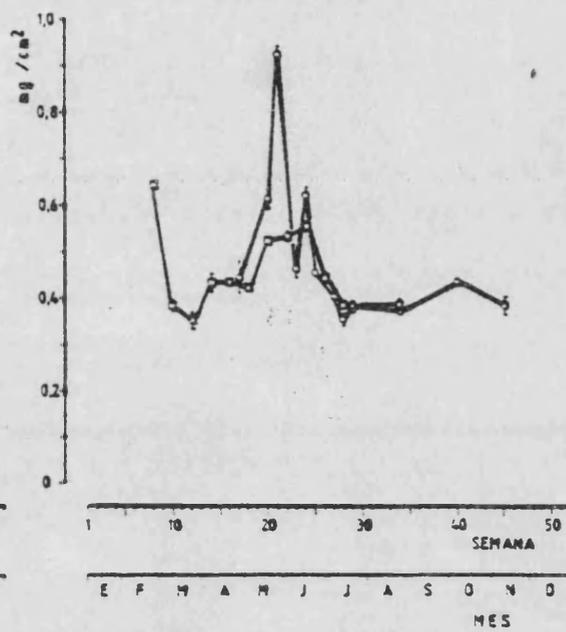
- parcela de Burriana (1980)
- parcela de Villarreal (1980)
- parcela de Almenara (1981)
- parcela de Villarreal (1982)

Figura 46.- Variación del contenido en azúcares reductores por unidad de su_
perficie a lo largo del año en las distintas parcelas estudiadas.
Las hojas jóvenes se representan mediante círculos unidos por trazo grueso;
las adultas, con cuadrados unidos por trazo fino.

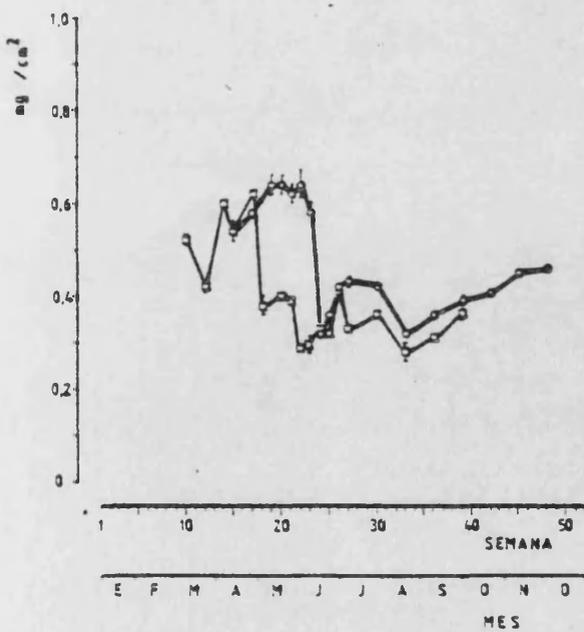
BURRIANA 1980



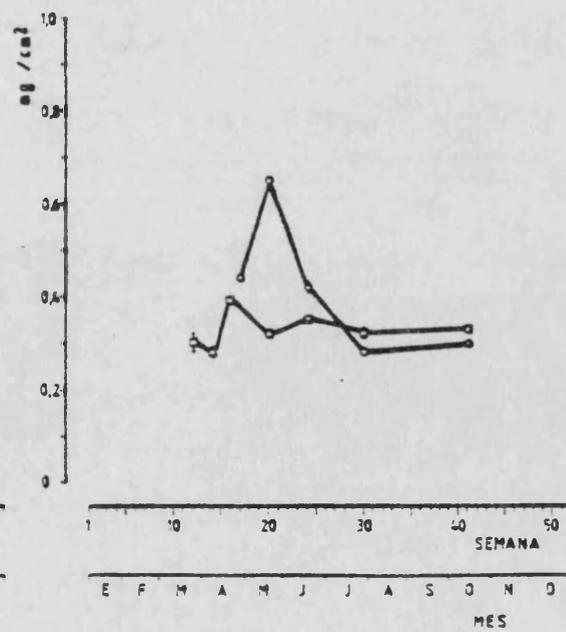
VILLARREAL 1980



ALMENARA 1981



VILLARREAL 1982



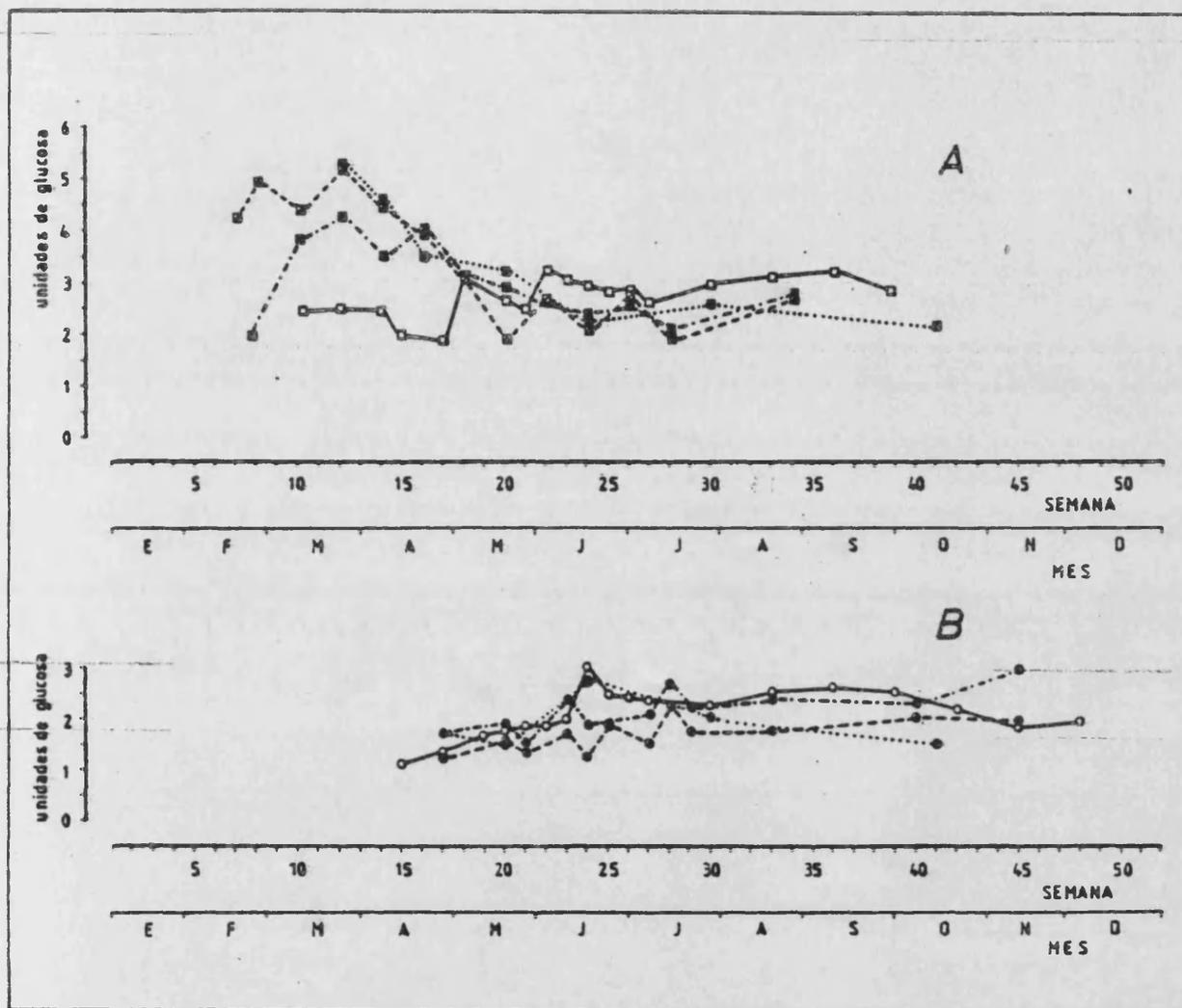


Figura 4.7.- Variación de la longitud de los azúcares solubles a lo largo del año en hojas adultas (A) y jóvenes (B).

- parcela de Burriana (1980)
- parcela de Villarreal (1980)
- parcela de Almenara (1981)
- parcela de Villarreal (1982)

En las hojas adultas, mientras el grado de polimerización es ligeramente mayor en las muestras de Almenara en relación con las hojas jóvenes y va aumentando desde un valor de 2,5 en la semana 10 hasta cerca de 3 en la semana 39, en las restantes parcelas es bastante superior al comienzo (entre 3 y 5 unidades) y disminuye a lo largo de la primavera hasta el mes de Junio, durante el cual se alcanzan valores similares a los obtenidos en 1981 en la misma época y se mantienen hasta el final de las determinaciones (figura 47-A).

III.2.3.1.- CARBOHIDRATOS TOTALES.-

La variación de los carbohidratos totales (almidón más azúcares solubles) a lo largo del año se presenta en la figura 48. En las hojas adultas se distinguen claramente tres fases (figura 48-A); en primer lugar se produce un acúmulo de carbohidratos durante el periodo de reposo vegetativo. El valor máximo (alrededor de $3,25 \text{ mg/cm}^2$) se alcanza al comienzo de la primavera (finales de Marzo). Inmediatamente se inicia una rápida movilización de las reservas acumuladas en las hojas durante la fase anterior; esta degradación se produce de forma lineal con el tiempo y a un ritmo constante hasta la semana 28-30 (mediados de Julio), excepto en la parcela de Villareal en la que se observa un descenso en dos fases, la primera al comienzo de la primavera y la segunda durante el mes de Junio (figura 48-D). A partir de ese momento y hasta el final de los muestreos el contenido en carbohidratos se mantiene constante en este tipo de hojas.

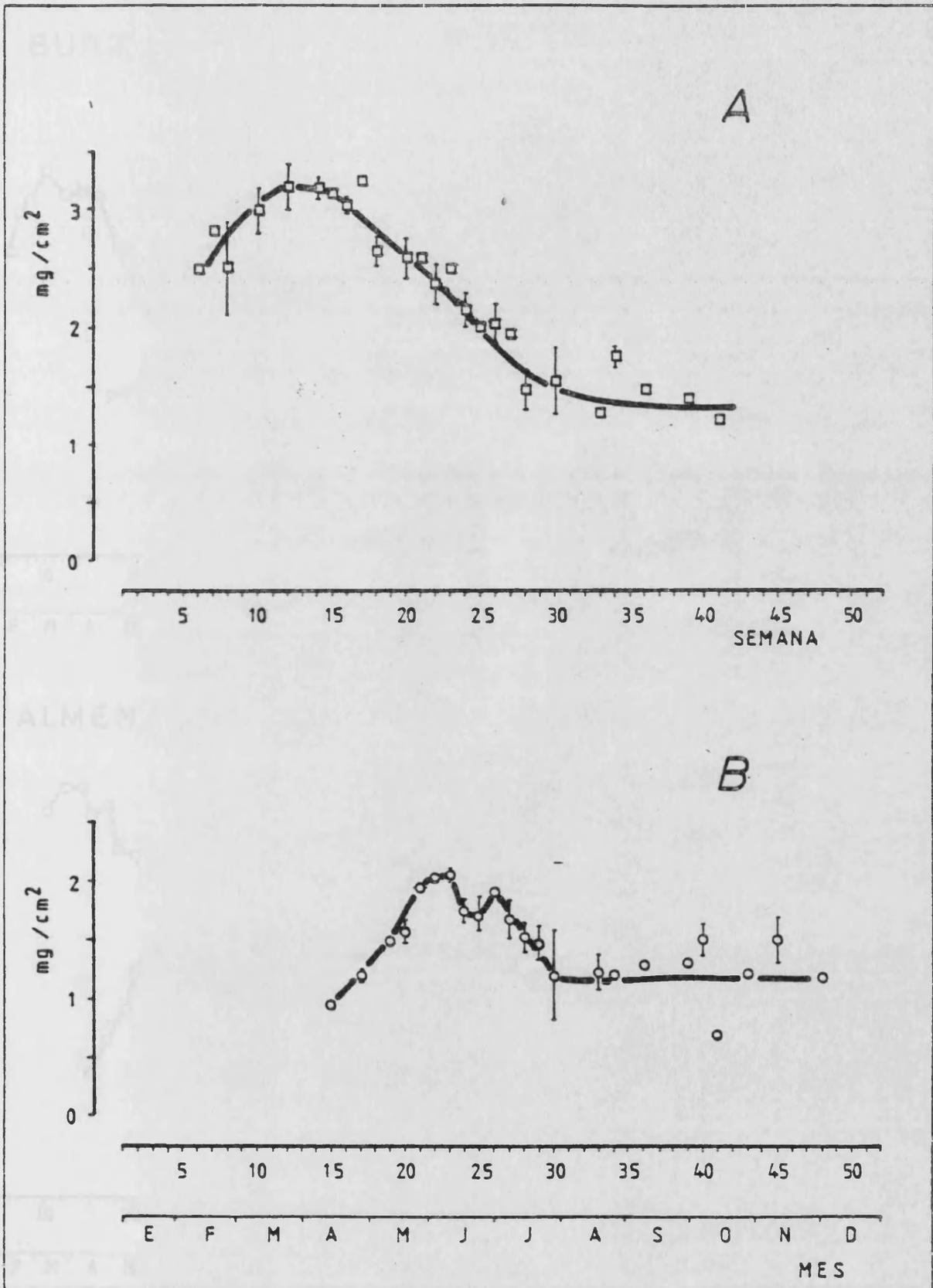
En las hojas jóvenes de brotes fructíferos existe una fase de almacenamiento durante la época de desarrollo de las mismas (figura 48-B), que coincide en el tiempo con los primeros momentos de degradación de los carbohidratos en las hojas adultas (semanas 15 a 23). En cuanto cesa el crecimiento de las hojas jóvenes (figuras 38 y 39) desciende de manera brusca y en muy pocos días el contenido en reservas hidrocarbonadas de estas ho-

jas, para recuperarse posteriormente con rapidez (figura 48-C y E) y seguir a partir de la semana 27 una evolución paralela a la de las hojas adultas (figura 48-B). También en las hojas jóvenes el descenso en el contenido en carbohidratos cesa hacia mediados del mes de Julio, época en la que el índice de crecimiento de los frutos disminuye drásticamente (Gonzalez - Ferrer, comunicación personal).

Los valores máximos obtenidos se encuentran alrededor de $3,25 \text{ mg/cm}^2$ en las hojas adultas y de $2,00 \text{ mg/cm}^2$ en las jóvenes, observándose que en las primeras el contenido en almidón es menor al de azúcares en las parcelas muestreadas en 1980 mientras que en los dos años posteriores el almidón contribuye mayoritariamente al total de los carbohidratos de las hojas (figuras 41 y 44), dando valores similares en las cuatro parcelas estudiadas (figura 48). En las hojas jóvenes, sin embargo, si bien los azúcares solubles representan un porcentaje mayor de los carbohidratos totales que el almidón, no se encuentran diferencias importantes entre los valores obtenidos en las distintas parcelas.

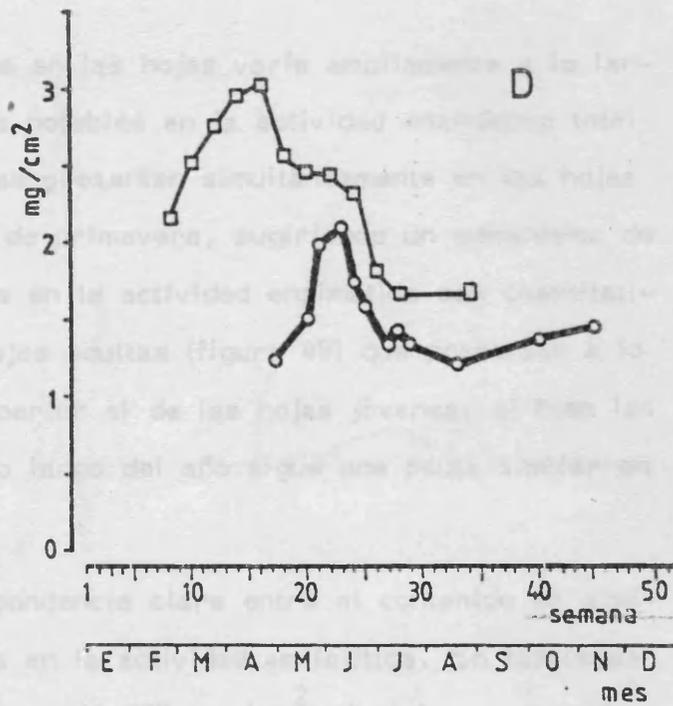
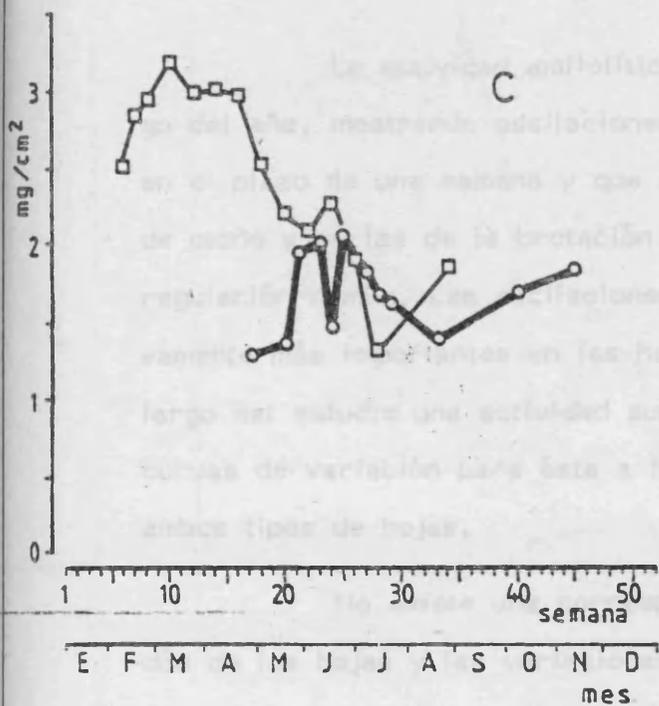
Figura 48.- Variación del contenido en carbohidratos totales por unidad de superficie a lo largo del año.

A.- Valores medios para las hojas adultas de las cuatro parcelas
B.- Valores medios para las hojas jóvenes de las cuatro parcelas
C, D, E y F.- Valores obtenidos para cada parcela. Las hojas jóvenes se representan mediante círculos unidos con trazo grueso; las adultas, con cuadrados unidos por trazo fino.



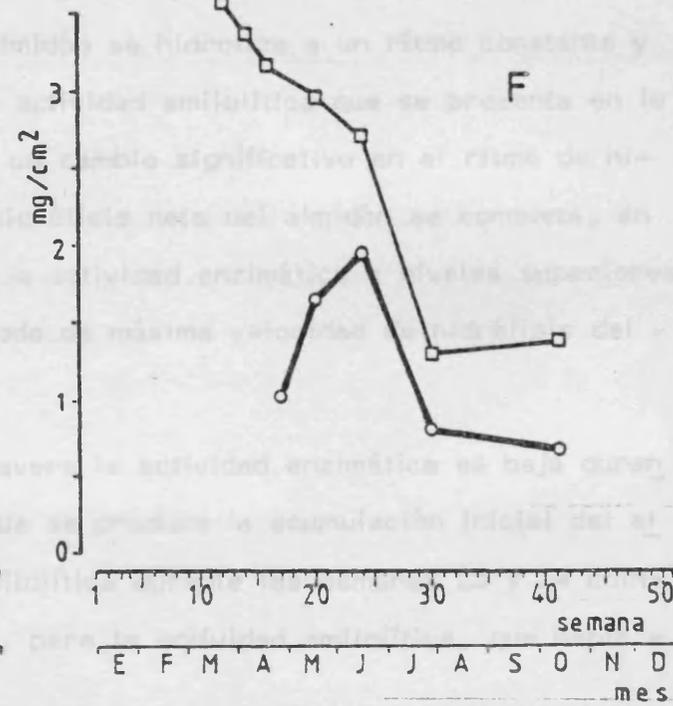
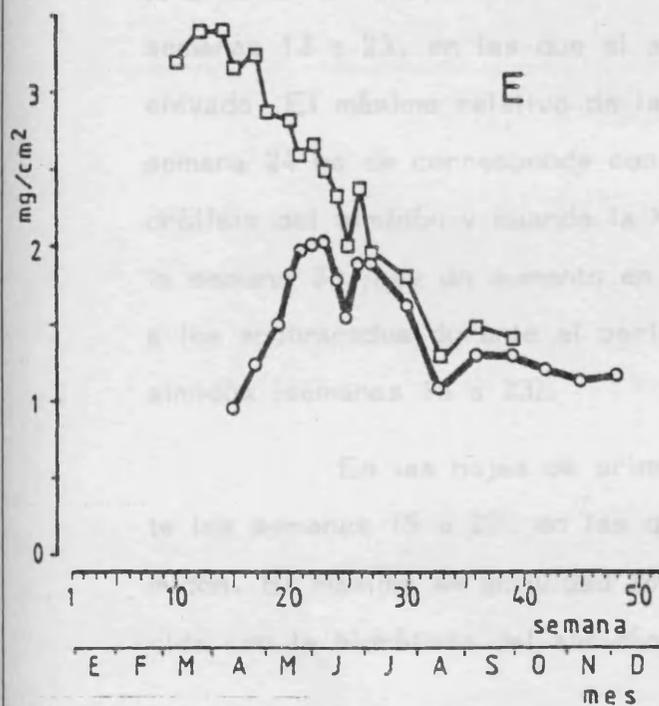
BURRIANA 1980

VILLARREAL 1980



ALMENARA 1981

VILLARREAL 1982



III.2.2.- VARIACION ESTACIONAL DE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA.-

La actividad amilolítica en las hojas varía ampliamente a lo largo del año, mostrando oscilaciones notables en la actividad enzimática total en el plazo de una semana y que se presentan simultáneamente en las hojas de otoño y en las de la brotación de primavera, sugiriendo un mecanismo de regulación común. Las oscilaciones en la actividad enzimática son cuantitativamente más importantes en las hojas adultas (figura 49) que presentan a lo largo del estudio una actividad superior al de las hojas jóvenes, si bien las curvas de variación para ésta a lo largo del año sigue una pauta similar en ambos tipos de hojas.

No existe una correspondencia clara entre el contenido en almidón de las hojas y las variaciones en la actividad amilolítica. En las hojas adultas ésta presenta un valor máximo (0,057 ud./cm² x min.) la semana 12, en coincidencia con el máximo contenido en almidón, para caer de modo inmediato a un nivel notablemente inferior (0,02 a 0,03 ud./cm² x min.) durante las semanas 13 a 23, en las que el almidón se hidroliza a un ritmo constante y elevado. El máximo relativo de la actividad amilolítica que se presenta en la semana 24 no se corresponde con un cambio significativo en el ritmo de hidrólisis del almidón y cuando la hidrólisis neta del almidón se completa, en la semana 33, hay un aumento en la actividad enzimática a niveles superiores a los encontrados durante el periodo de máxima velocidad de hidrólisis del almidón (semanas 15 a 23).

En las hojas de primavera la actividad enzimática es baja durante las semanas 15 a 22, en las que se produce la acumulación inicial del almidón. El máximo en actividad amilolítica durante las semanas 23 y 24 coincide con la hidrólisis del almidón, pero la actividad amilolítica, que había -

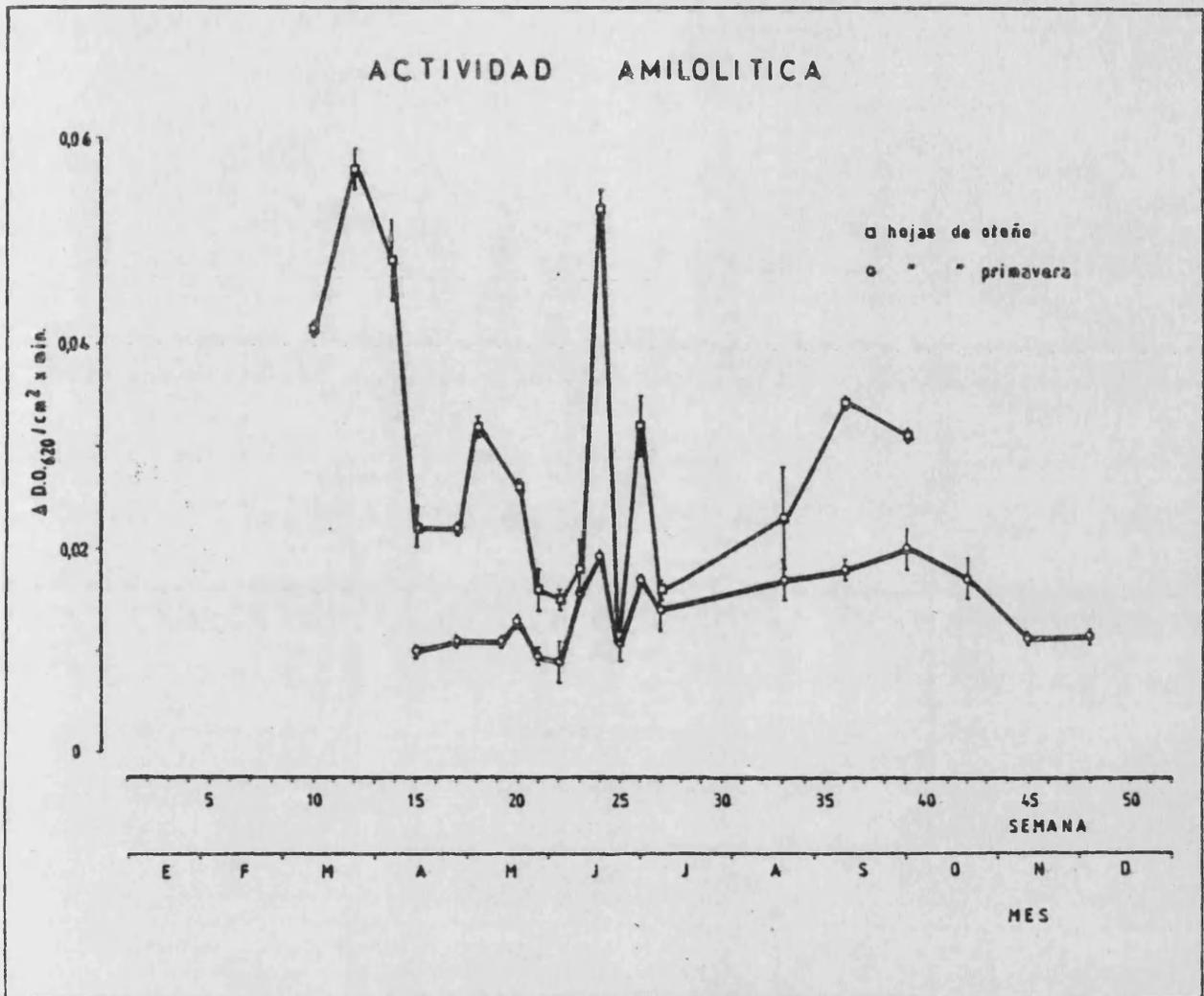


Figura 49.- Variación de la actividad amilolítica en hojas jóvenes (círculos - unidos por trazo grueso) y adultas (cuadrados unidos por trazo fino). Muestras de la parcela de Almenara.

descendido notablemente durante la semana 25 a un valor próximo al 50 % del valor encontrado la semana 24, vuelve a aumentar la semana 26 coincidiendo con la acumulación de almidón. Durante las semanas 30 a 40 la actividad enzimática es superior a la encontrada durante las semanas 14 a 22.

Las diferencias en actividad amilolítica en las hojas adultas a lo largo del tiempo no se traducen en modelos de zimogramas distintos en las electroforesis. Se encuentran las 13 bandas descritas en la sección III.1.3.1 si bien los números 7, 8 y 9 sólo aparecen ocasionalmente y sin que su presencia esté relacionada con la actividad total del extracto. Así, estas tres bandas son indetectables en los electroforegramas correspondientes a la semana 18 (figura 50), en que la actividad del extracto es de $0,03 \text{ ud./cm}^2 \times \text{min.}$, mientras tanto la banda 7 como la 8 son evidentes en el electroforegrama de la semana 33, en que la actividad total es marcadamente inferior ($0,02 \text{ ud./cm}^2 \times \text{min.}$). En los correspondientes a la semana 24 (con un máximo de actividad muy acusado) sí que es evidente la presencia de las tres bandas citadas.

Sí se encuentran diferencias cualitativas en los electroforegramas de las hojas jóvenes con el transcurso del tiempo y cuando se comparan con los correspondientes a hojas adultas de la misma época. En aquéllas, las bandas número 7 y 8 son inicialmente muy evidentes (semana 22; figura 50) disminuyendo su intensidad con el tiempo para hacerse indetectables a partir de la semana 25. Con posterioridad a estas fechas, estas bandas sólo se presentan ocasionalmente y precisamente en los mismos muestreos en que se detectan en las hojas adultas (semanas 33 y 42; datos no presentados).

Coincidiendo con la reducción en la intensidad de las bandas 7 y 8 hay un aumento en la actividad de las bandas 5 y 6, inicialmente indetectables, siendo esta banda número 5 perfectamente visible en la semana 25 (figura 51). En las semanas siguientes su actividad relativa frente a las bandas

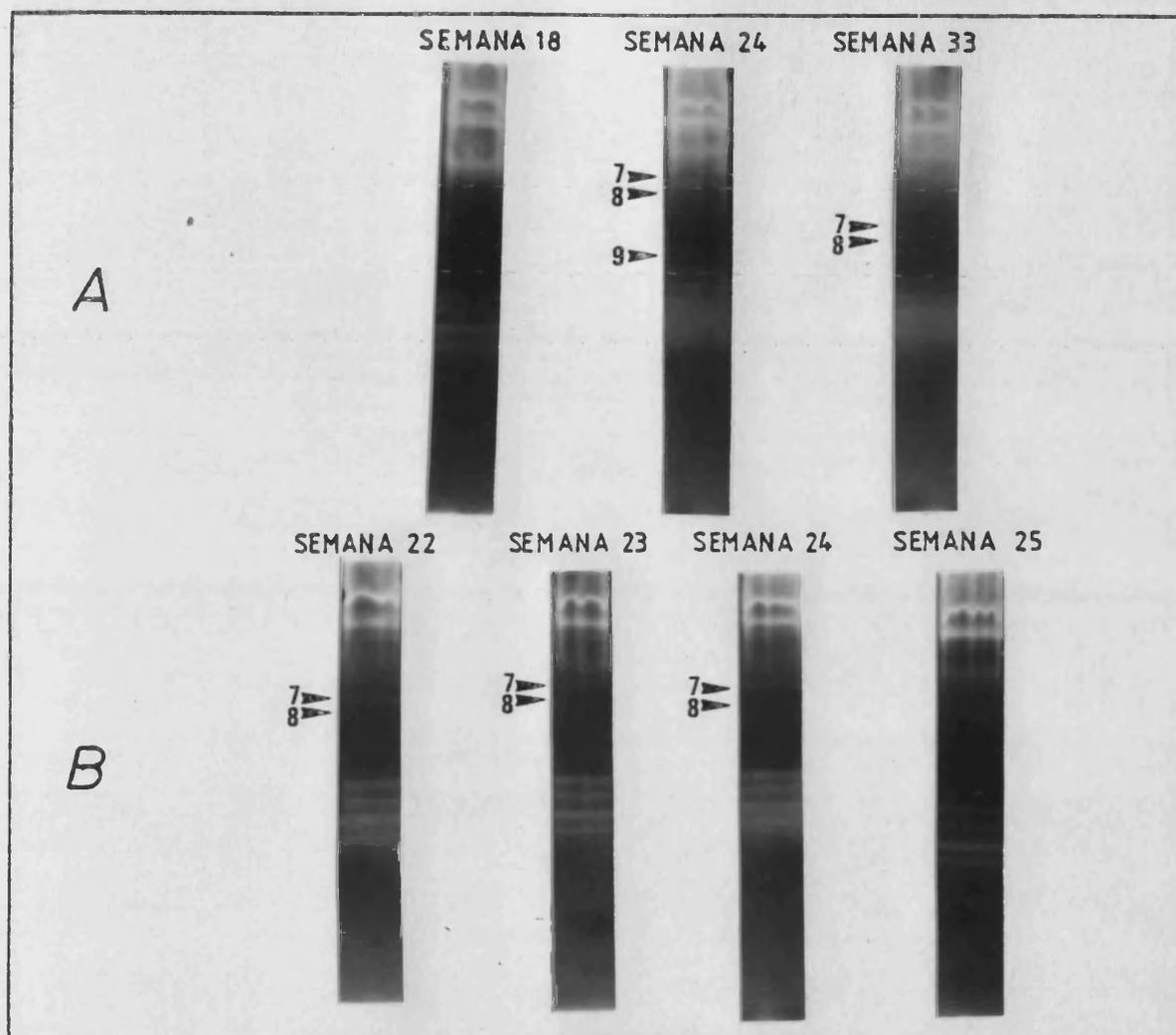


Figura 50.- Electroforegramas de extractos crudos de hojas adultas (A) y jóvenes (B) en gels con amilopectina azure 0,25 % como sustrato. Incubación en tampón acetato 0,1 M pH 5,0 con Cl_2Ca 1 mM, durante dos horas, a 30 °C.

1, 2 y 3 aumenta gradualmente y ya en la semana 27 el modelo de zimograma para las bandas de baja movilidad es comparable al obtenido para las hojas adultas.

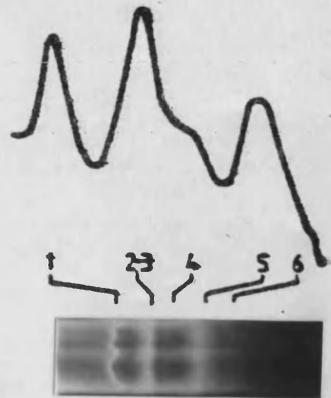
Desde los primeros muestreos las cuatro bandas de mayor movilidad presentan una intensidad similar en las hojas jóvenes. Con la edad de la hoja disminuye la intensidad relativa de las bandas 10 y 11 en relación con la de las bandas 12 y 13 y en la semana 25 el modelo de zimograma obtenido es comparable en los dos tipos de hoja (figura 52).

Figura 51.- Zona de menor movilidad de los electroforegramas y densitogramas de extractos crudos de hojas adultas y jóvenes. Incubación en tampón acetato 0,1 M pH 5,0 con Cl_2Ca 1 mM, durante dos horas, a 30°C. Amilopectina azure 0,25 % como sustrato.

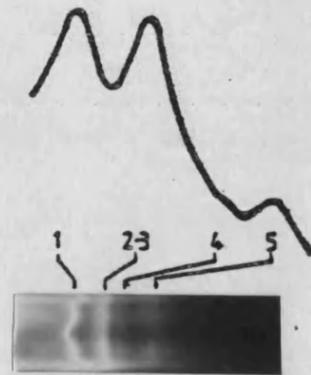
Hojas de
otoño

Hojas de
primavera

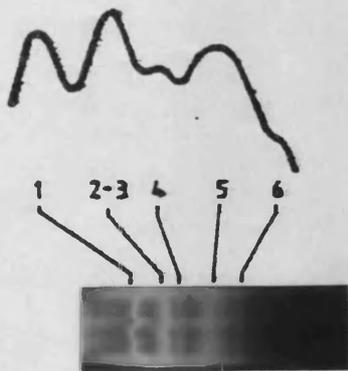
Semana
25



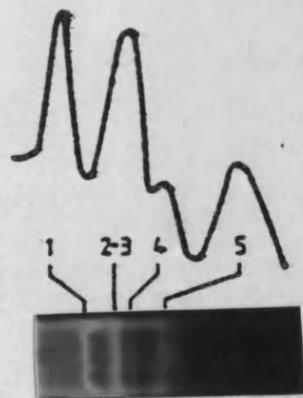
0.0.620



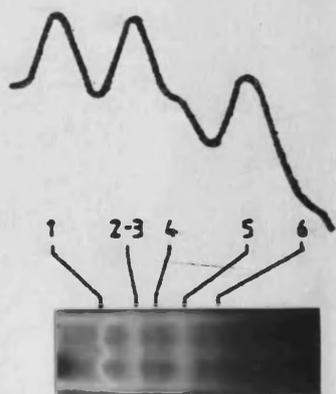
Semana
26



0.0.620



Semana
27



0.0.620

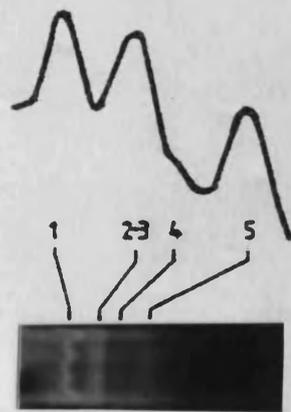


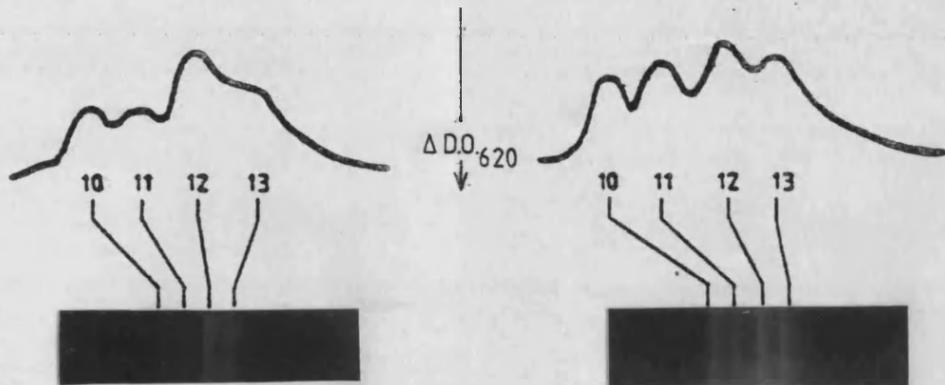
Figura 52.- Zona de mayor movilidad de los electroforegramas y densitogramas de extractos crudos de hojas adultas y jóvenes. Incubación en tampón acetato 0,1 M pH 5,0 con Cl_2Ca 1 mM, durante dos horas, a 30°C. Amilopectina azure 0,25 % como sustrato.

Hojas de
otoño

Hojas de
primavera

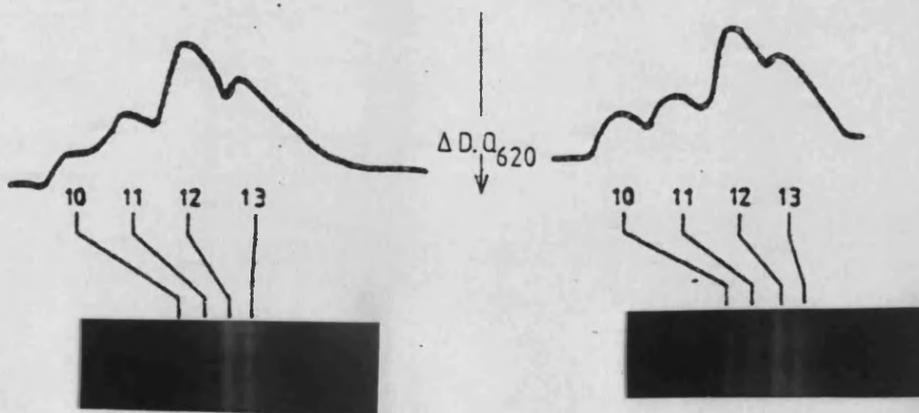
Semana

23



Semana

25



III.2.3.- INFLUENCIA DEL FRUTO SOBRE LA MOVILIZACION DE LOS CARBOHIDRATOS Y LA ACTIVIDAD AMILOLITICA.-

La eliminación de los frutos en desarrollo de los brotes con una sola flor (fruto) en posición terminal aceleró la hidrólisis del almidón de modo ligero pero significativo en las hojas del brote (Figura 53-A, Tabla 11) que, al cabo de nueve días presentaron un contenido similar al de las hojas de brotes vegetativos, manteniendo posteriormente valores iguales a éstas. En las hojas de brotes con frutos la movilización del almidón continuó más lentamente. En los tres tipos de hojas se produce una ligera disminución en el contenido en azúcares solubles, principalmente durante los nueve primeros días (Figura 54-A, Tabla 12), sin que se observen diferencias entre las hojas de ramas con y sin fruto, de modo que la evolución de los carbohidratos totales en estas hojas es igual a la descrita para el almidón (figura 55-A, tabla 13).

La actividad amilolítica aumentó de forma constante a partir del comienzo en las hojas de brotes sin fruto hasta 9 días (figura 56-A) o una semana (figura 57) después de iniciarse los experimentos, aproximándose rápidamente a los valores de actividad que presentaban las hojas de brotes vegetativos, inicialmente mayores, para seguir una evolución paralela hasta al menos un mes después de la eliminación del fruto (tabla 14).

En las hojas de otoño no se aprecian diferencias en la movilización del almidón cuando se eliminan todos los frutos en desarrollo de la rama en que están situados con respecto a ramas con frutos (figura 53-B, tabla 11). Se produce un descenso rápido del contenido en almidón en ambos tipos de hojas durante los primeros días, seguido de un descenso más gradual. Tampoco se advierten diferencias en azúcares solubles (figura 54-B, tabla 12) y actividad amilolítica (figura 56-B, tabla 14); ambos parámetros mantienen los valores iniciales durante todo el periodo de estudio.

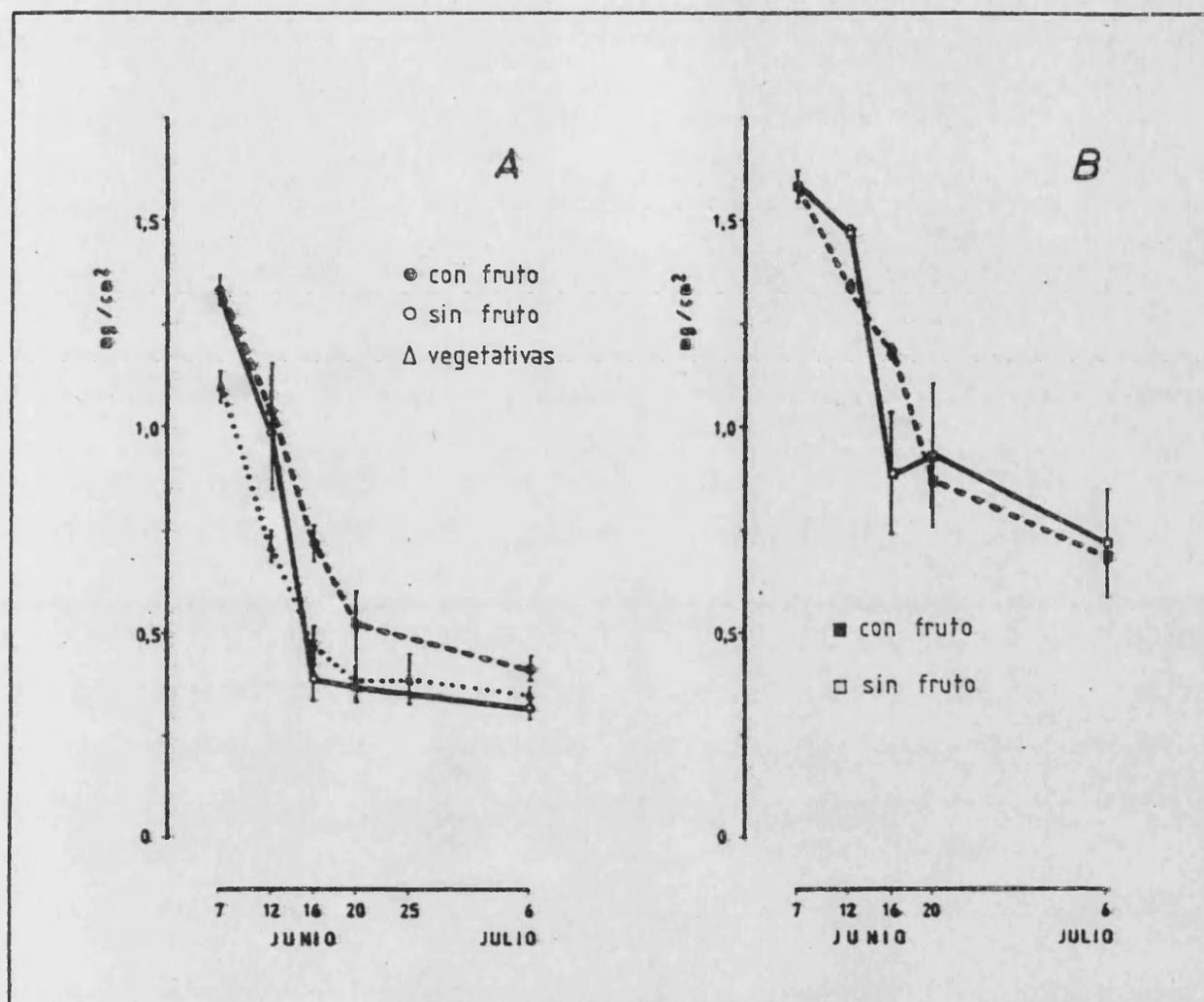


Figura 53.- Cambios en el contenido de almidón en hojas jóvenes (A) y adultas (B) en relación con la presencia o ausencia de fruto en las ramas. Muestras de la parcela de Almenara, tomadas durante el periodo de la caída de fruto en primavera, en 1982. Para la transformación de los datos, obtenidos como porcentaje sobre peso seco, en mg/cm^2 , se multiplicaron los valores por el peso por unidad de superficie de hojas de la misma brotación y tomadas en las mismas fechas.

T A B L A 11

Efecto de la eliminación del fruto sobre el contenido de almidón en hojas.

MODELO.- $x_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (A*B)_{ij} + \epsilon_{k(ij)}$

siendo: A = fecha ; B = tratamiento (presencia o ausencia de fruto)

TABLA DEL ANALISIS DE LA VARIANZA.- Hojas jóvenes.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrados medios	F
Fecha	3,438	4	0,860	53,19**
Tratamiento	0,238	2	0,119	7,35**
Interacción	0,123	8	0,015	-
Residual	0,242	15	0,016	

** significativo al 1 %

DIAGRAMA DEL TEST (efecto tratamiento).-

	Con fruto	Sin fruto	Vegetativas
Con fruto		1	1
Sin fruto			0
Vegetativas			

TABLA DEL ANALISIS DE LA VARIANZA.- Hojas adultas.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrados medios	F
Fecha	2,393	4	0,598	30,74**
Tratamiento	0,012	1	0,012	-
Interacción	0,096	4	0,024	1,23 ns
Residual	0,195	10	0,019	

** significativo al 1 %

ns no significativo

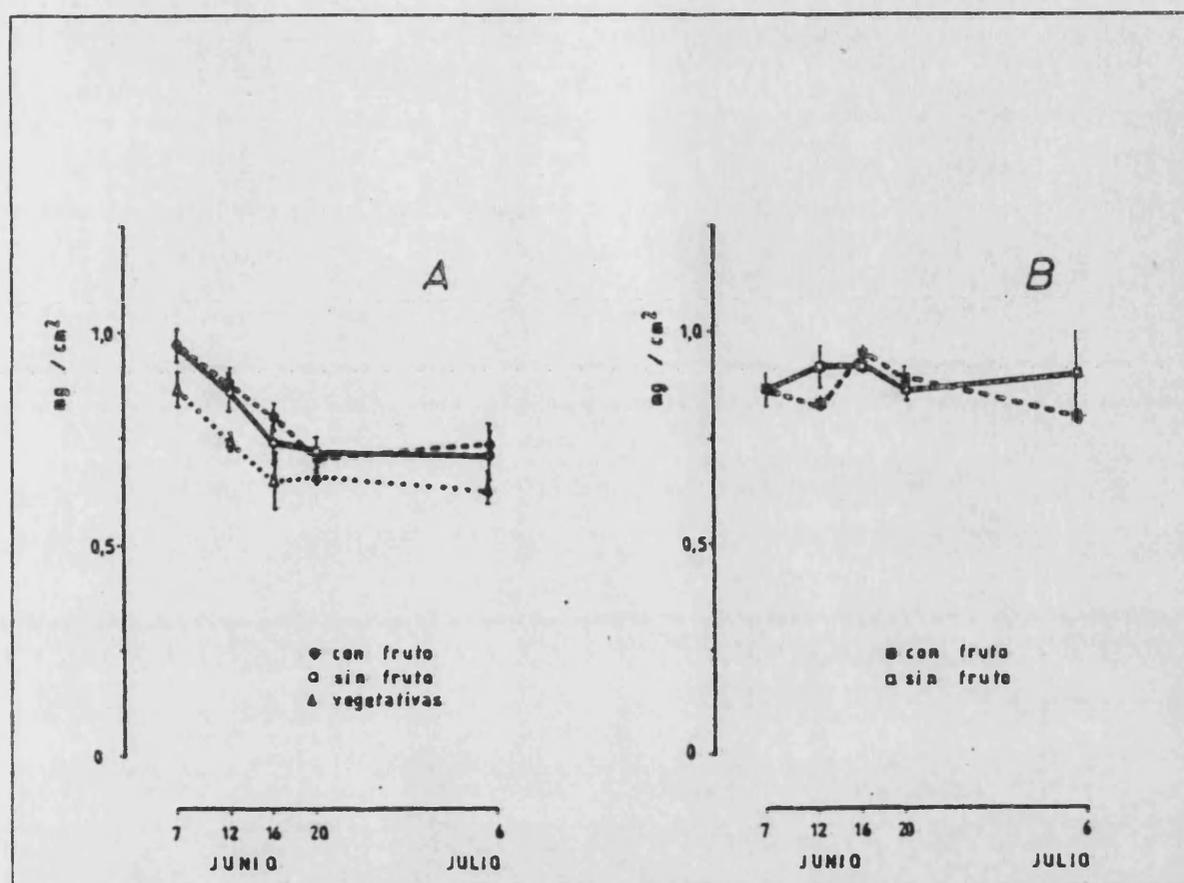


Figura 54.- Cambios en el contenido en azúcares solubles en hojas jóvenes (A) y adultas (B) en relación con la presencia o ausencia de fruto en las ramas. Muestras tomadas en 1982 en la parcela de Almenara, durante el periodo de caída de fruto en primavera. Para la transformación de los datos, obtenidos como porcentaje sobre peso seco, en mg/cm^2 , se multiplicaron los valores por el peso por unidad de superficie de hojas de la misma brotación y tomadas durante las mismas fechas.

T A B L A 12

Efecto de la eliminación del fruto sobre el contenido de azúcares solubles en hojas.

MODELO.-
$$x_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (A*B)_{ij} + \epsilon_{k(ij)}$$

siendo: A = fecha; B = tratamiento (presencia o ausencia de fruto)

TABLA DEL ANALISIS DE LA VARIANZA.- Hojas jóvenes.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrados medios	F
Fecha	0,263	4	0,066	16,01**
Tratamiento	0,057	2	0,029	6,96**
Interacción	0,013	8	0,002	-
Residual	0,062	15	0,004	

** significativo al 1 %

DIAGRAMA DEL TEST (efecto tratamiento).-

	Con fruto	Sin fruto	Vegetativas
Con fruto	0	1	
Sin fruto		1	
Vegetativas			

TABLA DEL ANALISIS DE LA VARIANZA.- Hojas adultas.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrados medios	F
Fecha	0,020	4	0,005	1,33 ns
Tratamiento	0,010	1	0,010	2,61 ns
Interacción	0,016	4	0,004	1,02 ns
Residual	0,038	10	0,0038	

ns no significativo

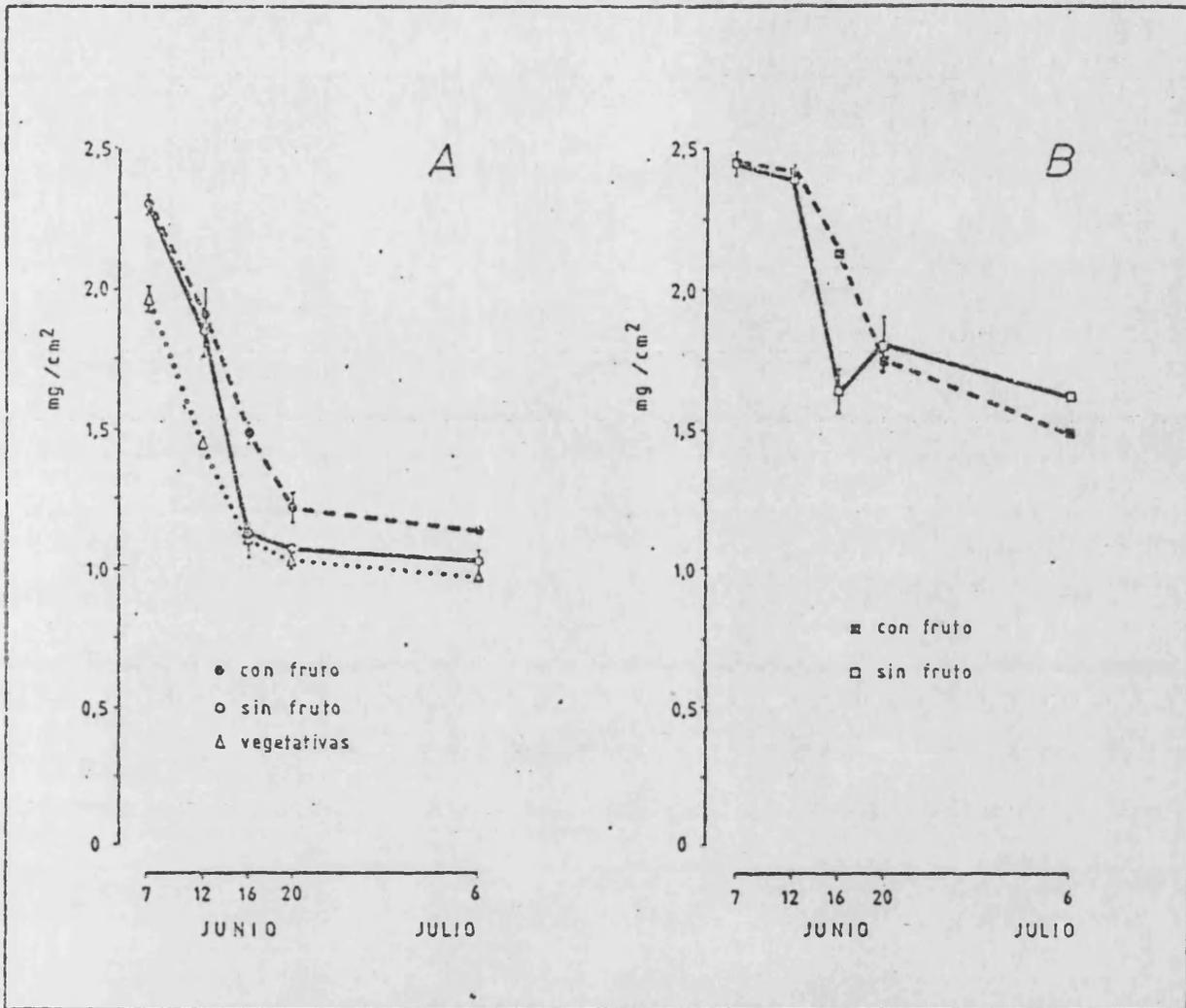


Figura 55.- Cambios en el contenido en carbohidratos totales en hojas jóvenes (A) y adultas (B) en relación con la presencia o ausencia de fruto en las ramas. Muestras de la parcela de Almenara, tomadas en 1982 durante el periodo de la caída de fruto en primavera.

T A B L A 13

Efecto de la eliminación de fruto sobre el contenido de carbohidratos totales en hojas

MODELO.-
$$x_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (A*B)_{ij} + \epsilon_{k(ij)}$$

siendo: A= fecha, B = tratamiento (presencia o ausencia de fruto)

TABLA DEL ANALISIS DE LA VARIANZA.- Hojas jóvenes.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrados medios	F
Fecha	5,596	4	1,399	85,83 **
Tratamiento	0,480	2	0,240	14,71 **
Interacción	0,182	8	0,023	1,40 ns
Residual	0,245	15	0,016	

** significativo al 1 %

DIAGRAMA DEL TEST (efecto tratamiento).-

	Con fruto	Sin fruto	Vegetativas
Con fruto		1	1
Sin fruto			1
Vegetativas			

TABLA DEL ANALISIS DE LA VARIANZA.- Hojas adultas.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrados medios	F
Fecha	2,473	4	0,618	32,13 **
Tratamiento	0,0001	1	0,0001	-
Interacción	0,149	4	0,038	1,96 ns
Residual	0,192	10	0,019	

** significativo al 1 %

ns no significativo

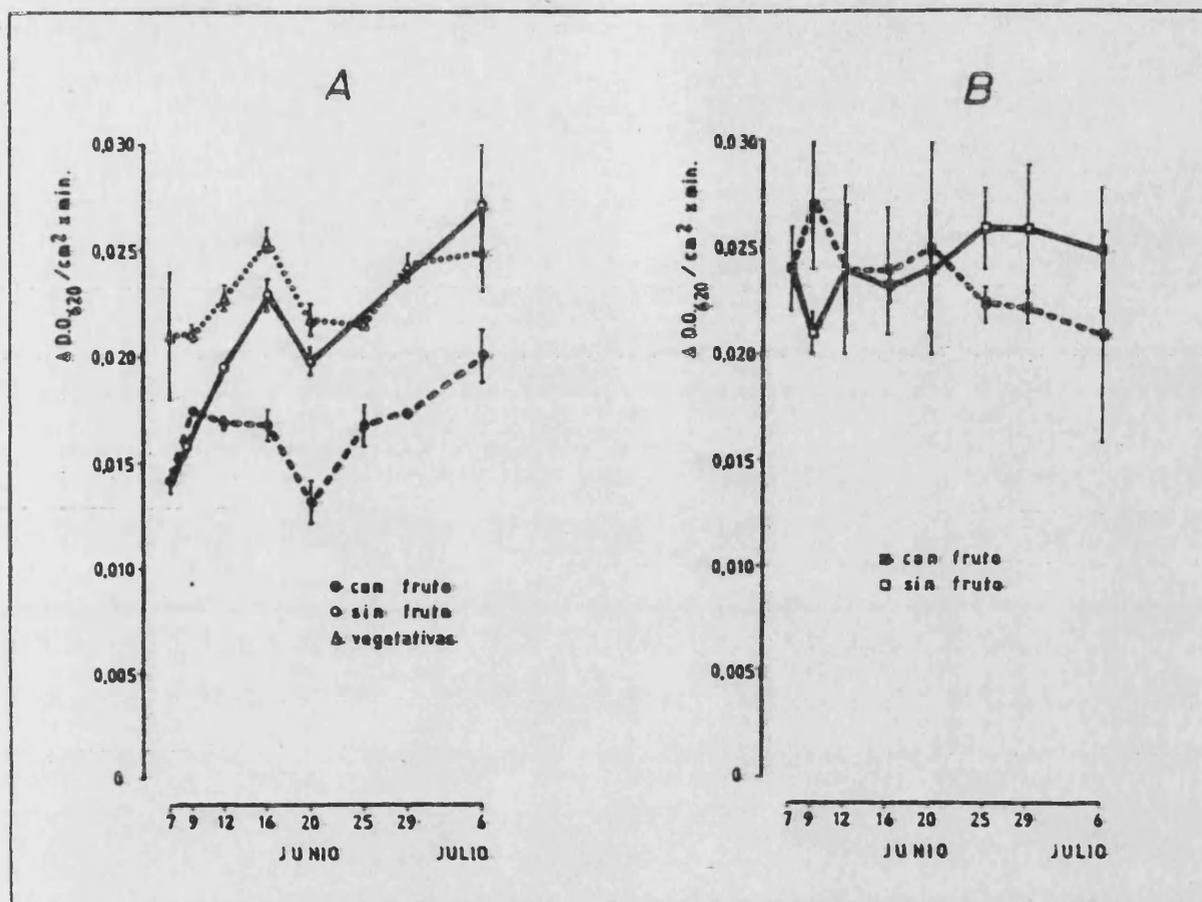


Figura 56.- Cambios en la actividad amilolítica en hojas jóvenes (A) y adultas (B) en relación con la presencia o ausencia de fruto en las ramas. Muestras tomadas en 1982 en la parcela de Almenara durante el periodo de la caída de fruto en primavera. Para la transformación de los datos, obtenidos como actividad por gramo de peso fresco, en actividad por unidad de superficie, se multiplicaron los valores por el peso por unidad de superficie de hojas de la misma brotación y tomadas durante las mismas fechas.

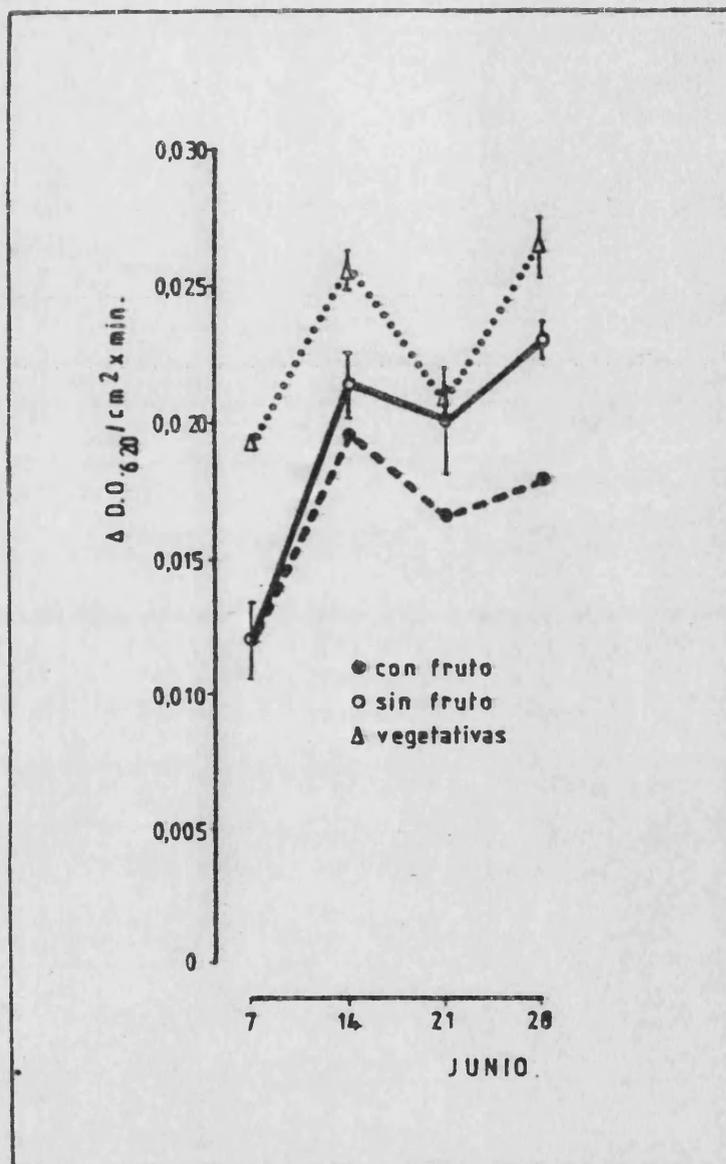


Figura 57.- Cambios en la actividad amilolítica en hojas jóvenes en relación con la presencia o ausencia de fruto en las ramas. - Muestras tomadas en 1983 en la parcela de Almenara durante el periodo de la caída de fruto en primavera .

T A B L A 14

Efecto de la eliminación del fruto sobre la actividad amilolítica en hojas.

MODELO.-
$$x_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (A*B)_{ij} + \epsilon_{k(ij)}$$

siendo: A = fecha, B = tratamiento (presencia o ausencia de fruto)

TABLA DEL ANALISIS DE LA VARIANZA.- Hojas jóvenes. Año 1982.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrados medios	F
Fecha	0,000222	5	0,000044	17,00 **
Tratamiento	0,000241	2	0,000121	46,15 **
Interacción	0,000093	10	0,000009	3,56 **
Residual	0,000047	18	0,0000026	

** significativo al 1 %

DIAGRAMA DEL TEST (efecto tratamiento).-

	Con fruto	Sin fruto	Vegetativas
Con fruto		1	1
Sin fruto			1
Vegetativas			

TABLA DEL ANALISIS DE LA VARIANZA.- Hojas adultas

Fuente	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrados medios	F
Fecha	0,000006	7	0,0000009	-
Tratamiento	0,000006	1	0,000006	-
Interacción	0,000090	7	0,000013	-
Residual	0,000298	16	0,000019	

TABLA DEL ANALISIS DE LA VARIANZA.- Hojas jóvenes. Año 1983.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrados medios	F
Fecha	0,000259	3	0,000086	39,69 **
Tratamiento	0,000167	2	0,000084	38,77 **
Interacción	0,000028	6	0,0000047	2,17 ns
Residual	0,000026	12	0,0000022	

** significativo al 1%

DIAGRAMA DEL TEST (efecto tratamiento).-

	Con fruto	Sin fruto	Vegetativas
Con fruto		1	1
Sin fruto			1
Vegetativas			

Los electroforegramas de los extractos enzimáticos de las hojas adultas (A) y las jóvenes (C, hojas de brotes con fruto; V, hojas de brotes vegetativos) se presentan en la figura 58. En todos los muestreos es posible distinguir los extractos correspondientes a las hojas adultas y a las jóvenes, siendo las diferencias similares a las descritas en el apartado III.2.2. : la banda número 5 aparece en las hojas adultas pero no en las jóvenes mientras que la intensidad relativa de las números 10 y 11 frente a las 12 y 13 es mayor en las hojas jóvenes. Sin embargo, no se observan diferencias debidas a la presencia del fruto en cada grupo de hojas. Las pequeñas variaciones cuantitativas en actividad encontradas no son detectables densitométricamente y las mismas isoenzimas están presentes en las hojas de brotes vegetativos y en las de brotes fructíferos.

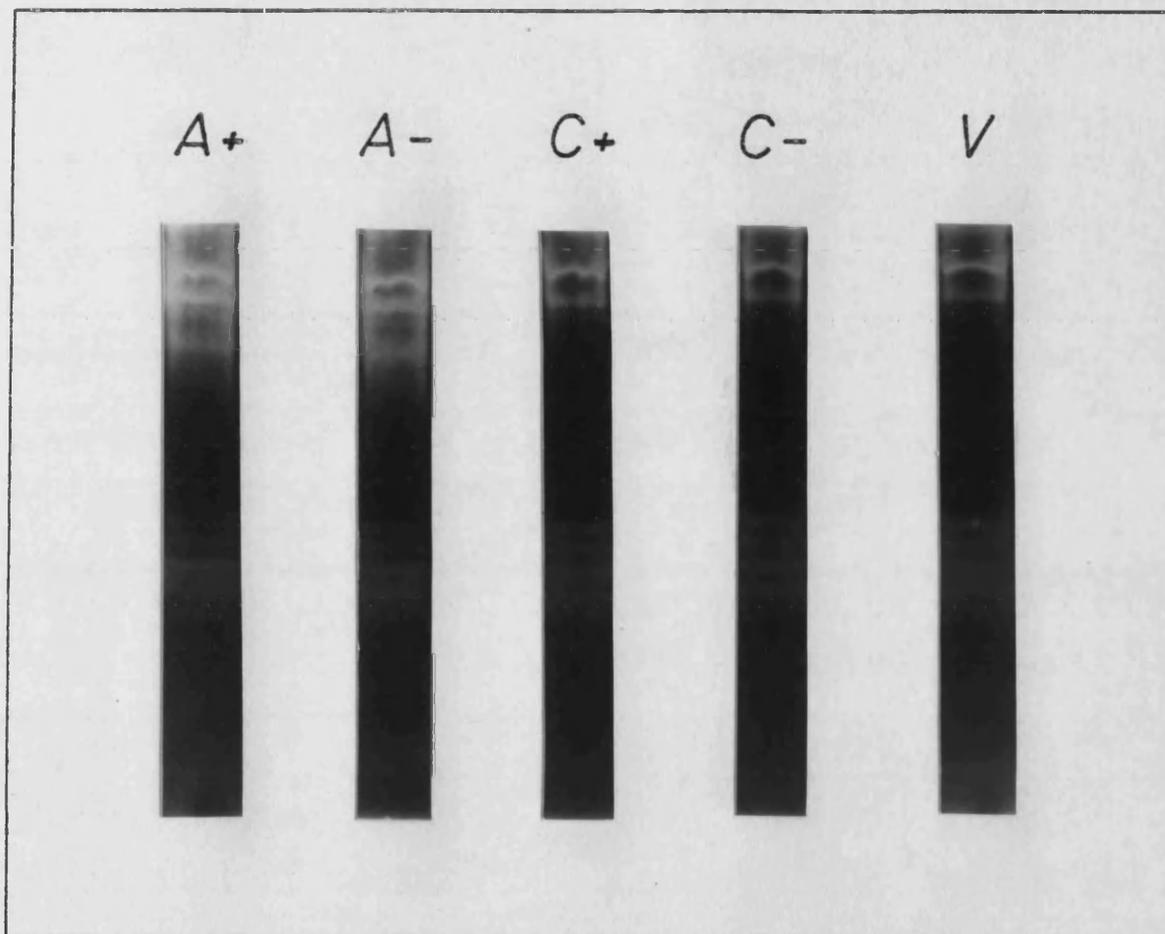


Figura 58.- Electroforegramas de extractos crudos de hojas de ramas con frutos (+) y de ramas en las que éstos han sido eliminados manualmente (-). Hojas adultas (A) y jóvenes de brotes fructíferos (C) y vegetativos (V). Incubación en tampón acetato 0,1 M a pH 5,0, con Cl_2Ca 1 mM durante dos horas, a 30 °C. Gel con amilopectina azure 0,25 % incorporada como sustrato.

III.3.- VARIACIONES DURANTE LA SENESCENCIA.-

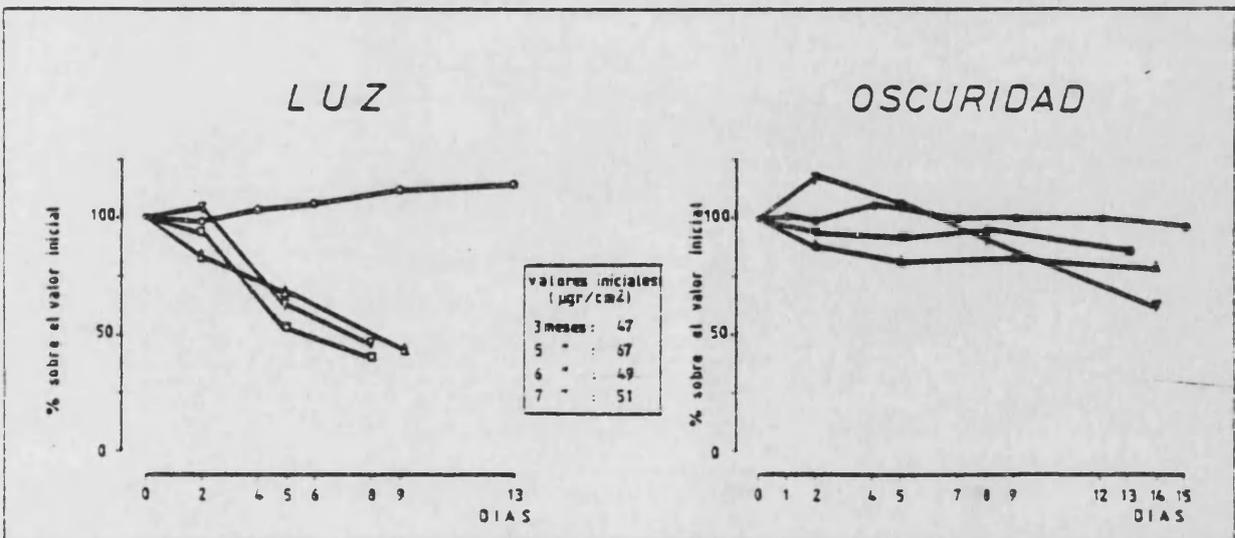
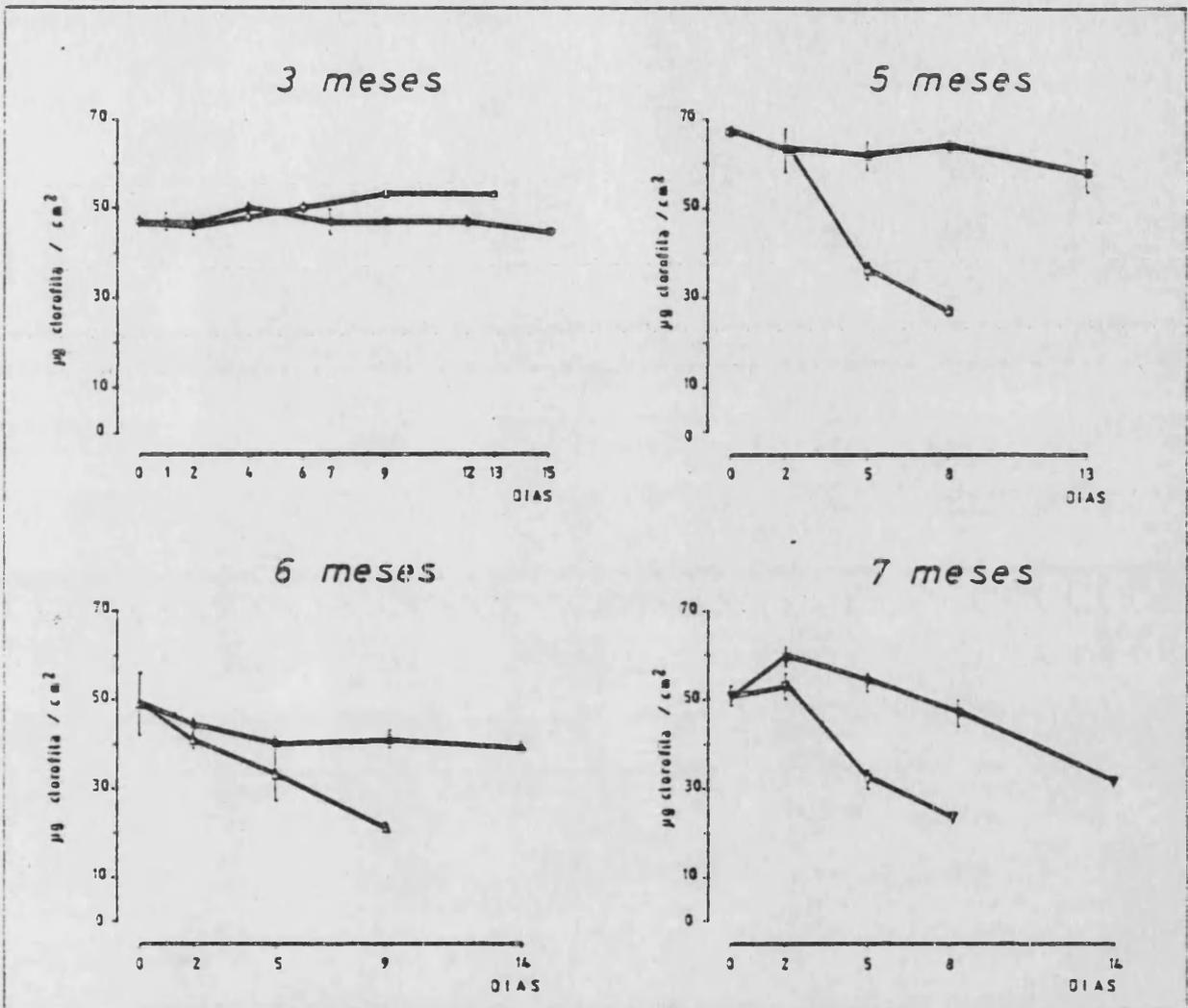
III.3.1.- COMPORTAMIENTO DE LAS HOJAS SEPARADAS DE LA PLANTA.-

La separación de las hojas de la planta y su incubación en un medio húmedo desencadena una serie de procesos que culminan con la muerte de la hoja. La abscisión del peciolo es el primer síntoma normalmente observado que coincide en el tiempo con la pérdida visible en clorofila. Esta se acentúa con el tiempo hasta que finalmente la hoja adquiere un color marrón parduzco y sufre una contaminación fúngica importante.

Si bien estas fases se presentan en este orden, la velocidad de las mismas está determinada por la edad de la hoja y por las condiciones de incubación. En la figura 59 se presenta la variación en el contenido en clorofila. Esta variación es inapreciable en las hojas de tres meses de edad que cuando se incuban a la luz presentan incluso un incremento neto en el contenido que aumenta gradualmente con el tiempo. A partir de los 5 meses de edad, la pérdida de clorofila es evidente dos días después de la separación de la planta y procede linealmente con el tiempo en las hojas incubadas a la luz durante al menos una semana, tiempo durante el que se degrada la mitad de la clorofila presente inicialmente en las hojas.

A la oscuridad la pérdida de clorofila es mucho menos importante y 10 días después de la separación de la planta, las hojas conservan entre el 80 y el 90 % de la clorofila presente al comienzo de los experimentos.

Figura 59.- Variaciones en el contenido en clorofila de hojas separadas de la planta a lo largo de su incubación a la luz (símbolos vacíos) o a la oscuridad (símbolos llenos),



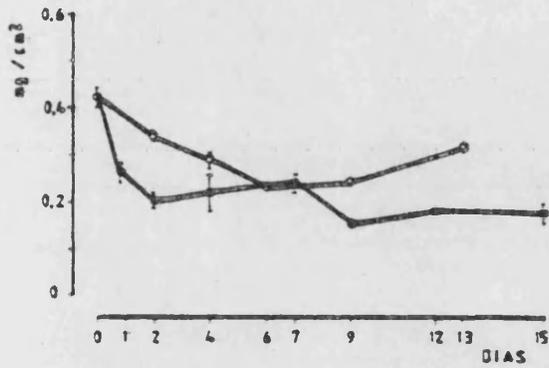
III.3.2.- CAMBIOS EN EL CONTENIDO EN CARBOHIDRATOS

La separación de la planta provocó de modo inmediato la movilización del almidón almacenado en sus tejidos (figura 60); después de dos días de incubación el contenido en almidón oscila entre el 45 y el 85 % del contenido inicial, siendo ligeramente mayor en las plantas mantenidas a la luz, - aunque las diferencias no son siempre consistentes en todos los experimentos. Posteriormente hay una pérdida gradual de almidón a la oscuridad hasta valores cercanos al 40 % del almidón inicial; a la luz, el comportamiento ulterior es errático pues mientras en algunos casos hay una recuperación hasta un valor del 75 % del inicial (hojas de tres meses de edad), en otros (hojas de 5 y 6 meses) hay una pérdida adicional superior a la encontrada en las hojas mantenidas a la oscuridad. Sorprendentemente no hay relación entre la hidrólisis del almidón y el contenido inicial en la hoja, salvo para las hojas incubadas a la luz después de 5 días en que el porcentaje de almidón hidrolizado es mayor en las hojas de 6 y 7 meses de edad (contenido inicial de almidón: 1,48 y 1,22 mg/cm²) que en las hojas mas jóvenes (contenido inicial: 0,42 y 0,53 mg/cm²). Así, en las hojas incubadas en la oscuridad el almidón residual después de 15 días es del mismo orden en las hojas de 3 y 6 meses de edad, a pesar de la marcada diferencia en su contenido inicial.

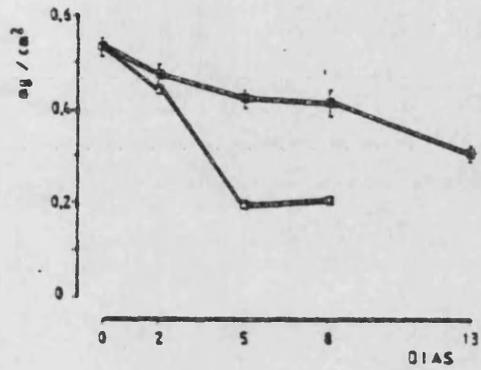
Se presentan influencias notables de las condiciones de incubación en el contenido de azúcares (figuras 61 y 62). En las hojas incubadas a la luz los azúcares solubles se mantuvieron a una concentración similar a la encontrada en el momento de la separación, independientemente del valor inicial -que osciló entre 0,5 mg/cm² (hojas de 3 meses) y 1,0 mg/cm² (hojas de 7 meses)- y aún aumenta notablemente en un caso (hojas de 6 meses de edad). A la oscuridad hay un descenso gradual pero significativo en su concentración que, trece días después, oscila entre el 50 y el 60 % del contenido ini

Figura 60.- Variaciones en el contenido en almidón de hojas separadas de la planta a lo largo de su incubación a la luz (símbolos vacíos) o a la oscuridad (símbolos llenos).

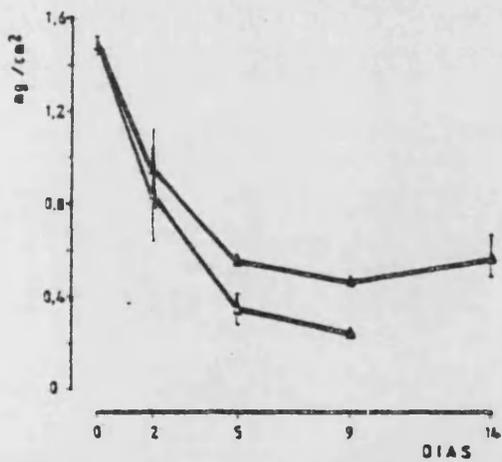
3 meses



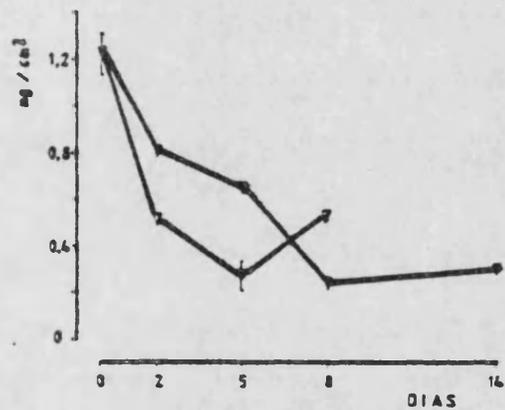
5 meses



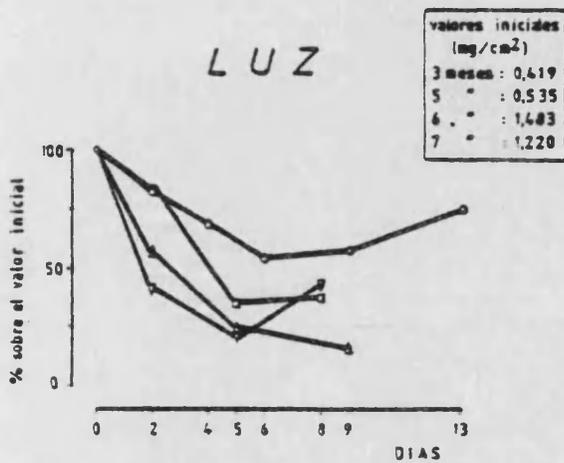
6 meses



7 meses



LUZ



OSCURIDAD

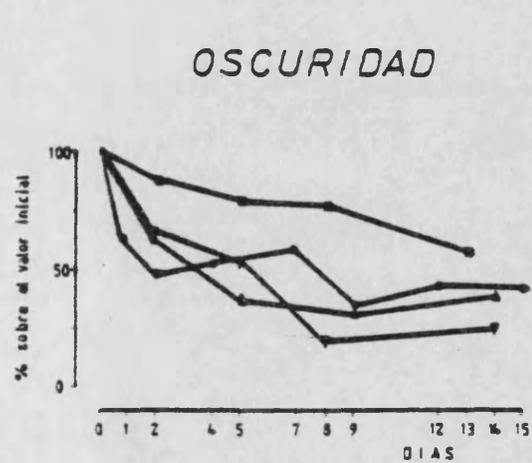


Figura 61.- Variaciones en el contenido en azúcares solubles de hojas separadas de la planta a lo largo de su incubación a la luz (símbolos vacíos) o a la oscuridad (símbolos llenos).

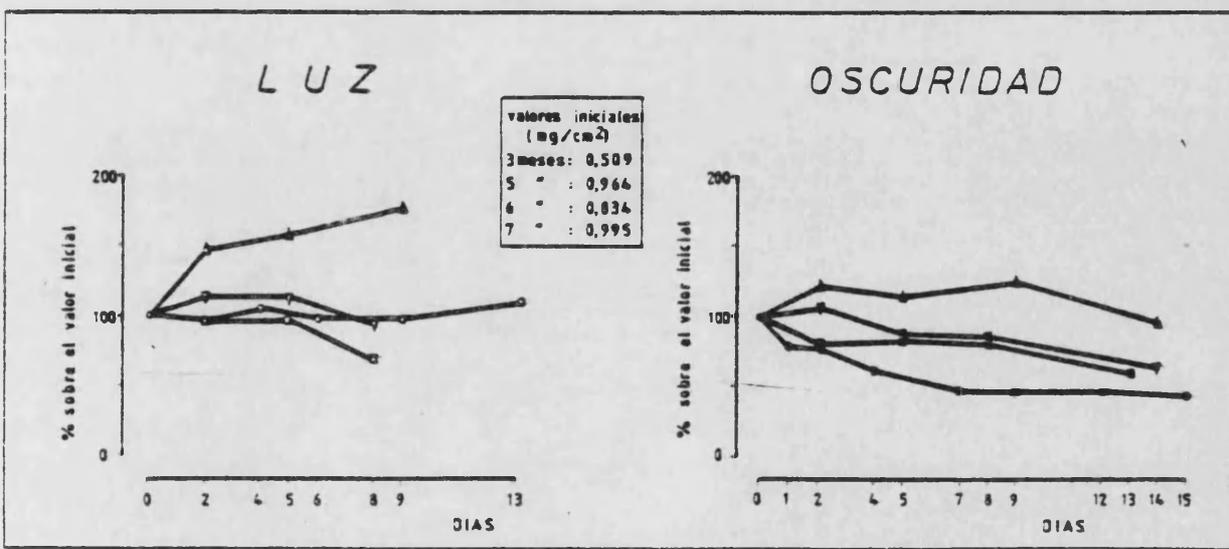
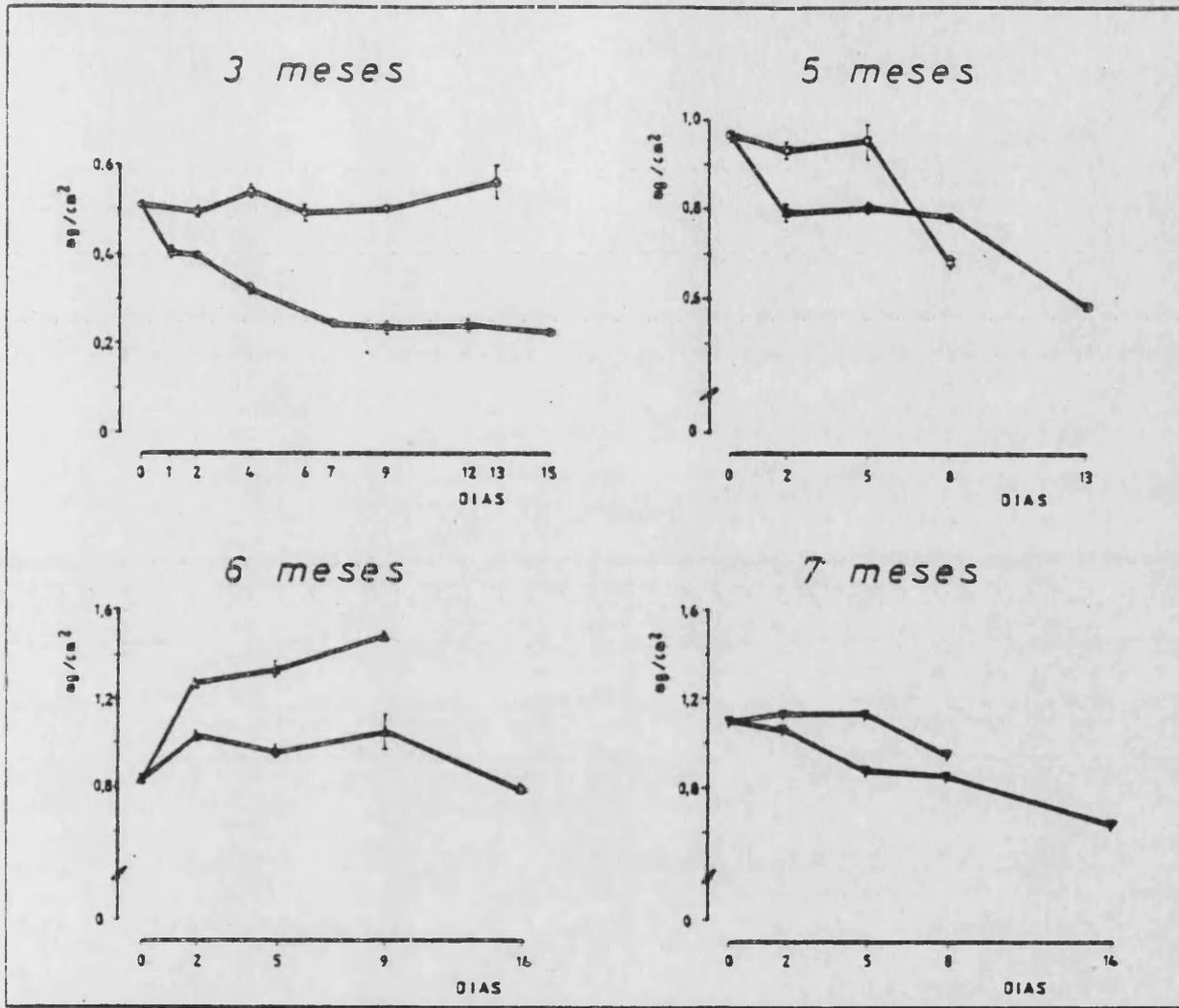
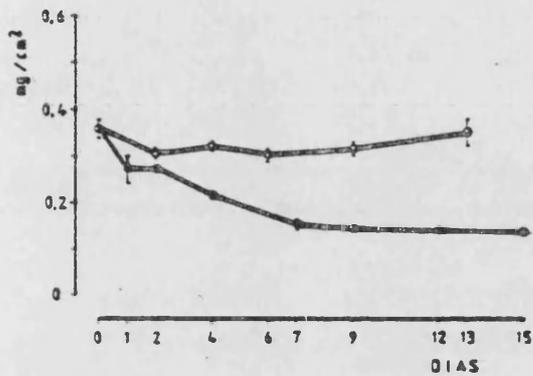
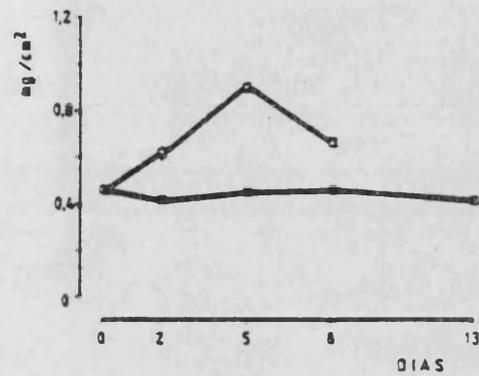


Figura 62.- Variaciones en el contenido en azúcares reductores de hojas se-
paradas de la planta a lo largo de su incubación a la luz (sím-
bolos vacíos) o a la oscuridad (símbolos llenos).

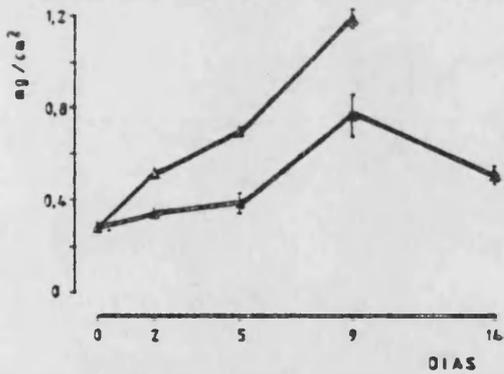
3 meses



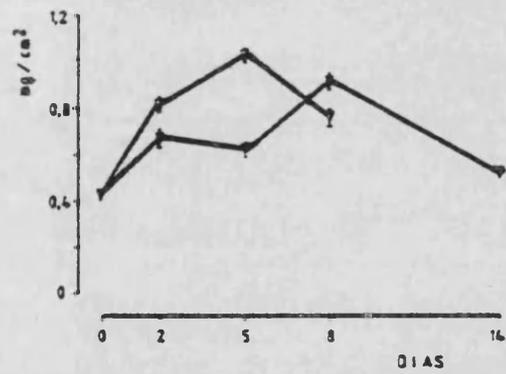
5 meses



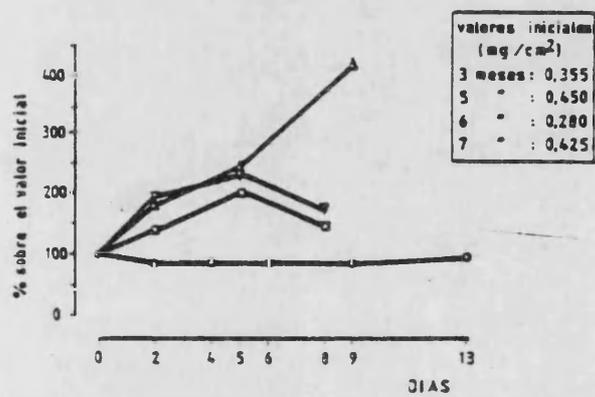
6 meses



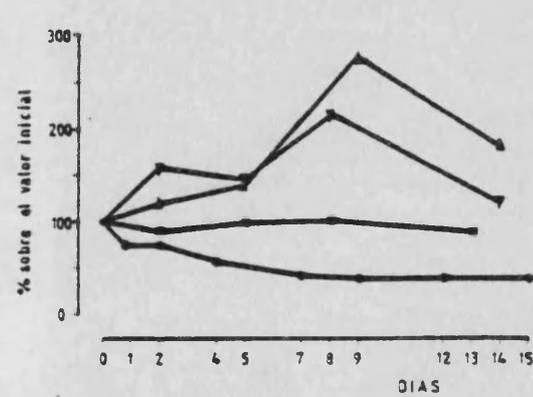
7 meses



L U Z



OSCURIDAD

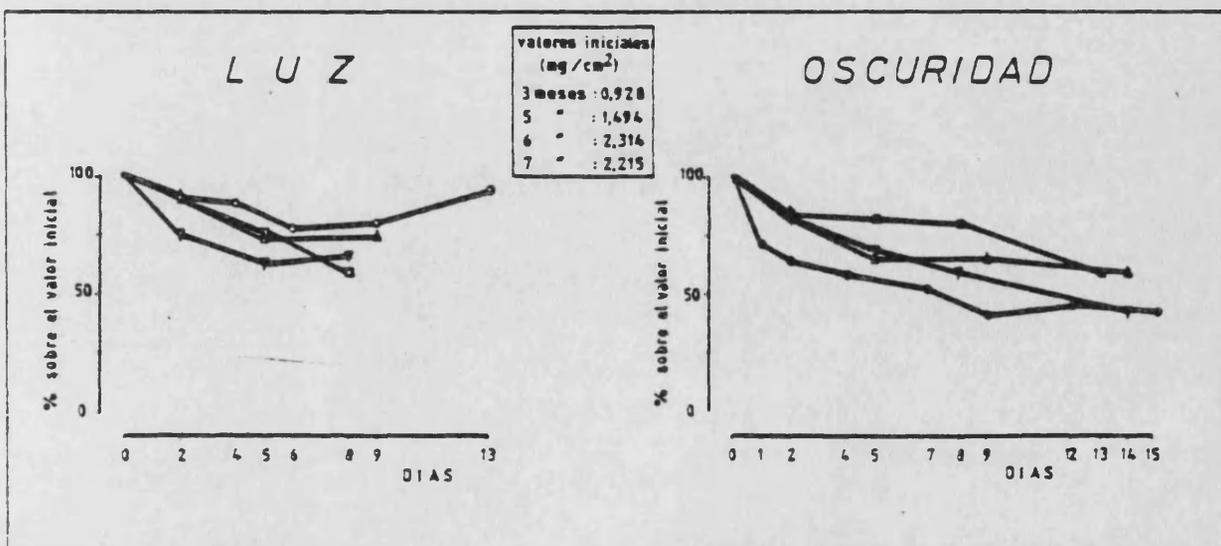
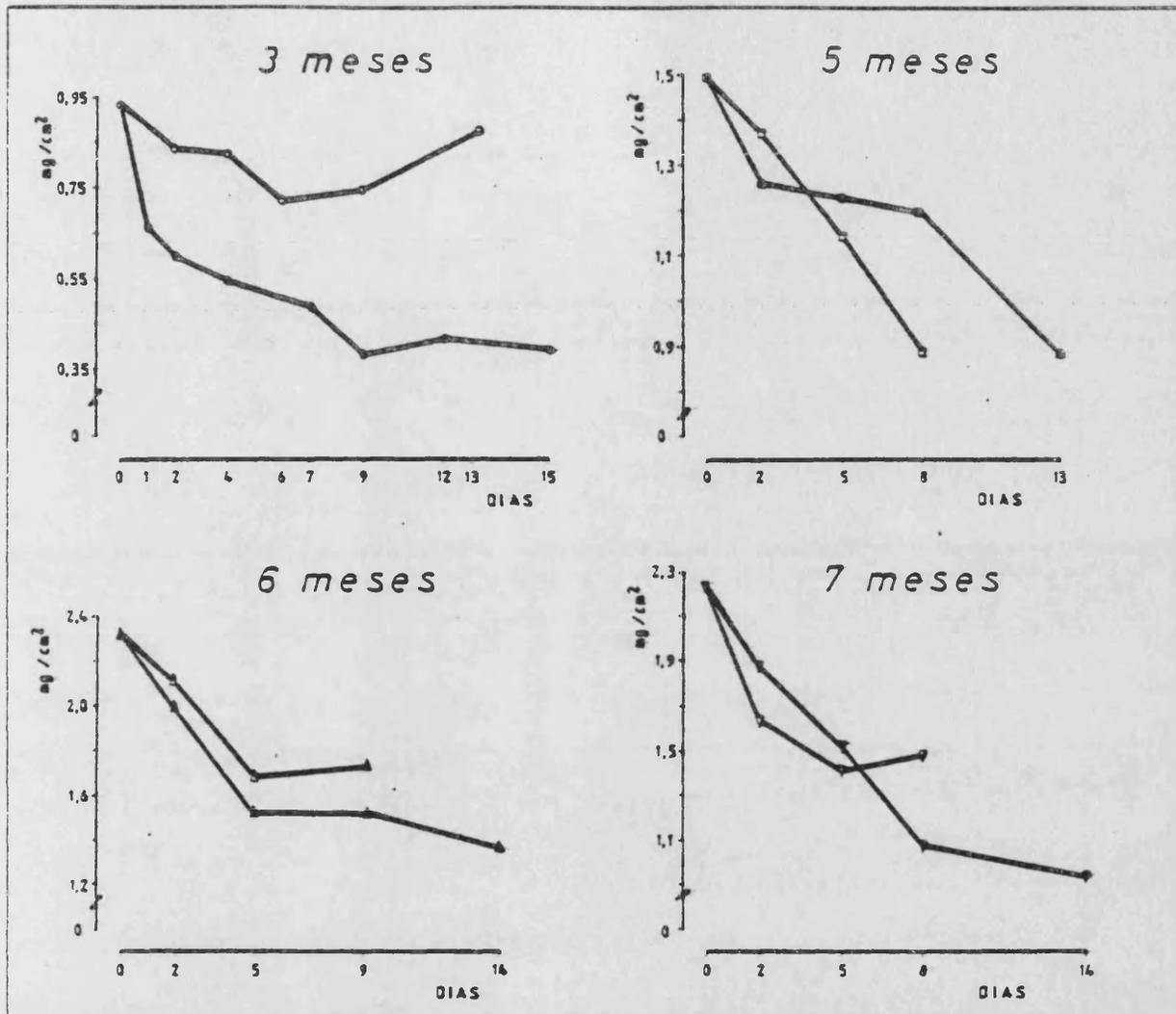


cial a excepción de las hojas de 6 meses en las que se produce un aumento inicial en su contenido para alcanzar finalmente un valor similar al del día 0. El comportamiento de las hojas de 6 meses en lo que respecta a la evolución en el contenido en azúcares solubles no guarda relación aparente con ninguno de los parámetros medidos. Los azúcares reductores aumentan en las hojas - incubadas a la luz, alcanzando los valores máximos a los 5 días (hojas de 5 y 7 meses) y aún continúa este ascenso en el caso de las hojas de 6 meses. Las hojas mas jóvenes, sin embargo, mantienen valores similares al inicial. En la oscuridad se produce un comportamiento distinto según la edad de la hoja pues mientras en las de 3 meses hay un descenso de hasta un 50 % del valor obtenido el día 0, en las hojas de 5 meses el contenido en azúcares reductores no varía con el transcurso del tiempo y en las de 6 y 7 meses se produce un aumento, de magnitud inferior al de las hojas a la luz y cuyos valores máximos se obtienen hacia el día 8 ó 9 de incubación.

El grado de polimerización medio de los azúcares solubles disminuye gradualmente durante la incubación de las hojas a partir de 5 meses de edad (tabla 11), pasando de un valor medio inicial de 2,49 unidades de glucosa a 1,26 unidades después de 8 ó 9 días. En las hojas de tres meses el grado de polimerización es menor que el del resto de las hojas al comienzo (1,43 unidades) y aumenta ligeramente con el transcurso del tiempo, siendo de 1,64 unidades a los 9 días.

El contenido en carbohidratos totales desciende marcadamente durante la incubación (figura 63) siendo este descenso en general mayor en las hojas mantenidas a la oscuridad. Bien la luz retarda la utilización de estos azúcares o permite una fotosíntesis significativa. Esta segunda posibilidad se ve reforzada por el hecho de que durante las últimas fases de la incubación se observa un aumento en el contenido en carbohidratos.

Figura 63.- Variaciones en el contenido en carbohidratos totales de hojas -
separadas de la planta a lo largo de su incubación a la luz (---
símbolos vacíos) o a la oscuridad (símbolos llenos).



T A B L A 15

Variación del grado de polimerización de los azúcares solubles durante la senescencia.

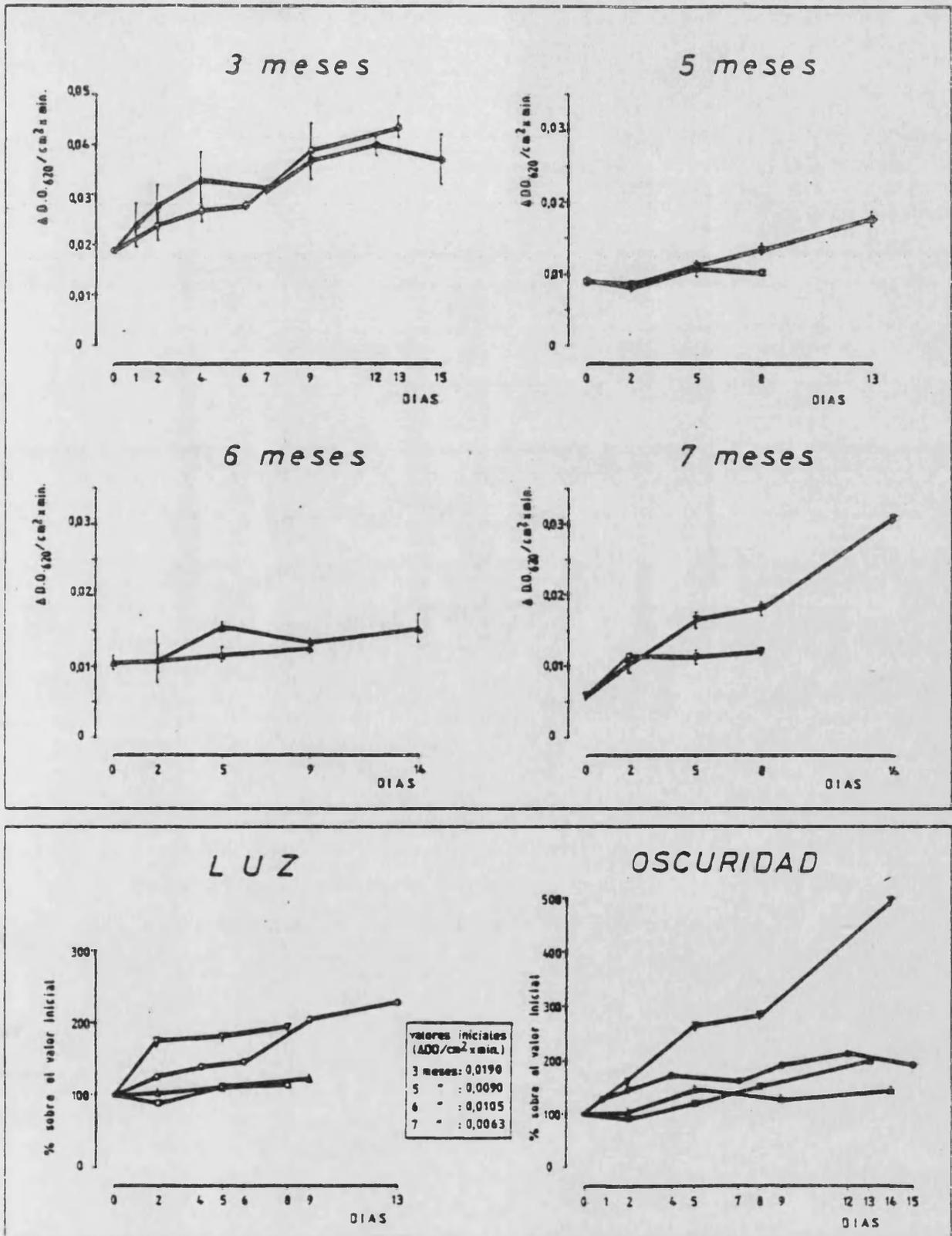
Incubación	día	3 meses	5 meses	6 meses	7 meses
	Inicial	1,43	2,14	2,98	2,34
Luz	2	1,63	1,50	2,42	1,38
"	4	1,69			
"	5		1,05	1,91	1,09
"	6	1,62			
"	8		1,02		1,24
"	9	1,59		1,25	
"	13	1,60			
Oscuridad	1	1,48			
"	2	1,47	1,93	3,05	1,58
"	4	1,53			
"	5		1,78	2,46	1,41
"	7	1,62			
"	8		1,70		0,97
"	9	1,69		1,36	
"	12	1,70			
"	13		1,43		
"	14			1,55	1,21
"	15	1,62			

III.3.3.- CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD AMILOLÍTICA.-

La actividad amilolítica en las hojas aumenta invariablemente durante la incubación, si bien la magnitud de los incrementos en su actividad varía de un experimento a otro y no guarda relación aparente con la actividad inicialmente presente o el contenido en almidón de las hojas (figuras 60 y 64). El incremento en la actividad es inicialmente menor en las hojas mantenidas a la luz que en las incubadas a la oscuridad. Sólomente después de cinco días de incubación se observa en algunos experimentos (hojas de 5 y 7 meses de edad) una mayor actividad en las hojas mantenidas a la oscuridad cuyo ritmo de síntesis de enzima es constante hasta el final del periodo experimental (dos semanas), seis días después de la muerte de las hojas mantenidas a la luz.

No se observan variaciones en la importancia relativa de las diversas bandas de actividad amilolítica durante la senescencia (figura 65). - Los cambios en la actividad total se traducen en cambios en la intensidad de todas las bandas sin que el procedimiento electroforético utilizado permita - detectar variaciones en el modelo obtenido.

Figura 64.- Variación de la actividad amilolítica de hojas separadas de la planta a lo largo de su incubación a la luz (símbolos vacíos) o a la oscuridad (símbolos llenos).



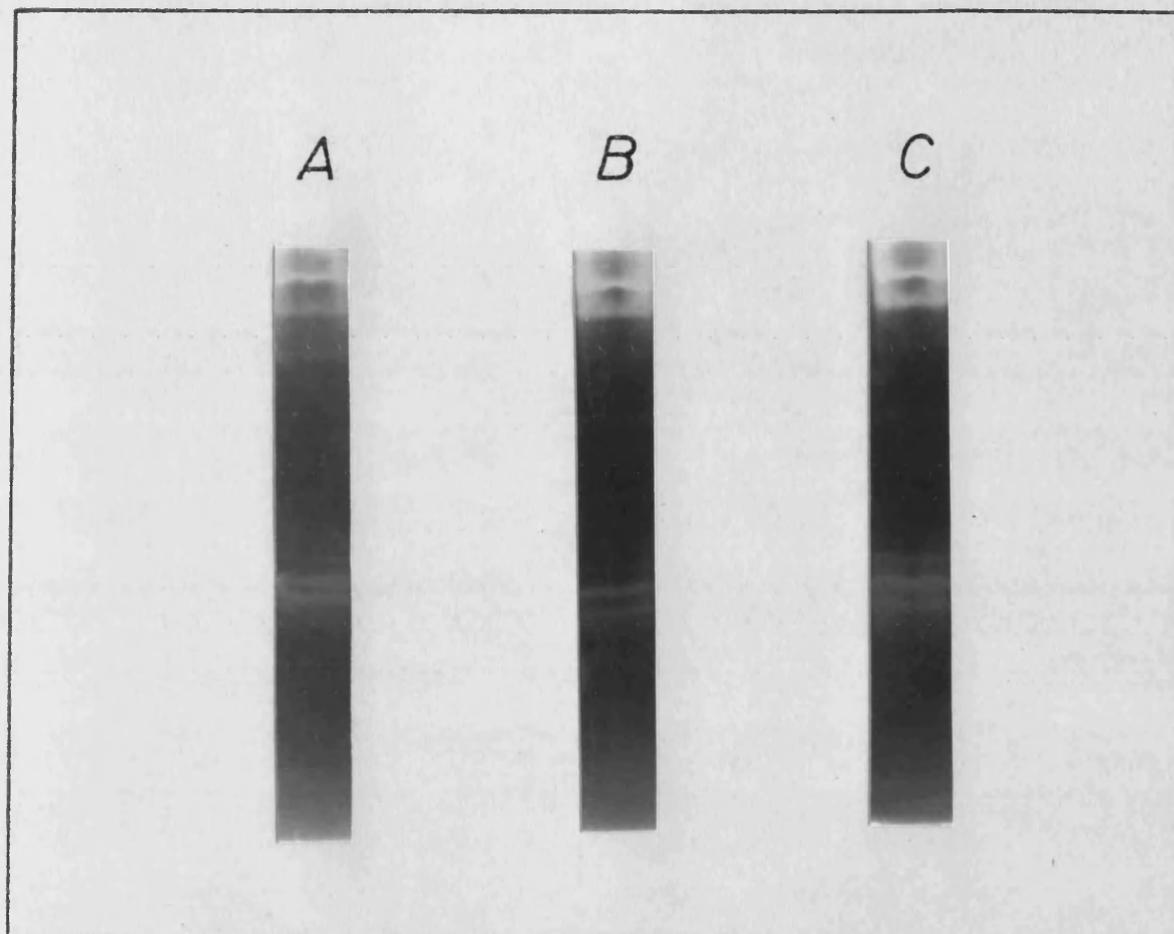


Figura 65.- Electroforegramas de extractos de hojas de 6 meses de edad el día en que fueron separadas de la planta (A) y tras 9 días de permanencia a la luz (B) o a la oscuridad (C). Incubación en tampón - acetato 0,1 M a pH 5,0, con Cl_2Ca 1 mM, durante 2 horas a 30 °C. Gel con amilopectina azure 0,25 % incorporado como sustrato.

discusión

El contenido en carbohidratos totales de las hojas adultas (figura 48-A) muestra una pauta de variación similar a la descrita en otras variedades de cítricos (Jones y Steinacker, 1951; Hilgeman et al., 1967; Dugger y Palmer, 1969). Hay un aumento en su contenido durante el invierno, alcanzándose el máximo de mediados de Marzo a principios de Abril, seguido por una disminución aproximadamente lineal con el tiempo para alcanzar un valor mínimo a finales del mes de Julio. Este modelo de variación es similar al encontrado en plantas caducifolias aunque está desplazado en el tiempo. En éstas, el máximo contenido en carbohidratos se presenta a finales de otoño o - aún antes, coincidiendo con la senescencia y abscisión de las hojas. Durante la brotación de primavera se produce una disminución del nivel de carbohidratos, alcanzándose el valor mínimo entre los meses de Mayo y Junio (Zimmerman, 1974; Worley, 1979).

Esta pauta de variación se ha interpretado con frecuencia como una acumulación de reservas en el árbol que es utilizada durante la brotación y la fructificación, y si la necesidad de acumular reservas, al menos para la brotación, parece evidente en las plantas caducifolias (Priestley, 1971) no lo es tanto en el naranjo, en que el descenso en el contenido en carbohidratos de las hojas adultas no tiene lugar hasta varias semanas después de iniciada la brotación y en el que las hojas hacen una contribución fotosintética significativa durante el reposo invernal como lo muestra la acumulación de carbohidratos durante este periodo del año (figura 48). Es de señalar que - tanto en el trabajo de Hilgeman et al. (1967) como en el de Dugger y Palmer (1969), el descenso en el contenido en carbohidratos de las hojas se inicia al menos dos meses antes que en nuestros experimentos, lo que puede estar relacionado con la situación más meridional de sus parcelas experimentales que provoca una anticipación en las fechas de brotación y floración.

Incluso en plantas caducifolias, en las que la dependencia de la brotación de las reservas previamente acumuladas es obvia, el papel de estas reservas en el desarrollo ulterior de la planta y en la fructificación no aparece claro en todos los casos. Priestley (1971), en su revisión crítica sobre este tema, señala la limitación de los conocimientos, en particular en los siguientes aspectos: a) la naturaleza química de estas reservas; b) la disponibilidad de los carbohidratos acumulados para el crecimiento de la planta, y c) su relación con la fructificación. A estos aspectos habría que añadir d) el control de la movilización y distribución en la planta y e) los aspectos metabólicos de esta movilización.

A.- NATURALEZA QUIMICA DE LAS RESERVAS.-

La naturaleza química de las reservas, esto es, qué fracción de los carbohidratos acumulados en el árbol son reutilizables para el crecimiento, puede inferirse de los cambios estacionales en el contenido de las diversas fracciones. De los datos de las figuras 41 y 44 resulta evidente que tanto la fracción almidón como la de carbohidratos solubles disminuyen durante el periodo de fructificación, y dentro de cada parcela experimental la evolución de ambas fracciones sigue curvas aproximadamente paralelas, --con la excepción de la parcela Almenara en 1981--, si bien el contenido en azúcares solubles se mueve en un rango de valores más estrecho que el contenido en almidón. La fracción almidón parece utilizarse en la planta como una reserva que mantiene los azúcares por encima de un valor mínimo, del orden de 0,7 a 0,8 mg / cm². Goldschmidt y Golomb (1982), revisando los trabajos de Jones et al. (1975) y Smith (1976) resaltan la importancia de las reservas de almidón ya que las correlaciones entre su contenido y la producción son mejores que para los azúcares solubles o los carbohidratos totales. Sin embargo, estos datos se refieren a análisis realizados en las mandarinas "Kinnow" y "Murcott", que presentan un caso de extrema vejería, y en las que se produce en ocasiones una desaparición total de las reservas de carbohidratos en los años de cosecha elevada, seguida normalmente por la muerte del árbol. Como señalan Jones et al. (1975) parece razonable que los carbohidratos sean limitantes en estas condiciones extremas en que el almidón desaparece por completo, pero no en condiciones normales en las que, no obstante, se encuentran correlaciones significativas entre los carbohidratos de las hojas y la --fructificación.

Los datos de nuestro estudio muestran que la proporción de carbohidratos solubles a almidón varía entre límites muy amplios y esta variación está más relacionada con el año que con la parcela. La acumulación de azúca

res solubles está relacionada con la temperatura y el fotoperiodo y se ha interpretado como una defensa de la planta a las condiciones ambientales adversas (Siminovitch et al., 1953; Sakai y Yoshida, 1969; Kandler y Hopf, 1980). Una acumulación de sacarosa ha sido señalada en los agrios cuando éstos se someten a bajas temperaturas invernales (Yelenosky y Guy, 1977; Yelenosky, 1979) aunque la rafinosa y otros oligosacáridos representan una fracción importante de los azúcares acumulados en estas condiciones en otras plantas - (Kandler y Hopf, 1980). Pruebas adicionales a esta interpretación son las diferencias en la pauta de variación de carbohidratos solubles y almidón en las hojas (Dugger y Palmer, 1969) y el menor grado de polimerización de los azúcares solubles el año 1981 (figura 47), en que éstos se acumularon en menor cantidad en las hojas (y el almidón lo hizo en mayor cantidad) que en los años 1980 y 1982, en que los niveles de azúcares fueron significativamente mayores.

A la vista de estos resultados parece lógico concluir que tanto - los azúcares solubles como el almidón constituyen reservas metabólicamente reutilizables por la planta, que su proporción está controlada por factores exógenos al árbol, concretamente climáticos, y que en los árboles que hemos utilizado el contenido en azúcares en cualquier momento del desarrollo de la hoja se mantiene por encima de los $0,7-0,8 \text{ mg / cm}^2$, si bien valores más bajos se encuentran transitoriamente en las hojas jóvenes en desarrollo.

Una discusión adicional merece la naturaleza de la fracción denominada almidón en este estudio. El método de extracción utilizado (ácido perclórico en frío) no es específico del almidón y extrae mayor cantidad de carbohidratos que métodos en principio más específicos como es la hidrólisis -- por enzimas amilolíticas. Gonzalez Ferrer (comunicación personal), trabajando con el mismo material, ha determinado que la extracción del almidón mediante la hidrólisis exhaustiva, después de una gelatinización, con una mezcla de - alfa- y beta-amilasa de B.subtilis y de endospermo de cebada respectivamen-

te, solubiliza un 85 % de los carbohidratos extraíbles con ácido perclórico. Sin embargo, a pesar de la mayor especificidad de este análisis no hay seguridad de que la hidrólisis enzimática solubilice completamente el almidón -nativo, y se han señalado diferencias en la cantidad de almidón extraído por distintas enzimas (MacRae et al., 1974; Banks y Muir, 1980). De hecho, en nuestro material, un 25 % de los polisacáridos extraíbles con ácido perclórico después de la hidrólisis exhaustiva con amilasa es precipitable con iodo, lo que sugiere la existencia de restos de amilopectina no solubilizada; por otro lado, el hidrolizado de este extracto final contiene pequeñas cantidades de xilosa y arabinosa lo que indica la solubilización de algunas hemicelulosas, fracción que al menos en parte se considera que puede ser también movilizada en la planta (Priestley, 1971). El método de extracción utilizado es, por otra parte, incapaz de hidrolizar celulosa, incluso después de un periodo de incubación de 20 horas (Hansen y Møller, 1975).

B.- DISPONIBILIDAD DE LOS CARBOHIDRATOS.-

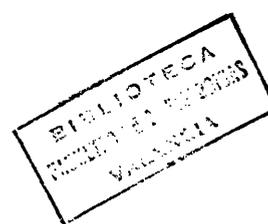
Diversos autores indican que la disponibilidad de los carbohidratos acumulados es únicamente parcial en condiciones normales y sólo se tienen referencias de la utilización completa de las reservas hidrocarbonadas de la planta en aquellos casos en los que sigue la muerte del árbol, como los ya mencionados de las variedades de cítricos "Kinnow", "Murcott" y "Wilking" (Jones et al., 1975; Smith, 1976; Monselise y Golomb, 1982). Priestley (1971) señala que en el manzano no es posible la utilización de más de un tercio de los carbohidratos extraíbles manteniendo al mismo tiempo la planta vigorosa. Este autor sugiere la hipótesis de la existencia de un equilibrio entre la utilización de los carbohidratos por los tejidos del árbol y la síntesis de nuevos fotoasimilados o el nivel de las reservas disponibles, de forma que la planta tiende a mantener en sus células un nivel relativamente constante de carbohidratos utilizables.

En nuestro estudio el nivel de carbohidratos en las hojas, tanto adultas como jóvenes de brotes fructíferos (Figura 48), no desciende en ningún momento del valor de $1 \text{ mg} / \text{cm}^2$ -lo que representa alrededor del 30 % del contenido máximo en las hojas adultas y el 50 % en las jóvenes-, y si en la parcela de Almenara el contenido de almidón llega a ser muy bajo a final de verano y principios de otoño (alrededor de $0,4 \text{ mg} / \text{cm}^2$; Figura 41), está aún lejos de agotarse en la planta ya que este valor representa aproximadamente el 20 % del máximo encontrado en primavera, y es superior al contenido en almidón de las hojas jóvenes en esa misma época ($0,3 \text{ mg} / \text{cm}^2$; Figura 41). Aún teniendo en cuenta que, según se ha indicado en el apartado anterior, es posible que el contenido real de almidón sea alrededor del 10 % inferior al obtenido por el método utilizado, el nivel de almidón en esta parcela se mantiene en todo momento por encima del 17 % del valor máximo, valor al que hay que añadir el de azúcares solubles (superior a $0,8 \text{ mg} / \text{cm}^2$) para tener el balance global de carbohidratos en esas fechas. Estos resultados están de acuerdo con

los de Cameron y Schroeder (1945) y Monselise y Goldschmidt (1982), que señalan que los carbohidratos de la planta sólo son movilizados parcialmente y la utilización completa del almidón no se alcanza ni siquiera en los momentos de gran demanda como la brotación de primavera. En la mayoría de los árboles se produce una recuperación del contenido en carbohidratos antes de que se agoten las reservas acumuladas, de forma que generalmente la degradación no sobrepasa un nivel mínimo de carbohidratos en las células (Priestley, 1971).

La presencia de un residuo de almidón no metabolizado se observa también en las hojas separadas de la planta, en las que la rápida degradación que se produce en estas condiciones se detiene al alcanzar un contenido mínimo de $0,2 \text{ mg / cm}^2$ (Figura 60), lo que representa más del 15 % del valor inicial en todos los casos. Kriedemann (1969a) ha señalado que el almidón acumulado en las hojas de cítricos no es totalmente metabolizado ni aún cuando se incuban las hojas separadas de la planta a la oscuridad durante 21 días. Sin embargo, con estos datos no queda claro si la muerte de la hoja se produce debido a que se alcanza un contenido límite en carbohidratos para la supervivencia de las células del tejido o si, por el contrario, está regulada por otro factor distinto, de modo que si no se metabolizan todos los carbohidratos contenidos inicialmente en la hoja porque este otro factor provoca la muerte con anterioridad al agotamiento de las reservas.

En resumen, sólo un determinado porcentaje de las reservas acumuladas durante el reposo vegetativo son utilizadas en el periodo de crecimiento y desarrollo, pues si bien la movilización del almidón puede producirse hasta en un 80 % de su contenido máximo, sólo se moviliza entre el 50 y el 60 % de los carbohidratos totales, permaneciendo el resto de las reservas en equilibrio dinámico con el metabolismo y el transporte.



C.- RELACION DE LOS CARBOHIDRATOS CON LA FRUCTIFICACION.-

La importancia de los carbohidratos en la fructificación parece desprenderse de los estudios de diversos autores, que señalan una correlación positiva muy estrecha entre el nivel de carbohidratos de las hojas al final del reposo invernal y la cuantía de la cosecha siguiente (Lewis et al., 1964; Jones et al., 1974). Del mismo modo, se ha encontrado una correlación negativa entre la cosecha precedente y la acumulación de carbohidratos en las hojas (Smith et al., 1953; Hilgeman et al., 1967; Jones et al., 1970). A pesar de la existencia de estas correlaciones Jones et al. (1974) dudan que el contenido en carbohidratos sea un factor limitante que controle la producción del año siguiente, debido fundamentalmente a dos hechos: 1) los tratamientos realizados con ácido naftalenacético (NAA) en la variedad "Wilking" revierten el ciclo de alternancia en la fructificación de esta variedad pero no cambia el de acumulación de carbohidratos en las hojas (Lewis et al., 1964) y 2) en la variedad "Valencia" hay un claro efecto del fruto sobre el cuajado, de modo que una recolección tardía determina una menor producción al año siguiente que si la recolección es temprana, pero no afecta sin embargo el contenido en carbohidratos de las hojas adultas, que es independiente del momento de la recolección (Jones et al., 1970), por lo que parece descartarse la posibilidad de una relación causa-efecto entre niveles de carbohidratos y fructificación.

La interpretación de las correlaciones entre el contenido en carbohidratos de las hojas y la fructificación no es unívoca ya que puede reflejar la intervención de otros mecanismos de regulación distintos, siendo aquéllas correlaciones secundarias y debidas a la acción de estos mecanismos. Particularmente relevante es la influencia de la floración en la fructificación, muy estrecha cuando el número de flores formadas en el árbol es baja (Moss, 1973), situación muy frecuente en las variedades, veceras, en que se han realizado los estudios discutidos anteriormente. Además, la floración está inversamente

relacionada con la cosecha precedente (Moss, 1971; Agustí et al., 1982) y , por tanto, correlacionada positivamente con el nivel de carbohidratos en las hojas, que se ha señalado como el factor determinante de las diferencias en floración (Goldschmidt y Golomb, 1982) ya que Altman y Goren (1977) señalan que la sacarosa es esencial para la brotación de las yemas "in vitro". Sin embargo, esta exigencia para la brotación ha sido cuestionada (Guardiola et al. 1982) y hay evidencias de una regulación hormonal de la floración tanto en agrinos (Guardiola et al., 1977; Monselise y Goldschmidt, 1982) como en otros frutales (Luckwill y Silva, 1979; Ebert y Bangerth, 1981) por lo que la correlación entre carbohidratos y floración podría ser meramente accidental y debida a mecanismos que operan simultáneamente.

A pesar de las dudas en la interpretación de las correlaciones apuntadas, los datos de este estudio demuestran que las excepciones señaladas pueden ser originadas por la desafortunada elección de las hojas adultas como órganos a analizar. Las variaciones estacionales en el contenido en carbohidratos presenta una pauta distinta en aquéllas y en las hojas de la brotación de primavera situadas junto a un fruto en desarrollo, que presentan un acusado descenso en el contenido en carbohidratos en el momento de la caída de Junio (figura 48). Esta caída en el contenido en carbohidratos se produce — cuando su capacidad fotosintética es máxima (Moss et al., 1972) y coincide — con el aumento en la velocidad de crecimiento —y por tanto en la acumulación de metabolitos— en el fruto en desarrollo, que supera la capacidad fotosintética de las hojas jóvenes en los brotes mixtos (Moss et al., 1972), momento en el que se produce una detención transitoria en la acumulación en las hojas de los elementos móviles en el floema (nitrógeno, fósforo, potasio; Gonzalez Ferrer, datos sin publicar). Parece evidente la existencia de un momento en el que se presenta un déficit en la disponibilidad de carbohidratos y elementos minerales, que no se traduce en un modificación en el ritmo de transporte — desde las hojas adultas (figura 48-A) y presumiblemente ambos factores pue-

den limitar el desarrollo y, por tanto, la capacidad de supervivencia del fruto (Zucconi et al., 1978; Agustí et al., 1982) por lo que las correlaciones entre contenido en carbohidratos y cosecha no se presentan siempre, aunque deben ser más estables para el contenido en hojas jóvenes que en hojas adultas.

Es notable al respecto que Hilgeman et al. (1967) sí encuentran una influencia de la época de recolección del fruto de la naranja "Valencia" y el contenido en azúcares en las hojas jóvenes, aunque no en las adultas, si bien el número de muestras analizadas por estos autores es insuficiente para establecer la influencia en el cuajado del fruto. La aseveración de Goldschmidt y Golomb (1982) de que las hojas son un mal indicador del nivel de carbohidratos en el árbol es admisible para las hojas adultas, que aún guarda una relación con el contenido en las raíces —órgano que proponen analizar estos autores—, pero no para las jóvenes. Por el contrario, éstas parecen —suficientemente sensibles para determinar la disponibilidad de carbohidratos para el fruto en desarrollo y proporcionan una serie de ventajas de índole —práctica (facilidad de muestreo, posibilidad de tipificación, repetibilidad) que aconsejan su utilización frente al uso de las raíces.

La velocidad de transporte constante desde las hojas adultas (figura 48-A) no es un caso singular. Si bien en la mayor parte de los casos hay una correlación entre la fotosíntesis y el transporte desde las hojas —(Moorby, 1977), se ha señalado un ritmo de exportación constante, aunque durante un periodo de tiempo limitado, tanto para niveles fotosintéticos muy bajos (Ho, 1976) como para contenidos elevados de azúcares en las hojas (Christy y Swanson, 1976). Ambos casos deben reflejar distintos factores limitantes en el transporte; la velocidad de movilización de las reservas previamente —acumuladas en el primero y la capacidad del sistema de transporte en alguno de sus puntos en el segundo. En las hojas adultas del naranjo, el ritmo de —transporte de las reservas medido es, en el periodo de descenso constante —del contenido en carbohidratos (principios de Abril a mediados de Julio) de

0,074 mg glucosa / dm² x hora, valor unas 35 veces menor a la máxima fotosíntesis neta medida y al que habría que añadir la fijación de CO₂ por estas hojas, que no supera los 2,56 mg glucosa / dm² x hora (Moss et al., 1972). Teniendo en cuenta que en esta época del año el periodo luminoso efectivo - para la fotosíntesis es alrededor de 10 horas diarias mientras que el transporte se lleva a cabo también durante el periodo oscuro del día, el transporte total de asimilados (reservas más fotoasimilados del día: 27,35 mg glucosa / dm² x día) es apenas mayor (1,07 veces) que la fotosíntesis producida diariamente (25,6 mg glucosa / dm² x día), lo que da como resultado un descenso - lento y gradual del nivel de las reservas de carbohidratos en estas hojas. La saturación del sistema de transporte parece en este caso responsable del ritmo constante de desaparición de las reservas a pesar del aumento del consumo por el fruto en estas fechas, puesto que la disponibilidad de las reservas no puede considerarse limitante ya que el nivel de carbohidratos en estas hojas es elevado y la actividad amilolítica encontrada podría explicar la movilización del almidón presente en pocas horas. La posibilidad de que el sistema vascular limite el transporte al fruto ya ha sido señalada por Bollard (1970) para el tomate, y Habeshaw (1969) indica que para índices fotosintéticos elevados se produce una saturación del sistema de transporte en las hojas de remolacha.

El hecho de que la eliminación del fruto localmente no afecte la velocidad de exportación (figura 53-B) indica que los gradientes locales de carbohidratos no tienen gran influencia en el transporte, pudiendo estar regulado por las resistencias de los tejidos al mismo. Luckwill y Silva (1979), - trabajando con manzano, sugieren que la eficiencia de las conexiones vasculares puede jugar un papel importante en la nutrición de los frutos, ocasionando una mayor caída de los que están en posición axilar frente a los terminales. Por tanto, no puede ser ignorada la posibilidad de que la aparente independencia del transporte entre las hojas adultas y los sumideros esté deter-

minada por la ausencia de conexiones directas entre los tejidos conductores de estas hojas y los de los brotes en desarrollo (figura 66). Según esto, un aumento del consumo en los frutos provoca un incremento inmediato del transporte desde las hojas jóvenes, a las que están conectadas directamente, y uteriormente desde el tallo. La influencia del consumo a nivel del brote sobre las hojas adultas es generalizada entre todas ellas por estar conectadas al sistema de transporte a larga distancia y no directamente con los frutos. El efecto del sumidero se diluye y por ello no se detecta una influencia clara - del aumento del consumo en el fruto sobre las hojas adultas, contrariamente a lo que sucede con las hojas jóvenes, que están unidas directamente con los frutos.

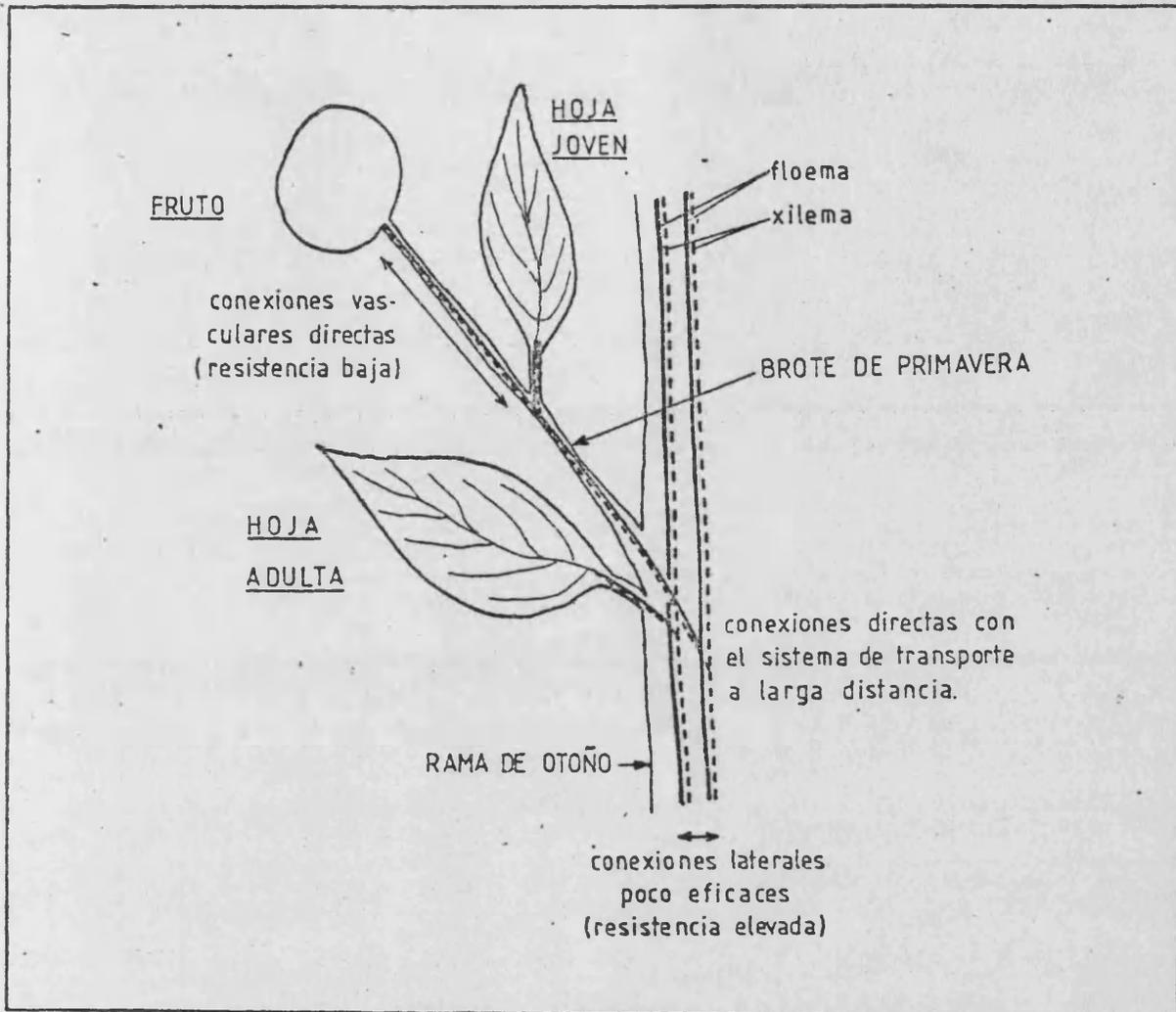


Figura 66.- Relaciones nutricionales entre las hojas y el fruto en desarrollo.

D.- CONTROL DE LA MOVILIZACION Y DISTRIBUCION DE LOS CARBOHIDRATOS EN LA PLANTA.-

A la relación fuente-sumidero que existe entre hojas y frutos, que se observa de forma mucho más patente en las hojas jóvenes y que provoca el descenso brusco del contenido en carbohidratos de estas hojas en la época de crecimiento rápido del fruto, se superpone una relación distinta que hace que la distribución de los azúcares en la planta no pueda entenderse simplemente - en términos de demanda de fotoasimilados por crecimiento. El contenido de carbohidratos en las hojas jóvenes aparece determinado por la presencia del fruto, teniendo menor contenido en azúcares solubles y en almidón las hojas de brotes vegetativos que las de brotes fructíferos (figura 43). Aunque en principio esto podría deberse a que el ápice vegetativo en crecimiento es un sumidero más potente que el fruto en desarrollo ya que hasta el mes de Junio el peso seco medio del fruto es del mismo orden que el de una hoja y las hojas en desarrollo son sumideros muy potentes en esta época (Kriedemann, 1969a y b; Kubota y Motoyama, 1971; Moss et al., 1972), los experimentos de eliminación de fruto no admiten esta interpretación. En las hojas de ramas sin fruto sería esperable un aumento del contenido en azúcares en cuanto que se elimina el sumidero principal de sustancias nutritivas y así, Treharne (1982) obtiene este resultado trabajando con manzano. Sin embargo, en nuestros experimentos, la eliminación de los frutos de la rama no altera la pauta de movilización en las hojas adultas (figura 55-B), mientras que en las hojas jóvenes se produce una reducción inmediata del nivel de carbohidratos, tanto en valor absoluto como en relación a las hojas de ramas con frutos (figura 55-A), a pesar de que en esta época del año no se produce la brotación de las yemas axilares, lo que ocasionaría la creación de sumideros alternativos. Este resultado es contrario a la respuesta esperable de existir únicamente una relación fuente-sumidero entre las hojas y los frutos como regulador de la movilización de los carbohi-

dratos en la planta.

Estos resultados no excluyen la fuerza del sumidero para atraer metabolitos como regulador del movimiento de asimilados sino que indican que no es el único factor implicado. Existe la posibilidad de que los altos niveles hormonales de los órganos en crecimiento puedan jugar un papel importante en su capacidad de movilización y les permitan determinar la dirección del transporte (Wareing y Patrick, 1975; Treharne, 1982; Marré, 1982) y, por tanto, es probable que en la distribución de los azúcares en los distintos órganos de la planta en cada momento del desarrollo esté implicado un equilibrio hormonal.

Numerosos autores indican que los frutos en desarrollo son una fuente importante de sustancias reguladoras del crecimiento y, así, en el género Citrus se ha determinado la presencia en los frutos de giberelinas (Khalifah et al., 1965; Wiltbank y Krezdorn, 1969; Goren y Goldschmidt, 1970; -- Goldschmidt et al., 1970; Monselise, 1977), auxinas (Lewis et al., 1965; Goren y Goldschmidt, 1970), citoquininas (Khalifah y Lewis, 1966; Erner et al., 1976; Monselise, 1977; Furió et al., 1981) y ácido abscísico (Goren y Goldschmidt, 1970; Goldschmidt et al., 1970, 1973; García Martínez et al., 1976). Grochowska (1973) señala que en el manzano el descenso rápido del contenido en almidón de las hojas coincide en el tiempo con la aparición de grandes cantidades de giberelinas en las semillas. Además, las sustancias hormonales producidas en los frutos difunden fácilmente hacia otros tejidos. En el manzano, Ebert y Bangerth (1981) describen un aumento de giberelinas difusibles en los frutos durante los primeros estadios de su desarrollo y en el género Citrus García Martínez y García Papí (1979) han detectado en las primeras semanas después de la anthesis la producción de hormonas difusibles desde el fruto, que identifican como sustancias de tipo auxínico y como giberelinas.

Es un hecho ampliamente reconocido que las sustancias reguladoras del crecimiento afectan el transporte y Treharne, en su revisión de 1982,

señala que el transporte de asimilados hacia los frutos se ve incrementado por aplicaciones específicas o generales tanto de giberelinas como de auxinas o citoquininas. Asimismo, el ácido abscísico es capaz de inducir tanto un aumento como una reducción de la importación de asimilados en semillas de avena - dependiendo de su concentración y del estado de desarrollo de las semillas - (Tietz et al., 1981) y según estos autores es posible que el efecto del ácido abscísico sobre el transporte y almacenamiento de azúcares sea más general y no esté únicamente restringido a cereales, dado que otros autores (Düring y Alleweldt, 1980) lo han observado también en otras plantas (Vitis vinifera). Sin embargo, el papel de las hormonas en la distribución de los asimilados no está claramente dilucidado y es objeto de controversia.

Una teoría, apoyada por numerosos experimentos, indica que el aumento del transporte que se produce hacia zonas tratadas con sustancias hormonales es una consecuencia del incremento de la actividad metabólica de la región tratada (Seth y Wareing, 1967; Gersani et al., 1980a y b), lo que inscribe este efecto en la relación fuente-sumidero típica. Esta relación, bien de forma directa o bien mediada por una acción hormonal, no es suficiente para explicar los resultados obtenidos en este trabajo y únicamente una acción sobre el transporte de forma independiente a la utilización metabólica de las sustancias transportadas explicaría nuestros resultados.

La hipótesis del transporte dirigido hormonalmente ha sido formulada por diversos autores basándose en los resultados obtenidos con segmentos de plantas adultas, que no están en crecimiento, y en los que las aplicaciones hormonales provocan el aumento del transporte en menos de 6 horas (Davies y Wareing, 1965), tiempo que parece insuficiente para que la respuesta esté mediada por un incremento de la actividad metabólica. Por ello, sugieren que el aumento del transporte puede ocurrir sin ningún cambio concomitante de la fuerza del sumidero. El aumento del crecimiento inducido por las hormonas -

puede no ser el mecanismo exclusivo por el que estas sustancias actúan sobre el transporte (Moorby, 1977; Patrick, 1982). Patrick y Wareing (1970), trabajando con entrenudos de judía no pudieron detectar ninguna alteración del estado metabólico ni de la capacidad de almacenar sacarosa por tratamientos con ácido indolacético que, sin embargo, produce un aumento del transporte. La posibilidad de que el ácido indolacético pueda afectar de forma directa los mecanismos de transporte está apoyada por el hecho de que promueve la diferenciación del tejido del floema (Sachs, 1975).

Marré (1982) indica que hay numerosas observaciones que demuestran claramente que sustancias producidas por órganos en crecimiento dirigen los flujos de nutrientes no sólo hacia esas zonas en crecimiento sino también hacia las regiones vecinas. Esto podría explicar los mayores niveles de carbohidratos encontrados en las hojas de brotes fructíferos frente a los de brotes vegetativos. Además, señala que la eliminación de los frutos jóvenes determina un marcado descenso de los azúcares solubles y el almidón en las zonas vecinas en el brote, como sucede en las hojas jóvenes de naranjo y que, por el contrario, no afecta de forma detectable el contenido en carbohidratos de las hojas adultas.

Según indican Wareing y Patrick en su revisión de 1975, estos experimentos con segmentos de tallos no desestiman la fuerza del sumidero como regulador del movimiento de asimilados y, como señala Treharne (1982) los argumentos en favor del transporte dirigido hormonalmente no serán concluyentes mientras no se diseñen experimentos en los que se pueda diferenciar claramente la actividad metabólica del sumidero del transporte en sí mismo. Por ello, la mayoría de los autores consideran insuficiente los datos disponibles hasta el momento para inclinarse por una u otra hipótesis (Patrick y Wareing, 1973; Mulligan y Patrick, 1979) y aún Altman y Wareing (1975) sugieren que ambos sistemas pueden estar controlando el transporte, mientras que Bowen y

Wareing (1971) señalan que parecen existir objeciones a ambas hipótesis como únicas responsables del transporte de metabolitos.

E.- ASPECTOS METABOLICOS DE LA MOVILIZACION DEL ALMIDON.-

La actividad enzimática asociada a la fracción enzimática 2, que corresponde a las bandas 1 a 6 de los electroforegramas, se debe a amilasas de tipo alfa. Este grupo de enzimas presenta características típicas de las alfa-amilasas, siendo inactivadas por EDTA (Swain y Dekker, 1966b; Pech et al., 1971; tabla 9 y figuras 24 y 27); su actividad desciende drásticamente a pH bajos (French, 1960; Shain y Mayer, 1968; tabla 8 y Figura 18); son resistentes a la inactivación térmica (Pech et al., 1971; figura 29) y se trata de endoamilasas puesto que degradan sustratos altamente ramificados, como la amilopectina, sin dejar residuos de alto peso molecular (Fischer y Stein, 1960; Bilderback, 1973; Doehlert y Duke, 1983). Además, su peso molecular, cercano a los 50.000 daltons, es similar al encontrado para otras alfa-amilasas de origen vegetal (Fischer y Stein, 1960). Su resistencia al cloruro mercurico es inferior a la que algunos autores (Pech et al., 1971) consideran propia de las alfa-amilasas (tabla 9), pero esta menor resistencia se ha señalado también para otras alfa-amilasas de tejido foliar. Okita et al. han descrito una endoamilasa presente en el cloroplasto (1979) y en el citoplasma (1980) de las células de hojas de espinaca que es sensible a los agentes oxidantes de los grupos sulfhidrilo. El comportamiento de la alfa-amilasa de naranjo difiere también en cuanto a su respuesta a la adición de iones calcio al medio. Según Swain y Dekker (1966b) la alfa-amilasa de guisante es activada por la presencia de bajas concentraciones de calcio cuando los extractos han estado en contacto con secuestradores de estos iones tales como el citrato u oxalato. Sin embargo, los extractos de naranjo obtenidos con tampón citrato-fosfato no son activados por la adición de bajas concentraciones de calcio (figura 9), lo que indica que estos iones están fuertemente unidos a la molécula de enzima. Irshad y Sharma (1981) describen un efecto inhibitorio de concentraciones elevadas de calcio sobre la actividad de las alfa-amilasas se

mipurificadas de semilla de maíz, trigo, cebada y cacahuete, no presentándose sobre alfa-amilasas de origen animal (pancreática) o bacteriano (Bacillus). Este efecto inhibitor no se presenta en los extractos crudos de hoja de naranjo (figura 9) así como tampoco se ha encontrado sobre los de cotiledones de guisante (Monerri, 1983). No puede excluirse la posibilidad de que exista una interferencia con el calcio por parte de alguna sustancia presente en los extractos crudos.

La fracción enzimática 1, correspondiente a las bandas 7 a 13 - de los electroforegramas, responden a las características clásicas de las beta-amilasas, siendo rápidamente afectadas por el cloruro mercúrico, mientras que no son inactivadas por el EDTA (tabla 7 y figuras 25 y 28) ni los pH -- muy ácidos (tabla 6, figura 16). Su peso molecular - alrededor de 150.000 - daltons- es similar al de otras beta-amilasas (French, 1960). Estas enzimas son capaces de atacar también la amilopéctina, formando dextrinas límite como producto de reacción. La longitud de onda de absorción máxima del complejo iodo-sustrato varía con el grado de polimerización de este último (Akazawa, 1965) por lo que en los electroforegramas las bandas de actividad debidas a la beta-amilasa presentan una coloración distinta a la coloración de fondo producida por el complejo amilopéctina-iodo. Las bandas de actividad - debidas a las alfa-amilasas no presentan ninguna coloración, puesto que estas enzimas degradan totalmente el sustrato (figura 30).

Los resultados obtenidos con los extractos crudos difieren de los descritos para los extractos purificados en cuanto a su respuesta al cloruro mercúrico. Concentraciones de cloruro mercúrico muy efectivas para la inactivación de la beta-amilasa en extractos purificados de hojas de naranjo (figuras 25 y 28) y en extractos crudos de guisante (Sanz, 1978; Monerri, 1983) no afectan prácticamente a los extractos crudos de naranjo (figura 10), por lo que la estimación de la actividad alfa-amilolítica como la residual de los extractos crudos tratados con cloruro mercúrico conduciría a atribuir la casi

totalidad de la actividad a amilasas de tipo alfa, lo cual es erróneo. Mediante cromatografía se ha determinado que la beta-amilasa contribuye en alrededor del 40 % a la actividad total recuperada, que es superior al 80 % de la presente en los extractos crudos en todos los casos. Parece obvia la existencia de alguna sustancia en los extractos crudos que impide la inactivación de la beta-amilasa por acción de este agente y que es eliminada durante la purificación por cromatografía o electroforesis, por lo que se cuestiona la utilización de este método para la estimación de la actividad de los dos grupos de isoenzimas en extractos de hojas sin purificar.

La actividad amilolítica total encontrada a lo largo de este trabajo es muy superior a la requerida para hidrolizar el almidón contenido en las hojas ya que la actividad mínima obtenida es capaz de explicar la degradación del contenido máximo de almidón en pocas horas. Es muy posible que con el método utilizado se produzca la extracción de enzimas no activas "in vivo" en esos momentos, por lo que la actividad encontrada es muy superior a la realmente en activo en las células.

Para determinar si la movilización del almidón está regulada por la amilasa, los cambios del contenido en almidón deben compararse con las variaciones de la actividad amilolítica y no con la actividad total en cada momento. Las variaciones de la actividad amilolítica a lo largo del año en las hojas adultas (figura 49) no guarda relación aparente con la acumulación de almidón (figura 41). El contenido en almidón disminuye de manera constante y gradual desde el comienzo de la primavera sin que se observe ninguna aceleración de la movilización en coincidencia con la aparición de los acusados picos de actividad obtenidos. En las hojas jóvenes se encuentra inicialmente una relación entre la actividad amilolítica y el contenido en almidón. Durante la época de acumulación de almidón la actividad amilolítica es baja y en el mes de Junio se produce un incremento inmediatamente anterior al descenso del contenido en almidón que se da en esta época (figuras 41 y 49). Poste-

riormente, sin embargo, se presenta de forma paralela un aumento de la actividad y una recuperación del contenido en almidón (semanas 26 y 27) y a partir de ese momento la actividad se mantiene relativamente constante hasta la semana 48 mientras que el nivel de almidón desciende en pocas semanas. Teniendo en cuenta que, como se discute en el apartado A, el método utilizado extrae mayor cantidad de almidón que los métodos enzimáticos, al corregir los valores se obtiene que el contenido en almidón a partir de la semana 33 corresponde al fijado por la fotosíntesis diaria y por tanto, a la actividad amilolítica relativamente elevada que se obtiene en esta época no puede corresponder una ulterior movilización del almidón.

Por el contrario, en los estudios realizados en sistemas más limitados y controlados como los experimentos de eliminación de fruto y los de hojas separadas de la planta, sí que existe una correspondencia entre los cambios de la actividad amilolítica y la degradación del almidón. La movilización más rápida provocada en las hojas jóvenes por la eliminación del fruto (figura 53-A) va acompañada por un incremento en la actividad amilolítica superior al encontrado en las hojas de brotes con frutos (figuras 56-A y 57). En las hojas adultas, en las que la pauta de movilización del almidón no varía al eliminar el fruto, no se producen tampoco diferencias en la síntesis de enzimas amilolíticas (figuras 53-B y 56-B). Del mismo modo, en las hojas separadas de la planta se observa también un descenso del contenido en almidón junto a un aumento de la actividad amilolítica (figuras 60 y 64).

La ausencia de correlación entre las variaciones estacionales de la actividad amilolítica y los cambios del contenido en almidón a lo largo del año indica que la movilización del almidón no está regulada al menos exclusivamente por estas enzimas, pudiendo estar implicada también la vía fosforolítica. La presencia de enzimas de las dos vías en hojas (Peavey et al., 1977; Pongratz y Beck, 1978; Okita et al., 1979), así como la detección de productos de reacción de los dos sistemas enzimáticos (Levi y Gibbs, 1976; Heldt et

al., 1977; Peavey et al., 1977) han llevado a Okita y colaboradores (1979) a proponer un modelo de acción conjunta según el cual el almidón sería inicialmente atacado por las amilasas produciendo maltosa, glucosa y oligosacáridos y liberándose posteriormente glucosa-1-fosfato por acción de la fosforilasa a partir de los oligosacáridos formados por la alfa-amilasa.

En el metabolismo del almidón en las hojas de naranjo podrían estar implicadas las dos vías degradativas y si bien no se ha realizado un estudio de los productos del metabolismo del almidón, sí se han detectado al menos tres fosforilasas en los extractos (figura 35).

conclusiones

De la discusión de los resultados anteriormente expuestos se desprenden las siguientes conclusiones:

- 1.- Tanto los azúcares solubles como el almidón constituyen reservas metabólicamente reutilizables por la planta, siendo el almidón una reserva de carbohidratos que permite mantener el nivel de azúcares solubles por encima de un valor mínimo.
- 2.- La caída del fruto durante el mes de Junio no viene determinada por el agotamiento de las reservas hidrocarbonadas de la planta, pues sólo un porcentaje entre el 50 y el 60 de las reservas acumuladas durante el reposo vegetativo son utilizadas en el periodo de crecimiento y desarrollo.
- 3.- La movilización de las reservas en las hojas adultas se produce de forma gradual y a un ritmo constante, al menos hasta mediados de Julio y no se ve afectada por la eliminación de los sumideros de las ramas en que están situadas. Esto es explicable por la ausencia de conexiones vasculares directas - entre estas hojas y los frutos en desarrollo así como por saturación del sistema de transporte.
- 4.- El estado nutricional de la planta se refleja de manera distinta en las hojas jóvenes y en las adultas. Durante el mes de Junio se presenta un periodo crítico en el contenido en carbohidratos en las hojas jóvenes cercanas al fruto, lo que refleja la existencia de una competencia de carácter local por los fotoasimilados y que puede provocar la caída de los pequeños frutos en desarrollo.

5.- La relación existente entre el fruto y las hojas situadas en el mismo brote no se explica simplemente por la relación fuente-sumidero. Las hojas de brotes fructíferos presentan una acumulación mayor de almidón y una degradación más rápida que las hojas de brotes vegetativos. La distribución de los azúcares en los distintos órganos de la planta en cada momento del desarrollo no está, por tanto, regulada únicamente por factores nutricionales sino también por otros distintos, presumiblemente hormonales.

6.- En las hojas de naranjo existe el complemento enzimático necesario para la degradación del almidón, tanto por la vía amilolítica como por la fosforolítica. Por electroforesis en geles de poliacrilamida se encuentran 3 fosforilasas y un total de 13 amilasas, de las cuales 7 son exoamilasas (beta-amilasas) y las otras 6 endoamilasas (alfa-amilasas).

7.- La alfa-amilasa de naranjo presenta características atípicas como son su parcial sensibilidad a la acción de los inactivadores de los grupos sulfhidri- lo y su mayor resistencia a los agentes secuestrantes de iones calcio, por estar estos iones fuertemente unidos a la molécula de enzima.

8.- En los extractos crudos existe alguna sustancia que impide la inactivación de la beta-amilasa por el cloruro mercúrico, por lo que la determinación de la actividad alfa-amilolítica como la residual de extractos tratados con cloruro mercúrico debe realizarse con extractos purificados o semipurificados.

9.- La movilización del almidón en hojas adultas no está regulada aparentemente por la actividad amilolítica y las variaciones de actividad que se producen a lo largo del año no coinciden con variaciones en la velocidad de degradación del almidón.

10.- La eliminación de los frutos de las ramas en que están situados no provoca cambios en el ritmo de degradación en las hojas adultas y tampoco afecta su actividad amilolítica.

11.- En las hojas jóvenes, particularmente en los experimentos de eliminación del fruto, se presenta una estrecha relación entre la variación de la actividad amilolítica y la del contenido en almidón. La eliminación del fruto, que provoca un descenso más rápido del contenido en almidón, induce también una mayor actividad amilolítica que en las hojas de brotes con fruto. Del mismo modo, durante la senescencia de las hojas separadas de la planta se produce un importante aumento de la actividad amilolítica simultáneamente con un rápido descenso del nivel de almidón.

bibliografía

- ABBOTT, I.R. and N.K. MATHESON. (1972) Starch depletion in germinating wheat, wrinkled seeded peas and senescing tobacco leaves..
Phytochemistry 11, 1261-1272.
- ADAMS, C.A.; R.W. RINNE and M.C. FJERSTAD. (1980). Starch deposition and carbohydrase activities in developing and germinating soya bean seeds. Ann.Bot. 45 , 577-582.
- ADAMS, C.A.; T.H. BROMAN; S.W. NORBY and S.W. RINNE. (1981). Occurrence of multiple forms of alpha-amylase and absence of starch - phosphorylase.in soya bean seeds. Ann.Bot. 48 , 895-903.
- AGUSTI, M.; F. GARCIA-MARI and J.L. GUARDIOLA. (1982). The influence of flowering intensity on the shedding of reproductive estructures in sweet orange. Sci. Horticulturae 17 , 343-352.
- AKAZAWA, T. (1965). Starch, inulin and other reserve polysaccharides.
En: Plant biochemistry (Bonner & Varner, eds.). Academic Press.
- ALTMAN, A. and P.F. WAREING. (1975). The effect of IAA on sugar accumulation and basipetal transport of ¹⁴C-labelled assimilates in relation to root formation in Phaseolus vulgaris cuttings. Physiol. Plant. 33 , 32-38.
- ALTMAN, A. and R. GOREN. (1977). Differential effects of sucrose, abscisic acid, and benzyladenine on shoot growth and callus formation in the abscission zone of excised citrus buds. Plant Physiol. 59, 1161-64
- A.O.A.C. (1970). Methods of analysis. 11th.ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C.
- ARGÜELLES, T. and J.L. GUARDIOLA. (1977). Hormonal control of senescence in excised orange leaves. J. Hort. Sci. 52 , 199-204.

- BALLS, A.K.; M.K. WALDEN and R.R. THOMPSON. (1948). A crystalline - beta-amylase from sweet potato. *J.biol.Chem.* 173 , 9-19.
- BANKS, W. and D.D. MUIR. (1980). Structure and chemistry of the starch granule. En: *The biochemistry of plants. Vol. 3 : Carbohydrates: structure and function.* (Preiss, J., ed.). Academic Press.
- BAUN, L.C.; E.P. PALMIANO; C.M. PEREZ and B.O. JULIANO. (1970). - Enzymes of starch metabolism in the developing rice grain. *Plant Physiol.* 46 , 429-434.
- BEAR, R.S. (1944). *J.Amer.Chem.Soc.* 66 , 2122-2123. Citado por Banks, W. & D.D. Muir (1980).
- BEEVERS, L. (1968). Growth regulator control in leaf discs of nasturtium (*Tropaeolum majus*). En: *Biochemistry and physiology of plant growth substances.* (Wightman, F. & G. Setterfield, eds.) pp 1417-1435. Runge Press.
- BENNET, J.P. (1924). The distribution of carbohydrate in the apricot tree. *Proc.amer.soc.Hort.sci.* 21 , 372-384.
- BIELORAI, H. and K. MENDEL. (1969). The simultaneous measurement of apparent photosynthesis and transpiration of citrus seedlings at different soil moisture levels. *J.amer.soc.Hort.sci.* 94 , 201-204.
- BILDERBACK, D.E. (1973). A simple method to differentiate between alpha- and beta-amylase. *Plant Physiol.* 51 , 594-595.
- BIRD, I.F.; H.K. PORTER and C.R. STOCKING. (1965). *Biochim. Biophys. Acta* 100 , 366-375. Citado por Preiss, J. & C. Levi (1980).
- BLOM, J.A.; A. BAK and B. BRAAE. (1936). *Z. Physiol. Chem.* 241 , 273. Citado por French, D. (1960).

- BLOM, J.; A. BAK and B. BRAAE. (1937). Z. physiol. Chem. 250 , 104.
Citado por French, D. (1960).
- BOLLARD, E.G. (1970). The physiology and nutrition of developing plants.
En: The biochemistry of fruits and their products. (Hulme, A.C.,
ed.) pp 387-425. Academic Press.
- BRIGGS, D.E. (1973). Hormones and carbohydrate metabolism in germinating
cereal grains. En: Biosynthesis and its control in plants. (Milbor-
row, B.V., ed.). Academic Press.
- BULPIN, P.V. and T. ap REES. (1978). Starch breakdown in spadix of Arum
maculatum. Phytochemistry 17 , 391-396.
- CAMERON, S.H. and C.A. SCHROEDER. (1945). Cambial activity and starch
cycle in bearing orange trees. Proc. amer. soc. Hort. sci. 46, 55-59
- BOURNE, E.J.; D.E. DAVIS and J.B. PRIDHAM. (1970). Alpha-amylase ac-
tivity in sugarcane (Saccharum officinarum) chloroplasts. Phytoche-
mistry 9 , 345-348.
- BOWEN, M.R. and P.F. WAREING. (1971). Further investigations into hormo-
ne-directed transport in stems. Planta 99 , 120-132.
- CHRISTY, A.L. and C.A. SWANSON. (1976). Control of translocation by -
photosynthesis and carbohydrate concentrations of the source leaf.
En: Transport and transfer processes in plantas (Wardlaw, I.F. &
J.B. Passioura, eds.) pp 329-338. Academic Press.
- CRANE, J.C. and M.M. NELSON. (1972). Effect of crop load and auxin ap-
plication on alternate bearing of the pistachio. J. amer. soc. Hort. sci.
97 , 337-339.
- ; I. AL-SHALAN and R.M. CARLSON. (1973). Abscission of pistachio -
inflorescence buds as affected by leaf area and number of nuts.

- J.amer.soc.Hort.sci. 98 , 591-592.
- ; P.B. CATLIN and I. AL-SHALAN. (1976). Carbohydrate levels in the pistachio as related to alternate bearing. J.amer.soc.Hort.sci. 101, 371-374.
- CHAPMAN, G.W.; J.E. PALLAS and J. MENDICINO. (1972). The hydrolysis of maltodextrins by a beta-amylase isolated from leaves of Vicia faba. Biochim.Biophys.Acta 276 , 491-507.
- DAVIES, D.R. (1974). Some aspects of sucrose metabolism. En: Plant carbohydrate biochemistry. (Pridham, J.B., ed.) pp 61-81. Academic Press.
- DAVIES, C.R. and P.F. WAREING. (1965). Auxin-directed transport of radio radiophosphorus in stems. Planta 65 , 139-156.
- DAVIS, B.D. (1979). Influence of cotyledons upon alpha-amylase activity in pea embrionic axes. Plant. Physiol. 63 , 1010-1015.
- DOEHLERT, D.C. and S.H. DUKE. (1983). Specific determination of alpha-amylase activity in crude plant extracts containing beta-amylase. Plant. Physiol. 71 , 229-234.
- DOWNTON, W.J.S. and J.S. HAWKER. (1973). Enzymes of starch metabolism in leaves and berries of Vitis vinifera. Phytochemistry 12, 1157-63.
- DUGGER, W.M. and R.L. PALMER. (1969). Seasonal changes in lemon leaf carbohydrates. Proc. 1st Int. Citrus Symp. 1 , 339-343.
- DÜRING, H. and G. ALLEWELDT. (1980). Effects of plant hormones on phloem transport in grapevines. Ber.Dtsch.Bot.Ges. 93 , 339-347.
- DWIVEDI, S.; M. KAR and D. MISHRA. (1979). Biochemical changes in excised leaves of Oryza sativa subjected to water stress. Physiol. - Plant. 45 , 35-40.

- EBERT, A. and F. BANGERTH. (1981). Relations between the concentration of diffusible and extractable gibberellin-like substances and the alternate-bearing behaviour in apple as affected by chemical fruit thinning. *Scientia Hort.* 15, 45-52.
- ERICKSON, L.C. (1968). The general physiology of citrus. En: The citrus industry. Vol. II: Anatomy, physiology, mineral nutrition, seed production, genetics, growth regulators. (Reuther, W.; L.D. Batchelor and H.J. Webber, eds.) University of California.
- and B.L. BRANNAMAN. (1960). Abscission of reproductive structures and leaves of orange trees. *Proc. amer. soc. Hort. sci.* 75, 222-229.
- ERNER, Y.; R. GOREN and S.P. MONSELISE. (1976). The rough fruit condition of the "Shamouti" orange connections with the endogenous hormonal balance. *J. hor. sci.* 51, 367-374.
- FEKETE, M.A.R.de and G.H. VIEWEG. (1973). The role of phosphorylase in the metabolism of starch. *Ann. New York Acad. Sci.* 210, 170-180.
- FERNANDEZ TARRAGO, J. and G. NICOLAS. (1976). Starch degradation in the cotyledons of germinating lentils. *Plant Physiol.* 58, 618-621.
- FISCHER, E.H. and E.A. STEIN. (1960). Alpha-amylases. En: The enzymes. vol. IV. (Boyer, Lardy and Myrbäck, eds.) pp 313-343. Academic Press.
- ; W.N. SUMMERWELL; J.M. JUNGE and E.A. STEIN. (1960). Calcium and the molecular structure of alpha-amylases. *Proc. 4th Intern. Congr. Biochem. Symp.* 8, reprint 3: 1-13. Wien 1958. Pergamon Press.
- FRENCH, D. (1960). Beta-amylases. En: The enzymes. Vol IV. (Boyer, Lardy & Myrbäck, eds.) Academic Press.

- FUKUMOTO, J. and Y. TSUJISAKA. (1955). *Kagaku to Kôgyô* 29 , 124. Cita-
do por French, D. (1960).
- FURIO, J.; F. CALVO; J.L. TADEO and E. PRIMO MILLO. (1981). Relation-
ship between endogenous hormonal content and fruit set in citrus
varieties of the navel group. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1, 253-
256. Japan.
- GARCIA LUIS, A. (1972). Cambios inducidos por el ácido giberélico duran-
te la germinación de semillas de guisante. Tesis doctoral. Facul-
tad de Ciencias. Universidad de Valencia.
- GARCIA MARTINEZ, J.L.; M.A. GARCIA PAPI y A. MANSANET. (1976).
Identificación y cuantificación de ácido abscísico por cromatografía
de gases en frutos inmaduros de clementino fino y clementino Mon-
real. *Agroquim. Tecnol. Alim.* 16 , 57-68.
- and M.A. GARCIA PAPI. (1979). Influence of gibberellic acid on early
fruit development, diffusible growth substances and content of macro
nutrients in seedless clementine mandarin. *Scientia Hortic.* 11, 337-
347.
- GATES, J.W. and G.M. SIMPSON. (1968). The presence of starch alpha-
amylase in the leaves of plants. *Can. J. Bot.* 46, 1459-1462.
- GEPSTAIN, S. and I. ILAN. (1974). Does osmotic regulation of amylase syn-
thesis in barley endosperm exist?. *Plant & Cell Physiol.* 15, 399-
402.
- and ----. (1979). Cytokinin-induced amylolytic activity in bean cotyle-
dons: identification of the regulated enzyme. *Plant & Cell Physiol.*
20 , 1603-1607.
- , and ----. (1981). Does osmotic regulation of amylase activity in bean
cotyledons exist?. *Physiol. Plant.* 53, 188-190.

- GERSANI, M.; S.H. LIPS and T. SACHS. (1980a). The influence of shoots, roots, and hormones on sucrose distribution. *J.exp.Bot.* 31, 177-184.
- , ----, and ----. (1980b). The influence of shoots, roots and hormones on the distribution of leucine, phosphate and benzyladenine. *J.exp. Bot.* 31, 777-782.
- GIBBS, M. (1966). Carbohydrates: their role in plant metabolism and nutrition. En: *Plant Physiology* (Steward, F.C., ed.) Vol. IV B. Academic Press.
- GOLDSCHMIDT, E.E.; S.K. EILATI and R. GOREN. (1970). Increase in ABA-like growth inhibitors and decrease in gibberellin-like substances during ripening and senescence of citrus fruits. En: *Plant growth substances 1970*. (Carr, D.J., ed.) pp 611-617. Springer Verlag.
- and A. GOLOMB. (1982) The carbohydrate balance of alternate-bearing citrus trees and the significance of reserves for flowering and - fruiting. *J.amer.soc.Hort.sci.* 107, 206-208.
- ; R. GOREN; Z. EVEN-CHEN and S. BITTNER. (1973). Increase in free and bound abscisic acid during natural and ethylene-induced senescence of citrus fruit peel. *Plant Physiol.* 51, 879-882.
- GOREN, R. and E.E. GOLDSCHMIDT. (1970). Regulative systems in the developing citrus fruit. I. The hormonal balance in orange fruit -- tissues. *Physiol. Plant.* 23, 937-947.
- GROCHOWSKA, M. (1973). Comparative studies on physiological and morphological features of bearing and non-bearing spurs of the apple tree. I. Changes in starch content during growth. *J.Hort.Sci.* 48, 347-356.

- GUARDIOLA, J.L.; M. AGUSTI and F. GARCIA MARI. (1977). Gibberellic acid and flower bud development in sweet orange. Proc.Int.Soc. Citriculture 2, 696-699.
- and J. GONZALEZ. (1982). Nutrient retranslocation in Navelate and Washington navel oranges. XXI Int.Hort.Congress. Hamburg.
- ; C. MONERRI and M. AGUSTI. (1982). The inhibitory effect of gibberellic acid on flowering in Citrus. Physiol.Plant. 55, 136-142.
- HAAPALA, H. (1969). Studies on the activity of beta-amylase in the chloroplasts of Stellaria media during prolonged illumination. Physiol. Plant. 22, 140-146.
- HABESHAW, D. (1969). The effect of light on the translocation from sugar beet leaves. J.exp.Bot. 20, 64-71.
- HANSEN, J. and I. MØLLER. (1975). Percolation of starch and soluble carbohydrates from plant tissue for quantitative determination with anthrone. Anal. Biochem. 68, 87-94.
- HELDT, H.W.; C.J. CHON; D. MARONDE; A. HEROLD; Z.S. STANKOVIC; D. A. WALKER; A. KRAMINEN; M.R. KIRK and V. HEBER. (1977). -- Role of orthophosphate and other factors in the regulation of starch formation in leaves and isolated chloroplasts. Plant.Physiol. 59, 1146-1155.
- HILDEBRAND, D.F. and T. HYMOWITZ. (1981). Role of beta-amylase in -- starch metabolism during soybean seed development and germination. Physiol. Plant. 53, 429-434.
- HILGEMAN, R.H.; J.A. DUNLAP and G.C. SHARPLES. (1967). Effect of times of harvest of Valencia oranges on leaf carbohydrate content and subsequent set of fruit. Proc.amer.soc.Hort.sci. 90, 110-116.

- HO, L.C. (1976). The relationship between the rates of carbon transport - and of photosynthesis in tomato leaves. *J.exp.Bot.* 27 , 87-97.
- IRSHAD, M. and C.B. SHARMA. (1981). Sensitivity of plant alpha-amylases to calcium ions "in vitro". *Phytochemistry* 20 , 1205-1209.
- IUPAC-IUB. (1972). Commission on biochemical nomenclature. *Enzyme nomenclature*. Elsevier.
- JACOBSEN, J.V.; J.G. SCANDALIOS and J.E. VARNER. (1970). Multiple - form of amylase induced by gibberellic acid in isolated aleurone - layers. *Plant. Physiol.* 45 , 367-371.
- JAHN, O.L. (1973). Inflorescence types and fruiting patterns in Hamlin and Valencia oranges and Marsh grapefruit. *Amer.J.Bot.* 60 , 663-670.
- JONES, R.L. and J.E. ARMSTRONG. (1971). Evidence for osmotic regulation of hydrolytic enzyme activity in germinating barley seeds. *Plant - Physiol.* 48 , 137-142.
- and J.E. VARNER. (1967). The bioassay of gibberellins. *Planta* 72 , 155-161.
- JONES, W.W.; T.W. EMBLETON; E.L. BARNHART and C.B. CREE. (1974). Effect of time and amount of fruit thinning on leaf carbohydrates and fruit set in Valencia oranges. *Hilgardia* 42 , 441-449.
- ; ---- and C.W. COGGINS. (1975). Starch content of roots of Kinnow mandarin trees bearing fruit in alternate years. *Hortsci.* 10 , 514.
- ; ----; ---- and D.D. HALSEY. (1973). Factors related to fruiting of - Kinnow mandarin. *Proc. 2nd Citrus Symp.* 235-241.
- ; ---- ; M.L. STEINACKER and C.B. CREE. (1964). The effect of fruit harvest on fruiting and carbohydrate supply in the Valencia orange. *Proc.amer.soc.Hort.sci.* 84 , 152-157.

- ; ---- ; ---- and ----. (1970). Carbohydrates and fruiting of Valencia orange trees. *J.amer.soc.Hort.sci.* 95 , 380-381.
- and M.L. STEINACKER. (1951). Seasonal changes in concentration of sugars and starch in leaves and twigs of citrus trees. *Proc.amer.soc.Hort.sci.* 58 , 1-4.
- JULIANO, B.O. and J.E. VARNER. (1969). Enzymic degradation of starch - granules in the cotyledons of germinating peas. *Plant Physiol.* 44, 886-892.
- KANDLER, O. and H. HOPF. (1980). Occurrence, metabolism and function of oligosaccharides. En: *The biochemistry of plants*. Vol. 3. (Preiss, J., ed.). Academic Press.
- KAO, C.H. (1981). Senescence of rice leaves. VI. Comparative study of the metabolic changes of senescing turgid and water-stressed excised leaves. *Plant & Cell Physiol.* 22 , 683-688.
- KHALIFAH, R.A. and L.N. LEWIS. (1966). Cytokinins in citrus: Isolation of a cell division factor from lemon seeds. *Nature* 212 , 1472-1473.
- ; ---- and C.W. COGGINS. (1965). Isolation and properties of gibberellin-like substances from citrus fruits. *Plant Physiol.* 40, 441-445.
- KOMBRINK, E. and G. WÖBER. (1980). Preparation of intact chloroplasts by chemically induced lysis of the green alga *Dunaliella marina*. *Planta* 149 , 123-129.
- KOSHIBA, T. and T. MINAMIKAWA. (1980). Effect of growth temperature on reserve mobilization and hydrolytic enzyme activities in *Vigna mungo* cotyledons. *Plant & Cell Physiol.* 21 , 865-872.
- KOZLOWSKI, T.T. and T. KELLER. (1966). Food relations of woody plants. *Bot.Rev.* 32 , 293-382.

- KRIEDEMANN, P.E. (1968). Some photosynthetic characteristics of citrus - leaves. *Aust. J. Biol.* 21 , 895-905.
- . (1969a). ^{14}C distribution in lemon plants. *J.Hort.sci.* 44 , 273-279.
- . (1969b). ^{14}C distribution in orange plants. *Aust.J.agric.res.* 20 , 291-300.
- KUBOTA, S. and E. MOTOYAMA. (1971). The effects of fruit-bearing on the translocation and distribution of ^{14}C -photosynthates in Satsuma - mandarin trees. *Bull.Shikoku agric. exp. sta.* 24 , 27-40.
- KUMAR, A. and G.G. SANWAL. (1977). Multiple forms of starch phosphorylase from banana leaves. *Phytochemistry* 16 , 327-328.
- LARNER, J. (1960). Other glucosidases. En: *The enzymes*. Vol. IV. (Boyer, Lardy and Myrbäck, eds.) pp 369-378. Academic Press.
- LATCHE, A.; J.C. PECH; A. DIARRA et J. FALLOT. (1974). Facteurs susceptibles de contrôler l'amylolyse chez la pomme et la poire. -- Colloques Internationaux C.N.R.S. n° 238. Facteurs et régulation de la maturation des fruits.
- LATZKO, E. and M. GIBBS. (1968). Distribution of enzymes of the reductive pentose phosphate cycle in spinach leaves and in chloroplasts isolated by different methods. *Z. Pflanzenphysiol.* 59 , 184-194.
- LENZ, F. (1966). Flower and fruit development in Valencia-late orange as affected by type of inflorescence and nutritional status. *Hort. Res.* 6 , 65-78.
- . Fruit effects on photosynthesis, light- and dark-respiration. En: *Photosynthesis and plant development*. (Marcelle, R.; H. Clijsters and M. van Poucke, eds.). W. Junk, publ.
- and P.R. CARY. (1969). Relationship between vegetative and reproducti

- ve growth in Washington-navel orange as affected by nutrition. -
Proc. 1st Int. Citrus Symp. 3 , 1625-1633.
- LEVI, C. and M. GIBBS. (1976). Starch degradation in isolated spinach --
chloroplasts. Plant Physiol. 57 , 933-935.
- and J. PREISS. (1978). Amylopectin degradation in pea chloroplast -
extracts. Plant Physiol. 61 , 218-220.
- LEWIS, L.N.; C.W. COGGINS and H.Z. HIELD. (1964). The effects of bien-
nial bearing and NAA on the carbohydrate and nitrogen composition
of Wilking mandarin leaves. Proc.amer.soc.Hort.sci. 84 , 147-151.
- LUCKWILL, L.C. and J.M. SILVA. (1979). The effects of daminozide and -
gibberellic acid on flower initiation, growth and fruiting of apple
cv. Golden Delicious. J. Hort. sci. 54 , 217-223.
- MacRAE, J.C.; D. SMITH and R.M. McCREADY. (1974). Starch estimation -
in leaf tissue.- A comparison of results using six methods. J.sci.
Food agric. 25 , 1465-1469.
- MacWILLIAMS , I.A. and G. HARRIS. (1959). The separation of limit dextri-
nase from R-enzyme and aspects of the activities of the separated
enzymes. Archs.Biochem.Biophys. 84 , 442-454.
- MANNERS, D.J. and K.L. ROWE. (1969). Carbohydr. res. 9 , 441-450. Cita-
do por Preiss, J. and C. Levi, 1979.
- MARRE, E. (1982). Hormonal regulation of transport: data and perspectives.
En: Plant growth substances 1982. (Wareing, P.F., ed.). pp 407-
417. Academic Press.
- McCREADY, R.M. (1977). Carbohydrates: composition, distribution, signifi-
cance. En: Citrus science and technology. Vol. I. The Avi publ.Co.
- ; J. GUGGOLZ; V. SILVEIRA and H.S. OWENS. (1950). Determination

- of starch and amylose in vegetables. *Anal.Chem.* 22 , 1156-1158.
- MEYER, K.H.; P.F. SPAHR et E.H. FISCHER. (1953). Purification, cristallisation et proprietes de la alpha-amylase de ble. *Helv. Chim. Acta.* 36 , 1924-1936.
- MEYER, M.M. and W.E. SPLITTSTOESSER. (1971). The utilization of carbohydrate and nitrogen reserves by Taxus during its spring growth period. *Physiol. Plant.* 24 , 306-314.
- MONDAL, M.H.; W.A. BRUN and M.L. BRENNER. (1978). Effects of sink removal on photosynthesis and senescence in leaves of soybean (Glycine max, L.) plants. *Plant Physiol.* 61 , 394-397.
- MONERRI, C. (1983). Control de la movilización del almidón en semillas - de guisante durante la germinación. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Valencia.
- MONSELISE, S.P. (1977). Citrus fruit development: endogenous systems - and external regulation. *Proc.Int.soc.Citriculture* 2 , 664-668.
- . (1980). Selection of appropriate bases of calculation for the evaluation of data in plant science and agriculture. *Codata Bull.* nº 39. Problems in the treatment of numerical data. Proc. of joint French-Israeli Interdisciplinary Symp.
- . (1982). Use of growth regulators in evergreen fruit crops. XXI Int. Hort. Congress. Hamburg.
- and E.E. GOLDSCHMIDT. (1982). Alternate bearing in fruit trees; a review. *Hort. rev.* 4 , 128-173.
- and L. HEYMANN-HERSCHBERG. (1953). Influence and age on dry - matter content, area and mineral composition of Shamouti orange leaves. *Proc.amer.soc.Hort.sci.* 62 , 67-74.

- and F. LENZ. (1980). Effect of fruit load on photosynthetic rates of -
budded apple trees. *Gartenbauwiss.* 45 , 220-224.
- MOORBY, J. (1977). Integration and regulation of translocation within the
whole plant. En: *Symposia of the Society for experimental Biology.*
Integration of activity in the higher plant. pp 425-454. Symp.XXXI.
Cambridge University Press.
- MOSS, G.I. (1970). Chemical control of flower development in sweet orange
(Citrus sinensis). *Aust. J. agr. res.* 21 , 233-242.
- . (1971). Effect of fruit on flowering in relation to biennial bearing in -
sweet orange (Citrus sinensis). *J. Hort. sci.* 46 , 177-184.
- and K.B. BEVINGTON. (1973). Methods for controlling biennial bearing
in Late-Valencia sweet orange. 1er. Congreso Mundial de Citricul-
tura 2 , 367-372. Murcia.
- ; B.T. STEER and P.E. KRIEDEMAN. (1972). The regulatory role of
inflorescence leaves in fruit-setting by sweet orange (Citrus sinen-
sis). *Physiol. Plant.* 27 , 432-438.
- MULLIGAN, D.R. and J.W. PATRICK. (1979). Gibberellic-acid-promoted -
transport of assimilates in stems of Phaseolus vulgaris, L. *Plan-*
ta 145 , 233-238.
- NOMURA, T.; Y. KONO and T. AKAZAWA. (1969). Enzymic mechanism of -
starch breakdown in germinating rice seeds. II. Scutellum as the
site of sucrose synthesis. *Plant Physiol.* 44, 765-769.
- OHLSSON, E. (1930). The two components of malt diastase, especially with
reference to the mutarotation of the products formed in the hydro-
lysis of starch. *Z.physiol.Chem.* 189 , 17-63.
- OKITA, T.W.; E. GREENBERG; D.N.KUHN and J. PREISS. (1979). Subcel-

lular localization of the starch degradative and biosynthetic enzymes of spinach leaves. *Plant Physiol.* 64, 187-192.

---- and J. PREISS. (1980). Starch degradation in spinach leaves. Isolation and characterization of the amylases and R-enzyme of spinach leaves. *Plant Physiol.* 66, 870-876.

ORNSTEIN, L. (1964). Disc electrophoresis: I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 321-343.

PARK, J.T. and M.J. JOHNSON. (1949). A submicrodetermination of glucose. *J. biol. Chem.* 181, 149-151.

PATRICK, J.W. (1982). Hormonal control of assimilate transport. En: *Plant growth substances 1982*. (Wareing, P.F., ed.) pp 669-678. Academic Press.

---- and P.F. WAREING. (1970). Experiments on the mechanism of hormone-directed transport. En: *Plant growth substances 1970*. (Carr, D.J. ed.). pp 695-700. Springer Verlag.

---- and ---- . (1973). Auxin-promoted transport of metabolites in stems of *Phaseolus vulgaris* L. *J. exp. Bot.* 24, 1158-1171.

PAZUR, J.H. (1965). Enzymes in synthesis and hydrolysis of starch. En: *Starch chemistry and technology*. Vol. 1: Fundamental aspects. (Whistler and Paschal, eds.). Academic Press.

PEAVEY, D.G.; M. STEUP and M. GIBBS. (1977). Characterization of starch breakdown in the intact spinach chloroplast. *Plant Physiol.* 60, 305-308.

PECH, J.C.; G. BONNEAU et J. FALLOT. (1971). Les amylases de la poire: caractérisation. *C.R.Acad. Sci.* 273, 775-778.

PONGRATZ, P. and E. BECK. (1978). Diurnal oscillation of amylolytic ac-

- tivity in spinach chloroplasts. *Plant: Physiol.* 62 , 687-689.
- PREISS, J. and C. LEVI. (1979). Metabolism of starch in leaves. En: *Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 6: Photosynthesis II.- Photosynthetic carbon metabolism and related processes.* (Gibbs, M. and E. Latzko, eds.) pp 282-312. Springer Verlag.
- ; T.W. OKITA and E. GREENBERG. (1980). Characterization of the -- spinach leaf phosphorylases. *Plant Physiol.* 66 , 864-869.
- PRIESTLEY, C.A. (1971). Carbohydrate storage and utilization. En: *Physiology of tree crops.* (Lucwill, L.C. and C.V. Cuttings, eds.) pp 113-127. Academic Press.
- REES, T. ap. (1974). Pathways of carbohydrate breakdown in higher plants. En: *Biochemistry. Series One.* (Northcote, D.H., ed.). Vol 11. *Plant Biochemistry.* MTP International Review of Science.
- ROUSELL, E.V. and L.J. GOAD. (1962) The constituent of wheat binding latent beta-amylase. Latent beta-amylase of wheat: its mode of attachment to glutenin and its release. *Biochem. J.* 84 , 73 P.
- SACHS, T. (1975). The induction of transport channels by auxins. *Planta* - 127 , 201-206.
- SAKAI, A. and S. YOSHIDA. (1968). The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. *Cryobiol.* 5 , 160-174.
- SANZ, A. (1978). Estimación de la actividad amilolítica en cotiledones de guisante. Tesina de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Valencia.
- SAUER, M.R. (1951). Growth of orange shoots. *Aust. J. agric. res.* 2 , 105-117.
- . (1954). Flowering in the sweet orange. *Aust.J.agric.res.* 5 , 649-657.

- SAUTER, J.J. (1966). Untersuchungen zur Physiologie der Pappelholzstrahlen. I. Jahresperiodischer Verlauf der Stärkespeicherung im Holzparenchym. Z. Pflanzenphysiol. 55, 246-258.
- SCHWIMMER, S. (1950) Kinetics of malt alpha-amylase action. J. biol. Chem. 186, 181-193.
- SETH, A. and P.F. WAREING. (1967). Hormone directed transport of metabolites and its possible role in plant senescence. J. exp. Bot. 18, 67-77.
- SHAIN, Y. and A.M. MAYER. (1968). Activation of enzymes during germination: amylopectin-1,6-glucosidase in peas. Physiol. Plant. 21, 765-776.
- SIMINOVITCH, D.; C.M. WILSON and D.R. BRIGGS. (1953). Studies on the chemistry of the living bark of the black locust in relation to its frost hardiness. V. Seasonal transformation and variations in the carbohydrates: starch-sucrose interconversions. Plant Physiol. 28, 383-400.
- SINCLAIR, W.B. and E.T. BARTHOLOMEW. (1937). Diastatic activity of orange leaves as affected by time, temperature, pH and certain zinc salts. J. agr. res. 54, 609-619.
- SMITH, P.R.; W. REUTHER and A.W. SPECHT. (1952). Seasonal changes in Valencia orange trees. II. Changes in microelements, sodium and carbohydrates in leaves. Proc. amer. soc. Hort. sci. 59, 31-35.
- SMITH, P.F. (1976). Collapse of Murcott tangerine trees. J. amer. soc. Hort. sci. 101, 23-25.
- SOKAL, R.R. y F.J. ROHLF. (1969). Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blume ediciones.

SPENCER, P.W. and J.S. TITUS. (1973). Apple leaf senescence: leaf disc compared to attached leaf. *Plant Physiol.* 51 , 89-92.

SPRADLIN, J. and J.A. THOMA. (1970). Beta-amylase thiol groups. *J. Biol. Chem.* 245 , 117-127.

STEUP, M. and E. LATZKO. (1979). Intracellular localization of phosphorylases in spinach and pea leaves. *Planta* 145 , 69-75.

---- and C. SCHÄCHTELE. (1981). Mode of glucan degradation by purified phosphorylase forms from spinach leaves. *Planta* 153 , 351-361.

STEWART, C.R. (1971). Effect of wilting on carbohydrates during incubation of excised bean leaves in the dark. *Plant Physiol.* 48 , 792-794.

STITT, M.; P.V. BULPIN and T. ap REES. (1978). Pathway of starch breakdown in photosynthetic tissues of *Pisum sativum*. *Biochim. Biophys. Acta* 544 , 200-214.

STOCKING, C.R. (1959) *Plant Physiol* 34 , 56-61. Citado por Preiss, J. & C. Levi (1979).

SWAIN, R.R. and E.E. DEKKER. (1966a). Seed germination studies. I. Purification and properties of an alpha-amylase from the cotyledons of germinating peas. *Biochim. Biophys. Acta* 122 , 75-86.

---- and ----- . (1966b). Seed germination studies. II. Pathways for starch degradation in germinating pea seedlings. *Biochim. Biophys. Acta* 122 , 87-100.

TAKEDA, F.; K. RYUGO and J.C. CRANE. (1980). Translocation and distribution of ¹⁴C-photosynthates in bearing and nonbearing pistachio branches. *J. amer. soc. Hort. sci.* 105 , 642-644.

- TANAKA, Y.; T. ITO and T. AKAZAWA. (1970). Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. III. Alpha-amylase isozymes. *Plant Physiol.* 46 , 650-654.
- TETLEY, R.R. and K.V. THIMANN. (1974). The metabolism of oat leaves - during senescence. I. Respiration, carbohydrate metabolism and the action of cytokinins. *Plant Physiol.* 54 , 294-303.
- THIMANN, K.V.; R.R. TETLEY and T.V. THANH. (1974). The metabolism of oat leaves during senescence. III. Senescence in leaves attached to the plant. *Plant Physiol.* 54 , 859-862.
- THOMAS, H. and J.L. STODDART. (1975). Separation of chlorophyll degradation from other senescence processes in leaves of a mutant genotype of meadow fescue (*Festuca pratensis* L.). *Plant Physiol.* 56 , 438-441.
- and ---- . (1980). Leaf senescence. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31, 83-111.
- THORNE, J.H. and H.R. KOLLER. (1974). Influence of assimilate demand on photosynthesis, diffusive resistances, translocation and carbohydrate levels of soybean leaves. *Plant Physiol.* 54 , 201-207.
- THORPE, T.A. and D.D. MEIER. (1974). Enzymes of starch metabolism in *Nicotiana tabacum* callus. *Phytochemistry* 13 , 1329-1334.
- TIETZ, A.; M. LUDEWIG; M. DINGKUHN and K. DORFFLING. (1981). Effect of abscisic acid on the transport of assimilates in barley. *Planta* 152 , 557-561.
- TREHARNE, K.J. (1982). Hormonal control of photosynthesis and assimilation distribution. En: *Chemical manipulation of crop growth and - development.* (McLaren, J.S., ed.) pp 55-66. Butterworth Scientific.
- ULL, M.A. (1977). Actividad amilolítica en hojas y su variación durante la

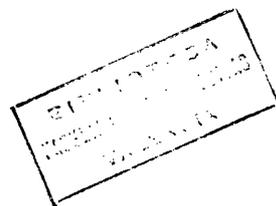
- senescencia. Tesina de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad de Valencia.
- VALLEE, B.L.; E.A. STEIN; W.N. SUMMERWELL and E.H. FISCHER. (1959) J. biol. Chem. 234, 2901. Citado por Fischer, E.H. & E.A. Stein (1960).
- VIEWEG, G.H. und M.A.R. de FEKETE. (1977). Tagesgang der Amylasenaktivität im Blatt von Kalanchoe daigremontiana. Z. Pflanzenphysiol. 81, 74-79.
- WAREING, P.F. and J.W. PATRICK. (1975). Source-sink relation and the partition of assimilates in the plant. En: Photosynthesis and productivity in different environments. (Cooper, J.P., ed.) Cambridge University Press.
- WILTBANK, W.J. and A.H. KREZDORN. (1969). Determination of gibberellins in ovaries and young fruits of Navel oranges and their correlation with fruit growth. J.amer.soc.Hort.sci. 94, 195-201.
- WORLEY, R.E. (1979). Fall defoliation date and seasonal carbohydrate concentration of pecan wood tissue. J.amer.soc.Hort.sci. 104, 195-199.
- YAMASHITA, Y. and K. MONOBE. (1971). J. polum. sci. A2 9, 1471-1481. Citado por Banks, W. & D.D. Muir, (1980)
- YELENOSKY, G. (1979). Accumulation of free proline in citrus leaves during cold hardening of young trees in controlled temperature regimes. Plant Physiol. 64, 425-427.
- and C.L. GUY. (1977). Carbohydrate accumulation in leaves and stems of Valencia orange at progressively colder temperatures. Bot.Gaz. 138, 13-17.

YOUNG, R.E.; S. SALMINEN and P. SORNSRIVICHAI. (1974). Enzyme regulation associated with ripening in banana fruit. Colloques Internationaux C.N.R.S. n° 238. Facteurs et régulation de la maturation des fruits.

ZASLOW, B. (1963). Biopolymers 1, 165-169. Citado por Banks, W. & D.D. Muir (1980).

ZIMMERMANN, M.H. (1974). Storage, mobilization and circulation of assimilates. En: Trees structure and function. (Zimmermann, M.M. & C.L. Brown, eds.) Springer Verlag.

ZUCCONI, F.; S.P. MONSELISE and R. GOREN. (1978). Growth-abscission relationships in developing orange fruit. Scientia Hortic. 9, 137-146.



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE CIENCIAS SOCIALES

Excmo. Sr. D. Amparo Sanz Fran Abogado del Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,

de 9 de Abril de 1984

El Secretario,

El Presidente

