

## CAMBIOS EN ACTIVIDAD TRIOSA-FOSFATO ISOMERASA Y ESTUDIO DE SU POSIBLE PÉRDIDA POR CLOROPLASTOS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO DE HOJAS\*\*\*

J. Cuello\*, M.<sup>a</sup> J. Quiles\* y B. Sabater\*\*

Recibido: 25 noviembre 1988

Aceptado: 27 julio 1989

### SUMMARY

Changes of triose-phosphate isomerase activity and study of its possible loss from chloroplasts during leaf senescence.

We have studied the relative changes of triose-phosphate isomerase (TIM) in cytoplasm and chloroplasts during the senescence of primary barley leaves. The subcellular fractions were isolated by equilibrium ultracentrifugation in a density sucrose gradient.

Cytoplasmic glucose-6-phosphate dehydrogenase and TIM activities diminished during senescence and their loss was retarded by kinetin. TIM activity was relatively low in chloroplasts.

The presence of TIM activity between chloroplast and cytoplasm ultracentrifugation fractions suggested that TIM activity was lost from broken chloroplasts. However, we do not find in senescent leaves any factor stimulating chloroplasts breakdown.

**Key words:** Chloroplast. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Senescence. Triose-phosphate isomerase.

### RESUMEN

Hemos estudiado los cambios relativos de triosa-fosfato isomerasa en el citoplasma y en los cloroplastos durante el envejecimiento de las hojas primarias de cebada. Las fracciones subcelulares se aislaron por ultracentrifugación hasta equilibrio en un gradiente de densidad de sacarosa.

Las actividades glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y TIM del citoplasma disminuyeron a lo largo del envejecimiento y su pérdida era retrasada por quinina. La actividad TIM en los cloroplastos era relativamente baja.

La presencia de actividad TIM en fracciones de ultracentrifugación situadas entre las de cloroplastos y citoplasma sugirió que la actividad TIM era perdida por los cloroplastos rotos. Sin embargo, no encontramos factor estimulante de la rotura de los cloroplastos en hojas en envejecimiento.

Palabras clave: **Cloroplasto.** Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Senescencia. Triosa-fosfato isomerasa.

### INTRODUCCIÓN

El envejecimiento foliar o conjunto de cambios degenerativos que conducen a la muerte de este órgano está programado genéticamente y

puede considerarse una etapa más del proceso de desarrollo de las hojas (THOMAS & STODDART, 1980; WOOLHOUSE, 1982). Entre los primeros cambios degradativos que son visibles microscópicamente están los producidos en los

\* Dep. Biología Vegetal, Fac. Biología, Universidad de Murcia, Espinardo, 30100 Murcia.

\*\* Dep. Biología Vegetal, Fac. Ciencias, Universidad de Alcalá de Henares. Apdo. 20, Alcalá de Henares, 28080 Madrid.

Trabajo financiado por la CAICYT. Proyecto PB85-0318.

cloroplastos (THIMANN, 1980). A nivel molecular ocurren en esta etapa pérdidas de componentes celulares, particularmente de **macromoléculas**, tanto en los cloroplastos como en el citoplasma (THOMAS & STODDART, 1980; THIMANN, 1980). Naturalmente, sincronizados con los anteriores se producen numerosos cambios **enzimáticos**, entre los que se encuentran aumentos de actividades de hidrolasas responsables de la degradación de sus respectivas macromoléculas y disminuciones de las actividades de enzimas que participan en las rutas biosintéticas que conducen a su formación.

Por otra parte, se conoce desde hace tiempo que para el desarrollo del síndrome del envejecimiento foliar se requieren algunas proteínas sintetizadas en el citoplasma (THOMAS & STODDART, 1980). Sin embargo, aunque hasta hace poco tiempo se pensaba que los **cloroplastos** desempeñaban solamente un papel pasivo en el envejecimiento, algunos resultados obtenidos utilizando inhibidores de síntesis de proteínas en cloroplastos son ahora indicativos de que estos orgánulos también participan en el proceso sintetizando diversas proteínas de **envejecimiento** (CUELLO et al. 1984; CUELLO & SABATER, 1982; MARTÍN et al., 1986; SABATER & RODRÍGUEZ, 1978; YU & KAO, 1981). Además, algunos resultados ya publicados (CUELLO et al., 1987) indican que la luz (que retrasa el envejecimiento, al menos en parte a través del pigmento fitocromo) y las hormonas que afectan al envejecimiento, influyen de forma paralela en la síntesis de proteínas por los cloroplastos aislados de hojas que han recibido los respectivos tratamientos.

En el presente trabajo, debido a los cambios tanto biosintéticos como degradativos que ocurren en el citoplasma y los cloroplastos durante el envejecimiento foliar, se estudian los cambios que ocurren durante este proceso de un enzima que está presente en ambos lugares de la célula. El enzima elegido fue triosafosfato **isomerasa** (TIM) y se midieron los cambios relativos en los dos compartimentos celulares cuando las hojas cortadas se sometieron a factores que estimulan el envejecimiento, como oscuridad, y que lo retrasan, como quinetina. Las diversas fracciones celulares se separaron mediante sedimentación por equilibrio de densidad en un gradiente de sacarosa y se usaron el enzima glucosa-6-P (G-6-P) deshidrogenasa y la clorofila como marcadores de citoplasma y clo-

roplastos respectivamente. Partiendo de los perfiles de TIM obtenidos, también se investigó la posible existencia de algún factor celular **deteriorativo** de los cloroplastos y que pudiera conducir a la pérdida de sus enzimas **estromales**.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se usaron plantas de cebada (*Hordeum vulgare* L. cv. **Hassan**) que crecieron en las condiciones descritas anteriormente (CUELLO, et al., 1987). En su caso, muestras de 4 g de secciones de 20-25 mm de la hoja basal de plántulas de cebada de 14 ó 15 días de edad se incubaron en cápsulas petri grandes con 100 ml de agua destilada o de disolución de quinetina  $1 \cdot 4 \cdot 10^{-4}$  M durante 48 h en oscuridad a 25-26 °C utilizando una cámara de cultivo Selecta S-484.

La obtención de los extractos acelulares y el aislamiento de los cloroplastos se realizaron según el método descrito por GARCÍA et al. (1983). Cuatro gramos de secciones de hojas (recién cortadas o después de incubadas en las condiciones descritas) se homogeneizaron con 12 ml de tampón de extracción conteniendo sacarosa 0.35 M, Hepes 25 mM, EDTA-Na, 2 mM y ditioneitol (DTT) 2 mM (pH 7.6) con un **Omni-Mixer** Sorvall a velocidad 9 durante 8 s. El homogeneizado se tamizó a través de 2 capas de muselina y se centrifugó durante 5 min a 200 xg en una **Centrífuga** Refrigerada Sorvall RC-5, constituyendo el sobrenadante resultante el extracto crudo acelular. Para estudiar la existencia de un hipotético factor celular deteriorativo de los cloroplastos, se aislaron éstos partiendo de 20 g de hojas, recién cortadas o incubadas durante 25 h en agua y oscuridad a 25-26 °C, que se homogeneizaron con 60 ml de tampón de extracción. Procediendo como se ha descrito antes, el extracto crudo acelular se centrifugó de nuevo durante 10 min a 2.500 xg y el precipitado de cloroplastos obtenido se lavó primero con 10 ml de tampón de extracción y después con 10 ml de tampón **glicil-glicina** 0.1 M-KOH (pH 7.5) conteniendo sacarosa 0.9 M. Finalmente se resuspendieron los cloroplastos en 5 ml de este último tampón.

Los extractos crudos se analizaron por **centrifugación** en un gradiente lineal de sacarosa, esencialmente en las condiciones descritas por SPALDING et al. (1979). Dos o dos y medio ml de extracto se depositaron sobre la parte superior de un gradiente de densidad de sacarosa compuesto, de abajo a arriba, de una capa de 4 ml de sacarosa de 55% (w/w), un gradiente lineal de 25 ml de 45 a 25% (w/w) y un gradiente lineal de 7 ml de 25 a 10% (w/w) de sacarosa. En todos los casos la sacarosa se disolvió en tampón Tris 50 mM-**ClH**, **polivinil pirrolidona** (PVP)-44 1% (w/v), EDTA-Na, 5 mM y DTT 2 mM (pH 8.0). El gradiente se centrifugó a 25.000 rpm durante 3 h 30 min a 4 °C en una ultracentrifuga Beckman modelo **L5-65** con un rotor SW-28. Finalmente, se colectaron manualmente fracciones de 1.2 ml aproximadamente, excepto las de la figura 1 que fueron de 1.05 ml.

La actividad TIM se midió por acoplamiento a la oxidación de NADH (BERGMEYER, 1974). La actividad G-6-P deshidrogenasa se ensayó siguiendo la re-

ducción de  $\text{NADP}^+$  0'33 mM con G-6-P 1'66 mM (SABATER, et al., 1972). Para la determinación de la actividad TIM, una alícuota de cada una de las fracciones del gradiente se incubó rutinariamente durante 5 min, al menos, con un volumen igual de Tritón X-100 al 0'1% (v/v) con el propósito de eliminar la integridad de las membranas de los orgánulos.

Definimos la unidad enzimática como la cantidad que, en las condiciones de ensayo, provoca un cambio de absorbancia de 0'001 unidades de densidad óptica por minuto.

La clorofila se determinó según el método de ARNON (1949). La concentración de sacarosa en cada fracción del gradiente se determinó por refractometría con un refractómetro manual Atago-500. A partir de la concentración de sacarosa y la temperatura, se estimó la densidad consultando la tabla estandar (WEAST, 1986).

El hipotético factor celular dañante de los cloroplastos se ensayó en extractos hipotónicos de secciones de hojas de cebada, recién cortadas o incubadas durante tiempos variables en agua y oscuridad a 25-26°C, con tampón Tris 20 mM-CIH (pH 7'5) según TOMOMATSU & ASAHI (1980). La actividad de este factor dañante de los cloroplastos se midió según el método II de estos autores (TOMOMATSU & ASAHI, 1980) en una mezcla de reacción compuesta por: 1'5 ml de suspensión de los cloroplastos de cebada, 0'02 ml de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  0'1 M, 0'20 ml de extracto del hipotético factor y completando hasta 1'98 ml con tampón glicilglicina 0'1 M-KOH (pH 7'5) que contenía sacarosa 0'9 M. Después de 30 min a 14°C la reacción se paró añadiendo 0'02 ml de EDTA 0'5 M (pH 7'5). La actividad TIM, presumiblemente liberada de los cloroplastos, se midió en el sobrenadante después de centrifugar durante 15 min a 10.000 xg en una centrífuga refrigerada Sorwall RC-2B.

El nivel de envejecimiento se estimó midiendo la clorofila remanente según SCHISTAD & NISSEN (1984) después de la incubación de las secciones de hojas a 25-26°C durante 48 h.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS DE HOJAS ADULTAS SOMETIDAS A DIVERSAS CONDICIONES DE ENVEJECIMIENTO

Se inició este estudio fraccionando el extracto crudo de hojas recién cortadas de plantas de 14 días en las que, según MARTIN et al. (1986), ya se ha iniciado la etapa de senescencia de la primera hoja. La figura 1 muestra los perfiles típicos de las actividades G-6-P deshidrogenasa y TIM y del contenido de clorofilas correspondientes a uno de los varios fraccionamientos independientes que se hicieron. Casi toda la actividad G-6-P deshidrogenasa se encontró en la parte superior del gradiente como debería esperarse puesto que este enzima es un marcador citoplásmico (en fig. 1 a partir de la fracción n.º 34 inclusive) hallándose después

únicamente y en una cantidad relativamente pequeña en la fracción 32, de densidad 1'084. La intensidad de este pico adicional de G-6-P deshidrogenasa, observable en todos los experimentos, varió de unos ensayos a otros y es probable que se deba a enzima incluido en vesículas. Casi toda la actividad TIM se encontró también en la zona superior del gradiente, lo que sugiere que es mayoritariamente citoplásmica. Sin embargo, y lo que es más llamativo, se detectó actividad TIM apreciable en todas o en casi todas las fracciones del gradiente comprendidas entre el máximo de actividad y el pico de cloroplastos inclusive. En otros fraccionamientos independientes hechos en las mismas condiciones que el de la fig. 1 se observó en esta zona intermedia incluso más actividad TIM que la mostrada en la figura 1. Aunque no se descarta la posibilidad de que la actividad TIM de alguna de estas fracciones intermedias se deba a enzima que está incluido en vesículas (de hecho en algunos experimentos se observó un pequeño pico coincidente con el pico menor de G-6-P deshidrogenasa), la distribución aproximadamente uniforme del enzima en esta zona sugiere una posible liberación gradual de los cloroplastos durante su migración a través del gradiente. El pico de máxima concentración de cloroplastos, cuyas fracciones no mostraron usualmente más actividad TIM que las de la zona intermedia, sedimentó con una densidad de 1'154  $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Seguidamente se estudiaron los efectos de factores que afectan al envejecimiento sobre los perfiles de separación de los marcadores antes mencionados. Concretamente, hojas de plantas de 14 ó 15 días se incubaron durante 48 h por una parte en agua y oscuridad, condiciones que aceleran el envejecimiento, y por otra en quinetina 30 ppm ( $1'4\cdot 10^{-4}$  M) y oscuridad, condiciones conocidas que lo retrasan. Las figuras 2 y 3 muestran respectivamente los perfiles de separación obtenidos en ambas condiciones, siendo los resultados presentados, en cada caso, los obtenidos típicamente en uno de los varios experimentos independientes realizados.

En comparación con los perfiles de hojas recién cortadas (fig. 1) los de hojas incubadas en agua y oscuridad (fig. 2; en donde se usaron plantas de 14 días) mostraron valores más bajos de clorofilas y actividades TIM y G-6-P deshidrogenasa. Por otra parte también se observó en estos últimos perfiles alguna diferencia cualitativa, como la menor densidad (1'148) de la fracción con el máximo de cloroplastos. Además, partiendo de hojas incubadas tanto en agua como en quinetina (fig. 3) el pequeño pico de G-6-P deshidrogenasa se encontró desplazado hacia densidades algo mayores (1'104 y

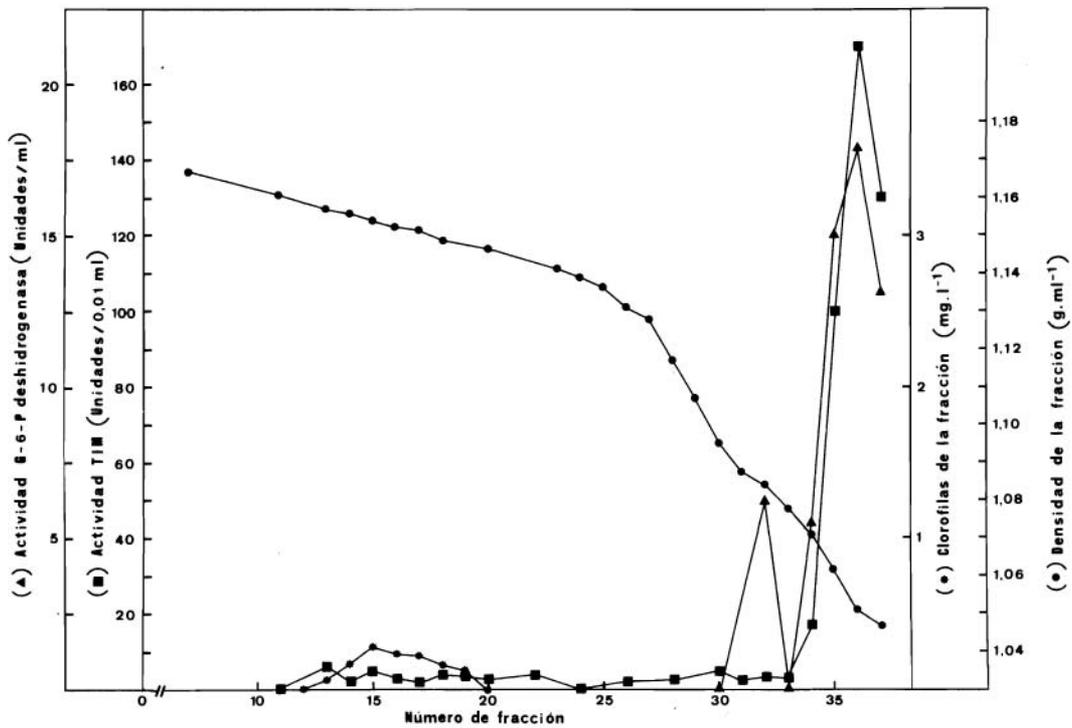


FIGURA 1. Fraccionamiento por ultracentrifugación en gradiente lineal de sacarosa de extracto crudo de hojas de cebada de 14 días recién cortadas. Para detalles ver texto.

Fractionation of crude extract from freshly detached 14-days-old barley leaves by ultracentrifugation in a linear sucrose gradient. Details in the text.

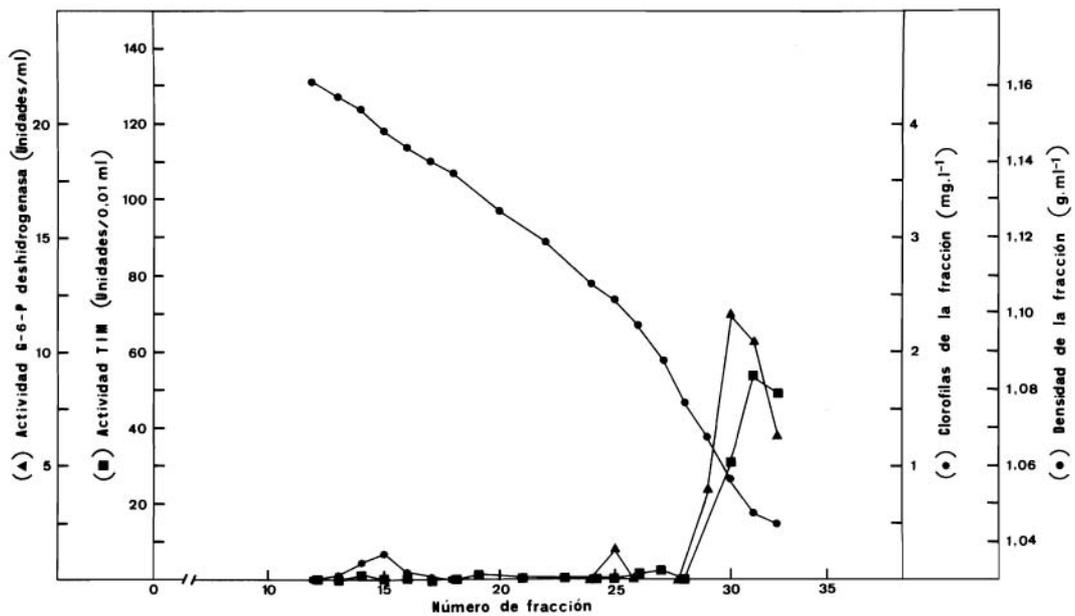


FIGURA 2. Fraccionamiento por ultracentrifugación en gradiente lineal de sacarosa de extracto crudo de hojas de cebada de 14 días incubadas en oscuridad durante 48 horas. Para detalles ver texto.

Fractionation of crude extract from 14-days-old barley leaves incubated during 48 hours in the dark by ultracentrifugation in a linear sucrose gradient. Details in the text.

CAMBIOS EN ACTIVIDAD TRIOSA-FOSFATO ISOMERASA

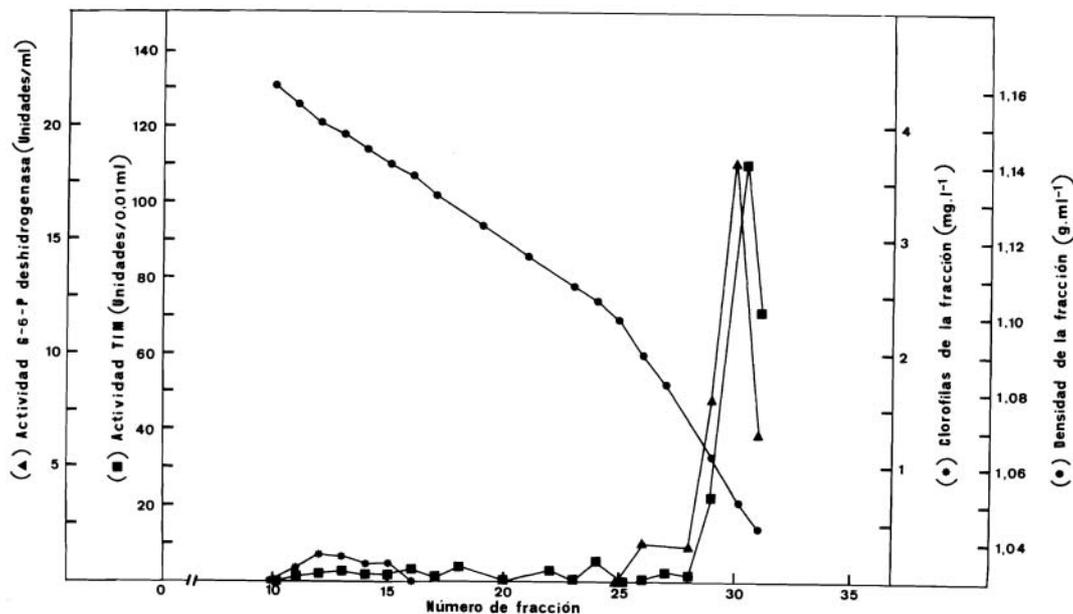


FIGURA 3. Fraccionamiento por ultracentrifugación en gradiente lineal de sacarosa de extracto crudo de hojas de cebada de 15 días incubadas en quinetina  $1 \cdot 4 \cdot 10^{-4}$  M y oscuridad durante 48 horas. Para detalles ver texto.

tractionation of crude extract from 15-days-old barley leaves incubated during 48 hours in the dark in the presence of  $1 \cdot 4 \cdot 10^{-4}$  M kinetin by ultracentrifugation in a linear sucrose gradient. Details in the text.

1'090 respectivamente). Sin embargo, como muestra la fig. 2 para hojas incubadas sin quinetina, en general se detectó muy baja actividad TIM a lo largo de la zona comprendida entre las fracciones citoplásmicas y el pico de los cloroplastos.

Los perfiles de las hojas incubadas en quinetina y oscuridad (fig. 3; obtenida a partir de hojas de 15 días) no mostraron, aparentemente, grandes diferencias cualitativas con respecto a los de las hojas incubadas en agua y oscuridad (fig. 2). En las primeras, aparte del desplazamiento del máximo de los cloroplastos hacia una densidad algo mayor (1'151) pueden observarse aumentos en los niveles globales de clorofila, TIM y G-6-P deshidrogenasa. Se encontró de nuevo una pequeña actividad TIM en muchas fracciones comprendidas entre las fracciones citoplásmicas y la banda de los cloroplastos. El pequeño pico de G-6-P deshidrogenasa se encontró a una densidad algo inferior (1'090) que en el perfil de las hojas incubadas

en agua (1'104) y esto era consistente en todos los experimentos realizados.

La tabla 1 resume, para cada una de las condiciones ensayadas: el % de clorofila remanente en hojas, clorofila total de la banda de los cloroplastos, G-6-P deshidrogenasa total (obtenida sumando la de todas las fracciones) y TIM total de las fracciones citoplásmicas (obtenida sumando la de todas éstas). Los niveles de clorofila de las bandas de cloroplastos son indicativos de que los experimentos seleccionados en cada caso son representativos, puesto que sus valores están en relación directa con la clorofila total remanente en las hojas incubadas en cada una de las condiciones de ensayo. Puede observarse claramente que la actividad TIM de las fracciones citoplásmicas (probablemente contaminadas con TIM de los cloroplastos) disminuye por incubación de las hojas en agua y oscuridad, y esta disminución se retrasa por quinetina. Por lo que nosotros conocemos cambios en los niveles de TIM durante la senescencia no

TABLA 1. Efectos de diferentes tratamientos de hojas sobre: clorofila de cloroplastos, G-6-P deshidrogenasa total y TIM citoplásmica medida después de la separación por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de extractos crudos de hojas de cebada cortadas. Los valores indicados son los correspondientes a 2 ml de extracto de hojas. Para más detalles ver texto.

Effects of different leaf treatments on: chloroplast chlorophyll, total G-6-P dehydrogenase and cytoplasmic TIM measured after separation by sucrose gradient ultracentrifugation of crude extracts from detached barley leaves. The indicated values are the corresponding to 2 ml of leaf extracts. More details in the text.

TRATAMIENTO	CANTIDADES CORRESPONDIENTES A 2 ml DE EXTRACTO			
	% CLOROFILA REMANENTE	µg CLOROFILA DE CLOROPLASTOS	UNIDADES DE G-6-P- DESHIDROGENASA	UNIDADES DE TIM
Hojas recién cortadas	100	17'21	8'10	294
48 h en agua y oscuridad	60	9'38	6'45	118
48 h en quinetina 1'4. 10 <sup>-4</sup> M y oscuridad	89	16'68	7'45	211

han sido descritos previamente. Aunque menos pronunciada que la anterior también se observa una disminución de G-6-P deshidrogenasa por inducción del envejecimiento, disminución que se retrasa por la aplicación de quinetina. Esta disminución de la actividad total G-6-P deshidrogenasa durante el envejecimiento ya se encontró en hojas ligadas a la planta (LAURIERE, 1983) mientras que, usando también hojas de cebada, CALLE *et al.*, (1986) encontraron una disminución bastante acusada de la actividad específica durante el envejecimiento y su retraso por quinetina.

Las densidades de equilibrio encontradas de los máximos de cloroplastos están de acuerdo con AGUILAR (1987). De las figuras 1, 2 y 3 puede deducirse que la inducción del envejecimiento disminuye esta densidad y quinetina retrasa la disminución.

Desde el principio llamó la atención la apreciable actividad TIM encontrada generalmente en todas o casi todas las fracciones del gradiente comprendidas entre las fracciones citoplásmicas y la banda de los cloroplastos, además de la actividad relativamente baja asociada a estos orgánulos. Una explicación posible de esta observación podna ser la liberación gradual de TIM por los cloroplastos antes y durante su migración a través del gradiente. Algunos resultados publicados (TOMOMATSU & ASAHI, 1980) hicieron pensar que esta posible liberación podría estar estimulada por algún factor del extracto bruto, lo que llevó a realizar diversos experimentos.

#### ENSAYOS DEL HIPOTÉTICO FACTOR CELULAR DAÑANTE DE CLOROPLASTOS

Se realizaron diversos ensayos basados en

los resultados obtenidos en el apartado anterior y en una referencia previa (TOMOMATSU & ASAHI, 1980) que indicó que un enzima de las hojas de *Phaseolus aureus* daña a diversos orgánulos celulares, las mitocondrias y los cloroplastos entre ellos, y conduce a la pérdida de sus enzimas matriciales. Aunque no existe confirmación posterior de estos resultados, están de acuerdo con lo que se conoce hasta ahora sobre la degradación de cloroplastos durante el envejecimiento de las hojas (THIMANN, 1980; THOMAS & STODDART, 1980; WOOLHOUSE, 1982), en donde algunos acontecimientos ligados a la síntesis de proteínas en el citoplasma son necesarios para la degradación de estos orgánulos.

Para estudiar la posibilidad de que algún factor celular fuera responsable de la pérdida de TIM por los cloroplastos, se incubaron éstos con extracto hipotónico de hojas en las condiciones indicadas en Materiales y Métodos. Tanto los cloroplastos, como el extracto con el hipotético factor fueron obtenidos en todos los casos a partir de hojas de cebada. Por otra parte, siempre se midió la actividad TIM adicionando a la mezcla de reacción correspondiente 0'01 ml del sobrenadante del medio de incubación de los cloroplastos. Para el ensayo de la «actividad dañante» de los cloroplastos se realizaron, en cada caso, 3 incubaciones independientes: medio de incubación completo, medio de incubación en donde el extracto del factor se sustituyó por el mismo volumen de tampón Tris 20 mM-ClH (pH 7'5) (éste indicana la cantidad de TIM liberada espontáneamente por los cloroplastos) y medio en donde la suspensión de los cloroplastos aislados se susti-

**TABLA 2.** Efecto de extracto hipotónico de hojas de cebada sobre la liberación de **TIM** por cloroplastos. Los cloroplastos se aislaron de hojas de cebada de 14 días recién cortadas y los extractos hipotónicos se prepararon a partir de las mismas hojas y de hojas de plantas de 15 a 17 días incubadas durante 26 horas en oscuridad. Para más detalles ver texto.

Effect of hypotonic barley leaf extract on the liberation of **TIM** from chloroplasts. Chloroplasts were isolated from freshly detached 14-days-old barley leaves and hypotonic extracts were prepared from the same leaves and of 15 to 17-days-old leaves incubated during 26 hours in the dark. More details in the text.

EXPERIMENTO	ACTIVIDAD <b>TIM</b> (UNIDADES DE ENZIMA/0'01 ml DE MEDIO)				
	MEDIO SIN EXTRACTO	CON EXTRACTO DE HOJAS RECIÉN CORTADAS		CON EXTRACTO DE HOJAS INCUBADAS DURANTE 26 HORAS EN AGUA Y OSCURIDAD	
		MEDIO SIN CLOROPLASTOS	MEDIO COMPLETO	MEDIO SIN CLOROPLASTOS	MEDIO COMPLETO
1	14	51'5	72	48'5	76
2	7'5	41'5	45'5	40'5	49
3	12'5	80	86	74	82
4	14	68	80'5	61'5	67

tuyó por el mismo volumen de tampón glicil-glicina 0'1 M-KOH (pH 7'5) conteniendo sacarosa 0'9 M (éste indicaría la cantidad de **TIM** ya presente en el extracto del factor). La actividad correspondiente al hipotético factor se obtendría restando a la actividad **TIM** medida después de la primera incubación la suma de los valores medidos después de las otras dos incubaciones.

La tabla 2 muestra los resultados de cuatro experimentos independientes con cloroplastos de hojas adultas y extractos hipotónicos de las mismas hojas recién cortadas o de hojas de 15-17 días incubadas previamente durante 26 h en agua y oscuridad. Los resultados variaron mucho de un experimento a otro y con excepción del experimento 1 puede observarse que la actividad **TIM** presente en el sobrenadante del medio completo, tanto en presencia del extracto de hojas recién cortadas como de hojas envejecidas, es inferior en cada caso a la suma de las actividades de los sobrenadantes de los medios sin extracto y sin cloroplastos. Como se puede observar la actividad **TIM** del extracto y de los cloroplastos es muy variable de unos experimentos a otros. Probablemente en el caso de los cloroplastos esto es debido a la distinta integridad de los cloroplastos de partida, factor que es muy difícil de controlar. Pero claramente en tres experimentos diferentes se puede comprobar que no afecta a la conclusión de que el extracto del factor no estimula la liberación de **TIM** de cloroplastos.

Puesto que los resultados anteriores no apo-

yaron la existencia de algún factor citoplásmico que estimule la liberación de **TIM** por los cloroplastos, ampliamos el estudio con experimentos que incluyeron diversas variantes en los medios de incubación de los cloroplastos: en concentración de sacarosa del tampón de suspensión de cloroplastos y los estados de las secciones fuentes de los cloroplastos y del extracto del hipotético factor. La tabla 3 muestra los resultados obtenidos. En todos los casos la suma de las actividades de los sobrenadantes de ambos medios incompletos (careciendo uno de extracto y otro de cloroplastos) es superior a la del sobrenadante del medio completo. Los cloroplastos pierden claramente menos **TIM** en presencia del extracto que en su ausencia. Sin embargo, puesto que el extracto hipotónico contribuye con casi toda la actividad enzimática al sobrenadante del medio completo, los resultados obtenidos están sujetos a un error alto, aunque, como se indicó en el caso de la tabla 2, de los resultados de los cinco experimentos de la tabla 3 se obtiene la misma conclusión.

Podemos concluir que en nuestras condiciones de experimentación no se pudo confirmar la existencia de ningún factor celular causante de la pérdida de **TIM** por los cloroplastos. **TOMOMATSU & ASAHI** (1980) tampoco encontraron dicho factor ni en hojas de trigo ni de otras plantas ensayadas. Según esto, la actividad **TIM** encontrada en todas las fracciones del gradiente de sacarosa comprendidas entre el pico de los cloroplastos y las fracciones del citosol podría deberse a la liberación espontánea

TABLA 3. Efectos de diferentes extractos crudos de hojas de cebada sobre la liberación de TIM por cloroplastos. Para más detalles ver texto.

Effects of different barley leaf crude extracts on the liberation of TIM from chloroplasts. More details in the text

EXPERIMENTO	[SACAROSA] DEL TAMPÓN GLICIL-GLICINA 0'1 M-KOH, pH 7'5	EDAD DE PLANTAS Y TRATAMIENTO DE HOJAS FUENTE DE CLOROPLASTOS	EDAD DE PLANTAS Y TRATAMIENTO DE HOJAS FUENTE DE EXTRACTO	ACTIVIDAD TIM (UNIDADES DE ENZ/IMA/0'01 ml DE MEDIO)		
				MEDIO SIN EXTRACTO	MEDIO SIN CLOROPLASTOS	MEDIO COMPLETO
1	0'9 M	16 días, recién cortadas	14 días, incubadas 49 h en agua y oscuridad	10	68	75'5
2	0'9 M	16 días, 25 h en agua y oscuridad	17 días, recién cortadas	22	77'5	85'5
3	0'35 M	15 días, 25 h en agua y oscuridad	16 días, recién cortadas	19'5	70	71
4	0'35 M	17 días, recién cortadas	16 días, incubadas 26 h en agua y oscuridad	11'5	53'5	56'5
5	0'35 M	16 días, 25 h en agua y oscuridad	16 días, incubadas 26 h en agua y oscuridad	10'5	53'5	57

de enzimas estromales por los cloroplastos durante su migración a lo largo de las concentraciones crecientes de sacarosa y, en todo caso, no parece tener un significado fisiológico.

#### BIBLIOGRAFÍA

- AGUILAR, M. N. 1987: Fraccionamiento en gradiente de densidad de sacarosa de cloroplastos de hojas de cebada (*Hordeum vulgare* L.) senescentes. Tesis de Licenciatura. Universidad de Murcia.
- ARNON, D. J. 1949: Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenoloxidase en *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24: 1-15.
- BERGMEYER, H. U. 1974 (Ed.): *Methods of enzymatic analysis*. Vol. 1. Verlag Chemie-Academic Press, Berlin, New York.
- CALLE, F.; MARTIN, M. & SABATER, B. 1986: Cytoplasmic and mitochondrial localization of the glutamate dehydrogenase induced by senescence in barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol. Plant.*, 66: 451-456.
- CUELLO, J.; QUILES, M. J. & SABATER, B. 1984: Role of protein synthesis and light in the regulation of senescence in detached barley leaves. *Physiol. Plant.*, 60: 133-138.
- 1987: Control by phytochrome of the synthesis of protein related to senescence in chloroplasts of barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol. Plant.*, 71: 341-344.
- CUELLO, J. & SABATER, B. 1982: Control of some enzymes of nitrogen metabolism during senescence of detached barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Plant Cell Physiol.* 23: 561-565.
- GARCÍA, S.; MARTIN, M. & SABATER, B. 1983: Protein synthesis by chloroplasts during the senescence of barley leaves. *Physiol. Plant.*, 57: 260-266.
- LAURIERE, C. 1983: Enzymes and leaf senescence. *Physiol. Vég.*, 21 (6): 1.159-1.177.
- MARTÍN, M.; URTEAGA, B. & SABATER, B. 1986: Chloroplast protein synthesis during barley leaf growth and senescence: Effect of leaf excision. *J. Exp. Bot.*, 37: 230-237.
- SABATER, B. & RODRÍGUEZ, M. T. 1978: Control of chlorophyll degradation in detached leaves of barley and oat through effect of kinetin on chlorophyllase levels. *Physiol. Plant.*, 43: 274-276.
- SABATER, B.; SEBASTIÁN, J. & ASENSIO, C. 1972: Identification and properties of an inducible manokinase from *Streptomyces violaceoruber*. *Biochim. Biophys. Acta*, 284: 406-413.
- SCHISTAD, I. J. & NISSEN, P. 1984: Cytokinin induced retention of chlorophyll in senescing barley leaves: complexity of dose response. *Physiol. Plant.*, 61: 566-570.
- SPALDING, M. H.; SCHMITT, M. R.; KU, S. B. & EDWARDS, G. E. 1979: Intracellular localization of some key enzymes of crassulacean acid metabolism in *Sedum praealtum*. *Plant Physiol.*, 63: 738-743.
- THIMANN, K. V. 1980: The senescence of leaves. In: THIMANN, K. V. (Ed.), *Senescence in Plants*: 85-115. C.R.C. Press. Florida.
- THOMAS, H. & STODDART, J. J. 1980: Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 31: 83-111.
- TOMOMATSU, A. & ASAH, T. 1980: An enzyme in mung bean leaves that damages cell organelles which leads to loss of their matrix enzymes. *Plant Cell Physiol.*, 21(4): 689-698.
- WEAST, R. C. 1986 (Ed.): *Handbook of chemistry and physics*, 66 th ed., C.R.C. Press. Florida.
- WOOLHOUSE, H. W. 1982: Leaf senescence. In: SMITH, H. & GRIERSON, D. (Ed.): *The molecular biology of plant development*: 256-281. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- YU, S. M. & KAO, C. H. 1981: Retardation of leaf senescence by inhibitors of RNA and protein synthesis. *Physiol. Plant.*, 52: 207-210.