

Intervención del sistema Ascórbico oxidasa en el crecimiento del coleoptilo de la avena

II.-Acción de las distintas sustancias que forman el sistema ascórbico oxidasa

LUIS RECALDE MARTINEZ Y RAFAEL GARCIA VILLANOVA

METABOLISMO DE LOS ACIDOS ORGANICOS EN LA CELULA VEGETAL DURANTE EL PERIODO DE CRECIMIENTO POR ELONGACION

Apenas hay una etapa en el metabolismo a la que no se le haya supuesto punto de acción de las auxinas en relación con el crecimiento celular. En ningún caso, sin embargo, esta relación resulta tan evidente y experimentalmente demostrada como el metabolismo de los ácidos orgánicos, del que ampliamente depende el de glúcidos, prótidos y lípidos, lo que le hace ocupar una posición clave en el metabolismo entero de la célula.

a) *Acción de los ácidos orgánicos sobre la inhibición del crecimiento por el ácido yodo-acético.*

COMMONER y THIMANN (1941) (55) al estudiar el crecimiento de secciones aisladas de coleoptilos flotando en solución de ácido indolacético y sacarosa, encontraron que el ácido yodo-acético se comportaba como un intenso inhibidor del crecimiento. Con la particularidad de que esta inhibición podía ser totalmente prevenida por ciertos ácidos orgánicos del ciclo de KREBS, tales como málico, succínico, fumárico y pirúvico, actuando a débiles concentraciones del tipo de 10^{-3} M.

ALBAUM y COMMONER (1941) (56) y ALBAUM y EICHEL (1943) (57) trabajando en plantas enteras de avena, confirmaron que los ácidos málico y fumárico son capaces de revertir la inhibición producida por el ácido yodo-acético, y de igual forma los ácidos malónico y maleico, que no sólo no pertenecen al ciclo de KREBS, sino que son clásicos inhibidores del mismo.

THIMANN y BONNER (1948) (44) sometieron a un detallado estudio las condiciones en que se verifica la inhibición del crecimiento por el ácido yodo-acético, encontrando; que la inhibición dependía en primer lugar, de la cantidad de oxígeno a disposición del coleóptilo, ya que la concentración umbral, para las secciones que crecen sumergidas, es inferior que para las que lo hacen flotando; y en segundo, del tamaño de los coleóptilos de donde se hubieran obtenido las secciones, ya que el umbral de inhibición resultaba tanto mayor cuanto menor fuera el tamaño de los coleóptilos, (o lo que es lo mismo, su edad "fisiológica"). En resumen, la resistencia de las plantas a la inhibición yodo-acética disminuye rápidamente con la edad y con la falta de oxígeno en el medio. Además, estos autores ampliaron la lista de los ácidos orgánicos capaces de revertir la inhibición yodo-acética, incluyendo el ácido isocítrico.

b) *Acción de los ácidos orgánicos sobre el crecimiento por elongación.*

THIMANN y BONNER (1948) (44) por otra parte, descubrieron una nueva e interesante faceta de la intervención de los ácidos orgánicos en la elongación, al demostrar que éstos, no solamente son capaces de neutralizar la inhibición provocada por el ácido yodo-acético sino también de aumentar el crecimiento cuando actúan solos. La mayoría de los ácidos pertenecientes al llamado ciclo de KREBS (ácido málico, pirúvico, fumárico, succínico, isocítrico, cítrico y α -cetoglutárico) demostraron poseer, con más o menos intensidad, acción estimulante sobre la elongación del coleóptilo de la avena. Además de ellos, presentaron actividad, aunque pequeña, los dos últimos, los ácidos acético, malónico y maleico. En fin, el ácido yodoacético a concentraciones por debajo de su umbral de inhibición, fue capaz también de comportarse como un estimulante, alcanzando su efecto valores del 60 % sobre los controles.

La acción estimulante de los ácidos orgánicos se ve modificada, en la misma dirección y por los mismos factores (tensión de oxígeno del medio y tamaño del coleóptilo) que intervienen en la reversión de la inhibición yodo-acética.

El triple hecho de que las secciones tomadas de coleóptilos jóvenes (cortos) necesiten menor concentración de ácidos orgánicos (para estimular el crecimiento o para revertir la inhibición yodo-acética, y mayor de ácido yodo-acético para inhibir el mismo) que las tomadas de coleóptilos viejos (largos), se explica suponiendo que la cantidad de ácidos orgánicos presentes en el coleóptilo disminuye con la edad. Así, si el contenido de ácidos orgánicos, del tipo dicarboxílico, fuera en los coleóptilos lo suficientemente grande, habría que suponer que el ácido yodo-acético no sería capaz de inhibir el crecimiento, y si dicho contenido disminuyera con la edad (o el tamaño del coleóptilo) la disminución de la resistencia a la inhibición yodo-acético quedaría explicada. De los datos publicados por THIMANN, BONNER y CHRISTIANSEN (1951) (58) puede concluirse que así sucede, ya que al pasar los coleóptilos de 54 a 120 horas de crecimiento, se observa que la cantidad de ácido málico descende de 205 miliequivalentes a 60, la de ácido cítrico de 23 a 12 y la de ácidos totales de 451 a 205.

Una explicación alternativa puede darse, según los autores anteriormente citados, a esta disminución; o bien que se debe a la simple acción

del tiempo, o bien a su utilización en el crecimiento. Para contestar a tal dilema se estudió las variaciones del contenido en ácidos orgánicos durante el crecimiento de secciones de coleóptilos en agua, ácido indolacético y ácido indolacético mas arsenito (el arsenito es inhibidor del crecimiento como luego veremos, pero su acción no es reversible que los ácidos orgánicos). El ácido málico se consumió cuando las secciones crecían en agua, es decir, cuando el crecimiento es lento, pero no el cítrico ni el pirúvico. Cuando el crecimiento se veía fuertemente estimulado por la presencia del ácido indolacético, los tres ácidos, sin distinción, fueron utilizados rápidamente. Por último, su utilización quedó casi totalmente prevenida, especialmente la del málico y pirúvico, cuando se inhibió el crecimiento por medio del arsenito.

c) *Acción de otros inhibidores distintos del ácido yodo-acético sobre el crecimiento por elongación.*

El ser el ácido yodo-acético un conocido inhibidor de los enzimas portadores de grupos activos de tipo sulfhidrilo, condujo a suponer que estos fermentos intervenían de forma importante en el crecimiento y llevó a THIMANN y BONNER (1949) (59) a ensayar otros inhibidores específicos de dicho grupo funcional con los resultados siguientes: El arsenito sódico se comporta como un poderoso inhibidor del crecimiento. Sin embargo, su acción se diferencia de la provocada por el ácido yodo-acético, en que no es reversible por los ácidos orgánicos, ni por los compuestos "ditiol" (2-3 ditioglicerol (Bal), 2-3 butanoditiol y ácido ditioglicólico) ni tampoco por la arginina, y en que la sensibilidad de las secciones (a la inhibición), no cambia con la tensión de oxígeno, ni con la edad del coleóptilo.

El poloromercuribenzoato, así como el nitrato y el cloruro fenilmercurico demostraron inhibir también el crecimiento con características análogas al arsenito. Estas (principalmente la falta de reversión por los ácidos orgánicos) las explican THIMANN y BONNER (1949) (59) sobre el hecho frecuentemente demostrado de que la inhibición de un fermento puede ser prevenida por exceso de sustrato, y sobre el de que la afinidad por el fermento (demostrada en experiencias de inhibición del crecimiento y de la actividad enzimática) disminuye en el siguiente orden: arsenito — cloromercuribenzoato — ácido yodo-acético.

Estas consideraciones, sugiere a los autores anteriormente mencionados, que la inhibición del crecimiento que producen las lactonas no saturadas, observada por VELDSTRA y HAVINGA (1943) (60), y en particular la protoanemonina (GOODARD, 1948 (61) tiene lugar también por medio de la combinación de estas sustancias con fermentos portadores de grupos sulfhidrilo.

BONNER y THIMANN (1950) (62), prosiguiendo su estudio sobre la intervención del metabolismo de los ácidos orgánicos en el crecimiento, investigaron la influencia de otro grupo de inhibidores.

Ya anteriormente BONNER y WILDMAN (1947) (63) y otros, publicaron experiencias en que el fluoruro sódico se comportaba como inhibidor del crecimiento y de la respiración. Según WARBURG y CHRISTIAN (1942) (64) el fluoruro sódico actúa sobre el sistema enolasa, que convierte el ácido 2-fosfoglicérico en ácido fosfoenolpirúvico, bloqueando la formación de

ácido pirúvico. Sin embargo, en la inhibición del crecimiento, el fluoruro sódico parece actuar de distinta forma, ya que su acción no se revierte por la adición de ácido pirúvico, ni de sus precursores (ácido málico, succínico, fumárico e isocítrico), ni tampoco se modifica por la concentración de iones magnésicos o fosfóricos (ambos iones juegan un importante papel en la reacción catalizada por la enolasa, y la acción del fluoruro se debe a su inactivación por la formación de un complejo "fosfato-fluor-magnesio" que se combina con la proteína de la enolasa). De lo anterior, puede concluirse que la acción del fluoruro sódico sobre el crecimiento, probablemente, no se ejerce sobre el sistema productor del ácido pirúvico.

Se ensayaron además los ácidos 1-amino-2-naftol-4-sulfónico (ANS) y el fluor-acético. El primero se comportó como estimulante del crecimiento, a pesar de ser un inhibidor específico de la carboxilasa, mientras que el segundo originó su clara inhibición en el mismo, reversible por la acción de los ácidos pirúvico y acético.

Sobre la base de los hechos anteriormente relatados, BONNER y THIMANN (1950) (62) proponen la siguiente explicación del sistema metabólico que conduce al crecimiento en secciones aisladas de coleóptilos: La inhibición por el ácido yodo-acético (y los otros inhibidores del grupo sulfhidrilo) y su reversión por los ácidos orgánicos, así como la naturaleza intensamente aeróbica del crecimiento, no deja lugar a duda de la intervención, bien proporcionando energía o materia, del metabolismo de los ácidos dicarboxílicos en el crecimiento. Este metabolismo, sin duda tiene lugar, por medio del llamado ciclo "de los ácidos tricarbóxicos" que en esencia parece ser el mismo en todos los organismos. El ciclo se interrumpe fácilmente con las sustancias capaces de reaccionar con el grupo sulfhidrilo, actuando sobre la succínico-de-hidrogenasa u otras dehidrogenasas del ciclo. Ahora bien, siendo la función del ciclo principalmente oxidar el ácido pirúvico, y habiéndose comprobado que este ácido, estimula claramente el crecimiento, el hecho de que el ANS (que inhibe la descarboxilación del pirúvico) no inhiba el crecimiento sino que lo estimula, viene a demostrar que es la oxidación aeróbica del ácido pirúvico, y no la anaeróbica, la que interviene en el crecimiento. Esta oxidación puede realizarse de dos modos, bien directamente a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, o bien indirectamente por descarboxilación oxidativa a ácido acético, y posterior oxidación por el mismo ciclo (STERN y OCHOA, (1949) (65). Ya que el ácido fluoracético (inhibidor específico de la oxidación del ácido acético) inhibe el crecimiento con más intensidad cuando las secciones crecen flotando que cuando lo hacen sumergidas, se llega a la conclusión, de que la oxidación del ácido pirúvico a ácido acético, juega un papel más importante en el primer caso que en el segundo. Naturalmente, el mayor crecimiento observado en las secciones flotantes, se debería a la superposición de la oxidación indirecta (vía ácido acético) sobre la directa.

A falta de pruebas positivas sobre la naturaleza exacta de la reacción sensible al fluoruro, BONNER y THIMANN (1950) (62) dan por válida la sugestión de BONNER y WILDMAN (1947) (63) de que la inhibición del crecimiento por esta sustancia, podía ser debida a la del enzima fosfatasa (aisla-

da por ellos de hojas). Este parece contener auxina en su molécula, así que su intervención en el crecimiento resulta posible.

METABOLISMO DE LOS GLUCIDOS, LIPIDOS Y PROTIDOS EN LA CELULA VEGETAL DURANTE EL PERIODO DE CRECIMIENTO POR ELONGACION

a) *Metabolismo de los glúcidos.*—Respecto a otros constituyentes, precursores de los ácidos orgánicos en el metabolismo como son los azúcares demostraron CHRISTIANSEN, THIMANN, KUNZ y BONNER (1949), (66) y CHRISTIANSEN y THIMANN (1950-a) (67) que el crecimiento representa la rápida desaparición de la sacarosa y de los azúcares reductores, y que ésta se acelera tanto por influjo de los estimulantes (ácido indolacético) como de los inhibidores (ácido yodo-acético, arsenito o fluoruro sódico) del crecimiento, aunque estos últimos actúen con más intensidad.

b) *Metabolismo de los lípidos.*—Ya que el consumo de los azúcares no puede atribuirse a su conversión en polisacáridos, por lo menos en proporción considerable, (la celulosa y otros constituyentes de la pared celular aumentan, pero sólo en una cantidad que representa de 1/5 a 1/2 de los azúcares consumidos), sólo restan dos caminos para explicar su desaparición: la destrucción respiratoria o la conversión en constituyentes de tipo lipídico o proteínico. Al comprobar estas hipótesis CHRISTIANSEN y THIMANN (1950-b) (68), encontraron que la absorción de oxígeno muestra muy poca relación con la cantidad de azúcar consumido. Las secciones en ácido indolacético respiran con más intensidad en agua, pero utilizan la misma cantidad de azúcares reductores y sólo un poco más de sacarosa. En presencia de inhibidores, el consumo de azúcar queda reducido a la mitad, sin embargo, la cantidad de oxígeno absorbida es prácticamente la misma (inhibición por fluoruro) o desciende en un 20 ó 30 % (inhibición por arsenito o por ácido yodo-acético). Así que, el azúcar que desaparece cuando se inhibe el crecimiento no se utiliza evidentemente en la respiración. Los mismos autores, al estudiar el contenido en lípidos y su variación hallaron que éste disminuye en un 25 % cuando el crecimiento tiene lugar en el agua, en un 30 % en presencia de ácido indolacético, mientras que, la de los tres inhibidores citados impiden con más o menos intensidad la utilización de la grasa. Estas experiencias, realizadas en hipocotilos de guisantes coinciden, en líneas generales, con las realizadas anteriormente por ALBAUM y EICHEL (1943) (57) con plántulas de avena crecidas en la oscuridad. En ellas también se pudo observar que el conjunto de sustancias solubles en éter (que según el método empleado incluye lípidos y ácidos orgánicos) se consumían rápidamente durante el crecimiento, mientras la concentración de azúcares reductores permanecían esencialmente constantes. Sobre la base de estas observaciones, ALBAUM y EICHEL (1943) (57) concluyeron: Que, en primer lugar, el principal metabolito, al comienzo del crecimiento, son lípidos; y que los azúcares no se utilizan durante este tiempo; en segundo, que el metabolismo graso es insensible al ácido yodo-acético que, sin embargo, inhibe el crecimiento por bloqueo de la glicolisis en la fase de triosa-fosfato; y finalmente, que durante el crecimiento hay una transición gradual de la destrucción

de las grasas a los azúcares, marcada, entre otras cosas, por el incremento que sufre el cociente respiratorio, que pasa de 0'8 a 1, al mismo tiempo que el crecimiento pasa de insensible, a la inhibición yodo-acético a sensible.

A pesar de la coincidencia en las observaciones, la interpretación de CHRISTIANSEN y THIMANN (1950-b) (67) dan a los hechos, es diferente. Así, suponiendo que los azúcares, las grasas y los ácidos orgánicos se oxidan tanto al comienzo como durante el crecimiento, no representando, en esto, el tiempo diferencia alguna; explicando la constancia en el contenido de azúcares reductores por la conversión de la grasa en azúcares. Una interpretación análoga se ha dado por MAPSON, CRUICKSHANK y YN-TUAN-CHEN (1949) (69) y MURLIN (1933-34) (70) a cambios metabólicos similares, que ocurren durante la germinación de semillas con reservas grasas.

Si la acción de los inhibidores fuera la de impedir la conversión de las grasas en azúcares, quedaría con ello explicado el incremento en el contenido de grasas, el decrecimiento en el de azúcares y la pequeña disminución en el oxígeno absorbido o el aumento del cociente respiratorio, efectos todos ellos, provocados indistintamente por cualquiera de los tres inhibidores ensayados. En cuanto a la sensibilidad de los coleóptilos jóvenes, el ácido yodo-acético, piensan CHRISTIANSEN y THIMANN (1950-b) (68) que se debe con toda certeza, como antes hemos indicado, a su elevado contenido en ácidos orgánicos THIMANN, (1949) (71) que los protege de la inhibición.

METABOLISMO FOSFORILANTE Y SU POSIBLE INTERVENCION EN EL CRECIMIENTO DE LA CELULA VEGETAL DURANTE EL PERIODO DE ELONGACION

Para explicar la relación entre el metabolismo de los ácidos orgánicos y el crecimiento, relación que según acabamos de exponer en el apartado anterior es evidente, THIMANN y sus colaboradores COMMONER y THIMANN, (1941), (55) THIMANN (1949) (71) THIMANN (1951) (72) vienen desarrollando desde hace bastantes años una tesis, de acuerdo con la cual, habría una parte de la respiración asociada al crecimiento de la cual dependería. Esto significa que si se inhibe el 10 % de la respiración total con agentes tales como el ácido yodo-acético o el arsenito sódico, el crecimiento queda totalmente inhibido. La acción de estos inhibidores sugiere a dichos autores la existencia de un "enzima del crecimiento" del tipo sulfhidrilo. El sustrato de tal fermento serían los ácidos orgánicos del ciclo tricarbóxico, ya que la inhibición yodo-acética puede ser revertida por el ácido succínico y otros pertenecientes a dicho ciclo. Respecto a la función de la auxina, sería la de proteger al "enzima del crecimiento" (THIMANN 1951) (72).

Aunque sin dudar de la intervención de los ácidos orgánicos en el crecimiento, los hechos, según otros autores, pueden explicarse de manera diferente. Para BONNER (1950-a) (40); ALBAUM (1952-a) (73), y VAN OVERBEEK (1952); (74) el efecto del ácido indolacético en el crecimiento se debería a su intervención en el metabolismo del ácido fosfórico.

BONNER (1950-a) (40) y (1950-b) (40), demostró que el arseniato sódico (en presencia de ácido indolacético) inhibe el crecimiento de las secciones de coleóptilos, pudiendo ser la inhibición revertida por iones fosfó-

ricos. El mismo autor (BONNER, 1949) (41) observó que otro clásico inhibidor de la fosforolisis, el 2-4 dinitrofenol, inhibe también el crecimiento.

Un aspecto curioso de la inhibición producida por estas dos sustancias es que la dosis que paralizan el crecimiento no tienen efecto sobre la respiración (30 mg/l de arseniato sódico) o incluso la aumentan (5 mg/l de 2-4 dinitrofenol).

ALBAUM (1952) (73), basándose en una serie de estudios realizados sobre el metabolismo del ATP (adenosintrifosfato) en los vegetales, llega a la conclusión de que no existe tal "enzima de crecimiento" sino un conjunto de reacciones sintéticas que intervienen en el crecimiento y que dependen del ATP como fuente de energía. Si se reduce la síntesis de ATP por un agente del tipo del arsenito, resultará inhibida alguna (o algunas) de las reacciones sintéticas, y como consecuencia también el crecimiento.

En este sentido, dicho autor admite la existencia de un reservorio metabólico de ATP al que tendrían acceso ciertas reacciones primero y otras después, aunque todas ellas fueron esenciales para el crecimiento.

Según ALBAUM (1952-b) (75) el arsenito, siendo un inhibidor de la fosforolisis, bloquearía la incorporación del fósforo inorgánico a ATP, teniendo en cambio poco efecto sobre la respiración como ha observado THIMANN. En cuanto al efecto del ácido yodo-acético podría ser interpretado como resultante del bloqueo de la utilización de la glucosa por inhibición de la glicolisis; y la reversión de esta inhibición por los ácidos orgánicos una "derivación" de la etapa bloqueada. En resumen, todos los hechos observados por THIMANN pueden ser igualmente interpretados según la hipótesis de ALBAUM.

En vista de que pequeñas cantidades de ácido indolacético originan fuertes respuestas en el crecimiento de las plantas BONNER (1950-b) (40) piensa que toda probabilidad participa como componente de un fermento de tipo fosfatasa, aunque reconoce que no ha sido posible demostrar en tejidos vegetales una relación directa entre el contenido en sustancias de crecimiento y la actividad fosfatásica.

PARTE EXPERIMENTAL

Material y Métodos.—Los métodos y material empleados fueron expuestos con detalle en la primera parte de este trabajo publicado en el número anterior de esta revista (RECALDE L. y GARCIA VILLANOVA-R. I., *Acción del ácido ascórbico y su interacción con el ácido indolacético*. *Ars Farmacéutica*, 1, 37, 1960) por lo que prescindimos de su descripción.

RESULTADOS Y SU DISCUSION

El crecimiento alcanzado por secciones de coleóptilos flotando en agua, después de un determinado tiempo, depende únicamente de los materiales presentes en las células, por ello en lo sucesivo le distinguiremos con el nombre de crecimiento endógeno.

Al ensayar la acción estimulante de diferentes sustancias, sobre el crecimiento de las secciones, tomaremos siempre como patrón el crecimiento endógeno de estas.

Como resultó prácticamente imposible realizar experiencias sucesivas en secciones de crecimiento endógeno constante, emplearemos para medir su variabilidad un índice que representa la sensibilidad (o potencia de crecimiento) de las secciones empleadas en cada caso. Tal índice en el mismo crecimiento endógeno, pero expresado en porcentajes del tamaño inicial de la sección (5 mm.).

Cada una de las experiencias consignadas a continuación, fué realizada en diferente día.

Efecto del ácido málico, sulfato de manganeso, glutatión, ácido ascórbico y coenzima II sobre el crecimiento (estimulado con glucosa y ácido indolacético) del coleóptilo de la avena.—Después de haber demostrado, con las experiencias referidas (RECALDE L. y G.³ VILLANOVA. *Ars Pharmaceutica* 2, 1960), el efecto claramente positivo del ácido ascórbico sobre el crecimiento, cabe preguntar por el camino, a través del cual, esta sustancia participa en dicho proceso.

Sabemos que el ácido ascórbico forma parte de una cadena de transportadores de hidrógeno. Si es por esta causa por la que interviene en el crecimiento, todos los componentes del sistema deberán tener también actividad.

Con el fin de que en esta y posteriores experiencias, el crecimiento no estuviese limitado por la cantidad de hidratos de carbono o auxina, se efectuaron siempre en presencia de glucosa (20 gr./l) y ácido indolacético (0,1 mg./l).

Se ensayó en primer lugar el ácido málico. En las tablas Xa y Xb se exponen los resultados de emplear seis concentraciones de ácido málico. La óptima resultó ser la de 10^{-3} mol. THIMANN y BONNER (1948) (44), hallaron este mismo resultado, aunque nuestro material presentó mayor sensibilidad, achacable a diferencias en la técnica empleada, (secciones de 5 mm. en vez de 3 mm.; 2 % de glucosa en vez de 1 % de sacarosa; 0,1 (mg./l) de ácido indolacético en vez de 1,0 (mg./l); pH 6,8 en vez de 6,5; etc.).

COOIL (1952) (77), al comparar el efecto que tiene el ajustar la solución de ácido málico (pH 6,5) con NaOH ó con KOH, encontró que, mientras el malato potásico estimulaba el crecimiento (26 %), el sódico carecía de actividad por completo. Por lo cual, llegó a la conclusión de que, el estímulo observado por THIMANN y BONNER (1948) (44) y otros autores, se debía al ión potásico y no al ácido málico. Nosotros, no obstante emplear sales sódicas (ajustábamos siempre el pH 6,8 de la solución con NaOH) obtuvimos resultados fuertemente positivos.

Otro componente del sistema "ascórbico-oxidasa", es el SO_4Mn que participaba como co-factor en la oxidación de los ácidos málicos e isocítrico.

WENT y THIMANN (1937) (54) afirman que las sales de manganeso carecen de efecto sobre el crecimiento o lo inhiben a concentración de 10^{-4} m.

BONNER (1949) (41) cultivando secciones de coleóptilo de avena a pH 4,5 observó que la adición de arginina y sulfato de manganeso determina mayor crecimiento que la sacarosa y el ácido indolacético solos.

Según COOIL (1952) (77) el SO_4Mn (5×10^{-4}) aumenta sólo ligeramente el crecimiento sobre el testigo (sacarosa 1 % y ácido indolacético (1 mg/L).

Nuestros resultados (tablas XIa y XIb), permiten afirmar la actividad del sulfato de manganeso en el crecimiento del coleóptilo de la avena, teniendo aproximadamente la misma concentración óptima que el ácido málico (entre 10^{-3} y 10^{-4} m.). Esta concentración es también la óptima en la actividad del sistema isocítrico por el ión manganeso.

Teniendo en cuenta que el manganeso interviene como co-factor en la oxidación del ácido málico, nos pareció interesante ver si la concentración óptima de SO_4Mn variaba en presencia del ácido málico en el medio de cultivo.

Las tablas XIIa y XIIb recogen los resultados de ensayar varias concentraciones de SO_4Mn con la concentración óptima de ácido málico; en ellos se puede observar una ligera fluctuación en la concentración óptima de SO_4Mn que pasa de $6,2 \times 10^{-4}$ m. en ausencia de ácido málico, a $12,5 \times 10^{-4}$ m. en presencia de éste.

Se conoce, desde hace tiempo, que al iniciarse el crecimiento en un tejido u órgano "durmiente" la concentración de glutatión, en sus células, aumenta considerablemente (FIRKET y COMHAIRE (1929) (23) y HOPKINS y MORGAN (1943) (20) lo observaron en la germinación; y MILLER, GUTHRIE y DENNY (1936) en tubérculos de patata forzados); así como también que la fructificación (LEOPOLD y GERNESEY (1952) (78) y la cicatrización (DAVIES (1949) (79) podía estimularse con glutatión.

Todos estos procesos (gemación, germinación, fructificación y cicatrización) con fenómenos complejos en los que predomina la división celular. Nadie sin embargo, que conozcamos, ha estudiado la acción del glutatión sobre la extensión celular (en el coleóptilo de la avena o en otro material apropiado). Por otra parte bioquímicamente está bien establecida su intervención en la reducción del ácido ascórbico; de aquí, que nos pareciera interesante su estudio.

El glutatión se mostró en nuestras experiencias como muy activo sobre el crecimiento del coleóptilo de la avena siendo la concentración óptima de 10^{-4} m. (tabla XIIIa y XIIIb).

También ensayamos el efecto del ácido ascórbico (tabla XIVa y XIVb) en una gama de concentraciones más amplia que la de las experiencias previas, obteniendo la confirmación de que la concentración óptima es 25 (mg./L.).

El único eslabón del sistema ascórbico-oxidasa que quedaba por experimentar su actividad fue el trifosfopiridín-nucleótido. Utilizamos un preparado de la casa "Sigma" con una concentración de 10 % en producto puro. Los resultados se muestran en las tablas XVa y XVb. La concentración óptima resultó ser la de 50 (mg./L.), es decir, 5 (mg./L.) de trifosfopiridinucleótido.

En las tablas XVIa y XVIb se recogen los resultados de ensayar el ácido ascórbico y el glutatión (en sus concentraciones óptimas) separados y juntas; observándose, en este último caso, un mayor estímulo en el crecimiento de las secciones de coleóptilo.

Finalmente, en las últimas experiencias, cuyos resultados se recogen en las tablas XVII y XVIII se ensayó el efecto de todos los componentes del

sistema "ascórbico-oxidasa", añadidos de forma gradual; obteniéndose gradualmente también, un incremento del crecimiento.

TABLA Xa

Crecimiento medio (en mm.) de secciones de 5 mm. de coleóptilo de avena, flotando durante 24 horas en 20 centímetros cúbicos de solución de glucosa, ácido indolacético y ácido málico

Sol. AIA (mg/l)	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
• A M ($\times 10^{-6}$ Mol)	0	0	6,2	12,5	25	50	100
Exp. • Glucosa (gr/l)	0	20	20	20	20	20	20
31	1,4	5,4	6,1	6,7	8,5	8,6	9,2
32	2,6	5,7	5,8	7,1	8,5	8,7	10,0
33	2,6	5,7	5,8	8,0	8,6	8,9	10,1
Media	2,6	5,6	5,9	7,3	8,5	8,7	9,8

TABLA Xb

Crecimiento medio (en porcentaje de los controles) de secciones de 5 mm. de coleóptilo de avena, flotando durante 24 horas en 20 c.c. de solución de glucosa, ácido indolacético y ácido málico

Sol. AIA (mg/l)	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
• A M ($\times 10^{-6}$ Mol)	0	0	6,2	12,5	25	50	100
Exp. • Glucosa (gr/l)	0	20	20	20	20	20	20
31	100	225	254	279	354	258	383
32	100	219	223	273	327	334	384
33	100	219	223	308	331	342	388
Media	100	221	233	287	338	345	385

TABLA XIa

Crecimiento medio (en mm.) de secciones de 5 mm. de coleóptilo de avena, flotando durante 24 horas en 20 c.c. de solución de glucosa, ácido indolacético y sulfato de manganeso

Sol. AIA (mg/L)	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
• SO_4Mn ($\times 10^{-4}$ mol)	0	0	6,2	12,5	25	50	100
Exp. • Glucosa (gr/L)	0	20	20	20	20	20	20
34	2,2	4,8	12,8	11,2	9,6	9,4	6,9
35	2,3	5,1	13,1	12,3	9,9	9,9	6,9
36	3,1	6,9	14,4	12,5	11,2	10,9	7,8
Media	2,5	5,6	13,4	12,0	10,2	10,1	7,2

TABLA XIb

Crecimiento medio (en porcentaje de los controles) de secciones de 5 mm. de coleóptilo de avena, flotando durante 24 horas en 20 c.c. de solución de glucosa, ácido indolacético y sulfato de manganeso

Sol. AIA (mg/L)	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
» SO ₄ Mn (x 10 ⁻⁴ Mol)	0	0	6,2	12,5	25	50	100
Exp. » Glucosa (gr/L)	0	20	20	20	20	20	20
34	100	218	582	509	436	427	314
35	100	222	569	539	430	430	300
36	100	229	478	415	372	362	259
Media	100	223	543	486	413	406	291

TABLA XIIa

Crecimiento medio (en mm.) de secciones de 5 mm. de coleóptilo de avena flotando durante 24 horas en 20 c.c. de solución de glucosa, ácido indolacético, ácido málico y sulfato de manganeso

Sol. AIA (mg/L)	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
» A M 10 ⁻⁵ mol.	0	0	100	100	100	100	100	100
» SO ₄ Mn 10 ⁻⁴ mol.	0	0	0	100	50	25	12,5	6,2
Exp. » Glucosa (Gr /L)	0	20	20	20	20	20	20	20
37	2,4	4,4	9,7	6,1	7,6	9,0	16,0	11,0
38	2,5	4,5	9,8	6,2	8,0	9,1	16,1	11,3
39	2,6	4,2	9,3	5,2	6,6	8,1	14,6	10,8
Media	2,5	4,4	9,6	5,8	7,4	8,8	15,5	11,0

TABLA XIIb

Crecimiento medio (en porcentaje de los controles) de secciones de 5 mm. de coleóptilo de avena, flotando durante 24 horas en solución de glucosa, ácido indolacético, ácido málico y sulfato de manganeso

Sol. AIA (mg/L)	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
» A M 10 ⁻⁵ mol.	0	0	100	100	100	100	100	100
» SO ₄ Mn 10 ⁻⁴ mol.	0	0	0	100	50	25	12,5	6,2
Exp. » Glucosa (Gr./L)	0	20	20	20	20	20	20	20
37		100	221	139	173	205	364	250
38		100	218	138	178	203	358	257
39		100	222	124	158	193	384	258
Media		100	219	133	168	200	353	253

TABLA XIIIa

Crecimiento medio (en mm.) de secciones de 5 mm. de coleóptilo de avena, flotando durante 24 horas en 20 c.c. de solución de glucosa, ácido indolacético y glutatión

Sol. AIA (mg/L)	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
» Glutatión 10 ⁻⁶ mol.	0	0	6,2	12,5	25	50	100
Exp. » Glucosa (gr/L)	0	20	20	20	20	20	20
40	2,4	5,3	7,1	8,8	10,1	10,8	17,1
41	2,6	5,6	7,4	8,8	10,2	11,1	17,5
42	2,8	6,1	7,4	8,8	10,3	11,7	19,3
Media	2,6	5,7	7,3	8,8	10,2	10,9	17,9

TABLA XIIIb

Crecimiento medio (en porcentaje de los controles) de secciones de 5 mm. de coleóptilo de avena, flotando durante 24 horas en 20 c.c. de solución de glucosa, ácido indolacético y glutatión

Sol. AIA (mg/L)	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
» Glutatión 10 ⁻⁶ mol.	0	0	6,2	12,5	25	50	100
Exp. » Glucosa (gr/L)	0	20	20	20	20	20	20
40	100	221	296	366	421	450	712
41	100	215	285	338	392	427	657
42	100	218	265	315	368	418	689
Media	100	218	281	338	396	418	689

TABLA XIVa

Crecimiento medio (en mm.) de secciones de 5 mm. de coleóptilo de avena, flotando durante 24 horas en 20 c.c. de solución de glucosa, ácido indolacético y ácido ascórbico

Sol. AIA (mg/L)	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	2,1
» A A (mg/L)	0	0	12,5	25	50	100	200
Exp. » Glucosa (gr/L)	0	20	20	20	20	20	20
43	2,5	5,5	7,2	7,5	6,6	4,4	2,8
44	2,6	5,7	8,8	8,9	6,8	4,5	3,0
45	2,7	5,8	9,0	9,0	7,1	5,0	3,0
Media	2,6	5,7	8,3	8,4	6,8	4,6	2,9

TABLA XIVb

Crecimiento medio (en porcentaje de los controles) de secciones de 5 mm. de coleóptilo de avena, flotando durante 24 horas en 20 c.c. de solución de glucosa, ácido indolacético y ácido ascórbico

Sol. AIA (mg/L)	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
» A A (mg/L)	0	0	12,5	25	50	100	200
Exp. » Glucosa (gr/L)	0	20	20	20	20	20	20
43	100	220	288	300	264	176	112
44	100	219	338	342	262	173	116
45	100	215	333	333	263	185	111
Media	100	219	319	323	262	177	113

TABLA XVa

Crecimiento medio (en mm.) de secciones de 5 mm. de coleóptilo de avena, flotando durante 24 horas en 20 c.c. de solución de glucosa, ácido indolacético, ácido ascórbico y glutatión

Sol. AIA (mg/L)	0	0,1	0,1	0,1	0,1
» A A (mg./L)	0	0	25	0	25
» Glutatión 10^{-4} mol	0	0	0	1	1
Exp. » Glucosa (mg/L)	0	20	20	20	20
46	2,3	5,1	8,1	16,7	20,0
47	2,6	5,6	8,3	17,5	20,5
48	2,9	6,3	9,0	18,0	21,0
Media	2,6	5,7	8,5	17,2	20,5

TABLA XVb

Crecimiento medio (en porcentaje de los controles) de secciones de 5 mm. de coleóptilo de avena, flotando durante 24 horas en 20 c.c. de solución de glucosa, ácido indolacético, ácido ascórbico y glutatión

Sol. AIA (mg/L)	0	0,1	0,1	0,1	0,1
» A A (mg./L)	0	0	25	0	25
» Glutatión 10^{-4} mol	0	0	0	1	1
Exp. » Glucosa (gr/L)	0	20	20	20	20
46	100	222	352	725	868
47	100	215	319	672	788
48	100	217	310	620	723
Media	100	219	327	661	791

TABLA XVIa

Crecimiento medio (en mm.) de secciones de 5 mm. de coleóptilo de avena, flotando durante 24 horas en 20 c.c. de solución de glucosa, ácido indolacético y co-enzima II

Sol. AIA (mg/L)	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
» Co II (10 ^{0/0}) (mg/L)	0	0	6,2	12,5	25	50
Exp » Glucosa (gr/L)	0	20	20	20	20	20
49	2,5	5,4	5,9	6,2	6,4	7,0
50	2,6	5,7	6,0	6,3	6,5	7,0
51	2,7	5,8	6,1	6,4	6,8	7,3
Media	2,6	5,6	6,0	6,3	6,6	7,2

TABLA XVIb

Crecimiento medio (en porcentaje de los controles) de secciones de 5 mm. de coleóptilo de avena, flotando durante 24 horas en 20 c.c. de solución de glucosa, ácido indolacético y co-enzima II

Sol. AIA (mg/L)	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
» Co.II (10 ^{0/0}) (mg/L)	0	0	6,2	12,5	25	50
Exp. » Glucosa (gr/L)	0	20	20	20	20	20
49	100	216	236	248	256	280
50	100	219	231	242	250	269
51	100	215	226	237	252	271
Media	100	215	231	242	252	274

TABLA XVIIa

Crecimiento medio (en mm.) de secciones de 5 mm. de coleóptilo de avena, flotando durante 24 horas en 20 c.c. de solución de glucosa, ácido indolacético, ácido mólico, sulfato de manganeso, glutatión y ácido ascórbico

Sol. AIA (mg/L)	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
» A M 10 ⁻³ mol	0	0	1	1	1	1
» SO ₄ Mn 10 ⁻³ mol	0	0	0	1	1	1
» GLUTATION 10 mol	0	0	0	0	1	1
» AA (mg/L)	0	0	0	0	0	25
Exp. » Glucosa (gr/L)	0	20	20	20	20	20
52	2,5	5,5	9,4	16,0	18,0	22,6
53	2,5	5,5	9,6	16,3	18,9	22,8
54	2,6	5,7	10,5	17,3	19,1	22,9
Media	2,6	5,6	9,8	16,5	18,7	22,7

TABLA XVIIIb

Crecimiento medio (en porcentaje de los controles) de secciones de 5 mm. de coleóptilo de avena, flotando durante 24 horas en 20 c.c. de solución de glucosa, ácido indolacético, ácido málico, sulfato de manganeso, glutatión y ácido ascórbico

Sol. AIA (mg/L)	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
» A M 10^{-3} mol	0	0	1	1	1	1
» SO_4 Mn 10^{-3} mol	0	0	0	1	1	1
» Glutatión 10^{-4} mol	0	0	0	0	1	1
» A A (mg/L)	0	0	0	0	5	25
Exp. » Glucosa (gr/L)	0	20	20	20	20	20
52	100	220	376	640	720	904
53	100	220	384	652	756	912
54	100	219	404	665	734	890
Media	100	220	388	653	737	902

TABLA XVIIIa

Crecimiento medio (en mm.) de secciones de 5 mm. de coleóptilo de avena, flotando durante 24 horas en 20 c.c. de solución de glucosa, ácido indolacético, ácido málico, sulfato de manganeso, glutatión, ácido ascórbico y co-enzima II

Sol. AIA (mg/L)	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
» A M 10^{-3} mol	0	0	1	1	1	1	1
» SO_4 Mn 10^{-3} mol	0	0	0	1	1	1	1
» GLUTATION 10^{-4} mol	0	0	0	0	1	1	1
» A A (mg/L)	0	0	0	0	0	25	25
» Co. II (10 %) (mg/L)	0	0	0	0	0	0	50
Exp. » Glucosa (gr/L)	0	20	20	20	20	20	20
55	2,5	5,4	9,5	16,5	18,5	21,9	22,9
56	2,6	5,6	9,7	16,7	18,7	22,6	23,2
57	2,6	5,7	9,9	17,2	19,0	22,8	23,8
Media	2,6	5,6	9,7	16,8	18,7	22,4	23,3

TABLA XVIIIb

Crecimiento medio (en porcentaje de los controles) de secciones de 5 mm. de coleóptilo de avena, flotando durante 24 horas en 20 c.c. de solución de glucosa, ácido indolacético, ácido málico, sulfato de manganeso, glutation, ácido ascórbico y co-enzima II

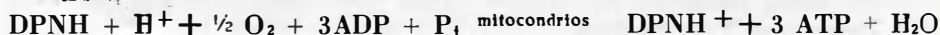
Sol. AIA (mg/L)	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
» AM 10^{-3} mol.	0	0	1	1	1	1	1
» SO_4Mn 10^{-3} mol	0	0	0	1	1	1	1
» Glutation 10^{-4} mol.	0	0	0	0	1	1	1
» A A (mg/L)	0	0	0	0	0	25	25
» Co. II (10%) (mg/L)	0	0	0	0	0	0	50
Exp. » Glucosa (mg/L)	0	20	20	20	20	20	20
55	100	216	380	660	740	876	916
56	100	215	375	642	718	868	891
57	100	219	381	661	730	876	914
Media	100	217	378	655	730	874	907

Discusión final

Ya que el crecimiento del coleóptilo de la avena aumenta claramente por la acción, no sólo del ácido ascórbico, sino también del resto de las otras sustancias, que forman con él la cadena de transportadores de hidrógeno denominada "sistema ascórbico-oxidasa", y que la concentración molar óptima es, en todas ellas, aproximadamente la misma; cabe lógicamente pensar que el crecimiento en el coleóptilo se encuentra limitado por la fase aeróbica de la respiración, o mejor dicho, por la cantidad presente de las sustancias que en ella intervienen.

Otra cuestión, es la de la posible relación entre la intervención del ácido indolacético en el crecimiento y la del sistema ascórbico-oxidasa. Como vimos anteriormente, aquella se efectúa según opinión de muchos investigadores a través del metabolismo fosforilante; pues bien, es posible que la del ácido ascórbico tenga lugar por el mismo medio.

Los enzimas responsables de la fosforilación aeróbica (oxidante), o de "cadena respiratoria", están contenidos en los mitocondrios. LEHNINGER (1951) fue el primero en demostrar directamente con mitocondrios de origen animal, que la fosforilación de cadena respiratoria está ligada en la reoxidación de DPNH de acuerdo con la siguiente ecuación general:



(*)

ADP = Difosfopiridín-nucleótido.

DPNH = Difosfopiridín-nucleótido.

ATP = Adenosindifosfato.

P = Fosfato inorgánico.

Poco después, MILLER, BONNER, AXELROD y BANDUSKI (1951) (80) demostraron que los mitocondrios de origen vegetal son capaces de llevar a cabo la misma reacción.

La intervención del sistema "ascórbico-oxidasa" en la oxidación del DPNH aunque bioquímicamente posible, no se ha demostrado en los mitocondrios.

Sin embargo, según ARNON (1956) (76) y sus colaboradores, el ácido ascórbico es un importante co-factor de la fosforilación fotosintética.

Sugerimos como probable, para explicar la acción del sistema ascórbico-oxidasa en el crecimiento del coleóptilo de la avena, la siguiente hipótesis:

La fase aeróbica de la respiración, y por tanto la fosforilación oxidante, limitan el crecimiento al limitar la cantidad de ATP disponible. La adición de ácido ascórbico y de las otras sustancias estudiadas, al intensificar esta fase incrementan la concentración de ATP y con ello el crecimiento.

CONCLUSIONES

1.^a La sal sódica del ácido málico es activa sobre el crecimiento, con una concentración óptima de 10^{-3} mol.

2.^a El SO_4Mn es activo aproximadamente a la misma concentración que el malato sódico (entre 10^{-3} y 10^{-4} mol.).

3.^a El glutation es activo sobre el crecimiento del coleóptilo, teniendo su concentración óptima de 10^{-4} mol.

4.^a El Trifosfopiridín-nucleótido intensifica el crecimiento del coleóptilo.

5.^a El malato sódico, SO_4Mn , glutation, ácido ascórbico y trifosfopiridín-nucleótido cuando actúan juntos en diversas combinaciones, potencian su efecto individual sobre el crecimiento del coleóptilo de la avena.

6.^a Los resultados obtenidos sugieren claramente la intervención del sistema "ascórbico-oxidasa" en el crecimiento; tal vez, mediante la formación de ATP por medio de la fosforilación aeróbica.

BIBLIOGRAFIA

55. COMMONER, B. y THIMANN, K. V. (1941).—*On the relation between growth and respiration in the avena coleoptile*. J. Gen. Physiol. 24, 279.
56. ALBAUM H. G. y COMMONER B. (1941).—*The relation between the fourcarbon acids and the growth of oat seedling*. Biol. Bull., 80, 314.
57. ALBAUM H. G. y EICHEL B. (1943).—*The relationship growth and metabolism in the oat seedling*. Amer. J. Bot., 30, 18.
58. THIMANN K. V., BONNER W. D. y CHRISTIANSEN G. S. (1951).—*Changes in metabolism during growth and its inhibition*. «Plant Growth Substances» Edit. F. Skoog, University of Wisconsin Press.
59. THIMANN K. V. y BONNER W. D. (1949 b).—*Experiments on the growth and inhibition of isolated plant parts. II. The action of several enzyme inhibitors on the growth of the avena coleoptile on pisum internodes*. Amer. J. of Bot., 36, 214.
60. VELDSTRA H. y HAVINGA E. (1943).—*On the physiological activity of unsaturated lactones*. Enzymologia. II, 373.

61. GODAARD D. R. (1948).—*Metabolism in relation to cell growth*. Growth (Supplement 8th. growth Symposium).
62. BONNER W. D. y THIMANN K. V. (1950).—*Studies on the growth and inhibition of isolated plant parts. III The action of some inhibitors concerned with piruvate metabolism*. Am. J. of Bot., 37, 66.
63. BONNER J. y WILDMAN S. G. (1947).—*Contributions to study of auxin physiology*. Growth (Sixth. growth symposium, 1956), 10, 51.
64. WARBURG O. y CHRISTIAN W. (1942).—*Isolierung und kristallisation des garungs ferments enolasa*. Biochem., 310, 384.
65. STERN J. R. y OCHOA S. (1949).—*Enzymatic synthesis of citric acid by condensation of acetate and oxalactate*. J. Biol. Chem., 179, 491.
66. CHRISTIANSEN G. S., KUNZ L. J., y BONNER W. D. (1949).—*Action of growth inhibitors on carbohydrate metabolism in the pea*. Plant Physiol., 24, 178.
67. CHRISTIANSEN G. S. y THIMANN K. V. (1950 a).—*The metabolism of stem tissue during growth and its inhibition. I. Carbohydrate*. Arch. of Biochim., 260, 230.
68. CHRISTIANSEN G. S. y THIMANN K. V. (1950 b).—*The metabolism of stem tissue during growth and its inhibition. II. Respiration and eter-soluble material*. Arch. of Biochem., 26, 248.
69. MAPSON L. W., CRUICKSHANK E. M. y IN-TUAN CHEN. (1949).—*Factors affecting synthesis of ascorbic acid in crees seedlins. II. Ascorbic acid synthes's in relation to sugar formation*. Biochem. J., 45, EBE.
70. MURLIN J. R. (1933).—*The conversion of fat to carbohydrate in the germination castor bean. I. The respiratory metabolism. II. The combustion respiratory guotent as determined by midified oxycalorimeter*. J. Gen. Physiol., 17, 283.
71. THIMANN K. V. (1949 a).—*Plant hormones growth and respiration*. Biol. Bull., 96, 296.
72. THIMANN K. W. (1951).—*The synthetic auxins: Relation between structure and activity*. «Plant Growth Substances». Edit. F. Skoog, Univ. Wisconsin Press.
73. ALBAUM H. G. (1952 a).—*The metabolism of phosphorilated compounds in plants*. Ann. Rev. Plant Physiol., 3, 35.
74. VAN OVERBEEK J. (1952).—*Agricultural application of growth regulators and their physiological basis*. Ann. Rev. Plant. Physiol., 2, 87.
75. ALBAUM H. G. (1952 b).—*The role of phosphorus in the metabolism of plants. The incorporation of radiophosphorus during growth*. «The Biology of Phosphorus». Ed. D. F. Wolterink., Michigan State Coll. Press.
76. ARMON D. I. (1956).—*Localización de la fotosíntesis en particulas celulares aisladas*. An. Edaf., 15, 983.
77. COOIL B. J. (1952).—*Relationship of certain nutrients, metabolites and inhibitors to growth in the avena coleoptilo*. Plant Physiol., 27, 49.
78. LEOPOLD A. C. y GERNENESEY F. G. (1952).—*A role formalic acid intomato fruit-sc.* Arch. Biochem, Biophys., 41, 64.
79. DAVIES E. A. (1949).—(Citado por Andus L. J. 1953.—Plant growth substances. London, Leonard Hill Ltd.) Bot. Gaz., III, 69.
80. MILLERD A., BONNER J., AXELROD B. y BANDURSKI R. (1951).—*Oxidative and phosphorilative activity mitochondrio*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 37, 855.