

La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castelló, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.

Los trabajos publicados en Serie Universitaria abarcan las siguientes especialidades:
Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas;
Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales;
Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía;
Física; Geología; Historia; Ingeniería;
Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina,
Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología.
A ellas corresponden los colores de la cubierta.

Edición no venal de 300 ejemplares que se reparte gratuitamente a investigadores, Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Fundación Juan March



FJM-Uni 150-Vio
Estudio de procesos bioquímicos impl
Vioque Cubero, Blanca.
1031769



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

Blanca Vioque Cubero

Estudio de procesos
bioquímicos implicados en la
abscisión de la aceituna.

150 Estudio de procesos bioquímicos implicados en la abscisión de la aceituna / Blanca Vioque Cubero

FJM
Uni-
150
Vio
150

Fundación Juan March
Serie Universitaria



150

Blanca Vioque Cubero

Estudio de procesos
bioquímicos implicados en la
abscisión de la aceituna.



Fundación Juan March
Castelló, 77. Teléf. 225 44 55
Madrid - 6

Fundación Juan March (Madrid)

*Este trabajo fue realizado con una Beca de la
Convocatoria de España, 1979, individual
Departamento de QUIMICA
Centro de trabajo: Departamento de Bioquímica del
Instituto de la Grasa y sus Derivados. Sevilla.*

Los textos publicados en esta Serie Universitaria son elaborados por los propios autores e impresos por reproducción fotostática.

Depósito Legal: M - 15335 - 1981

I.S.B.N. : 84 - 7075 - 200 - 6

Impresión: Gráficas Ibéricas, Tarragona, 34, Madrid-7

Deseo expresar mi agradecimiento a la Fundación Juan March y al Instituto de la Grasa y sus Derivados del C.S.I.C. que han hecho posible la realización de este trabajo. Asimismo deseo hacer constar mi agradecimiento al Profesor D. Agustín Vioque Pizarro y al Doctor D. Miguel Angel Albi Romero por su dirección y ayuda durante la realización de este trabajo.

I N D I C E

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCION	7
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	8
II.1 La abscisión en general	8
II.2 La abscisión en el olivo	14
III. MATERIALES Y METODOS	18
III.1. Olivos	18
III.2. Determinación de hierro	18
III.3. Medida de la fuerza de ruptura de las aceitunas	18
III.4. Obtención del extracto enzimático parcialmente purificado	19
III.5. Medida de las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa	19
III.6 Determinación de proteínas	19
III.7. Ultrafiltración	19
III.8. Cromatografía de filtración por gel	19
III.9. Electroforesis	20
III.9.1. Isoelectroenfoque	20
III.9.2. Electroforesis en gel con gradiente de concentración de poliacrilamida	21
III.10. Incubación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico con extracto enzimático	21
III.11. Incubación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico con discos de hojas de olivo	22
III.12. Determinación del etileno	22
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	22
IV.1. Propiedades del sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo	22
IV.1.1. Influencia de la concentración de sustrato en la actividad	

	peroxidasa	22
IV.1.2.	Inhibidores	24
IV.1.3.	Comportamiento en ultrafiltración	27
IV.1.4.	Comportamiento en filtración por gel	28
IV.1.4.1.	Estudio de las actividades enzimáticas	28
IV.1.4.2.	Determinación del peso molecular	28
IV.1.5.	Comportamiento electroforético	29
IV.1.5.1.	Isoelectroenfoque	29
IV.1.5.2.	Electroforesis en gel con gradiente de concentración de poliacrilamida	30
IV.1.6.	Evolución del contenido en hierro y de las actividades enzimáticas AIA-oxidasa y peroxidasa durante el ciclo vegetativo	31
IV.2.	Sistema AIA-oxidasa/peroxidasa y biosíntesis del etileno	31
IV.2.1.	Formación de etileno a partir del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico por el sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo	33
IV.2.2.	Formación de etileno a partir del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico por tejidos de olivo	39
IV.2.3.	Nuestra hipótesis	41
IV.2.4.	Provocación de la abscisión de las aceitunas por formación de etileno, "in situ", en ramas de olivo tratadas con ACC	45
V.	CONCLUSIONES	48
VI.	BIBLIOGRAFIA	50

I. INTRODUCCIÓN

La gran importancia económica que el olivar tiene en nuestro país, no necesita comentarios. Uno de los problemas más graves que tiene planteado actualmente, sin duda, es el de la recolección de sus frutos. Los procedimientos clásicos, que hacen uso de una gran cantidad de mano de obra, son cada día más inviables, por antieconómicos. Este problema, presentado también en otros tipos de cosechas, frutos o semillas, ha tenido soluciones, en algunos casos, totalmente satisfactorias.

En estos momentos, en el caso del olivar está aun — sin resolver, limitándose los ensayos, totalmente empíricos, a tratamientos de los árboles con diversas sustancias, con el fin de provocar la caída de los frutos, sin afectar perniciosamente al resto del árbol y, por ende, a sus posteriores cosechas.

No cabe duda de que poder conseguir controlar la caída o abscisión de los frutos, retardándola o acelerándola según convenga, sería de la mayor importancia para su recolección, — tanto manual como mecánica. Por ello, el proceso de abscisión de los frutos es hoy uno de los temas que más atención está reclamando por parte de los fisiólogos vegetales. Sólo un conocimiento lo más profundo posible del mecanismo de la abscisión — pondrá en manos del hombre los medios eficaces para su control.

Los conocimientos que se adquirieran en este campo serían de una utilidad inmediata en la recolección de la aceituna, pero indudablemente cabe esperar que tales conocimientos podrían trasladarse a la abscisión de otros muchos frutos de interés agrícola nacional.

Sin duda, uno de los principales protagonistas en el proceso de abscisión se considera hoy al sistema enzimático —

AIA-oxidasa y buena prueba de ello es su acumulación en la zona de abscisión. Este sistema está sometido a una gran controversia desde su descubrimiento en jugos vegetales por Larsen - en 1936, debido principalmente a la dualidad de funciones que exhibe, al presentar simultáneamente las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa. Ello ha hecho que surjan tres hipótesis para explicar tal comportamiento: 1ª) la AIA-oxidasa y la peroxidasa son enzimas diferentes (Sequeira y Mineo, 1966), 2ª) las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa están asociadas con la misma molécula de proteína pero teniendo diferentes centros activos (Siegel y Galston, 1967) y 3ª) sólo algunos de los isoenzimas que constituyen la peroxidasa, poseen actividad AIA-oxidasa (Macnicol, 1973).

Todas estas circunstancias justifican el estudio, lo más detenido posible, del sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa presente en el olivo, que nos permita conocer su papel en la fisiología de la abscisión y acercarnos a poder controlar, en alguna medida, su función (activación, inhibición, inducción, etc.).

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

II.1. La abscisión en general

La abscisión del fruto lógicamente debe mirarse como una etapa dentro del proceso de maduración y senescencia. Los cambios fisiológicos que acompañan a la senescencia son cambios amplios que afectan al órgano entero. Es sorprendente -- que uno de los resultados de estos cambios esté tan altamente localizado. El conocimiento de los factores causantes de esta localización es una de las metas importantes de la investigación sobre abscisión.

La bibliografía sobre la abscisión es muy abundante; entre las recopilaciones más importantes deben citarse las de Addicott (1961, 1965), Overbeek (1961), Carns (1966), Baird y Webster (1979) y Lieberman (1979).

Peroxidasas, deshidrogenasas y fosfatasas ácidas, - han sido localizadas en la zona de abscisión de frutos de cerezas ácidas y dulces durante la formación de la capa de abscisión (Poovaiah et al., 1973). Aunque no es posible sobre la base de datos histoquímicos establecer la participación de estos enzimas en el proceso de abscisión "per se" en estos frutos, su actividad localizada en regiones en las que ocurre la separación es indicativa de una asociación con la abscisión. Ridge y Osborne (1970 a, b), encuentran actividad peroxidasa en zonas de abscisión del guisante y creen que dicha actividad es moderada por el etileno. Poovaiah et al (1973), sugieren - que las peroxidasas pueden regular los niveles endógenos del AIA en la abscisión de los frutos.

Limitaremos nuestros comentarios a aquellas facetas que guardan relación directamente con nuestras experiencias, - aún estando convencidos de que el proceso de abscisión es la interacción de muy diversos factores.

La intervención del ácido indolacético o auxina retrasando la maduración o senescencia de los frutos está más - que probada (Vendrell, 1969; Hale, 1968; Hale et al., 1970; Frenkel y Dryck, 1973). Los cambios en auxina en una fase de preabscisión son ahora bien conocidos. La abscisión va precedida de una disminución en auxina del órgano que sufre abscisión. El retraso de la abscisión por acción de auxina exógena fue indicado por Leibach (1933). Esto ha sido confirmado innum^{er}ables veces en una amplia variedad de plantas. Carns (1966)

Jacobs (1962), Addicott (1965) y Rubinstein y Leopold (1964), han presentado revisiones, asignando a la auxina un papel regulador específico en el proceso de abscisión.

La presencia del sistema enzimático AIA-oxidasa en vegetales superiores está fuera de duda. Concretamente en el olivo ha sido estudiado en hojas y yemas, a lo largo del ciclo vegetativo, por Catalina et al. (1972), en relación con la floración.

El papel fisiológico de la AIA-oxidasa parece ser el de regular los niveles de AIA endógeno. Consecuentemente con ello, hay bastante evidencia de la intervención de este enzima en aquellos procesos fisiológicos vegetales en los que la concentración de auxina debe disminuir, tales como la maduración y abscisión. Así Vendrell (1969), muestra como la auxina retarda la maduración del plátano, y Hale (1968) y Hale et al. (1970), encuentran el mismo efecto en la uva, comprobando que la auxina endógena disminuye en el momento en que se inicia la maduración, haciéndose los tejidos sensibles al etileno. Frenkel (1972), estudiando los isoenzimas de peroxidasa y AIA-oxidasa de peras, tomates y arándanos encuentra un aumento de la actividad AIA-oxidasa durante la maduración, y apunta que la finalidad sería conseguir la disminución de la concentración de AIA necesaria para hacer los tejidos permeables al etileno.

Por otra parte, el papel predonderante que el etileno juega en el desarrollo, maduración y senescencia de los -- frutos es sobradamente conocido. En efecto, el etileno fue y aún es considerado como el agente "disparador" de la maduración o como hormona de maduración y, en general, como un poderoso regulador natural en el metabolismo vegetal, actuando

e interaccionando con otras hormonas vegetales reconocidas, observándose sus efectos especialmente en periodos críticos del ciclo vegetal de las plantas superiores.

Los estudios bioquímicos y fisiológicos sobre la biosíntesis del etileno y modo de acción han aumentado significativamente en los pasados veinte años.

Las investigaciones en el área de la bioquímica y fisiología del etileno tienen sus objetivos en el establecimiento de su ruta biosintética, controles regulares y mecanismos de acción de esta hormona vegetal. Nosotros limitaremos nuestra atención, fundamentalmente, a su ruta biosintética y sus relaciones con el AIA, por la aportación que significan nuestras experiencias, como veremos más adelante.

La metionina, fue reconocida como el principal, si no el único, precursor del etileno en plantas superiores hace más de una década. Recientemente, se ha presentado evidencia de -- que la activación de la metionina por el ATP es la primera reacción en la ruta desde la metionina al etileno, (Adams y Yang, - 1977; Konze y Kende, 1979 a). La ruta biosintética con más visos de realidad se debe fundamentalmente a los trabajos de --- Adams y Yang (1977, 1978) y se resume en la Figura 1. Sobre este esquema queremos centrar nuestra atención en el último paso, descubierto muy recientemente y de forma simultánea por Adams y Yang (1979) en E.E.U.U. y por Lürssen et al. (1979) en Alemania. Ellos han podido comprobar que la formación del etileno a partir de la S-adenosil-metionina (SAM) tiene como producto intermedio el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), siendo este aminoácido el inmediato precursor del etileno, quedando establecida la siguiente ruta: Met \rightarrow SAM \rightarrow ACC \rightarrow etileno.

Uno de los caminos para probar si esta ruta realmente existe durante la biosíntesis del etileno, es correlacionar

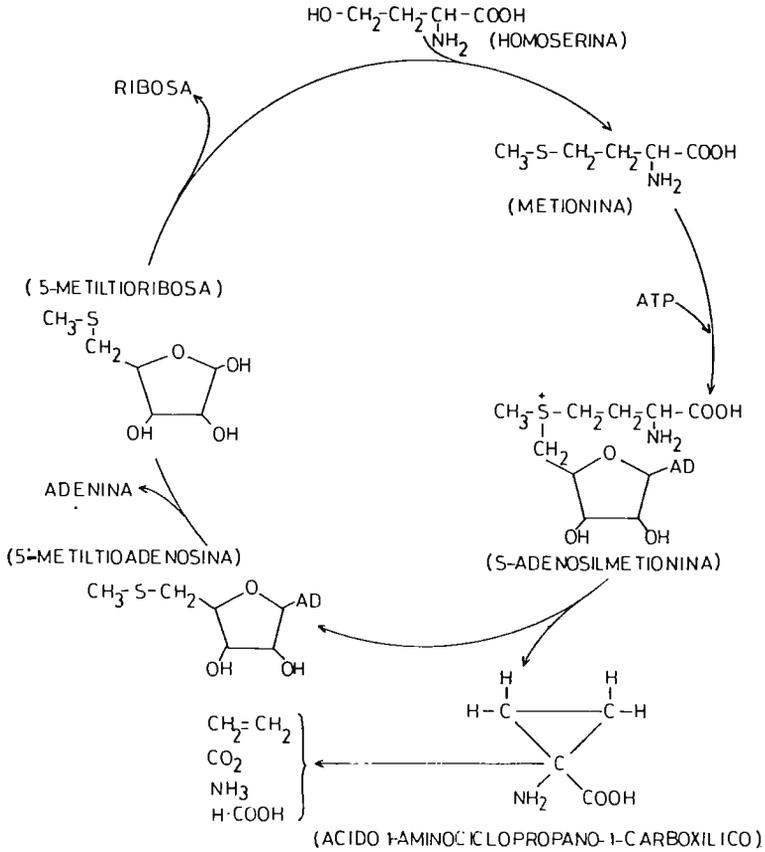


Figura 1: Esquema de la Biosíntesis del etileno a partir de la metionina en vegetales superiores.

la actividad y características de los tres enzimas que pueden catalizar las reacciones individuales desde la metionina al etileno, con la actividad y características del sistema sintetizante del etileno "in vivo".

Estos primeros pasos han sido seguidos en el caso del enzima que transforma Met en SAM, metionina-adenosil-transferasa, de flores senescentes de *Ipomoea tricolor* (Konze y Kende, - 1979 b), y para el enzima que actúa en el paso SAM \rightarrow ACC de -- frutos de tomate (Boller et al., 1979) cuya actividad es inhibida por los análogos de la rizobitoxina, tales como la aminoetoxivinilglicina (AVG), inhibidor típico de reacciones en que toma parte el fosfato de piridoxal (Boller et al., 1979). Sobre el mecanismo de conversión del ACC en etileno se tiene aún poca información, excepto que el proceso requiere oxígeno (Adams y Yang, 1979; Konze y Kende, 1979 a), ya que en un medio anaerobio se acumula ACC en los tejidos vegetales, y que es la parte de la ruta sintetizante del etileno más sensible al EDTA, n-propilgalato, cianuro y azida (Konze y Kende, 1979 a). El cloruro de cobalto y la catalasa inhiben el paso ACC a etileno (Konze y Kende, 1979 a).

Los mecanismos postulados por Adams y Yang (1979), y por Lürssen et al. (1979) para explicar la biosíntesis del etileno a partir de la metionina difieren sólo ligeramente. Según la hipótesis de Adams y Yang, el fosfato de piridoxal se une a la S-adenosilmetionina (SAM) como base de Schiff, liberándose aquél antes de formarse el ACC. Los autores sugieren que el -- oxígeno es transformado en H_2O_2 (o un hidropéroxido) por acción de una oxidasa y, posteriormente, en presencia de una peroxidasa el H_2O_2 rompe el anillo ciclopropano paso previo a la liberación del etileno. En la hipótesis de Lürssen, el fosfato de piridoxal permanece unido, como base de Schiff, al ACC hasta su --

degradación a etileno. Ellos hacen intervenir también al coenzima A.

Lógicamente, estos últimos descubrimientos nos han llevado a concebir que el sistema AIA-oxidasa/peroxidasa, sea precisamente el que actúe en la biosíntesis del etileno a partir de la metionina, en el paso ACC \rightarrow etileno, sobre todo teniendo presente el efecto reiteradamente mencionado en la bibliografía, de un incremento en la formación de etileno producido por AIA exógeno. Así quedaría perfectamente justificada la sorprendente dualidad de funciones del sistema enzimático objeto de nuestra atención.

II.2. La abscisión en el olivo

Ya hemos indicado que, hasta hace unos años, las únicas experiencias orientadas a resolver el problema de la recolección de la aceituna consistían en unos ensayos totalmente empíricos, de tratamientos de los árboles con un sinnúmero de sustancias, que se esperaba provocasen la caída selectiva de los frutos, sin afectar perniciosamente al árbol (caída de hojas, etc.). Estos estudios no merecen un mayor comentario.

Posteriormente, comenzaron a aplicarse al olivar los conocimientos adquiridos en otros árboles frutales, consistentes fundamentalmente en tratamientos con determinados compuestos que, incorporados al árbol, se descomponen originando etileno, cuyo papel decisivo en la maduración y senescencia ya se ha comentado. Entre los compuestos generadores de etileno utilizados están la cicloheximida, el ácido 2-cloroetilfosfónico (Ethephón, Ethrel), el 2-cloroetil-tris-(2-metoxietoxi)-silano (CGA-13586, Almol) y el 2-cloroetilsulfónico (Hól). Todos ellos causan abscisión de los frutos, pero simultáneamente ocasionan una

excesiva caída de hojas y reducen la floración en la primavera siguiente (Hartman y Heslop, 1968; Hartman et al. 1972, 1975, 1976; Lavee et al. 1973). Estas experiencias han ido acompañadas de estudios histoquímicos y ultraestructurales de la zona de abscisión (Reed y Hartman, 1976).

También debemos mencionar aquí el desarrollo de una maquinaria apropiada para someter a vibración a los árboles facilitando así la caída de los frutos.

El hecho de haberse propuesto medidas de actividades enzimáticas en extractos vegetales, con el fin de detectar deficiencias en elementos micronutrientes que forman parte de determinados enzimas (O'Sullivan et al. 1969) y la amplia experiencia en el Instituto de la Grasa sobre la determinación de elementos trazas en productos vegetales, hicieron a Vioque y Albi (1975) concebir la idea de seguir la evolución de los micronutrientes en el pedúnculo, desde la formación de la aceituna hasta su maduración y caída, pensando que alguno de ellos - estuviera implicado en algún sistema enzimático participante - en los procesos de abscisión, dando así los primeros pasos en este campo.

Estos autores siguieron la evolución de las concentraciones de hierro, cobre, manganeso y cinc en pedúnculos y aceitunas durante las campañas 1971-2 y 1972-3. Ellos no observaron cambios de los citados metales en las aceitunas, ni de cobre, manganeso y cinc en los pedúnculos. El hecho notable, observado, fue el aumento de la concentración de hierro en los pedúnculos, alcanzando su máximo valor cuando el fruto se ha desarrollado completamente, conservando aún su color -- verde.

Nuestros primeros trabajos se encaminaron a confirmar los resultados obtenidos en algunas experiencias hechas en el Instituto de la Grasa a partir del año 1971.

Pudimos comprobar, Figura 2, que la concentración de hierro en los pedúnculos aumenta notablemente a lo largo del -

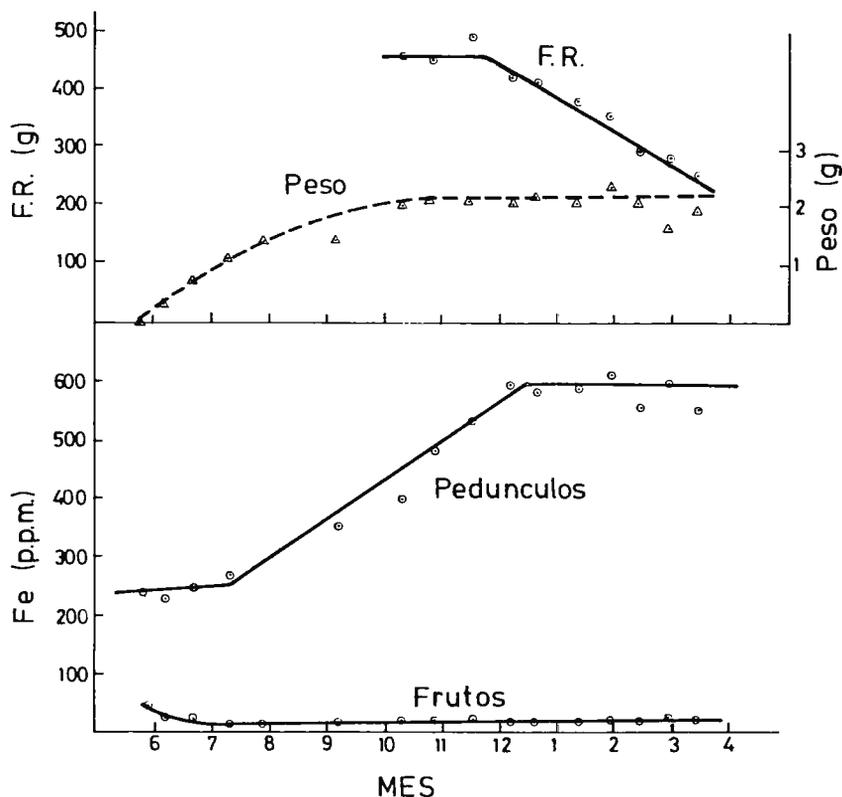


Figura 2: Evolución del contenido en hierro de pedúnculos y frutos, de la fuerza de ruptura -- (F.R.) y del peso de los frutos.

ciclo vegetativo, hasta alcanzar un valor máximo cuando el fruto se ha desarrollado completamente, momento en que comienza a disminuir, progresivamente, la fuerza necesaria para desprender las aceitunas. También volvió a observarse que la concentración de hierro en los frutos permanece prácticamente constante. Este aumento de la concentración del hierro en pedúnculos (confirmado en 3 ciclos vegetativos sucesivos), se asoció con un incremento de la concentración del enzima AIA-oxidasa, dada la naturaleza hemoproteica de este enzima y el hecho de venir atribuyéndosele la misión de reducir la concentración de auxina hasta niveles apropiados para que se provoque la abscisión.

Posteriormente pudimos detectar histoquímicamente, la presencia y acumulación de este sistema enzimático en la zona de abscisión pedúnculo-aceituna.

Estos hechos nos llevaron a centrar nuestra atención en el estudio del sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa presente en el olivo, con objeto de adquirir unos conocimientos más profundos en la fisiología de la abscisión. Como los resultados conseguidos en estos estudios (Vioque et al. 1978 a y 1978 b) nos han servido de base para el presente trabajo, recogemos a continuación las conclusiones más importantes obtenidas:

- 1) Se ha desarrollado un procedimiento que permite aislar y purificar parcialmente el sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa a partir de hojas y pedúnculos de olivo, consistente esquemáticamente en una trituración del material vegetal con tampón, precipitación de las proteínas con acetona fría y un tratamiento posterior del precipitado con polivinilpirrolidona (PvP).
- 2) El extracto así obtenido presenta actividades AIA-oxidasa y peroxidasa.

- 3) El sistema enzimático es termolábil, corriendo paralelos los efectos de la temperatura sobre ambas actividades enzimáticas.
- 4) La actividad AIA-oxidasa presenta inhibición por exceso de sustrato.
- 5) El pH tiene una clara influencia sobre las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa, siendo los valores óptimos 5,7 y 6,1, respectivamente.
- 6) La presencia de los cofactores diclorofenol (DCP) y Mn^{++} es indispensable para que se manifieste la actividad AIA-oxidasa.

El presente trabajo puede dividirse en dos partes. La primera, en la que se continúa con el estudio de las características del sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa del olivo, y la segunda, que pone de manifiesto la intervención de este sistema enzimático en el último paso de la biosíntesis del etileno.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Olivos

Se han utilizado olivos de unos 7 años de la variedad Picual.

III.2. Determinación de hierro

Se sigue el método espectrofotométrico de la ortofenantrolina según Vioque y Villagrán (1956).

III.3. Medida de la fuerza de ruptura de las aceitunas

Se utilizan dinamómetros apropiados (PEPSOLA), que permiten fijar las aceitunas, mientras se aplica una fuerza en la dirección misma del pedúnculo.

III.4. Obtención del extracto enzimático parcialmente purificado

Se sigue el método descrito por Vioque et al. (1978 a).

III.5. Medida de las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa

Se utilizan los métodos descritos por Vioque et al. - (1978 a).

Como medida de la actividad AIA-oxidasa se utiliza la velocidad inicial de destrucción del ácido indolacético (AIA) - durante la incubación de una cantidad conocida del mismo y una parte alícuota de extracto enzimático. La determinación del AIA residual se hace con ayuda de la reacción colorimétrica de Sal-kowski, modificada por Gordon y Weber (1951).

El método utilizado para medir la actividad peroxidasa está inspirado en el de Pilet y Lavanchy (1969), en el que se usa guayacol como reactivo.

III.6. Determinación de proteínas

El contenido proteínico de los extractos enzimáticos se determina siguiendo el método de Lowry et al. (1951), utilizando ovoalbúmina como patrón.

III.7. Ultrafiltración

Se ha utilizado un equipo de ultrafiltración UF-52 de Amicón y membranas XM-100 (retiene moléculas de peso molecular superior a 100.000), XM-50 (retiene moléculas de peso molecular por encima de 50.000) y UM-10 (retiene moléculas de peso molecular por encima de 10.000).

III.8. Cromatografía de filtración por gel

Se han utilizado columnas K 26/40 y K 26/100 de PHAR-MACIA. Los volúmenes de elución de las proteínas (V_e) se calcu-

laron registrando continuamente las absorbancias a 254 nm, y - la elución del sistema enzimático determinando las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa en alícuotas de las fracciones. El vo lumen vacío de la columna (V_0) se midió calculando el volumen de elución de una muestra de Azul Dextrano 2000 y el volumen to tal de la columna (V_t) se determinó calibrando la columna vacía con agua destilada.

III.9. Electroforesis

III.9.1. Isoelectroenfoque

Hemos operado con láminas de gel de poliacrilamida - (PAA), técnica horizontal, en accesorio FBE 3000 de PHARMACIA, con platina refrigerada con agua corriente. El gel tiene la - composición T = 5 %, C = 2,5 %, recomendada por Jeppsson et al. (1978) y un gradiente de pH de 3 a 10, conseguido por incorporación de anfolito LKB o PHARMACIA.

Las condiciones de trabajo son:

Preenfoque: 200 voltios, 1 hora.

A continuación de llevan las muestras.

Enfoque: 1ª fase, 200 voltios, 2 horas.

2ª fase, 400 voltios, 1 hora 30 minutos aprox.,

(el final se establece cuando dos muestras de citocromo C colocadas a cada extremo del gel coinciden).

Para medir el pH a lo largo de la lámina de gel, he mos utilizado un microelectrodo Ingold, realizando medidas cada cm.

El revelado de las bandas enzimáticas se hace por - sus actividades peroxidasa y AIA-oxidasa. La actividad peroxidasa se pone de manifiesto usando el reactivo recomendado por Schrauwen (1966), que contiene una mezcla de bencidina y gua-

yacol. La actividad AIA-oxidasa se revela con el reactivo recomendado por Hoyle (1977), que utiliza la propiedad del azul sólido BB (Fast Blue BB, FBBB) de reaccionar con los productos de la oxidación del AIA por el enzima, en un medio apropiado, en presencia de Mn^{++} y DCP.

III.9.2. Electroforesis en gel con gradiente de concentración de poliacrilamida

Hemos operado con láminas de geles prefabricadas, de PHARMACIA, del tipo 4/30, es decir, que se comienza el proceso en una zona de gel con un 4 % de poliacrilamida y se termina con un 30 %.

Como proteínas patrones hemos utilizado las colecciones suministradas por PHARMACIA y se opera con tampón tris-bórico-EDTA, pH 8,3-8,4, recomendado por PHARMACIA.

Las condiciones de trabajo fueron:

Equilibrio (sin muestras): 70 voltios, 20 minutos.

Preelectroforesis: 70 voltios, 20 minutos.

Electroforesis: 150 voltios, 15 horas.

Las proteínas se revelaron fijando con ácido sulfosalicílico al 10 % durante 30 minutos, tñiendo con coomassie G 250 al 0,02 % en ácido acético al 7 % durante la noche y destñiendo con el mismo ácido acético al 7 %. La actividad peroxidasa se revela como se ha indicado antes (Schrauwen, 1966).

III.10. Incubación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico con extracto enzimático

En un vial de 15 ml se colocan 50 μ l de ACC 1 M 6 - 100 mM, 200 μ l de fosfato de piridoxal 10 mM y se completa hasta 1 ml con tampón fosfato 0,02 M pH 5,7. Se agita durante 10 minutos a 30°C. Se añaden 0,5 ml de DCP 3 mM, 0,5 ml de Mn^{++} 3 mM, 1 ml de AIA 1 mM, una alícuota de extracto enzimático

y se completa hasta un volumen de 5 ml. Se cierra herméticamente y se incuba a 30°C en la oscuridad. Se toman muestras de 1 ml del espacio de cabeza con jeringa, periódicamente o a un tiempo determinado que se inyectan directamente en el cromatógrafo para determinar etileno. Se desprecia el etileno disuelto en la fase líquida.

III.11. Incubación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico con discos de hojas de olivo

En un vial de 15 ml se coloca 1 ml de ACC 1 mM junto con tres discos de hojas (diez mm Ø) y se cierra herméticamente. Se incuba a 30°C, en la oscuridad y se toman muestras para determinar etileno según se ha indicado en el apartado anterior.

III.12. Determinación del etileno

Cromatógrafo gaseoso con FID, columna de vidrio de 3 m X 3 mm Ø interno, Chromasorb 102, temperatura del horno -- 40°C, gas portador helio. Tiempo de retención del etileno 2 minutos.

Se construye una curva de calibrado partiendo de la mezcla azethyl de la Sociedad Española del Oxígeno (aproximadamente 5 % de etileno en nitrógeno).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Propiedades del sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo

IV.1.1. Influencia de la concentración de sustrato en la actividad peroxidasa

La misma cantidad de extracto enzimático se incuba con cantidades crecientes de H₂O₂ entre 0,08 y 4,80 mM, y se determinan las velocidades iniciales, obteniéndose de la repre

sentación de Lineweaver-Burk unos valores de $V = 0,24 \Delta A/\text{min}$ y una K_m para el H_2O_2 de $0,88 \text{ mM}$, (Figura 3).

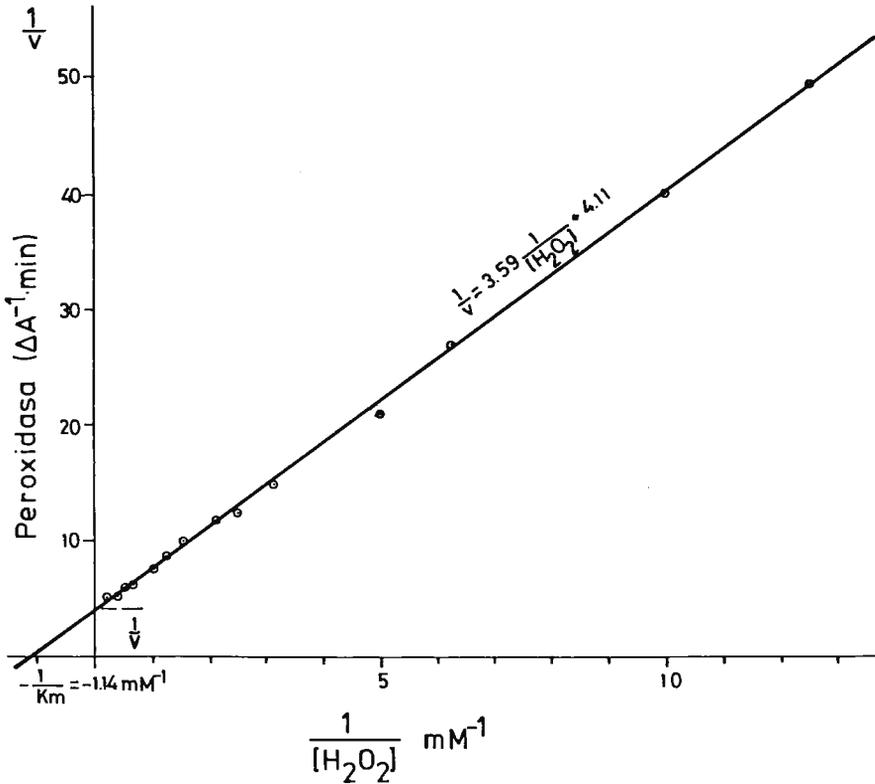


Figura 3: Influencia de la concentración de H_2O_2 en la actividad peroxidasa.

IV.1.2. Inhibidores

La supuesta presencia de un grupo hemo en el coenzima de este sistema enzimático, nos llevó a estudiar los efectos de algunos inhibidores de hemoproteínas tales como el cianuro, azida y EDTA. Se han estudiado los tipos y constantes de inhibición en ambas actividades enzimáticas. En este estudio se han empleado, indistintamente, las representaciones de Lineweaver-Burk, que relaciona inversos de velocidades iniciales con inversos de concentraciones de sustrato, sin inhibidor y a una concentración determinada del mismo; y la de Dixon, que relaciona inversos de velocidades iniciales con concentraciones de inhibidor, a dos concentraciones determinadas de sustrato. En algunos casos se han utilizado las dos representaciones, obteniéndose constantes de inhibición similares. La Tabla I resume

T A B L A I

TIPOS Y CONSTANTES DE INHIBICIÓN ENCONTRADOS PARA EL CIANURO, AZIDA Y EDTA EN LAS ACTIVIDADES AIA-OXIDASA Y PEROXIDASA

INHIBIDOR	AIA-OXIDASA	ACTIVIDAD	PEROXIDASA
	No-competitiva		Competitiva
Cianuro	$K_I = 3,92 \cdot 10^{-8} M$		$K_I = 7,3 \cdot 10^{-6} M$
	Competitiva		Competitiva
Azida	$K_I = 1,06 \cdot 10^{-3} M$		$K_I = 4,13 \cdot 10^{-3} M$
	Competitiva		Competitiva
EDTA	$K_I = 1,44 \cdot 10^{-4} M$		$K_I = 2,26 \cdot 10^{-6} M$

los tipos y constantes de inhibición encontrados en cada caso. Puede concluirse que el sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo presenta una marcada sensibilidad al cianuro, azida y EDTA típicos inhibidores de hemoproteínas.

Por otra parte, hemos estudiado también, el efecto de la acriflavina, un potente inhibidor específico de flavoproteínas (Hellerman et al., 1946; Murphy y O'hEocha, 1973 a, b y c), en el sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa, ante la posibilidad de la presencia de un grupo prostético flavina, como tienen algunas peroxidases de bacterias (Dolin, 1957).

En la actividad peroxidasa, la acriflavina $0,8 \mu\text{M}$, - produce un 40 % de inhibición. En la actividad AIA-oxidasa, la acriflavina $5 \mu\text{M}$, no sólo no ejerció inhibición alguna, sino - que la cantidad de AIA destruido, se incrementó ostensiblemente. Posteriormente, pudimos comprobar, como a la luz la acriflavina incrementa la velocidad de destrucción del AIA y, también, que la acriflavina sola es capaz de destruir el AIA, (Figura 4). La cantidad de AIA destruido durante la incubación en presencia de enzima + acriflavina es, aproximadamente, la suma del destruido por el enzima más el destruido por la acriflavina. En la oscuridad, la acriflavina no actúa.

En otros ensayos pudimos comprobar que la acriflavina necesita, también, para destruir el AIA, la presencia en el medio de incubación de los cofactores DCP y Mn^{++} .

Para asegurarnos de que la acriflavina destruye realmente al AIA, hemos seguido espectrofotométricamente, por absorción en el ultravioleta, el proceso. Los espectros de absorción correspondientes al ensayo AIA + acriflavina son idénticos a -- los del ensayo AIA + extracto enzimático de hojas.

En su conjunto, el comportamiento de la acriflavina -

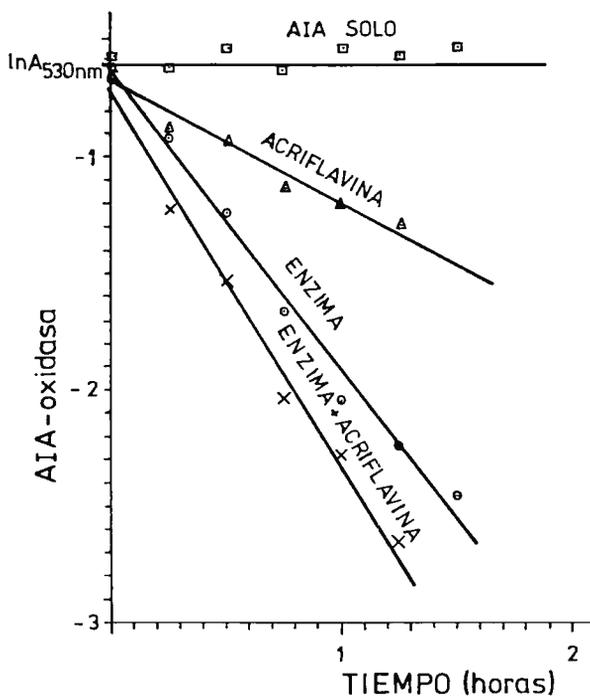


Figura 4: Efecto de la acriflavina a la luz, sobre la actividad AIA-oxidasa.

es análogo al encontrado por Galston (1948), y Galston y Baker (1949), para la riboflavina, capaz de oxidar al AIA bajo acción de la luz, pero no en la oscuridad, siendo también la reacción de primer orden, con una constante de velocidad, precisamente - del mismo orden de magnitud que la encontrada por nosotros para la acriflavina.

IV.1.3. Comportamiento en ultrafiltración

Se ha filtrado un extracto enzimático a través de las membranas XM-100, XM-50 y UM-10, siguiendo a Hoyle (1972), obteniéndose cuatro fracciones, cuyas actividades específicas AIA-oxidasa y peroxidasa se recogen en la Tabla II. Las fracciones

T A B L A I I

ACTIVIDADES AIA-OXIDASA Y PEROXIDASA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR ULTRAFILTRACIÓN DE UN EXTRACTO ENZIMÁTICO DE HOJAS DE OLIVO

FRACCIÓN	PESO MOLECULAR	ACTIVIDADES ESPECÍFICAS	
		AIA-OXIDASA	PEROXIDASA
UF 1	inferior a 10.000	-	-
UF 2	10.000 a 50.000	-	57,9
UF 3	50.000 a 100.000	1,36	444,7
UF 4	superior a 100.000	0,37	122,8

UF 3 y UF 4 presentan ambas actividades enzimáticas, siendo las actividades específicas de la fracción UF 3, 3,6 veces superiores a las de la fracción UF 4. Estos datos parecen indicar que ambas actividades son desarrolladas por el mismo enzima.

IV.1.4. Comportamiento en filtración por gel.

IV.1.4.1. Estudio de las actividades enzimáticas.

Con el fin de obtener una mayor información sobre las dos actividades exhibidas por el sistema enzimático se han realizado ensayos de filtración en gel de Sephadex. Se ha utilizado una columna de 33 X 2,6 cm de Sephadex G-100, equilibrada -- con tampón fosfato 0,02 M pH 6,1, por la que se pasaron volúmenes de 1 ml de extracto enzimático, eluyéndose con el mismo tampón a una velocidad de flujo de 0,3 a 0,4 ml/min, recogiendo fracciones de 2 ml mediante un colector automático de fracciones LKB.

Hemos podido comprobar, como ambas actividades eluyen juntas, lo que apoya la hipótesis de que ambas actividades son desarrolladas por el mismo enzima.

IV.1.4.2. Determinación del peso molecular.

Se ha determinado el peso molecular del sistema enzimático por filtración a través de una columna calibrada de Sephadex G-200 superfino de 91,1 X 2,6 cm, según Andrews (1964). Las proteínas patrones se filtraron en dos recorridos disueltas en 4 ml, con una concentración de 5 mg/ml, de cada proteína, estableciéndose la siguiente relación:

$$K_{av} = - 0,517 \log P_m + 2,917$$

Se aplicaron a la columna 4 ml de una preparación enzimática, que se eluyeron a una velocidad de 1,5 a 1,8 ml/hora, recogiendo fracciones de 2 ml, y se determinó el volumen de elución del sistema enzimático. De la Figura 5, se obtiene para el sistema enzimático un peso molecular de 54.100 Daltons. Tanto en este ensayo, como en los anteriores, se aprecian también picos con actividad mucho menores, en volúmenes de elu--

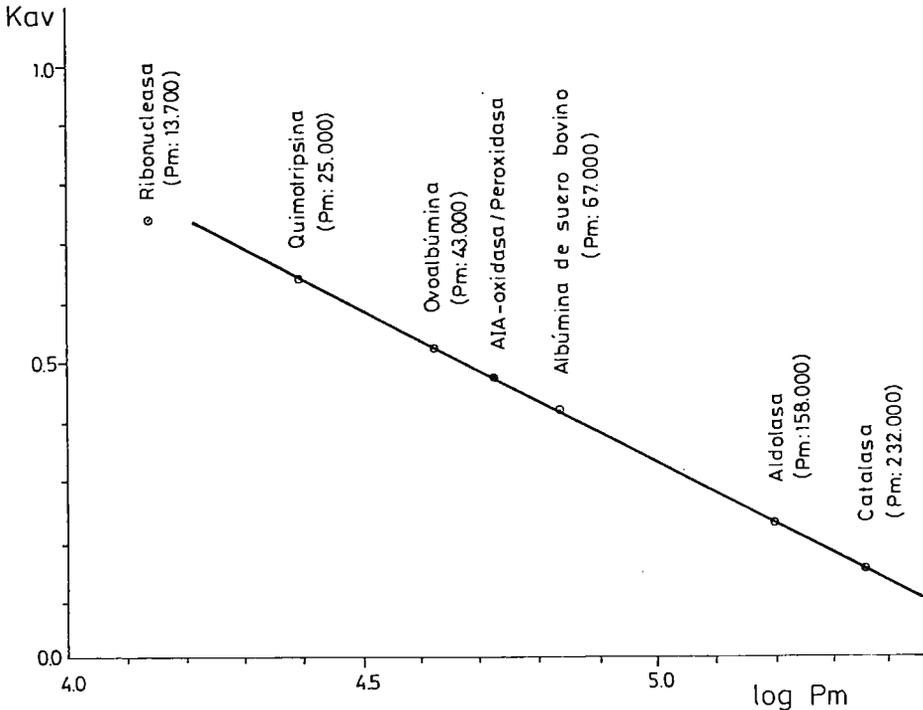


Figura 5: Peso molecular del sistema AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo.

ción a los que les corresponden pesos moleculares de 34.500 y 70.500 Daltons.

IV.1.5. Comportamiento electroforético

IV.1.5.1. Isoelectroenfoque

Hemos sometido a IEF un extracto enzimático y las fracciones con pesos moleculares de 10.000 a 100.000 y superior a - 100.000, obtenidas de él por ultrafiltración, revelando las bandas por su actividad peroxidasa.

La fracción de Pm entre 10.000 y 100.000 se comporta electroforéticamente como más pura, originando bandas nítidas y bien definidas correspondientes a isoenzimas con pI entre 4 y 7. La fracción con Pm superior a 100.000 no tiene un comportamiento electroforético correcto, quedando junto al lugar de aplicación de la muestra una gran cantidad de restos con actividad peroxidasa, que no llegan a formar bandas nítidas, pero que sí emigran ligeramente hacia el ánodo. Este comportamiento coincide con la idea de que el sistema enzimático se encuentra ligado a restos celulares. En el extrado original llegan a distinguirse las mismas bandas que en las dos fracciones, aunque debido a la menor concentración no alcanzan a verse todas las bandas.

También hemos revelado las bandas por su actividad AIA-oxidasa, comportándose análogamente a como lo hacen frente al reactivo de peroxidasa.

IV.1.5.2. Electroforesis en gel con gradiente de concentración de poliacrilamida.

Se someten a este proceso electroforético las proteínas patrones y la fracción de peso molecular entre 10.000 y - 100.000, aplicando 150 voltios durante 32 horas, para asegurarnos de que las bandas han alcanzado el "límite de poro". En este caso hemos utilizado la reacción de las peroxidasa por su mayor sensibilidad. Las proteínas patrones que se llevan simultáneamente en el gel se revelan con Coomassie, cortando el gel previamente al revelado. Operando bajo las condiciones citadas, pueden verse en esta fracción hasta cinco bandas, de las cuales dos son mucho más intensas, a las que les corresponden pesos moleculares de 10.600 y 56.600, coincidiendo con los máximos de actividad obtenidos en filtración por gel.

IV.1.6. Evolución del contenido en hierro y de las actividades enzimáticas AIA-oxidasa y peroxidasa durante el ciclo vegetativo

Cuando se han diferenciado claramente las aceitunas en los árboles (Junio) se ha iniciado un muestreo periódico, - cada quince días aproximadamente, de hojas y pedúnculos, para determinar sus contenidos en hierro y sus actividades AIA-oxidasa y peroxidasa. Los resultados obtenidos se recogen en la - Figura 6.

Puede observarse que, al igual que otras veces, el - contenido en hierro aumenta rápidamente con el desarrollo del fruto para hacerlo más lentamente cuando éste ha alcanzado su tamaño definitivo, llegando a estabilizarse con la maduración del mismo. También podemos observar que las actividades AIA-oxi- dasa y peroxidasa descienden al principio y aumentan en el úl- timo periodo del desarrollo, cuando el fruto comienza a madurar, alcanzando sus cotas más altas cuando del 90 al 100 % de las - aceitunas están moradas y va a comenzar, incluso, la abscisión espontánea de las mismas. Este aumento de la actividad enzimá- tica con la maduración era de esperar y ha sido observado por Frenkel (1972) en peras, tomates y arándanos.

IV.2. Sistema AIA-oxidasa/peroxidasa y biosíntesis del etileno

El descubrimiento en 1979 del ácido 1-aminociclopro- pano-1-carboxílico (ACC) como inmediato precursor del etileno, la hipótesis de Adams y Yang haciendo intervenir el H_2O_2 forma da previamente por una oxidasa en la ruptura del anillo de ci- clopropano previa a la liberación del etileno, así como el - que las características y propiedades fundamentales atribui- das al enzima presumiblemente activo en el paso ACC \rightarrow etileno,

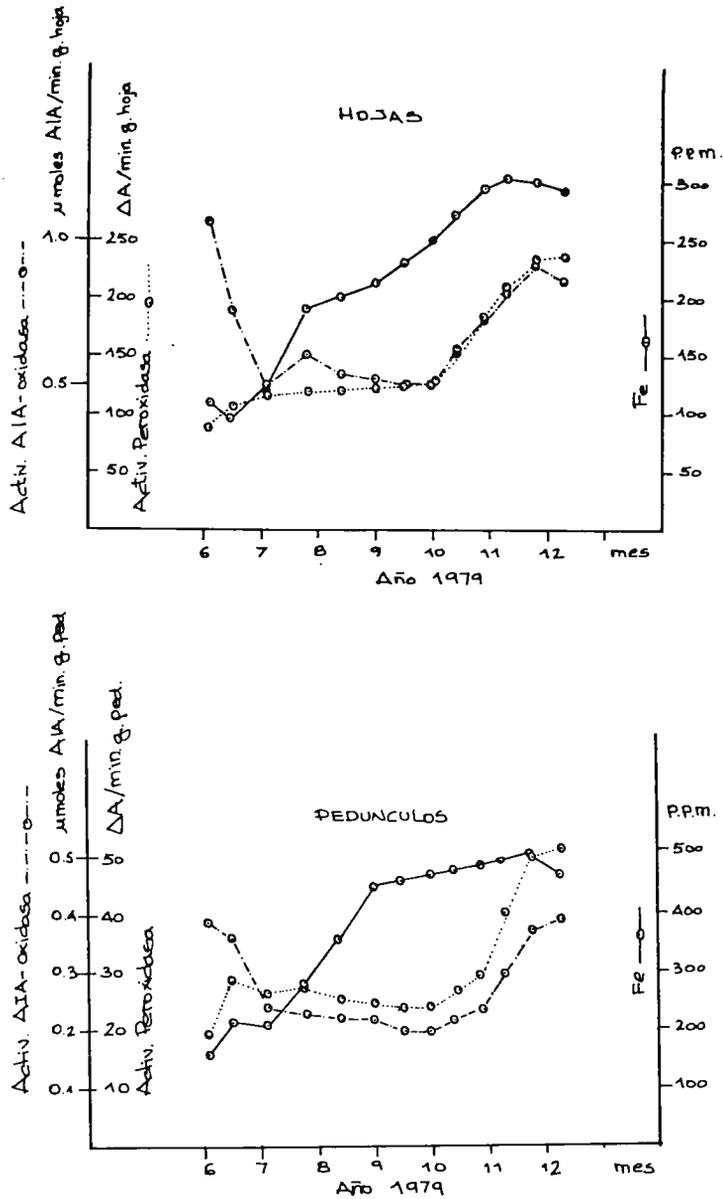


Figura 6: Evolución del contenido en hierro y de las actividades enzimáticas durante el ciclo vegetativo.

estudiadas muy recientemente, correspondan a las encontradas por nosotros para el sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa, nos hicieron suponer que este sistema enzimático fuese el que actuase "in vivo" en el paso ACC \rightarrow etileno.

Elo nos movió a realizar las experiencias "in vitro" e "in situ" que se recogen a continuación, con objeto de que pudieran servir de apoyo a esta hipótesis.

IV.2.1. Formación de etileno a partir del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico por el sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo.

La Tabla III recoge los resultados de una experiencia que pone de manifiesto la necesidad del fosfato de piridoxal para que el sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo libere etileno a partir del ACC.

En efecto, cuando se ponen a incubar discos de hojas de olivo con ACC (1mM), se produce una cantidad apreciable de etileno. En cambio, cuando un extracto enzimático de hojas de olivo se incubaba con ACC, incluso diez veces más concentrado, 10 mM, en las condiciones óptimas encontradas por nosotros para desarrollar su actividad AIA-oxidasa, sólo se libera etileno en una proporción muy pequeña.

Este comportamiento, junto con el hecho ya citado, de la intervención del fosfato de piridoxal en el paso $\text{SAM} \longrightarrow \text{ACC}$ (Adams y Yang, 1979 y Lüssen et al., 1979), -- permaneciendo la base de Schiff formada, en la interpretación de Lürssen et al., hasta la posterior descomposición del ACC, así como, el que el método descrito por Boller et al. (1979), para determinar ACC en extractos vegetales por una vía química, tiene como primer paso la unión del ACC al fosfato de piridoxal, nos hicieron suponer que tal vez fuera necesaria la interven--

T A B L A I I I

NECESIDAD DEL FOSFATO DE PIRIDOXAL EN LA FORMACIÓN DE ETILENO A PARTIR DEL ACC POR EL SISTEMA ENZIMÁTICO AIA-OXIDASA/PEROXIDASA DE HOJAS DE OLIVO

INCUBACIÓN	nmoles etileno/g peso fresco o mg proteína
Discos de hojas (x)	773,7
Extracto enzimático (xx)	42,4
Extracto enzimático + fosf. pirid. (0,4 mM)(xx)	845,8

Condiciones de incubación:

(x) ACC (1mM), 3 discos de hojas de olivo (10mm Ø, 60 mg), vo lumen total de incubación 1 ml; 30°C, oscuridad, 24 horas.

(xx) ACC (10 mM), AIA (0,2 mM), DCP (0,3 mM), Mn^{++} (0,3 mM), tampón fosfato (0,02 M, pH 5,7) y extracto enzimático - (96,7 μ g proteína), volumen total de incubación 5 ml; 30°C, oscuridad, 24 horas.

ción del fosfato de piridoxal para que el sistema enzimático AIA-oxidasa pudiese actuar sobre el ACC y generar etileno.

En la citada Tabla, puede observarse, como la adición de fosfato de piridoxal al medio de incubación, aumenta en 20 veces la producción de etileno.

Una vez demostrada la necesidad del fosfato de piridoxal, hemos estudiado la influencia de la concentración del mismo en la velocidad de formación de etileno. La Figura 7 - que representa los resultados obtenidos muestra que la concentración óptima de fosfato de piridoxal es 0,30 mM.

Por otra parte, hemos estudiado también los posibles efectos de la presencia del coenzima A, solo o junto --

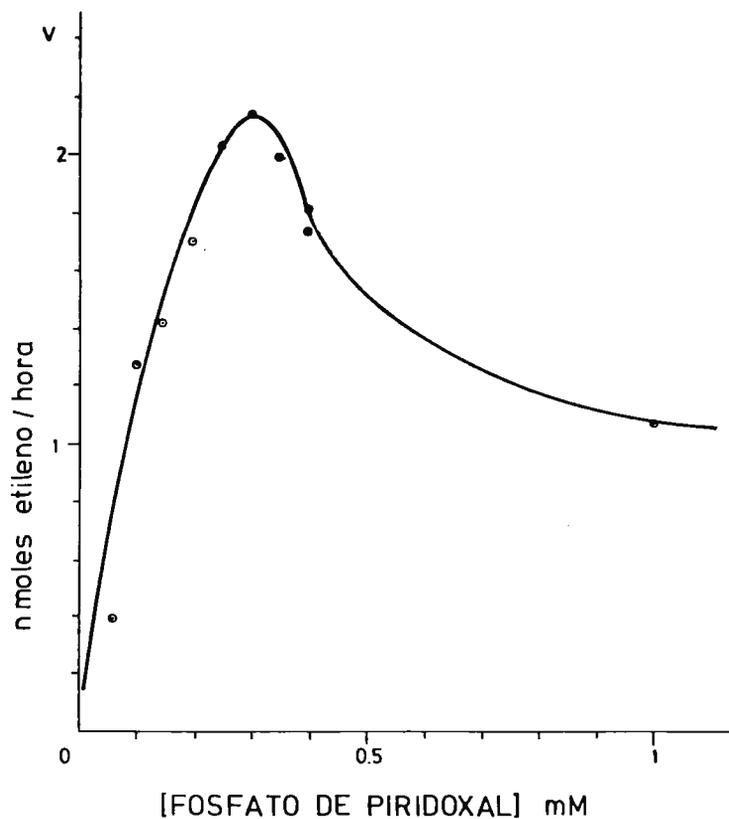


Figura 7: Influencia de la concentración de fosfato de piridoxal en la velocidad de formación de -- etileno a partir del ACC por el extracto enzimático de hojas de olivo.

con el fosfato de piridoxal, ante la sugerencia de su intervención en la ruta biosintética del etileno por Lürssen et al. (1979), pero no hemos observado influencia alguna.

La Tabla IV recoge una serie de experimentos que ponen de manifiesto la intervención del sistema enzimático en la liberación de etileno a partir del ACC.

En la Tabla IV (exp. nº 3 y 4) puede verse, la formación de cierta cantidad detectable de etileno, estando ausentes en la mezcla de incubación el extracto enzimático o el AIA. Este hecho lo explicamos por la posible formación, al estar -- presentes los iones Mn^{++} , de un complejo aminoácido-metal-fosfato de piridoxal del tipo descrito por Metzler et al. (1954), que a su vez podría generar etileno por vía no bioquímica. Efectivamente, omitiendo simultáneamente los iones Mn^{++} en la mezcla de incubación no se detecta formación alguna de etileno -- (tabla IV, exp. nº 5 y 6).

Por otra parte, la omisión en la mezcla de reacción de uno cualquiera de los cofactores clásicos, DCP o Mn^{++} , necesarios para el desarrollo de la actividad AIA-oxidasa, anula prácticamente la formación de etileno (tabla IV, exp. nº 7 y 8).

Los ensayos en atmósfera de nitrógeno o con extracto hervido (tabla IV, exp. 9 y 10), muestran una vez más, que se trata de un proceso aerobio y que el sistema enzimático es termolábil.

Un hecho plenamente confirmado y recogido en la bibliografía es el incremento de la producción de etileno por tejidos vegetales cuando estos se someten a tratamientos con AIA. Esta producción de etileno, inducida por el AIA, responde positivamente a las concentraciones crecientes de AIA, --

T A B L A I V

FORMACIÓN DE ETILENO A PARTIR DEL ACC POR EL SISTEMA ENZIMÁTICO AIA-OXIDASA/PEROXIDASA DE HOJAS DE OLIVO

Exp. nº	MEZCLA DE INCUBACIÓN	nmoles etileno/ mg proteína
1	Completa	845,8
2	Sin ACC	0,0
3	Sin extracto enzimático	24,5
4	Sin AIA	18,5
5	Sin extracto enzim. y Mn^{++}	0,0
6	Sin AIA y Mn^{++}	0,0
7	Sin DCP	9,8
8	Sin Mn^{++}	4,2
9	En atmósfera de nitrógeno	7,6
10	Extracto enzimático hervido	36,7

Condiciones de incubación:

ACC (10 mM), fosfato de piridoxal (0,4 mM), AIA (0,2 mM), DCP (0,3 mM), Mn^{++} (0,3 mM), tampón fosfato (0,02 M, pH 5,7) y -- extracto enzimático (96,7 μ g proteínas), volumen total de incubación 5 ml; 30°C, oscuridad, 24 horas.

- - - - -

hasta ciertos valores de éstas, a partir de los cuales la producción disminuye (Lieberman, 1979). Este fenómeno, junto con el hecho puesto de manifiesto por nosotros y otros autores de presentar el sistema AIA-oxidasa inhibición por exceso de sutrato, nos llevó a estudiar la influencia de la concentración de AIA sobre la velocidad de formación de etileno a partir del ACC.

Cuando se incubaba ACC con extracto enzimático de hojas de olivo según se indica en Materiales y Métodos (apart. III.11.), con concentraciones crecientes de AIA, entre 0,025 y 1,2 mM, la velocidad de formación de etileno aumenta con las concentraciones crecientes de AIA hasta 0,4 mM, a partir de aquí la producción de etileno disminuye. La Figura 8 recoge los resultados obtenidos.

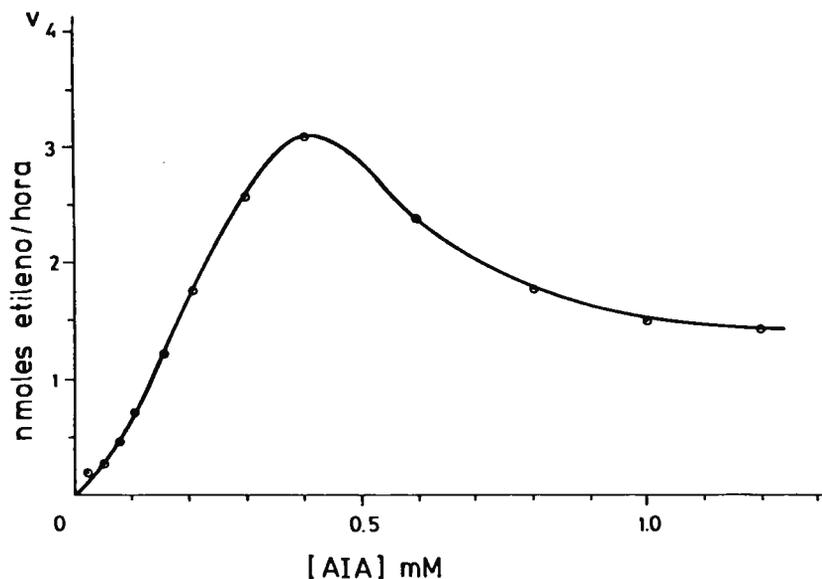


Figura 8: Influencia de la concentración de AIA en la velocidad de formación de etileno a partir de ACC por el extracto enzimático de hojas de olivo.

La Tabla V recoge los efectos de diversos inhibidores típicos del sistema AIA-oxidasa, en la formación de etileno a partir del ACC. Se incubó ACC con extracto enzimático según se indica en Materiales y Métodos (apart. III. 11.) con distintas cantidades de los inhibidores indicados. La velocidad de formación de etileno en presencia de los inhibidores se representa frente a las concentraciones de inhibidor, deduciéndose gráficamente de estas representaciones las concentraciones de cada inhibidor que producen el 50 % de inhibición.

T A B L A V

INHIBIDORES DE LA PRODUCCIÓN DE ETILENO A PARTIR DEL ACC "in vitro"

INHIBIDOR	Margen de concentración	Concentración que produce el 50 % de inhibición
CoCl_2	1 μM - 50 μM	37 μM
KCN	10 μM - 2 mM	212 μM
NaN_3	0,1 mM - 7 mM	5,9 mM
EDTA	50 μM - 250 μM	32 μM
Catalasa	5 μg - 20 μg	4,9 μg

Condiciones de incubación:

ACC (1 mM), fosfato de piridoxal (0,3 mM), AIA (0,2 mM), DCP -- (0,3 mM), Mn^{++} (0,3 mM), tampón fosfato (0,02 M, pH 5,7), extracto enzimático (57,1 μg proteínas) e inhibidor, volumen total de incubación 1 ml; 30°C, oscuridad, medidas periódicas.

IV.2.2. Formación de etileno a partir del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico por tejidos de olivo

La Tabla VI muestra como discos de hojas de olivo, in-

cubados con ACC 1 mM, liberan hasta 160 veces más etileno que con agua sola (ACC endógeno), mientras que segmentos de pedúnculos y rodajas de aceitunas (de frutos pequeños, inmaduros) liberan menos etileno.

También recoge la Tabla VI el efecto que, sobre la liberación de etileno, tienen la ausencia de oxígeno y la inmersión,

T A B L A V I

FORMACIÓN DE ETILENO A PARTIR DEL ACC POR TEJIDOS DE OLIVO

MUESTRA	nmoles etileno/ g peso fresco
Discos de hojas + ACC	773,7
Discos de hojas sin ACC exógeno	4,7
Discos de hojas + ACC en atmósfera de nitrógeno	0,0
Discos de hojas hervidos + ACC	0,0
Segmentos de pedúnculos + ACC	73,5
Rodajas de aceitunas + ACC	6,6

Condiciones de incubación:

ACC (1mM), volumen total de incubación 1 ml; 30°C, oscuridad, 24 horas. Se han utilizado 3 discos de 10 mm Ø (aprox. 60 mg), segmentos de pedúnculos (aprox. 60 mg) o rodajas de aceitunas (aprox. 60 mg).

durante dos minutos, de los discos de hoja en agua hirviendo. Se confirma, una vez más, como el paso ACC → etileno requiere oxígeno y como interviene un sistema enzimático termolábil.

Los discos de hojas de olivo, triturados con agua o un tampón apropiado, pierden su capacidad para liberar etileno a partir del ACC, al igual que encuentran Lürssen et al. (1979) en otros tejidos vegetales. Este fenómeno fue interpretado por estos autores como prueba de que era necesaria la estructura organizada, intacta, de los tejidos para la reacción de la liberación de etileno. Nuestras experiencias con extractos parcialmente purificados de hojas de olivo ponen claramente de manifiesto que no es correcta esa interpretación. Nosotros pensamos que, - al destruirse las estructuras celulares se ponen en libertad - sustancias, especialmente polifenoles, que inhiben la actividad enzimática AIA-oxidasa, y consecuentemente, cesa la formación de etileno. Esta misma interpretación fue dada por Ku, Yang y Pratt (1969), estudiando la formación de etileno a partir de --KMB, por incubación con extractos crudos de tomate.

La Tabla VII recoge la acción "in situ" de los mismos inhibidores estudiados anteriormente en los ensayos con extractos enzimáticos de hojas de olivo. En este ensayo los inhibidores se han estudiado a una concentración fija (10 μ M, catalasa 5 μ g), y se ha llevado a la Tabla la inhibición en %. Puede observarse que también se encuentra inhibición en los ensayos realizados "in situ" por los mismos inhibidores estudiados "in vitro".

IV.2.3. Nuestra hipótesis

Los resultados recogidos en los apartados IV.2.1. y IV.2.2., ponen de manifiesto que el sistema AIA-oxidasa, aislado de hojas de olivo y convenientemente purificado, en presencia de su sustrato, AIA, y de los cofactores, DCP y Mn^{++} , es capaz de liberar etileno a partir del ACC, en presencia de fosfato de piridoxal.

T A B L A VII

INHIBIDORES DE LA PRODUCCIÓN DE ETILENO A PARTIR DEL ACC POR DISCOS DE HOJAS DE OLIVO

INHIBIDOR	% inhibición
CoCl ₂	40
KCN	27
NaN ₃	42
EDTA	23
Catalasa	44

Condiciones de incubación:

ACC (1 mM), 3 discos de hojas de olivo (10 mm Ø, 60 mg) e inhibidor (10 µM; catalasa 5 µg), volumen total de incubación 1 ml; 30°C, oscuridad, medidas periódicas.

- - - - -

Las características y propiedades fundamentales de este sistema, estudiados por nosotros, corresponden a las atribuidas recientemente (Adams y Yang, 1979; Lürssen et al. 1979; y -- Konze y Kende, 1979 a) al enzima presumiblemente activo en el último paso de la biosíntesis del etileno (ACC → etileno).

Igualmente, el paralelismo existente entre las inhibiciones encontradas al estudiar la destrucción del AIA por el sistema AIA-oxidasa del olivo, las encontradas, y recogidas aquí -- (Tabla V), en las experiencias "in vitro" de formación de etileno por acción de la AIA-oxidasa del olivo sobre el ACC y las, -- asimismo, puestas de manifiesto en los ensayos "in situ" con discos de hojas y ACC (Tabla VII), apuntan a que este sistema enzi-

mático sea el que actúe "in vivo" en la última fase de la ruta biosintética del etileno.

Consideramos muy interesante el papel desempeñado por el fosfato de piridoxal, incrementando la liberación de etileno (unas veinte veces). En primer lugar, es una confirmación de la hipótesis, ampliamente sostenida por diversos autores de ser necesaria su intervención en el paso SAM \longrightarrow ACC, para explicar la inhibición producida por la aminoetoxivinilglicina (AVG), típica de reacciones en que toma parte el fosfato de piridoxal, - y, especialmente, un apoyo al esquema de Lürssen et al. (1979), quienes suponen que el fosfato de piridoxal permanece unido, como base de Schiff, al ACC hasta su degradación a etileno.

En nuestras experiencias, siguiendo a Boller et al. (1979), hemos hecho reaccionar previamente el ACC con el fosfato de piridoxal, antes de su incubación con el sistema enzimático. También hemos investigado la marcha de la liberación de etileno, agregando simultáneamente el fosfato de piridoxal y el extracto enzimático, observando que, en este caso, la velocidad inicial de formación de etileno es mucho más lenta, si bien, al cabo de 24 h. las cantidades de etileno formadas son, prácticamente iguales.

Sobre el posible mecanismo de la reacción que rompiendo el anillo de ciclopropano, pone en libertad al etileno, arroja luz la inhibición por la catalasa, que hemos encontrado tanto en los ensayos "in vitro" con extracto enzimático, como "in situ" con discos de hojas. Este comportamiento de la catalasa apunta a favor de la hipótesis expuesta por Adams y Yang (1979), que hace intervenir el agua oxigenada, formada previamente por una oxidasa, en la ruptura del anillo de ciclopropano en presencia de una peroxidasa. No cabe duda de que, precisamente, - el sistema AIA-oxidasa ha mostrado siempre, ante la perplejidad

de los investigadores que de él se han ocupado (Hoyle, 1972), esta dualidad de funciones oxidativa y peroxidativa.

Sin embargo, nosotros nos inclinamos por la intervención, no del agua oxigenada, sino de algún radical peroxídico, análogo a los descritos por Fox et al. (1975), en la degradación oxidativa del AIA por la peroxidasa del rábano (HRP), y a los que también hacen intervenir Mapson y Wardale (1972), interpretando los resultados de sus investigaciones sobre el papel del AIA en la formación de etileno a partir de KMB, por peroxidasa de rábano (HRP).

La intervención del sistema AIA-oxidasa y su sustrato, AIA, en este paso de la biosíntesis del etileno, explica--ría, también, el fenómeno plenamente confirmado de un incremento en la producción de etileno por tejidos vegetales, cuando se someten a tratamiento con AIA. Esta producción de etileno, inducida por el AIA, responde positivamente a las concentraciones crecientes de AIA, hasta ciertos valores de éstas, a partir de los cuales la producción disminuye, (Lieberman, 1979). Nosotros hemos visto como el AIA produce este efecto en la liberación de etileno a partir del ACC por el extracto enzimático de hojas de olivo. Este comportamiento se corresponde con el -hecho, puesto de manifiesto por nosotros y otros autores (Zmrhal y Machácková, 1979), de presentar el sistema AIA-oxidasa inhibición por exceso de sustrato. Este punto de vista no coincide con el expuesto por Yu y Yang (1979), quienes opinan que el -AIA ejerce su efecto estimulante sobre la producción de etileno al inducir la síntesis del enzima responsable de la conversión de SAM en ACC.

IV.2.4. Provocación de la abscisión de las aceitunas, por formación de etileno, "in situ", en ramas de olivo tratadas con ACC

Para comprobar la rápida formación de etileno a partir del ACC que es de esperar por ser éste su inmediato precursor en su ruta biosintética, se planteó la experiencia que a continuación se describe.

Se separaron cuatro ramas parecidas, con unas 14 aceitunas, del mismo olivo. Las aceitunas estaban terminando su desarrollo, pero lejos aun de comenzar su maduración. Dos de ellas fueron pulverizadas con 5 ml de disoluciones al 0,04 % de Triton X-100 (agente humectante), una de las cuales contenía ACC 10 mM (1mg/ml), ajustadas a pH 5,7. Estas dos ramas pulverizadas, junto con una tercera sin tratar, fueron introducidas en sendas botellas de cristal, de 2 litros de capacidad, con unos 50 ml de agua en el fondo donde se sumergían sus extremos inferiores. Las botellas se cerraron herméticamente con doble papel parafinado y se colocaron en cámara oscura a 30°C. En la cuarta rama se determinaron las fuerzas de ruptura de los pedúnculos de aceituna.

A las veinticuatro horas del tratamiento, se tomaron muestras de 1 ml del aire contenido en las botellas y se inyectaron en la columna del cromatógrafo de gas. El aire que rodeaba a la rama tratada con ACC, de la que se había desprendido de forma natural una aceituna, contenía etileno mientras que las otras dos ramas no habían producido liberación alguna de este gas. Se taparon nuevamente los botes y se llevaron a la cámara oscura.

A las cuarenta y ocho horas de las pulverizaciones se volvieron a repetir las medidas de etileno liberado (de la

rama tratada con ACC había ya cuatro aceitunas caídas) que reprodujeron los resultados del día anterior: liberación de etileno por la rama pulverizada con ACC y no liberación por parte de las otras dos ramas.

Una vez hechas estas medidas, se extrajeron las ramas de las botellas y se sacudieron ligeramente. Después se sacudieron más fuertemente y, por último, con el dinamómetro se midió las fuerzas de ruptura de los pedúnculos de las aceitunas aun retenidas (F.R.).

De las 14 aceitunas que, originalmente tenía la rama tratada con ACC, 4 de ellas habían caído de forma natural en las 48 horas de permanencia en la cámara oscura, 9 cayeron al sacar la rama o al sacudirla muy ligeramente y sólo una de ellas necesitó una tracción de 80 gramos con el dinamómetro. Al sacudir la rama se cayeron dos hojas.

De las otras dos ramas no se cayó ninguna aceituna ni con fuertes sacudidas, teniendo que recurrir al arranque con el dinamómetro; de la mojada con Tritón se desprendieron dos hojas. En la Tabla VIII se recogen las F.R. medias de los tratamientos y la significación de sus diferencias.

No cabe duda de que la experiencia ha sido francamente interesante y prometedora, ya que, además de poner de manifiesto la formación de etileno por la planta a partir del ACC exógeno, ha mostrado que, sin producirse defoliación, las aceitunas pueden desprenderse con facilidad a las 48 horas del tratamiento.

T A B L A V I I I

EFFECTOS DEL ACC SOBRE LAS FUERZAS NECESARIAS PARA SEPARAR EL -
FRUTO

Muestra	Fuerzas ruptura (g)		
Rama inicial	269,3	a(x)	A(xx)
Rama sin tratar	237,9	a	AB
Rama con tritón	187,1	a	B
Rama con tritón y con ACC	5,7	b	C

(x) Los números seguidos por diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes al nivel del 1 % (prueba de t).

(xx) Los números seguidos por diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes al nivel del 5 % (prueba de t).

V. CONCLUSIONES

1. Se han estudiado algunas características importantes del sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo. Merecen destacarse:
 - a) Dualidad de funciones enzimáticas AIA-oxidasa y peroxidasa, incluso a nivel de isoenzimas.
 - b) Inhibición de ambas actividades enzimáticas por cianuro, azida y EDTA, lo que parece confirmar la presencia de hierro en el sistema enzimático.
 - c) La acriflavina, no sólo no ejerce inhibición de la actividad AIA-oxidasa, sino que, a la luz, destruye al AIA. En cambio, sí inhibe la actividad peroxidasa.
 - d) En cromatografía de filtración por gel, ambas actividades eluyen juntas.
 - e) El sistema enzimático está formado por un componente mayor, al que por cromatografía de filtración por gel le corresponde un peso molecular algo superior a 50.000 - Daltons.
 - f) En electroforesis en gel con gradiente de concentración de poliacrilamida se obtienen cinco bandas de las cuales dos son mucho más intensas, a las que les corresponden pesos moleculares de 56.600 y 70.600 Daltons.
 - g) En isoelectroenfoque se obtienen bandas con actividades enzimáticas correspondientes a isoenzimas con pI entre 4 y 7.
2. El sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo, bajo las condiciones óptimas para desarrollar su actividad, es capaz de liberar etileno a partir del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), su inmediato precursor en la ruta biosintética en vegetales superiores, --

siendo necesaria la presencia del fosfato de piridoxal.

3. Diversos tejidos del olivo, especialmente discos de hojas, son capaces de liberar etileno cuando se incuban con disolución de ACC.
4. En ambos ensayos "in vitro" e "in situ", la liberación de etileno es inhibida por los mismos compuestos que impiden el desarrollo de las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa.
5. Un tratamiento "in situ" de ramas de olivo con ACC, pone de manifiesto la liberación de etileno a partir del aminoácido. Después de 48 horas del tratamiento, las aceitunas caen espontáneamente o se desprenden con facilidad, sin producirse defoliación.
6. Se emite la hipótesis de que el sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa sea activo "in vivo" en el último paso de la ruta biosintética del etileno en los vegetales superiores: ACC \longrightarrow etileno. Esta hipótesis explicaría la presencia del sistema enzimático en la zona de abscisión, su dualidad de funciones, el aumento de su concentración con la maduración y la inducción de la formación de etileno en tejidos vegetales por el AIA.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D.O. y S.F. Yang. 1977. *Plant Physiol.* 60: 892
- Adams, D.O. y S.F. Yang. 1978. *Plant Physiol. Suppl.* 61: 90
- Adams, D.O. y S.F. Yang. 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 170
- Addicott, F.T. 1961. "Handbuch der Pflanzenphysiologie" XIV. W. Ruhland (ed). Springer-Verlag. Berlin. Gottingen. Heidelberg, p. 829
- Addicott, F.T. 1965. "Handbuch der Pflanzenphysiologie" XV/2. W. Ruhland (ed). Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York, p. 1094
- Andrews, P. 1964. *Biochem. J.* 91: 222
- Baird, L.A.M. y B.D. Webster. 1979. *Hortic. Rev.* 1: 172
- Boller, Th., R.C. Herner y H. Kende. 1979. *Planta* 145: 293
- Carns, H.R. 1966. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 17: 295
- Catalina, L., R. Sarmiento y M. Valpuesta. 1972. *An. Edafol. Agrobiol.* 31: 607
- Dolin, M.I. 1957. *J. Biol. Chem.* 225: 557
- Fox, L.R., W.K. Paves y H.I. Nakada. 1965. *Biochem.* 4: 2754
- Frenkel, C.H. 1972. *Plant Physiol.* 45: 620
- Frenkel, C.H. y R. Dyck. 1973. *Plant Physiol.* 51: 6
- Galston, A.W. 1948. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.)* 35: 1017
- Galston, A.W. y R.S. Baker. 1949. *Am. J. Bot.* 36: 773
- Gordon, S.A. y R.P. Weber. 1951. *Plant Physiol.* 26: 192
- Hale, C.R. 1968. *Aust. J. Agr. Res.* 19: 939
- Hale, C.R., B.G. Coombe y J.S. Hawker. 1970. *Plant Physiol.* 45: 620
- Hartmann, H.T., M. El-Hamady y J. Whisler. 1972. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 97: 781
- Hartmann, H.T. y A.J. Heslop. 1968. *Calif. Agr.* 23: 14

- Hartmann, H.T., W. Reed y K. Opitz. 1976. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 101: 278
- Hartmann, H.T., W. Reed, J. Whisler y K.W. Opitz. 1975. *Calif. Agr.* 29: 4
- Hellerman, L., A. Lindsay y M.R. Bovarnick. 1846. *J. Biol. - Chem.* 163: 553
- Hoyle, M.C. 1972. *Plant Physiol.* 50: 12
- Hoyle, M.C. 1977. *Plant Physiol.* 60: 787
- Jacobs, W.P. 1962. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 13: 403
- Jeppsson, J.O., B. Franzén y K.O. Nilsson. 1978. *Sci. Tools* 25: 69
- Konze, J.R. y H. Kende. 1979 a. *Planta* 146: 293
- Konze, J.R. y H. Kende. 1979 b. *Plant Physiol.* 63: 507
- Ku, H.S., S.F. Yang y H.K. Pratt. 1969. *Phytochem.* 8: 567
- Laibach, F. 1933. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 51: 386
- Larsen, P. 1936. *Planta* 25: 311
- Lavee, S., G. Barshi y A. Haskal. 1973. *Sci. Hort.* 1: 63
- Lieberman, M. 1979. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30: 533
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. *J. Biol. Chem.* 193: 265
- Lürssen, K., K. Naumann y R. Schröder. 1979. *Z. Pflanzenphysiol.* 92: 285
- Macnicol, P.K. 1973. *Phytochem.* 12: 1269
- Mapson, L.W. y D.A. Wardale. 1972. *Phytochem.* 11: 1371
- Metzler, D.E., M. Ikawa y E.E. Snell. 1954. *J. Am. Chem. Soc.* 76: 648
- Murphy, M.J. y C. O'hEocha. 1973 a. *Phytochem.* 12: 55
- Murphy, M.J. y C. O'hEocha. 1973 b. *Phytochem.* 12: 61
- Murphy, M.J. y C. O'hEocha. 1973 c. *Phytochem.* 12: 2645
- O'Sullivan, M., M.J. Flynn y F.J. Codd. 1969. *Ir. J. Agric. Res.* 8: 111

- Overbeek, J. van. 1961. "Handbuch der Pflanzenphysiologie". XIV. W. Ruhland (ed). Springer-Verlag. Berlin. Göttingen. Heidelberg. p. 1137
- Pilet, P.E. y P. Lavanchy. 1969. *Physiol. Veg.* 7: 19
- Poovaiah, B.W., H.P. Rasmussen y M.J. Bukovac. 1973. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 98: 16
- Reed, N.R. y H.T. Harman. 1976. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 101: 633
- Ridge, I. y D.J. Osborne 1970 a. *J. Expte. Bot.* 21: 720
- Ridge, I. y D.J. Osborne 1970 b. *J. Expte. Bot.* 21: 843
- Rubinstein, R. y A.C. Leopold. 1964. *Quart. Rev. Biol.* 39: 356
- Schrauwen, J. 1966. *J. Chromatog.* 23: 180
- Sequeira, L. e I. Mineo. 1966. *Plant Physiol.* 41: 1200
- Siegel, B.Z. y A.W. Galston. 1967. *Science* 157: 1557
- Vendrell, M. 1969. *Aust. J. Biol. Sci.* 22: 601
- Vioque, A. y M.A. Albi. 1975. *Grasas y Aceites* 26: 73
- Vioque, A., M.A. Albi y B. Vioque. 1978. *Grasas y Aceites* 29: 391
- Vioque, A., M.A. Albi y B. Vioque. 1978. *Grasas y Aceites* 29: 397
- Yu, YB. y S.F. Yang. 1979. *Plant Physiol.* 64: 1074
- Zmrhal, Z. e I. Machácková. 1979. *Phytochem.* 17: 1517



FUNDACION JUAN MARCH

SERIE UNIVERSITARIA

TITULOS PUBLICADOS

Serie Verde

(Matemáticas, Física, Química, Biología, Medicina)

- 2 Mulet, A.:
Estudio del control y regulación, mediante un calculador numérico, de una operación de rectificación discontinua.
- 4 Santiuste, J. M.:
Combustión de compuestos oxigenados.
- 5 Vicent López, J. L.:
Películas ferromagnéticas a baja temperatura.
- 7 Salvá Lacombe, J. A.:
Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental.
- 8 Plá Carrera, J.:
Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos.
- 11 Drake Moyano, J. M.:
Simulación electrónica del aparato vestibular.
- 19 Purroy Unanua, A.:
Estudios sobre la hormona Natriurética.
- 20 Serrano Molina, J. S.:
Análisis de acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-adrenérgicos.
- 22 Pascual Acosta, A.:
Algunos tópicos sobre teoría de la información.
- 25 I Semana de Biología:
Neurobiología.
- 26 I Semana de Biología:
Genética.
- 27 I Semana de Biología:
Genética.
- 28 Zugastl Arbizu, V.:
Analizador diferencial digital para control en tiempo real.
- 29 Alonso, J. A.:
Transferencia de carga en aleaciones binarias.
- 30 Sebastián Franco, J. L.:
Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.
- 39 Blasco Olcina, J. L.:
Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos.
- 44 Sánchez Rodríguez, L.:
Estudio de mutantes de saccharomyces cerevisiae.
- 45 Acha Catalina, J. I.:
Sistema automático para la exploración del campo visual.
- 47 García-Sancho Martín, F. J.:
Uso del ácido salicílico para la medida del pH intracelular.
- 48 García García, A.:
Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina.
- 49 Trillas, E., y Alsina C.:
Introducción a los espacios métricos generalizados.
- 50 Pando Ramos, E.:
Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados.
- 51 Orozco, F., y López-Fanjul, C.:
Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la mejora.

- 52 Gallego Fernández, A.:
Adaptación visual.
- 55 Castellet Solanas, M.:
Una contribución al estudio de las teorías de cohomología generalizadas.
- 56 Sánchez Lazo, P.:
Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales.
- 57 Carrasco Llamas, L.:
Estudios sobre la expresión genética de virus animales.
- 59 Afonso Rodríguez, C. N.:
Efectos magneto-ópticos de simetría par en metales ferromagnéticos.
- 63 Vidal Costa, F.:
A la escucha de los sonidos cerca de T_λ en el 4_{Fe} líquido.
- 65 Andrés Morales, J. M.:
Una proteína asociada a membrana y sus subunidades.
- 66 Blázquez Fernández, E.:
Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para insulina y glucagón.
- 69 Vallejo Vicente, M.:
Razas vacunas autóctonas en vías de extinción.
- 76 Martín Pérez, R. C.:
Estudio de la susceptibilidad magnetoeléctrica en el Cr_2O_3 policristalino.
- 80 Guerra Suárez, M.ª D.:
Reacción de Amidas con compuestos organoaluminicos.
- 82 Lamas de León, L.:
Mecanismo de las reacciones de iodación y acoplamiento en el tiroideo.
- 84 Repollés Moliner, J.:
Nitrosación de aminas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental.
- 86 II Semana de Biología:
Flora y fauna acuáticas.
- 87 II Semana de Biología:
Botánica.
- 88 II Semana de Biología:
Zoología.
- 89 II Semana de Biología:
Zoología.
- 91 Viéitez Martín, J. M.:
Ecología comparada de dos playas de las Rías de Pontevedra y Vigo.
- 92 Cortijo Mérida, M., y García Blanco, F.:
Estudios estructurales de la glucógeno fosforilasa b.
- 93 Aguilar Benítez de Lugo, E.:
Regulación de la secreción de LH y prolactina en cuadros anovulatorios experimentales.
- 95 Bueno de las Heras, J. L.:
Empleo de polielectrolitos para la floculación de suspensiones de partículas de carbón.
- 96 Núñez Álvarez, C., y Ballester Pérez, A.:
Lixiviación del cinabrio mediante el empleo de agentes complejantes.
- 101 Fernández de Heredia, C.:
Regulación de la expresión genética a nivel de transcripción durante la diferenciación de Artemia salina.
- 103 Guix Pericas, M.:
Estudio morfométrico, óptico y ultraestructural de los inmunocitos en la enfermedad celíaca.
- 105 Llobera i Sande, M.:
Gluconeogénesis «in vivo» en ratas sometidas a distintos estados tiroideos.
- 106 Usón Finkenzeller, J. M.:
Estudio clásico de las correcciones radiactivas en el átomo de hidrógeno.
- 107 Gallán Jiménez, R.:
Teoría de la dimensión.
- 111 Obregón Perea, J. M.:
Detección precoz del hipotiroidismo congénito.

- 115 Cacicedo Egües, L.:
Mecanismos moleculares de acción de hormonas tiroideas sobre la regulación de la hormona tirótropa.
- 121 Rodríguez García, R.:
Caracterización de lisozimas de diferentes especies.
- 122 Carravedo Fantova, M.:
Introducción a las Orquídeas Españolas.
- 125 Martínez-Almoyna Rullán, C.:
Contribución al estudio de la Manometría Ano-rectal en niños normales y con alteraciones de la continencia anal.
- 127 Marro, J.:
Dinámica de transiciones de fase: Teoría y simulación numérica de la evolución temporal de aleaciones metálicas enfriadas rápidamente.
- 129 Gracia García, M.:
Estudio de cerámicas de interés arqueológico por espectroscopia Mössbauer.
- 131 García Sevilla, J. A.:
Receptores opiáceos, endorfinas y regulación de la síntesis de monoaminas en el sistema nervioso central.
- 132 Rodríguez de Bodas, A.:
Aplicación de la espectroscopia de RPE al estudio conformacional del ribosoma y el tRNA.
- 136 Aragón Reyes, J. J.:
Interacción del Ciclo de los Purín Nucleótidos con el Ciclo del Acido Cítrico en Músculo Esquelético de Rata durante el Ejercicio.
- 139 Genís Gálvez, J. M.:
Estudio citológico de la retina del camaleón.
- 140 Segura Cámara, P. M.:
Las sales de tiazolio ancladas a soporte polimérico insoluble como catalizadores en química orgánica.
- 141 Vicent López, J. L.:
Efectos anómalos de transporte eléctrico en conductores a baja temperatura.
- 143 Nieto Vesperinas, M.:
Técnicas de prolongación analítica en el problema de reconstrucción del objeto en óptica.
- 145 Arias Pérez, J.:
Encefalopatía portosistémica experimental.
- 147 Palanca Soler, A.:
Aspectos Faunísticos y Ecológicos de Carábidos Altoaragoneses.

