

R. 14006

TD
431



INSTITUTO DE LA GRASA

Departamento de Fisiología y
Tecnología de Productos vegetales

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Departamento de Bioquímica Vegetal y
Biología Molecular

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Dpto. Bioquímica Vegetal
y Biología Molecular
Facultad de Biología

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Desde el día 25-07-1996
18-09-1996

Queda pagada esta Tesis Doctoral
al folio 49 número 243 del libro
correspondiente
Sevilla, _____

18 de Octubre de 1996

EL DIRECTOR DE Dpto. Bioquímica Vegetal
y Biología Molecular

El Jefe del Negociado de Tesis,
Álvaro Peláez

Blanca Vioque

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ENZIMA ÁCIDO
1-AMINOCICLOPROPANO-1-CARBOXÍLICO (ACC) OXIDASA
DE PERA (*Pyrus communis*) cv. BLANQUILLA**

Memoria presentada por

JOSÉ MARÍA CASTELLANO OROZCO

para optar al Grado de

DOCTOR en QUÍMICA

Blanca Vioque Cubero

Directora:

Dra. BLANCA VIOQUE CUBERO
Colaborador Científico del CSIC

José María Vega Piqueres

Tutor:

Dr. JOSÉ MARÍA VEGA PIQUERES
Catedrático de Bioquímica y
Biología Molecular

*A Hermi,
A José María.*

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Fisiología y Tecnología de Productos Vegetales del Instituto de la Grasa (CSIC), bajo la dirección de la Dra. Blanca Vioque Cubero, a quién quiero expresar mi gratitud por su enorme esfuerzo y dedicación, así como su apoyo ilimitado en todas las circunstancias que a lo largo de estos años hemos compartido.

Igualmente, deseo expresar mi reconocimiento al Dr. José María Vega Piqueres, tutor de esta Tesis, quien siempre se mostró accesible y exquisitamente cordial. Gracias por su colaboración y asesoramiento.

Mi agradecimiento quiero hacerlo extensivo a todas las personas que de una u otra manera han sido partícipes de esta aventura:

Al Instituto de la Grasa (CSIC) por poner a mi disposición el material, los equipos y el tiempo necesarios para la realización de esta Tesis Doctoral y, concretamente al personal del Departamento de Fisiología y Tecnología de Productos Vegetales, de cuya afable colaboración siempre disfruté.

Especialmente al Dr. Miguel Angel Albi Romero, quién con infinita paciencia guió mis primeros pasos en el Instituto de la Grasa.

No quiero olvidar un tributo a mi familia y amigos, por comprender lo que esta actividad representa para mí.

A todos, gracias por estar ahí cuando os necesité.

Abreviaturas

ABA:	Ácido abscísico
ACC:	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
Ado :	Adenosina
AEC:	Ácido 1-amino-2-etilciclopropano-1-carboxílico
AIA:	Ácido indol-3-acético
AIB:	Ácido α -aminoisobutírico
AOA:	Ácido aminooxiacético
AVG:	Aminoextoxivinilglicina
BA :	Benciladenina
BS :	Benzoato sódico
BSA:	Albúmina de suero bovino
CCCP:	m-clorofenilhidrazona del cianuro de carbonilo
CHI:	Cicloheximida
COS:	Sulfuro de carbonilo
CPA:	Ciclopropilamina
CPC:	Ácido ciclopropanocarboxílico
DCP:	Diclorofenol
DDF:	Días después de la floración plena
1,2-DHN:	1,2-dihidroxi-naftaleno
DNP:	2,4-dinitrofenol
DTE:	Ditioeritrol
DTT:	Ditiotreitrol
DFMA:	α -difluorometilarginina
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EFE:	Enzima formador de etileno
EH:	Apoenzima
HEPES:	Ácido N-(2-hidroxi-etil)piperazine-N'-(2-etanosulfónico)
HPA:	3-hidroxi-propanoamida
KMB:	Ácido 2-ceto-4-metiltiobutírico
MACC:	Ácido 1-(malonilamino)ciclopropano-1-carboxílico
MDPP:	2-metil-1,2-di-3-piridil-1-propanona
MeJa:	Jasmonato de metilo
MES:	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
Met:	Metionina
MGBG:	Metilglioxal-bis-guanilhidrazona
MOPS:	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MSAE:	Metionina-SAM-ACC-Etileno
MTA:	5'-metiltioadenosina

Abreviaturas

MTR:	5-metiltiorribosa
MTR-1-P:	5-metiltiorribosa-1-fosfato
PCIB:	Ácido α - <i>p</i> -clorofenoisobutírico
PCMFS:	Ácido <i>p</i> -cloromercurifenilsulfónico
PG:	Galato de <i>n</i> -propilo
PLP:	Fosfato de piridoxal
PVPP:	Polivinilpolipirrolidona
SAM:	S-adenosil-L-metionina
SDS:	Sodiododecilsulfato
SDS-PAGE:	Electroforésis en gel de poliacrilamida-SDS
TNBS:	Ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico



Indice

INTRODUCCION y OBJETIVOS	1
ANTECEDENTES	5
1. RIPENING DE FRUTOS	5
1.1. PATRONES DE RIPENING EN FRUTOS	6
1.1.1. Frutos climatéricos	7
1.1.2. Frutos no climatéricos	10
2. LA PERA (<i>Pyrus communis</i> L.)	13
2.1. BOTANICA	13
2.2. COMPOSICION QUIMICA	15
2.3. PRODUCCION Y TECNOLOGIA POSTCOSECHA	17
3. ETILENO Y CONTROL DEL RIPENING	19
3.1. ETILENO Y REGULACION DEL RIPENING	20
3.2. CONCENTRACION UMBRAL DE ETILENO	21
3.3. ETILENO Y EXPRESION GENETICA	24
4. BIOSINTESIS DE ETILENO	25
4.1. S-ADENOSIL-L-METIONINA COMO INTERMEDIARIO	25
4.2. EL ACIDO 1-AMINOCICLOPROPANO-1-CARBOXILICO COMO INMEDIATO PRECURSOR	26
4.3. EL CICLO DE LA METIONINA	28
4.4. RUTA DEL ACC	29
4.4.1. ACC sintasa [SAM MTA-liasa](EC 4.4.1.14)	30
4.4.1.1. <i>Propiedades enzimológicas</i>	30
4.4.1.2. <i>Inactivación inducida por SAM</i>	31
4.4.1.3. <i>Purificación y caracterización</i>	32
4.4.1.4. <i>Mecanismo de catálisis e identificación del Centro Activo</i>	34
4.4.1.5. <i>Clonación de ACC sintasa</i>	36
4.4.1.6. <i>Inducción de ACC sintasa</i>	37
4.4.2. ACC-N-maloniltransferasa	38
5. EL ENZIMA FORMADOR DE ETILENO o ACC	43
5.1. ASOCIACION CON LAS MEMBRANAS CELULARES	43
5.2. PROPIEDADES DE ACC OXIDASA IN VIVO	44
5.3. SISTEMAS MODELO DESCRITOS	46
5.4. MECANISMOS PROPUESTOS A NIVEL MOLECULAR	51
5.5. LOCALIZACION SUBCELULAR	53
5.6. REQUERIMIENTO DE HIERRO	54
5.7. AVANCES EN BIOLOGIA MOLECULAR	55

5.8. CARACTERIZACION BIOQUIMICA	57
6. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE ETILENO	61
6.1. REGULACION POR FACTORES EXTERNOS	61
6.1.1. Temperatura	61
6.1.2. Influencia del nivel de oxígeno	62
6.1.3. Regulación por la luz y el dióxido de carbono	62
6.1.4. Nutrición	63
6.2. REGULACION POR FACTORES INTERNOS	64
6.2.1. Regulación por etileno	64
6.2.2. Interacción con la biosíntesis de poliaminas	66
6.2.3. Carbohidratos	68
6.2.4. Interacción con otros reguladores del crecimiento	69
6.3. CONTROL DE LA BIOSINTESIS DE ETILENO EN PLANTAS TRANSGENICAS	71
<i>MATERIALES y METODOS</i>	73
1. MATERIAL VEGETAL	73
2. CUANTIFICACION DE ETILENO	73
3. CUANTIFICACION DE DIOXIDO DE CARBONO	74
4. MEDIDA DE LA TASA RESPIRATORIA Y DE LA VELOCIDAD DE PRODUCCION DE ETILENO	75
4.1. Sistema estatico	76
4.2. Sistema dinamico	76
5. EXTRACCION DE ACC OXIDASA	78
5.1. Metodologia de Ververidis y John (1991)	78
5.2. Modificaciones del metodo de Dong et al. (1992)	79
6. CUANTIFICACION DE PROTEINAS	79
7. ENSAYO DE ACTIVIDAD ACC OXIDASA	80
7.1. In vivo	80
7.2. In vitro	81
8. ACTIVIDAD ENZIMATICA RESIDUAL	81
9. PREINCUBACIONES	81
10. COMPORTAMIENTO CROMATOGRAFICO. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR	82
11. EXTRACCION DE ACC	83
12. CUANTIFICACION DE ACC	84
13. TRATAMIENTOS CON ETILENO EXOGENO	84

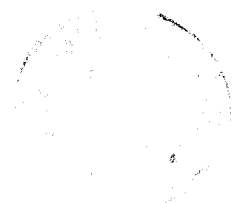
14. ESTUDIO DE LA EVOLUCION DE PERA BLANQUILLA DURANTE EL DESARROLLO, CONSERVACION Y MADURACION	85
<i>14.1. Desarrollo</i>	86
<i>14.2. Conservacion y maduracion</i>	86

RESULTADOS y DISCUSION	89
-------------------------------	----

1. ELECCION DEL MATERIAL VEGETAL	89
2. ACTIVIDAD ACC OXIDASA <i>in vivo</i> DE PERA BLANQUILLA	91
3. EXTRACCION DE ACC OXIDASA DE PERA BLANQUILLA	93
3.1. RECUPERACION DE LA ACTIVIDAD IN VITRO	93
3.2. REQUERIMIENTO DE COFACTORES	94
3.3. ESTABILIDAD DE LA PREPARACION ENZIMATICA	96
3.4. INFLUENCIA DEL TIEMPO Y DE LA CONCENTRACION DEL ENZIMA	99
3.5. CONDICIONES OPTIMAS DE EXTRACCION	100
<i>3.5.1. Efecto de distintos agentes solubilizantes</i>	100
<i>3.5.2. Influencia del pH de extracción</i>	101
3.6. REVISION DEL PROTOCOLO DE VERVERIDIS Y JOHN (1991)	102
4. OPTIMIZACION DEL ENSAYO DE ACTIVIDAD IN VITRO	105
4.1. CONCENTRACIONES OPTIMAS DE COFACTORES	105
4.1.1. Dependencia de la concentración de Fe ²⁺	105
4.1.2. Dependencia de la concentración de ascorbato	106
4.1.3. Dependencia de la concentración de CO ₂	107
4.2. EFECTO DEL pH	108
4.3. TEMPERATURA OPTIMA	109
5. CARACTERIZACION DE ACC OXIDASA	113
5.1. EFICIENCIA DE LA REACCION	113
5.2. POSIBLE PARTICIPACION DE 2-OXOGLUTARATO	114
5.3. REQUERIMIENTO DE AGENTES REDUCTORES	115
5.4. AFINIDAD POR ACC. CALCULO DE LA K_m	117
5.5. AFINIDAD POR EL OXIGENO. CALCULO DE LA K_m	120
5.6. INHIBICION POR IONES Co²⁺	122
5.7. INHIBICION COMPETITIVA POR ACIDO α-AMINOISOBUTIRICO	123
5.8. COMPORTAMIENTO CROMATOGRAFICO. ESTIMACION DEL PESO MOLECULAR	124
5.9. EFECTO DE IONES METALICOS	127
5.9.1. Como sustitutos de Fe ²⁺	127

5.9.2. Como inhibidores	129
5.10. ESTUDIO DE OTROS POSIBLES INHIBIDORES	130
5.10.1. Inhibidores de hemoproteínas	130
5.10.2. Análogos estructurales de ACC	131
5.10.3. Sensibilidad a inhibidores de la biosíntesis de etileno	134
5.10.3.1. Desacopladores de la fosforilación oxidativa	134
5.10.3.2. Secuestradores de Radicales Libres	136
5.10.3.3. Quelantes de hierro (II)	137
5.10.3.4. Reactivos de grupos -SH y ácido salicílico	137
5.10.3.5. Inhibidores de la síntesis de proteínas	139
5.11. EFECTO DE AUXINA Y PCIB	139
6. INDUCCION DE ACC OXIDASA POR ETILENO	143
7. INACTIVACION DE ACC OXIDASA	145
7.1. PERDIDA DE LINEALIDAD IN VITRO	145
7.2. EFECTO DE LA CATALASA	145
7.3. ACTIVIDAD ENZIMATICA RESIDUAL	146
7.4. POSIBLES CAUSAS DE LA INACTIVACION	148
7.5. PREINCUBACION CON ETILENO	150
7.6. EFECTO DE LOS COMPONENTES DE LA REACCION EN LA INACTIVACION	151
8. OPTIMIZACION DEL ENSAYO DE ACTIVIDAD IN VIVO	155
9. EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD ACC OXIDASA A LO LARGO DEL DESARROLLO Y MADURACION DEL FRUTO	159
9.1. CRECIMIENTO Y DESARROLLO	159
9.2. CONSERVACION Y MADURACION POSTCOSECHA	161
 CONCLUSIONES	 165
 BIBLIOGRAFIA	 169

Introducción y Objetivos



INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En 1893, en las islas Azores, se produjo un pequeño incendio en un invernadero en el que se cultivaban piñas. En lugar de dañar las plantas, el humo causó en ellas una repentina floración. Este sorprendente hecho es hoy fácilmente explicable: las llamas producen etileno, una hormona vegetal que además de inducir la floración juega un papel protagonista en el crecimiento y desarrollo vegetal.

Que las plantas producen y utilizan su propio etileno quedó firmemente establecido en los albores del presente siglo, aunque los detalles moleculares de cómo las plantas sintetizan esta fitohormona han empezado a esclarecerse en las tres últimas décadas. Investigadores que han estudiado la bioquímica y fisiología del etileno durante muchos años se sorprenden aún de la diversidad de efectos que este compuesto provoca en las plantas. El etileno causa la germinación de las semillas, la apertura de las flores, que los frutos maduren y caigan y que las hojas y pétalos se marchiten y vuelvan pardos.

La industria agrícola utiliza etileno exógeno para que la maduración sea uniforme, haciendo la recolección más eficiente. Esta situación sería aún más eficiente si consiguiéramos controlar la generación de etileno por las plantas. Del mismo modo, cabe pensar, que si pudiéramos inhibir la biosíntesis de etileno de forma efectiva, se mantendría la vitalidad de las plantas durante más tiempo, incrementándose el rendimiento de las cosechas. La clave para conseguir estas metas se basa en un profundo conocimiento del mecanismo de biosíntesis del etileno.

Este conocimiento recibió un gran impulso, cuando en 1979, Adams y Yang y Lürssen y cols. descubrieron simultáneamente que las plantas sintetizan etileno a partir del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Este aminoácido inusual se produce a

partir de S-adenosil-metionina, un eslabón común a diversas rutas metabólicas, que resulta de la unión del grupo adenosil al aminoácido común metionina. Con este descubrimiento quedó finalmente establecida la ruta biosintética del etileno en plantas superiores.

Conocida la ruta y la mayor parte de los detalles del mecanismo de biosíntesis del etileno, la atención se centró en contestar numerosas cuestiones pendientes respecto de la bioquímica del etileno en las plantas, como son: ¿Cuál es la naturaleza del enzima formador de etileno? ¿Cómo regulan las plantas su biosíntesis? ¿Cómo puede inhibirse el proceso? ó ¿Cómo interacciona el etileno con el sitio receptor en las plantas para ejercer sus diversos efectos?

La conversión de ACC en etileno es un paso enzimático. Sin embargo, a pesar del gran número de ensayos realizados, el enzima ha eludido durante años todo intento de aislamiento y caracterización. El enzima parece estar asociado con las membranas celulares, ya que la actividad se pierde completamente cuando el tejido se homogeneiza. Por otro lado, se han descrito varios sistemas enzimáticos oxidativos capaces de transformar ACC en etileno, entre ellos el que describieron en 1981 Vioque y cols. Sin embargo, estos sistemas enzimáticos aportaron pistas falsas, pues hoy día se conoce que en ellos el etileno se generaba por reacciones no enzimáticas entre el ACC y radicales libres que resultan de diversas reacciones enzimáticas, no correspondiéndose con el sistema que opera fisiológicamente. Estos desafortunados hechos, han entorpecido la labor de los investigadores, quienes entre los años 80 y 90 han conseguido pocos avances en la caracterización del enzima formador de etileno (EFE).

En 1990 Hamilton y cols. identificaron un gen en tomate que codificaba el EFE o, al menos, un polipéptido componente de éste. La secuencia aminoácida de este polipéptido tiene una estrecha homología con la de flavonona-3-hidroxilasa, un enzima soluble que participa en la ruta biosintética de las antocianidinas. Ningún bioquímico había propuesto previamente afinidad entre estos dos enzimas. La relación estructural deducida de la homología secuencial ha suministrado la pista clave que ha permitido salir del *impasse*

alcanzado con el EFE. Para la estabilización de flavonona-3-hidroxilasa se requiere Fe^{2+} y ascorbato. Cuando estas condiciones se utilizaron para extraer el enzima de fruto de melón, se consiguió por vez primera recuperar auténtica actividad EFE como enzima soluble.

El caso del EFE ha sido calificado por Kende (1993) como un “típico caso de bioquímica reversa”, en donde el aislamiento de un gen por parte de biólogos moleculares ha permitido aislar y caracterizar un enzima que ofrecía dificultades por técnicas bioquímicas convencionales.

A raíz de este hallazgo, el estudio del EFE, hoy denominado ACC oxidasa, ha entrado en una nueva etapa en la que todo el cuerpo de evidencias acumuladas durante una década ha de ser revisado con el enzima *in vitro*. Por ello, en esta Tesis, se ha planteado como objetivo extraer y determinar las características bioquímicas y moleculares del enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa. Como material vegetal se ha utilizado pera Blanquilla, un fruto climatérico caracterizado por una alta tasa de producción de etileno.

Dentro de este objetivo general, en la presente Memoria, se abordan los siguientes aspectos concretos:

1. Obtención de extractos enzimáticos de pericarpio de pera con actividad ACC oxidasa.
2. Optimización del ensayo de actividad *in vivo* e *in vitro*.
3. Determinación de las características cinéticas y moleculares del enzima.
4. Estudio de la inactivación de ACC oxidasa durante la catálisis.
5. Inducción de la actividad del enzima por etileno y,
6. Estudio de la evolución de la actividad ACC oxidasa a lo largo del desarrollo, conservación y maduración del fruto.

El fin primordial de esta Tesis se integra plenamente dentro de los objetivos de los Proyectos de Investigación ALI91-0421 y ALI94-0738 (CICYT) que estudian los mecanismos reguladores de la maduración de los frutos, y entronca con la línea investigadora tradicional del Departamento de Fisiología y Tecnología de Productos Vegetales del Instituto de la Grasa.

Antecedentes

1

RIPENING DE FRUTOS

La vida de un vegetal puede ser dividida en tres etapas fisiológicas fundamentales tras la germinación de la semilla: el crecimiento, la maduración y la senescencia. El crecimiento implica división celular y la posterior expansión de las células, que origina el tamaño definitivo del producto. La maduración normalmente comienza antes de que cese el crecimiento y consiste en un periodo de diferenciación de los tejidos, acompañado de la síntesis y acción de ciertos enzimas que conducen a la maduración de las semillas, a la formación de compuestos específicos y a la degradación de otros. Al crecimiento y maduración es frecuente referirse conjuntamente como desarrollo (Wills *et al.*, 1989).

La senescencia de un órgano vegetal puede definirse como la etapa final de su ontogenia, durante la que tienen lugar una serie de acontecimientos esencialmente irreversibles, que conducen en última instancia a la descomposición celular y a la muerte del órgano (Sacher, 1973). El término anglosajón ripening, que en castellano podría ser traducido por maduración organoléptica, designa globalmente aquellos cambios que suceden en un fruto durante las últimas fases del desarrollo e incluso en las primeras fases de la senescencia, en los que la estructura y la composición se alteran hasta resultar en un producto con sus características estéticas y/o calidad alimentaria (Watada *et al.*, 1984). Por esto, la distinción entre ripening y senescencia nunca ha estado nítidamente establecida. El ripening y la senescencia comparten rasgos comunes. Sin embargo, el ripening comprende procesos que no forman parte del síndrome de senescencia, como la acumulación de pigmentos y los cambios en las paredes celulares que originan el ablandamiento de los frutos.

Los signos visibles del ripening son aquellos cambios en el color, la textura, el sabor y el aroma que conducen a un estado en el que el fruto resulta apetitoso, y están

determinados por cambios en la estructura y el metabolismo de los tejidos (Tabla I). El papel botánico de un fruto es dispersar las semillas, y de ello cabe pensar que los colores atrayentes, unas pulpas dulces y jugosas y unos aromas característicos pueden estar relacionados con esta misión.

Tabla I. Cambios durante el ripening (Tucker y Grierson, 1987)

Cambios físicos	
Color	Pérdida de clorofila y desmantelamiento del aparato fotosintético. Acumulación de carotenoides Síntesis de antocianinas
Textura	Alteraciones en la composición de la pared celular Solubilización parcial de pectina o celulosa e hidratación de la pared Degradación de almidón
Flavor	Acumulación de azúcares y ácidos orgánicos Producción de una mezcla compleja de volátiles
Cambios metabólicos	
Modificación del control metabólico	Incremento de la tasa respiratoria Síntesis incrementada de etileno Catabolismo de almidón y ácidos orgánicos Alteración de la regulación de rutas existentes
Cambios en la expresión genética	Desaparición de ARN _m y de proteínas sintetizadas Irrupción de ARN _m específicos del ripening Síntesis <i>de novo</i> de enzimas implicados en el ripening

1.1. PATRONES DE RIPENING EN FRUTOS

Los tejidos comestibles de los frutos de interés comercial se derivan de diversos tejidos de la inflorescencia (Coombe, 1976). Así, tenemos verdaderos frutos en los que sólo el tejido del ovario se desarrolla (tomate) y falsos frutos, en los que el receptáculo de la flor origina su masa (fresa). Además, podemos considerar frutos simples, desarrollados

a partir de un único ovario (albaricoque, aguacate, manzana, cereza, dátil, membrillo o tomate) y frutos compuestos que, o bien se han desarrollado a partir de varios ovarios de una misma flor (fresas, arándanos) o bien provienen de diversos ovarios de diferentes flores (piña). Los frutos de importancia comercial se derivan tanto de plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas, y de una amplia gama de familias dentro de cada grupo. Con esta diversidad de origen, no resulta sorprendente que haya una variada gama de patrones de desarrollo y ripening. No obstante, en la mayoría de los frutos, los procesos asociados al ripening ocurren de manera relativamente coordinada.

1.1.1. Frutos climatéricos

Las investigaciones de Kidd y West (1930) hicieron las primeras contribuciones importantes al estudio del comportamiento de los frutos durante el ripening. Estos autores mostraron que el comienzo de los cambios visibles asociados a este estadio en manzanas estaba marcado por un aumento en la tasa respiratoria (Figura 1). Esto llevó a muchos investigadores a postular que este incremento aportaba la energía requerida para el

ripening, pero paradójicamente, esto no ocurre así en todos los frutos. Kidd y West acuñaron el término *climaterio respiratorio* para describir lo que vieron como una fase

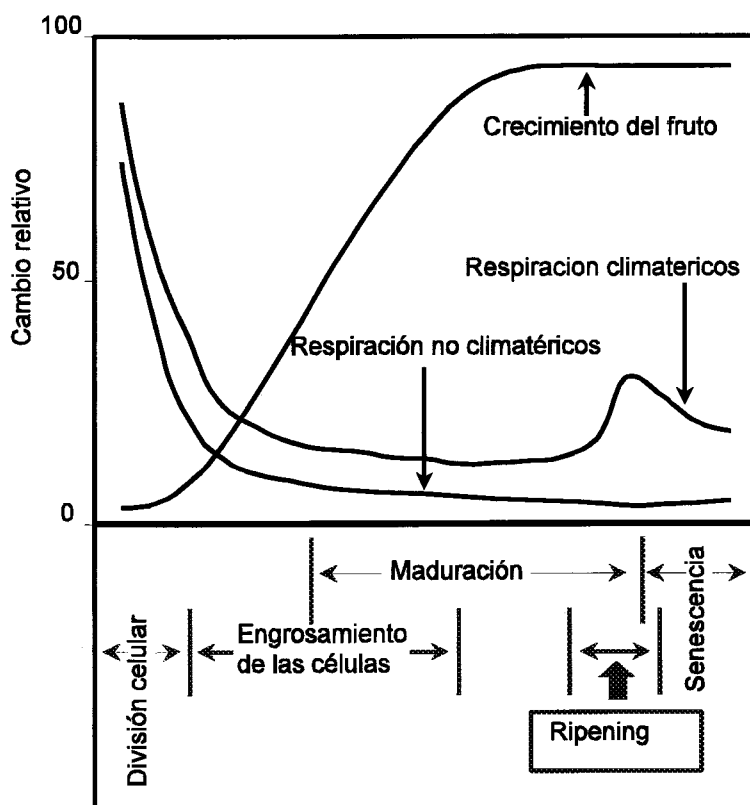


Figura 1. Crecimiento y patrones de respiración de los frutos durante el desarrollo (Biale, 1964).

crítica en la vida de los frutos que separaba los procesos implicados en el desarrollo, de aquellos otros, esencialmente irreversibles, que se producen en el comienzo de la senescencia. En los años siguientes a los esfuerzos pioneros de Kidd y West , se comprobó que la mayoría de los frutos de climas templados y tropicales seguían un patrón de comportamiento similar (Tabla II). Kidd y West (1930) mostraron que el climaterio respiratorio se produce incluso cuando el fruto se mantiene unido a la planta madre. Una excepción es el aguacate, que aún mostrando un climaterio respiratorio normal tras la recolección, se muestra incapaz de madurar mientras se encuentra unido al árbol y no experimenta incremento de la tasa respiratoria.

Tabla II. Ejemplos de frutos que exhiben climaterio respiratorio durante el ripening (Biale y Young, 1981).

Nombre común	Nombre científico
Aguacate	<i>Persea americana</i>
Albaricoque	<i>Prunus armeniaca</i>
Banana	<i>Musa sapientum</i>
Caqui	<i>Diospyros kaki</i>
Ciruela	<i>Prunus americana</i>
Higo	<i>Ficus carica</i>
Mango	<i>Mangifera indica</i>
Manzana	<i>Malus silvestris</i>
Melocotón	<i>Prunus persica</i>
Melón	<i>Cucumis melo</i>
Papaya	<i>Carica papaya</i>
Pera	<i>Pyrus communis</i>
Tomate	<i>Lycopersicon esculentum</i>

En 1934, Gane demostró que el etileno era un producto natural del metabolismo de los frutos, si bien hubo de esperarse treinta años para, gracias al desarrollo de la cromatografía gas-líquido, investigar en detalle la implicación del etileno en el ripening (Burg y Thimann, 1959; Meigh, 1960). Hoy día se conoce que todos los frutos que muestran el climaterio respiratorio generan pequeñas cantidades de etileno a lo largo de

sus vidas (Burg, 1962; Burg y Burg, 1965). La producción de etileno durante la floración suele ser alta, para caer entonces de forma sostenida hasta un nivel bajo, que se mantiene hasta el advenimiento del ripening. La velocidad de producción de etileno se incrementa dramáticamente hasta alcanzar un pico en torno al momento en el que ocurre el climaterio respiratorio, manteniéndose a partir de entonces en unos niveles relativamente altos durante todo el ripening. El pico en la tasa de producción de etileno puede anteceder (plátano), coincidir (aguacate, mango, pera) o seguir (chirimoya, manzana, tomate) al pico respiratorio (Burg, 1962).

Kidd y West (1945) demostraron que aplicando etileno a manzanas se provocaba el climaterio respiratorio y se inducía una producción autógena de etileno en el tejido. Esta explosión en el contenido de etileno se ajusta bien a una función logarítmica durante la mayoría de su evolución a lo largo del tiempo. Por esto se dice que se produce autocatalíticamente. La naturaleza de esta producción secundaria de etileno fue demostrada por los experimentos de McMurchie et al. (1972), quienes usando propileno como disparador del ripening en bananas, pudieron estudiar tanto el efecto iniciador de este proceso (representado por el efecto directo del propileno) como la generación secundaria autocatalítica de etileno. Estos investigadores postularon que en la regulación del ripening están involucrados dos sistemas. En el Sistema I la biogénesis de etileno se inicia por factores implicados en el envejecimiento de los tejidos y permite alcanzar los niveles suficientes de etileno para iniciar el climaterio respiratorio y los cambios asociados al ripening, uno de los cuales (Sistema II) conduce a una gran generación adicional de etileno.

La capacidad de los tejidos de los frutos para responder ante la presencia de etileno (aplicado exógenamente o generado de forma endógena), produciendo etileno autocatalíticamente, es una característica de los frutos climatéricos. La inducción del ripening de frutos inmaduros mediante la aplicación de etileno exógeno subraya este comportamiento. Los tratamientos con etileno acortan el periodo requerido tras la cosecha para la inducción del climaterio respiratorio sin afectar la magnitud de la tasa respiratoria

en el pico. Este acortamiento del periodo preclimaterico muestra una relación logarítmica con la concentración de etileno aplicada (Burg, 1962).

Con el paso del tiempo ha llegado a aceptarse que el incremento de la tasa respiratoria es sólo uno de los cambios metabólicos que suceden en este periodo crítico del desarrollo. Esto condujo a Rhodes (1970) a intentar redefinir el concepto de climaterio en base a los conocimientos acumulados hasta entonces, tratando de incorporar el concepto esencial de Kidd y West. Rhodes (1970) definió el climaterio como el periodo en la ontogenia de ciertos frutos durante el que una serie de cambios bioquímicos se inician como respuesta a la producción autocatalítica de etileno, marcando la transición entre el desarrollo y la senescencia, implicando un incremento en la tasa respiratoria y conduciendo al ripening.

1.1.2. Frutos no climatéricos

En la década de los cuarenta ya había quedado claro que no todos los frutos seguían el patrón de ripening climatérico. En un estudio con limones, Biale y Young (1947) experimentaron que los frutos mantenidos a 15 °C exhibían una progresiva disminución de la tasa respiratoria, que podía alargarse incluso por 6 meses. Posteriormente, Biale (1960) pudo comprobar un comportamiento similar en naranja, definiendo un grupo de frutos que no mostraban aumento en la tasa respiratoria ni de la producción acelerada de etileno durante el ripening (Tabla III). Estos frutos se caracterizan por largos periodos de crecimiento y un proceso de ripening muy extendido, en los que los cambios experimentados por los cloroplastos y en los contenidos de pigmentos están, a menudo, disociados de otros procesos relacionados con este estadio (Goldschmidt, 1974). Los frutos no climatéricos, una vez recolectados, disminuyen lentamente su tasa respiratoria.

El tratamiento de frutos no climatéricos con etileno exógeno provoca el incremento de la tasa respiratoria, la degradación de clorofilas en la epidermis y una acumulación de

Tabla III. Frutos con patrón respiratorio no climatérico (Biale y Young, 1981).

Nombre común	Nombre científico
Aceituna	<i>Olea europaea</i>
Cacao	<i>Theobroma cacao</i>
Cereza	<i>Prunus cerasus</i>
Fresa	<i>Fragaria</i>
Limón	<i>Citrus limonia</i>
Litchi	<i>Litchi chinensis</i>
Naranja	<i>Citrus sinensis</i>
Pepino	<i>Cucumis sativus</i>
Piña	<i>Ananas comosus</i>
Pomelo	<i>Citrus paradisi</i>
Uva	<i>Vitis vinifera</i>

azúcares reductores (Goldschmidt *et al.*, 1977). La magnitud del máximo respiratorio observado parece guardar una correlación logarítmica con la concentración aplicada de etileno (Burg, 1962). La reexposición del fruto a una atmósfera exenta de etileno, origina que la tasa respiratoria y las otras alteraciones metabólicas, vuelvan a sus niveles basales, por lo que los frutos no climatéricos son susceptibles de repetidas estimulaciones por etileno exógeno. McMurchie *et al.* (1972) aplicaron propileno a naranja encontrando que se inducía un incremento de la tasa respiratoria y de la velocidad de devertización sin que se produjera inducción de la producción autocatalítica de etileno. Así, en su nomenclatura los cítricos poseerían el Sistema I, pero carecerían del Sistema II. Estos resultados confirman las sugerencias previas de Burg y Burg (1962) y de Reid y Pratt (1970) en cuanto a que la diferencia esencial entre los frutos climatéricos y los no-climatéricos radica en su capacidad para producir etileno autocatalíticamente en respuesta a la acumulación en los tejidos de un nivel umbral de la fitohormona.

No obstante, los cítricos pueden, bajo ciertas condiciones, producir cantidades importantes de etileno. Por ejemplo, varios factores que originan estrés fisiológico, como atmósferas con niveles de oxígeno superiores a los normales (Biale y Young, 1947) o ricas en CO₂ (Young *et al.*, 1962), tratamientos con agroquímicos (Cooper *et al.*, 1968) o la

irradiación (Maxie *et al.*, 1965) pueden inducir la producción de etileno a velocidades relativamente altas, pudiendo este fenómeno provocar el incremento de la tasa respiratoria, pero este comportamiento no se expresa en el ripening normal.

2

LA PERA (*Pyrus communis* L.)

Los árboles frutales de pepita pertenecen a la familia de las Rosáceas, tribu Maloideas. Las tres especies frutales más comúnmente utilizadas de las Maloideas son las manzanas, los membrillos y las peras. Los perales son cultivares del *Pyrus communis*, si bien otra especie originaria de extremo oriente, el *Pyrus pyrifolia* (Burm.) Nakai (= *P. Serotina* Redh.), está empezando a difundirse.

Los perales se cultivan en las zonas templadas de ambos hemisferios, clasificándose en función de la fecha en la que alcanzan su madurez: verano, otoño e invierno. Las peras de verano, como la Blanquilla, maduran entre Julio y Agosto en el hemisferio Norte y de Enero a Febrero en el hemisferio Sur. Estos frutos normalmente tienen una vida postcosecha corta (de 1 a 3 meses). La expansión de las plantaciones a partir de 1950 fue posible gracias al perfeccionamiento de los métodos de almacenamiento del fruto, que ha permitido no sólo prolongar la vida de las variedades de larga conservación sino también guardar durante algún tiempo las variedades precoces, con el fin de escalonar su comercialización.

2.1. BOTÁNICA

La especie *Pyrus communis* tiene frutos accesorios denominados *pomos*. Estos tienen un pericarpio diferenciado, a la manera de una drupa. El pericarpio, la parte carnosa comestible, constituida por un parénquima cortical de reserva, corresponde al desarrollo del periantio, soldado estrechamente a los estambres y a la pared del ovario; esto es lo que diferencia a estos frutos de las drupas típicas. El ovario se transforma en el corazón del fruto y los 5 carpelos encierran dos semillas cada uno.

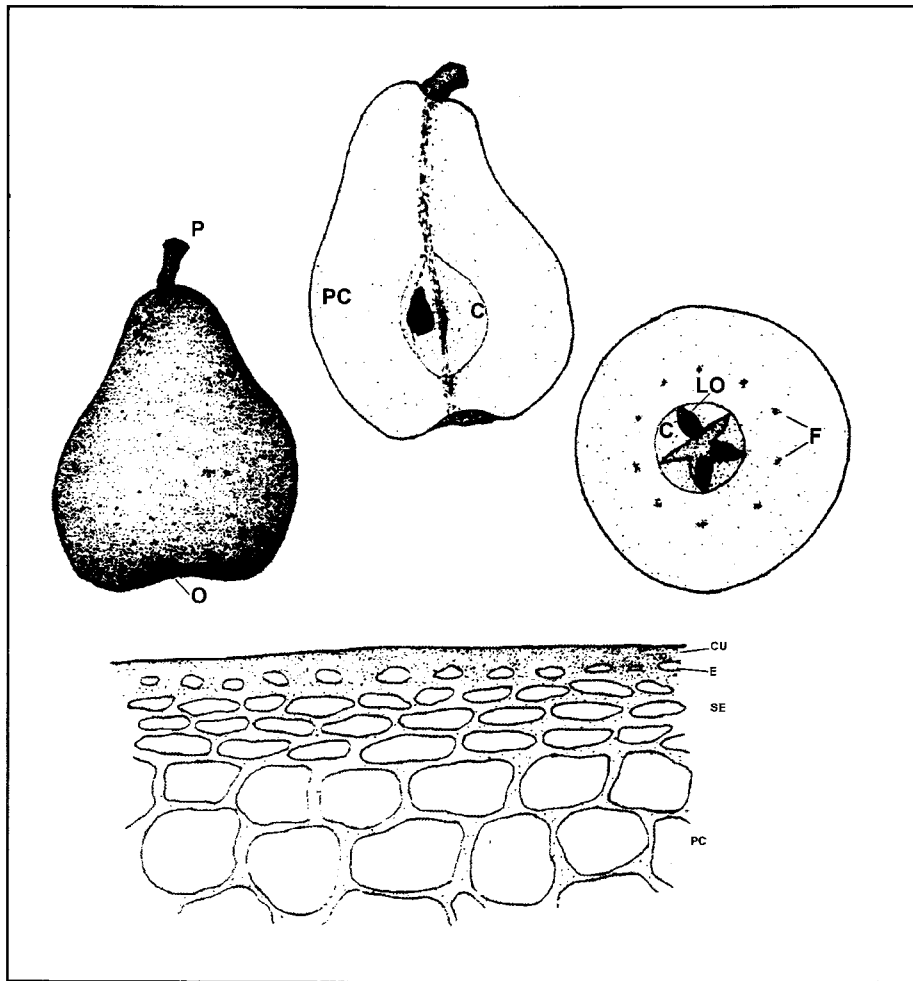


Figura 2. Aspecto exterior, cortes longitudinal y ecuatorial. Esquema de las capas celulares periféricas.

Los frutos poseen la típica estructura piriforme, si bien existen numerosas variaciones dentro del mismo patrón. Exteriormente se distinguen tres zonas (Figura 2): el pedúnculo (**P**), el ojo (**O**) (resto del cáliz persistente), y la parte globosa que se extiende entre las dos zonas precedentes y que es la más desarrollada. Toda la periferia de los frutos, excepto el pedúnculo y el cáliz persistente, está recubierta por una capa monocelular que comprende la capa de las células epidérmicas recubiertas por la cutícula cerosa. Esta capa está interrumpida por numerosas lenticelas más o menos desarrolladas rellenas de un tejido suberoso.

Internamente, podemos distinguir, en el centro, la zona ovárica, que constituye el corazón del fruto (**C**) y que contiene las cavidades que albergan las semillas (lóculos) (**LO**), mientras que en la periferia se puede observar el parénquima cortical de reserva (**PC**), procedente del gran desarrollo del periantio. Este parénquima está recorrido por haces vasculares (**F**), como se aprecia en un corte fresco, gracias a su tonalidad amarillenta o verdosa. Estos vasos son muy aparentes en los pardeamientos de senescencia.

Si consideramos un corte perpendicular a la superficie del fruto, podemos distinguir en primer lugar la epidermis (**E**), en la que las células son más o menos visibles, coronadas y a veces rodeadas por la cutícula (**CU**) de naturaleza lipídica. Descendiendo podemos apreciar una o varias capas subepidérmicas (**SE**) (a menudo 3), de células alargadas en sentido tangencial y de membranas frecuentemente gruesas. Y, por último, el propio pericarpio (**PC**), que está formado por células grandes de dimensiones muy variables y de forma redondeada. Los haces vasculares están generalmente por debajo de estas capas celulares.

2.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Nutricionalmente, las peras se consideran una buena fuente de fibra y pueden aportar sustanciales cantidades de potasio a la dieta. El flavor de las peras está asociado con unos elevados niveles en azúcares (Visser *et al.*, 1968), oscilando el contenido de azúcares totales en las variedades de pera más comunes entre el 8 y el 11 % por unidad de peso de pulpa comestible (Strachan *et al.*, 1951). Los azúcares reductores, de los que fructosa es el componente principal, constituyen alrededor del 80 % del total de azúcares presentes en estos frutos.

Los constituyentes pécticos en peras dependen de la variedad, el estadio de madurez y las condiciones de almacenamiento. Durante el ripening, la protopectina resulta hidrolizada generando pectina soluble. Este proceso es el factor más importante en el

ablandamiento de las peras. El contenido en pectina soluble de peras Barlett pasó del 0.07 % en el momento de la cosecha al 0.7-0.8 % en el fruto organolépticamente maduro (CSIR, 1969).

Las peras tienen un contenido muy bajo de nitrógeno. El nitrógeno protéico sólo constituye el 8 % del nitrógeno total. Lisina, fenilalanina y leucina son los aminoácidos más abundantes en las proteínas de las peras, especialmente durante la maduración. Las vitaminas más importantes en pera son la vitamina A y el ácido ascórbico, seguidas de tiamina, riboflavina y ácido nicotínico. También contienen biotina, ácidos fólico y pantoténico y vitamina B₁₂. Se ha encontrado que las concentraciones de ascorbato y biotina son mucho mayores en la piel que en la pulpa de las peras. Los ácidos málico y cítrico son los ácidos orgánicos más importantes de los encontrados en peras.

Se ha determinado alta actividad poligalacturonasa durante el ripening de peras Barlett. Polifenol oxidasa se considera el enzima responsable del pardeamiento de los frutos al ser cortados, actuando el ácido clorogénico como sustrato preferente. Las peras maduras contienen cantidades apreciables de acetaldehído, que se cree responsable del escaldado y descomposición del fruto. El amargor y la astringencia son atribuidas a la presencia de compuestos fenólicos y polifenólicos (taninos). Los polifenoles de alto peso molecular tienden a ser más astringente mientras que los polifenoles de bajo peso molecular resultan más amargos (Williams *et al.*, 1977)

El flavor característico de cualquier fruto viene definido básicamente por sus volátiles. En peras Barlett se han determinado casi una centena de compuestos aromáticos (Jennings y Tressl, 1974). Los volátiles cuantitativamente más importantes del fruto maduro son los acetatos de etilo, propilo, butilo y hexilo, que forman el 70.6 % del total de volátiles (Shiota, 1990).

2.3. PRODUCCIÓN Y TECNOLOGÍA POSTCOSECHA

Los perales crecen en una amplia variedad de suelos. Los árboles se desarrollan prácticamente en todos los terrenos de cultivo, siempre que éstos les aporten suficiente humedad y estén bien drenados. Las condiciones bajo las que el peral se cultiva tienen una importante influencia en el posterior comportamiento del fruto durante el almacenamiento y la maduración.

La pera es un fruto climatérico que requiere ser recolectado antes de que se produzca la crisis climatérica si se quiere maximizar su vida postrecolección. La firmeza de la pulpa, el color de la piel, la suberosidad de las lenticelas, la fuerza de ruptura del pedúnculo, los días desde la floración plena, el etileno interno, el calor acumulado o el índice de Iodo son algunos de los métodos usados para indicar el óptimo de madurez del fruto, con vistas a la recolección (Salunkhe y Desai, 1984). El momento de la cosecha es crítico, ya que una recolección precoz rendirá frutos con pobre calidad organoléptica, mientras que una cosecha tardía acortará ostensiblemente la vida postcosecha del fruto. Por ello, el rango de madurez en el momento de la cosecha que permite obtener frutos de calidad óptima es bastante estrecho.

Las peras maduran mejor y con más aromas entre 18 y 21 °C que a temperaturas inferiores o superiores. De hecho, algunas variedades no madurarán si la temperatura se mantiene por encima de 25 °C (Maxie *et al.*, 1974). La pera Blanquilla tiene una alta actividad respiratoria que se ve sensiblemente reducida al ir descendiendo la temperatura; de ahí el interés de que esta disminución se produzca rápidamente. El Q_{10} entre 20 y 10 °C vale 4.6 y entre 10 y 0 °C adquiere un valor 3.5. Por consiguiente, hacer descender la temperatura del fruto desde 20 a 0 °C puede reducir la tasa respiratoria, y con ella la actividad metabólica en general, en más de 15 veces su valor. Los frutos soportan bien las bajas temperaturas (-1 °C). La temperatura media de congelación de sus tejidos se evalúa próxima a -2.2 °C, dependiendo de su contenido en sólidos solubles. El almacenamiento refrigerado en atmósfera de aire resulta apropiado para periodos cortos de tiempo,

normalmente no más de tres o cuatro meses, aunque en las variedades de verano (como Blanquilla) su duración debe acortarse más, si no se quiere incrementar el riesgo de pérdidas importantes por problemas de senescencia. Los frutos destinados a conservación frigorífica deben ser sometidos a tratamientos que prevengan la aparición de alteraciones fúngicas o fisiológicas. El tratamiento puede realizarse inmediatamente antes o inmediatamente después de la recolección, siendo el tratamiento postcosecha el que rinde mejores resultados.

El uso de atmósferas controladas o modificadas permite alargar la vida útil de los frutos incluso en un 50 %. Las peras son sensibles al dióxido de carbono. Expuestas a niveles iguales o superiores al 3 % pueden desarrollar pardeamiento del pericarpio, mientras que ante un 5 % de CO₂ pueden resultar severamente afectadas por una fisiopatía denominada “corazon pardo”. La sensibilidad al CO₂ se incrementa a medida que baja la concentración de oxígeno. En la conservación de peras resulta frecuente el uso de atmósferas con un 3-5 % O₂ + 1.5-3 % CO₂, aunque la orientación actual se dirige hacia atmósferas con un contenido muy bajo de oxígeno, 0.5 a 1.5 %, (*Ultra Low Oxygen, ULO*), con una disminución paralela del contenido de CO₂ hasta obtener porcentajes semejantes de ambos gases.

Los frutos de pera han sido irradiados con rayos γ y con rayos X antes del almacenamiento refrigerado o en atmósfera controlada. Al-Bachir y Sass (1989) han mostrado que la irradiación acelera el ripening de los frutos, al menos en lo que respecta a la respiración y a la producción de etileno. No obstante, los frutos irradiados pudieron ser almacenados con éxito durante 7 meses a 0-0.5 °C, 92 % Hr en 2 % CO₂ y 2 % O₂ (Schwarz, 1991).

3

ETILENO Y CONTROL DEL RIPENING

El etileno, que es la olefina de estructura más simple y existe en estado gaseoso bajo condiciones fisiológicas normales, regula muchos aspectos del desarrollo y la senescencia de los vegetales. Es biológicamente activo en cantidades traza y sus efectos son comercialmente importantes. Aunque a mitad del siglo XIX estaba claro que la presencia de “materiales gaseosos” en el aire podía modificar el crecimiento de las plantas, no fue hasta el comienzo de este siglo cuando Neljubow (1901) identificó al etileno como el componente activo del gas de iluminación que causaba un extraño hábito de crecimiento en plántulas de guisante etiolado. La primera sugerencia de que los vegetales producen un gas que influencia el crecimiento de vegetales adyacentes fue aportada por Cousin (1910), quien encontró que un gas producido por naranjas causaba el ripening de bananas durante el transporte de una carga mixta. En 1934 Gane mostró evidencias de que el etileno era realmente producido por manzanas maduras. Desde entonces, se ha demostrado que el etileno es producido por prácticamente todas las partes de los vegetales superiores, incluyendo hojas, tallos, raíces, flores, frutos, tubérculos y semillas en germinación. Igualmente ha quedado claro que el etileno juega un importante papel en la regulación de muchos procesos fisiológicos entre la germinación de la semilla y la senescencia (Abeles, 1992).

Durante el crecimiento y la maduración de los frutos hay cambios en las concentraciones de todas las sustancias reguladoras del crecimiento vegetal (fitohormonas) y la aplicación exógena de éstas puede modificar en alguna extensión su comportamiento durante el ripening (McGlasson et al., 1978). Así, las giberelinas pueden retardar el ripening oponiéndose a la acción del etileno, el ácido abscísico puede acelerarlo (McGlasson, 1985), y las auxinas pueden retardarlo o acelerarlo, dependiendo del método

de aplicación y del tejido al que es aplicado (McGlasson et al., 1978). Sin embargo, no hay evidencias de un papel primario para ninguna de estas fitohormonas. El único compuesto identificado como regulador del ripening es el etileno, y esto parece sólo funcionar en frutos climatéricos.

3.1. ETILENO Y REGULACIÓN DEL RIPENING

Las evidencias acumuladas que apoyan el papel regulador del etileno en el ripening podrían concretarse en los siguientes hechos:

- 1) La producción de etileno por frutos climatéricos es una de las primeras indicaciones del ripening y precede otros eventos (Grierson y Tucker, 1983; Su et al., 1984).
- 2) La maduración de frutos inmaduros resulta acelerada si se aplica exógenamente etileno (McGlasson et al., 1978).
- 3) La eliminación del etileno endógeno que se va produciendo retarda el ripening.
- 4) La inhibición de la síntesis de etileno retarda o previene el ripening (Yang y Hoffman, 1984).
- 5) Bajas concentraciones de Ag^+ , que se cree interfieren con los supuestos receptores de etileno, inhiben el ripening (Hobson et al., 1984; Salveit et al., 1978).

Se conoce que el etileno, en frutos climatéricos, juega al menos tres diferentes papeles durante el ripening. En primer lugar, es un componente del sistema hormonal responsable de su iniciación. Además es, por su producción autocatalítica, un producto del propio ripening. Y en tercer lugar, la gran cantidad de etileno generada secundariamente, parece coordinar los otros procesos asociados a esta fase. La base bioquímica por la que el etileno indica el comienzo del ripening es desconocida. El etileno parece estimular el metabolismo en general y puede estar involucrado en la activación o modificación de la regulación de enzimas o rutas ya existentes, así como producir la expresión de nuevos genes (Baker *et al.*, 1985).

3.2. CONCENTRACION UMBRAL DE ETILENO

Pratt y Goeschl (1969) reconocieron al menos tres relaciones entre los cambios en los niveles de etileno y la iniciación del climaterio respiratorio. En muchos frutos el nivel de etileno se incrementa hasta una concentración umbral crítica, que entonces induce el síndrome del ripening. El caso más claro de esta situación es el melón dulce (Marei y Crane, 1971), en el que la concentración endógena de etileno pasa de 0.1 $\mu\text{l/l}$ hasta 3 $\mu\text{l/l}$ diez días antes de que se produzca el incremento respiratorio. Esta concentración de etileno es la mínima exigida para promover el ripening en frutos inmaduros. En otros frutos, como el plátano, el incremento en la concentración de etileno precede en pocas horas la crisis climaterica (Burg y Burg, 1962). Ambas situaciones dejan abierta la cuestión del factor responsable del aumento inicial de la producción de etileno.

Las otras dos relaciones de Pratt y Goeschl tienen que ver con la presencia de inhibidores del ripening. Estos factores pueden bien ser endógenos del fruto o bien tratarse de compuestos producidos en otro punto de la planta y continuamente transportados hasta él. En aguacate cv. Fuerte, el ripening está totalmente inhibido mientras el fruto se encuentra unido al árbol. Gazit y Blumenfeld (1970) mostraron que el tratamiento de aguacates en el árbol con 50 $\mu\text{l/l}$ de etileno durante 24 horas no provocaba el ripening. De igual manera, tampoco se inducía el ripening si frutos recién cosechados se trataban durante 24 h con 100 $\mu\text{l/l}$ de etileno. Sin embargo, el tratamiento resultaba satisfactorio si su aplicación se retrasaba 24 horas. Resulta evidente, pues, que en este fruto el nivel de etileno no es el factor que determina el inicio del ripening, sino que es la lenta desaparición de un factor suministrado al fruto mientras se encuentra unido al árbol, la que condiciona la entrada en esta fase. En manzana, la permanencia en el árbol no impide el ripening, pero modifica la intensidad del climaterio respiratorio y reduce severamente la producción de etileno (Meigh *et al.*, 1967). En plátano (Burg y Burg, 1962) y manzana (Reid *et al.*, 1973) los niveles de etileno potencialmente efectivos están presentes en el fruto mucho antes del comienzo del ripening. Parece que es el cambio en la sensibilidad que los tejidos muestran al etileno lo que condiciona el momento de inicio del ripening. En estos frutos, la

concentración de etileno requerida para inducir el ripening disminuye a medida que avanza el estadio de madurez (Harkett *et al.*, 1971; Wang *et al.*, 1972).

La concentración de etileno en el interior de un fruto viene determinada por su velocidad de producción y por la estructura de los tejidos (Burg y Burg, 1965). La difusión del etileno, oxígeno y dióxido de carbono en un fruto obedece la ley de Fick, de manera que la velocidad de difusión de estos gases es proporcional al gradiente de concentración existente entre el interior y el exterior del fruto (Burg y Burg, 1965). La constante de proporcionalidad de esta relación incluye aspectos relacionados con el coeficiente de difusión para el gas, así como una constante específica del fruto, que a su vez considera parámetros implicados en la geometría y el espesor de las barreras que limitan la difusión.

En los frutos se produce un gradiente de concentración de etileno debido fundamentalmente a la resistencia a la difusión que ofrecen los tejidos y a una baja relación área superficial/volumen. En frutos tales como la manzana, la principal barrera a la difusión la opone la epidermis, produciéndose el desprendimiento de etileno fundamentalmente a través de las lenticelas, mientras que en tomate, se ha estimado que del orden del 60 % de la difusión gaseosa se produce a través del cáliz (Burg y Burg, 1965). Así, es posible que los cambios en la resistencia a la difusión del etileno en los tejidos puedan tener una repercusión no suficientemente valorada en el mantenimiento de unos niveles críticos de etileno endógeno.

El fenómeno de autoinhibición de la producción de etileno ha sido apuntada por Zeroni y cols. (1976) como un mecanismo de conservación del estado preclimatérico. En higo inmaduro y en tomate verde maduro se observa que si se deja acumular etileno alrededor del fruto, la producción de etileno cesa al alcanzarse un valor crítico (en torno a 0.6 $\mu\text{l/l}$), mientras que esta autoinhibición no se registra cuando la experiencia se repite con frutos más maduros.

Se ha encontrado que el almacenamiento de plátano preclimatérico en atmósfera

con bajo contenido en oxígeno (1 a 5 %) conduce a una casi completa inhibición del ripening (Mapson y Robinson, 1966), si bien esta situación puede ser obviada por la introducción de etileno en esa misma atmósfera. Así mismo, en plátano cuyo ripening ha sido inducido por un corto tratamiento con etileno, el almacenamiento en atmósfera pobre en oxígeno (0 a 2 %), provoca un retraso del ripening. Sin embargo, este efecto pudo ser revocado si se introducía etileno en la atmósfera de almacenamiento. Hay, por tanto, evidencias de que el etileno puede afectar directamente procesos particulares, y que la activación de muchos de ellos puede ser una respuesta a la presencia de altos niveles de etileno.

En tejidos de frutos, incluyendo los no-climatéricos y los mutantes *rin* de tomate, la respuesta respiratoria se induce por tratamiento con etileno, pero requiere la presencia continuada de este gas para que la respuesta se mantenga. Esto podría explicar la relación que existe entre cambios en el citoplasma (producción de etileno) y la actividad mitocondrial (Romani, 1975). Igualmente hay relación directa entre la presencia de etileno y otros aspectos del ripening. Se ha sugerido que la existencia de altos niveles de etileno afecta el ablandamiento de la manzana durante su conservación (Forsyth *et al.*, 1969). Estos investigadores mostraron que la presencia de un absorbedor de etileno en la cámara de almacenamiento tenía un marcado efecto en la retención de la textura de los frutos. En aceituna, un fruto no climatérico, el tratamiento con etileno no tiene efecto sobre la tasa respiratoria, la pérdida de textura o el desarrollo del color. En cambio, incrementa la destrucción de clorofila (Maxie *et al.*, 1960).

Hay evidencias de que los niveles umbrales para diferentes respuestas dependientes de etileno pueden ser diferentes (Goeschl y Kays, 1975). Ya hemos mencionado que el climaterio en melón dulce requiere una concentración umbral de etileno de 3 $\mu\text{l/l}$ (Marei y Crane, 1971), siendo la concentración para semi-máxima respuesta de 5 a 10 $\mu\text{l/l}$. Por otro lado, el ablandamiento del tejido se induce por una concentración umbral del orden de 100 nl/l , con un semi-máximo valor de 320 nl/l (Goeschl y Kays, 1975). El incremento en la biosíntesis de carotenoides parece tener una similar dependencia de la concentración

de etileno que el ablandamiento (Pratt, 1971). Hay por tanto, una diferencia de aproximadamente 30 veces en la sensibilidad de estos procesos hacia el etileno. De forma similar, en pera, el comienzo del ablandamiento se indujo por concentraciones de etileno de sólo 0.08 $\mu\text{l/l}$, mientras que el comienzo del climaterio respiratorio en el mismo fruto requería 0.46 $\mu\text{l/l}$ (Wang y Mellenthin, 1972). Knecht *et al.* (1974) encontraron que la concentración interna de etileno se incrementaba hasta 5 $\mu\text{l/l}$ durante el ripening del tomate antes de que se produjera la solubilización de pectina, mientras que en el mismo fruto, una concentración de sólo 0.1 $\mu\text{l/l}$ fue suficiente para inducir el climaterio respiratorio. Vendrell y McGlasson (1971) mostraron que para inducir la degradación de almidón se requería una exposición a etileno más prolongada que para iniciar la destrucción de clorofila.

3.3. ETILENO Y EXPRESIÓN GENÉTICA

Se ha demostrado que el etileno estimula la incorporación de precursores radiactivos en ARN y proteínas en higo (Marei y Romani, 1971) y manzana (Hulme *et al.*, 1971), produciéndose un incremento del nivel de marcaje del ARN antes de que resulte aparente un incremento de la síntesis de proteínas. Sin embargo, en plátano, el etileno puede estimular la velocidad de síntesis de proteínas existentes sin que ello conduzca al ripening (Brady y O'Connell, 1976). Esto es consistente con estudios llevados a cabo con aguacate y tomate que muestran que el etileno induce la producción aumentada de ARNm ya existentes, seguido ligeramente rezagado por la aparición de nuevos ARNm (Christoffersen *et al.*, 1984; Maunders *et al.*, 1987). La aparición relativamente lenta de ARNm específicos del ripening en respuesta al etileno, indica el requerimiento de algún tipo de acondicionamiento. Es posible que puedan tener lugar cambios en la sensibilidad a esta fitohormona, tal vez mediados por un incremento en la concentración del receptor hormonal (Trewavas, 1981, 1983; McGlasson, 1985).

4**BIOSINTESIS DE ETILENO**

La historia de la investigación sobre la biosíntesis de etileno conoce de la agonía y la frustración de los científicos que han estado implicados en su dilucidación. Debido al hecho de que la homogeneización de los tejidos abolía completamente la actividad productora de etileno, los estudios de su ruta biosintética tuvieron que hacerse suministrando a los tejidos los precursores e intermediarios potenciales para observar su conversión en etileno. Debido a la simplicidad estructural del etileno existen numerosos compuestos que pueden producirlo a través de diversas reacciones químicas. Consecuentemente, un número elevado de compuestos fueron propuestos como precursores de esta fitohormona. Entre ellos se incluye al ácido linolénico, propanal, β -alanina, ácidos acrílico y β -hidroxipropiónico, etionina, etano, ácido acético, ácido fumárico y metionina. Estos trabajos, llevados a cabo con muy diferentes tejidos vegetales, incluyendo frutos maduros, tejidos tratados con auxinas, sometidos a heridas, estresados o senescentes, han indicado claramente que en plantas superiores el etileno se deriva de los carbonos 3 y 4 de la metionina. El etileno también es biosintetizado en grandes cantidades por algunas bacterias y hongos, pero la ruta biosintética operativa en microorganismos parece ser diferente a la activa en vegetales superiores (Yang y Hoffman, 1984).

4.1. S-ADENOSIL-L-METIONINA COMO INTERMEDIARIO

En todos los organismos, L-metionina no sólo se incorpora a las proteínas sino que también produce S-Adenosil-L-metionina (SAM ó AdoMet). De hecho, la mayoría de la metionina radiactiva suministrada a tejidos de manzana se convierte en SAM (Burg y Claggett, 1967). Puesto que la producción de etileno requiere oxígeno y es inhibida por

arsenito, y recuperada por fosfato, Burg (1973) propuso que la biosíntesis de etileno involucra una reacción que requería un enlace fosfato de alta energía, probablemente la formación de SAM. La observación de Murr y Yang (1975) de que la biosíntesis de etileno se inhibía por desacopladores de la fosforilación oxidativa también apoyó a SAM como intermediario. Adams y Yang (1977) propusieron que si SAM era intermediario en la biosíntesis de etileno, se produciría concomitantemente a la formación de etileno, 5'-metiltioadenosina (MTA). Usando [³⁵S]metionina, Adams y Yang encontraron que tejidos de manzana climatérica producían MTA y 5'-metiltioribosa (MTR) radiactivos, pero tejidos preclimáticos no los producían. Además, la formación de MTA y MTR era inhibida poderosamente por aminoetoxi-vinilglicina (AVG), que también inhibía la formación de etileno. Así, la producción de MTA se correlaciona con la síntesis de etileno, implicando a SAM como intermediario. La prueba definitiva de esta hipótesis se obtuvo cuando se detectó actividad ACC-sintasa en pericarpio de tomate y se observó que utilizaba SAM como sustrato (Boller *et al.*, 1979).

4.2. EL ÁCIDO 1-AMINOCICLOPROPANO-1-CARBOXÍLICO (ACC) COMO INMEDIATO PRECURSOR

La biosíntesis de etileno requiere oxígeno, de manera que cuando el tejido vegetal es sometido a condiciones anaeróbicas, la producción de etileno cesa (Hansen, 1942). Al retornar a atmósfera de aire, la producción de etileno comienza inmediatamente a una velocidad significativamente mayor que la que tenía antes de ser colocado en situación de anaerobiosis. Sin embargo, esta velocidad de producción de etileno es transitoria, de manera que, a las pocas horas, el tejido posee una tasa normal de producción de etileno. Burg y Thimann (1959) interpretaron este fenómeno proponiendo que en condiciones anaeróbicas se acumulaba un intermediario de la biosíntesis de etileno, y que este intermediario era rápidamente convertido a etileno en presencia de oxígeno. Adams y Yang (1979) encontraron que un metabolito de [U-¹⁴C]metionina se acumulaba sólo bajo condiciones anaeróbicas, que este metabolito desaparecía cuando el tejido retornaba al

aire, y que la radiactividad del metabolito acumulado se incorporaba en etileno. Este metabolito fue identificado como ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Adams y Yang también mostraron que [metil- ^{14}C] o [^{35}S]metionina incorporaban su marcaje en MTR, lo que era consistente con la formación de ACC a partir de metionina vía SAM.

El ACC había sido simultáneamente encontrado en pera y manzana por Burroughs, y en arándano por Vahatalo y Virtanen en 1957, considerándose un aminoácido no protéico. Burroughs (1957) también observó que el contenido de ACC se incrementaba durante el almacenamiento postcosecha de pera.

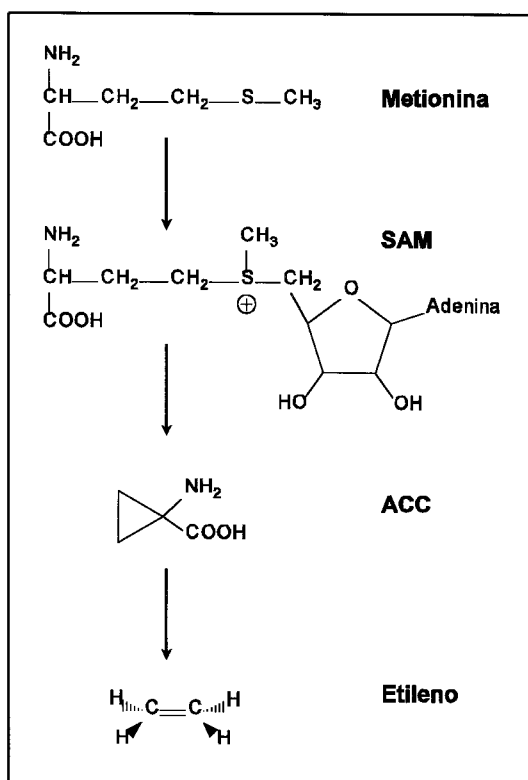


Figura 3. Ruta biosintética del etileno a partir de metionina.

El hallazgo del papel intermediario del ACC en la biosíntesis del etileno permitió determinar la etapa que era inhibida por AVG y la que presentaba requerimiento de oxígeno, resultando ser la conversión de SAM a ACC y la de ACC a etileno, respectivamente (Figura 3). Lürssen y cols. (1979) encontraron que tejidos incubados con ACC producían grandes cantidades de etileno y que las características de esta producción dependiente de ACC eran similares a las de la producción endógena, en términos de inhibición por anaerobiosis, choque osmótico y Co^{2+} . Todos estos resultados evidencian que en la mayoría de tejidos vegetales se produce etileno primariamente a partir de metionina, con SAM y ACC como intermediarios.

4.3. EL CICLO DE LA METIONINA

Adams y Yang (1977) encontraron que $[^{35}\text{S}]\text{MTA}$ suministrado a tejido de manzana era eficientemente convertido a MTR y metionina, y que $[^{35}\text{S}]\text{MTR}$ era incorporado en metionina. Esto indicaba que MTA era hidrolizado a MTR y que el átomo de azufre se reciclaba en metionina. Más tarde se demostró que la mitad ribosa de MTR también se incorporaba en metionina (Yung *et al.*, 1982; Wang *et al.*, 1982) y que MTR era fosforilado a MTR-1-fosfato (MTR-1-P) (Kushad *et al.*, 1983). La porción ribosa del ATP actúa como fuente de la porción butirato de la metionina, a partir de la cual se formará ACC y posteriormente etileno (Figura 4) (Yang y Hoffman, 1984).

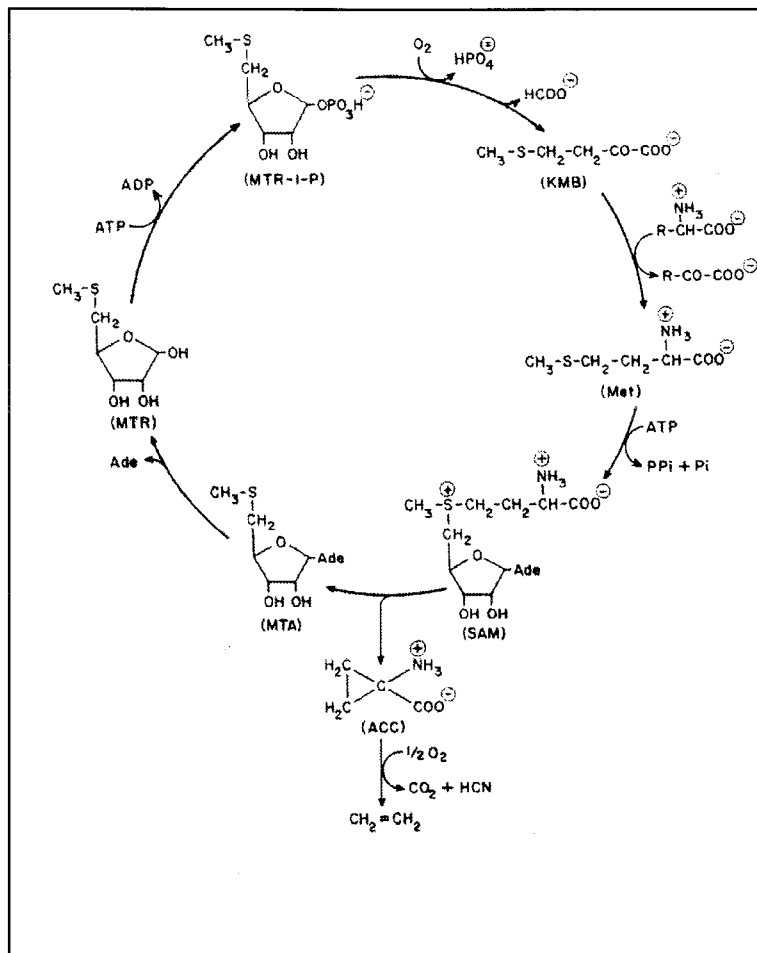


Figura 4. Ciclo de la metionina.

Los productos y los intermediarios conocidos en la ruta de reciclaje de la metionina son los mismos en animales y plantas, con una excepción: los animales usan MTA fosforilasa para metabolizar MTA a MTR-1-P en una única etapa, mientras que las plantas utilizan MTA nucleosidasa, que convierte MTA en MTR, siendo posteriormente MTR kinasa la que convierte MTR en MTR-1-P (McKeon y Yang, 1984). MTR-1-P se transforma en última instancia en KMB y formiato (Miyazaki y Yang, 1987), representando la reacción global una oxidación que involucra cuatro electrones. Puesto que el requerimiento de oxígeno molecular no ha podido ser demostrado, es probable que en esta reacción sean deshidrogenasas y no oxidasas los enzimas implicados. Para completar el ciclo, KMB es transaminado a metionina por acción de una transaminasa específica (Miyazaki y Yang, 1987), para la que L-glutamina es el donador más efectivo del grupo amino.

Este ciclo es también conocido como *Ciclo de Yang*. Se sabe poco acerca de su regulación, aunque la conversión de MTR a metionina no parece ser un factor limitante de la producción de etileno (Miyazaki y Yang, 1987). Las implicaciones fisiológicas de este ciclo son significativas. Cuando se produce etileno en cantidad importante, también se origina un coproducto, cuya misión es ser reciclado a metionina, manteniéndose así un aporte constante de este aminoácido para sostener la biosíntesis de etileno, incluso en tejidos con un *pool* pequeño de metionina. MTA es igualmente producido durante la biosíntesis de poliaminas, siendo posible que esta ruta biosintética también sea mantenida por el ciclo de la metionina (Imaseki, 1991).

4.4. RUTA DEL ACC

Una pequeña fracción del SAM generado a partir de metionina es utilizado para producir etileno vía ACC (Figura 5). Los enzimas implicados en esta ruta son ACC sintasa y ACC oxidasa. ACC sintasa además de ACC, cataliza la formación de MTA que, como hemos visto, se introduce en el ciclo de Yang para el reciclaje de la metionina. ACC

oxidasa cataliza la conversión de ACC en etileno, CO₂ y HCN (Peiser *et al.* 1984). El ACC es también metabolizado a ácido 1-(malonilamino)ciclopropano-1-carboxílico (MACC) (Amrhein *et al.*, 1981). Esta reacción es catalizada por el enzima ACC N-maloniltransferasa (Amrhein *et al.*, 1982). La malonización del ACC se piensa que es un proceso fisiológicamente irreversible (Hoffman *et al.*, 1983b), si bien se ha descrito que altos niveles de MACC inducen la conversión de MACC a ACC en tallos de berro y en hojas de tabaco (Jiao *et al.*, 1986).

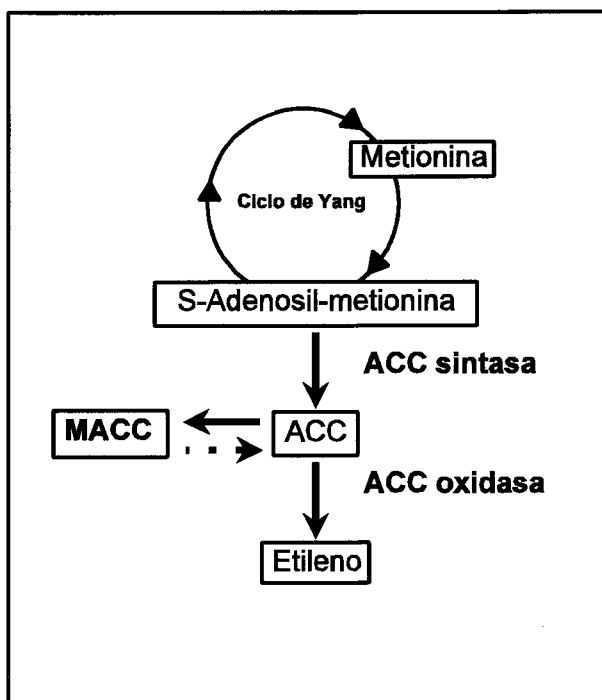


Figura 5. Ruta del ACC.

4.4.1. ACC sintasa [SAM MTA-liasa] (EC 4.4.1.14)

4.4.1.1. Propiedades enzimológicas

Al establecer métodos para la cuantificación de ACC, Boller y cols. (1979) y Yu y cols. (1979a) detectaron *in vitro* actividad ACC sintasa en pericarpio de tomate sometido a herida. En tejidos vegetales, ACC sintasa cataliza la formación de ACC y MTA a partir de SAM, siendo generalmente el enzima limitante de la velocidad de la ruta biosintética de etileno. Este enzima utiliza SAM como sustrato y piridoxal-5'-fosfato (PLP) como cofactor. El requerimiento de PLP en la biosíntesis de etileno había sido apuntado por Murr y Yang (1975) al comprobar que la conversión de metionina a etileno se inhibía por L-canalina, un inhibidor de enzimas unidas a PLP. ACC sintasa ha sido detectado, junto con pericarpio de tomate, en un grupo no muy numeroso de tejidos vegetales (Yoshii e

Imaseki, 1981; Nakagawa *et al.*, 1988; Fuhrer, 1982; Hoffman y Yang, 1982; Riov y Yang, 1982b; Wang y Adams, 1982).

ACC sintasa parece ser un enzima citosólico y es inhibido competitivamente por AVG y ácido aminooxiacético (AOA), ambos inhibidores de los enzimas unidos a piridoxal. Como resultado de las distintas condiciones experimentales se han descrito valores de K_m para SAM que oscilan entre 12.1 y 60 μM y unas K_i para AVG que varían entre 0.12 y 10 μM . La K_i para AOA se cifra en 0.8 μM . El pH óptimo de la reacción enzimática está entre 8.5 y 9.5. ACC sintasa presenta una alta especificidad estereoquímica para SAM, tanto para el centro sulfurado como para el carbono α de la porción metionina, de manera que sólo el compuesto natural, (-)-L-SAM es sustrato activo, mientras que (+)-L-SAM es un inhibidor efectivo ($I_{50} = 15 \mu\text{M}$) y tanto (-)- como (+)-D-SAM son inactivos como sustratos (Khani-Oskouee *et al.*, 1987).

4.4.1.2. Inactivación inducida por SAM

Cuando la producción de etileno es inducida en un tejido vegetal por auxinas, o algún tipo de estrés, la producción de etileno después de la inducción declina rápidamente (Sakai e Imaseki, 1971). Este declinar está asociado a una bajada de actividad ACC sintasa (Yoshii e Imaseki, 1981). La vida media aparente de este enzima, en hipocotilos de *Phaseolus vulgaris* tratados con auxina y en tomate se estima en 25-30 minutos respectivamente (Yoshii e Imaseki, 1982; Imaseki *et al.*, 1982; Kende y Boller, 1981). Satoh y Esashi (1986) demostraron que ACC sintasa de hipocotilo de *Phaseolus vulgaris* tratado con auxina era inactivado por su sustrato (SAM). Esta inactivación no se observa en ausencia de PLP, ni en presencia de S-adenosil-homocisteina u homocisteina, conocidos inhibidores de ACC sintasa, lo que sugiere que la inactivación está asociada con la reacción catalítica. Ya que la vida media *in vitro* era similar a la mostrada por el tejido, se sugirió que SAM era el responsable de la rápida inactivación encontrada en el tejido (Satoh y Yang, 1988; Kim y Yang, 1992). Satoh y Yang (1988) pusieron de manifiesto que la

inactivación de ACC sintasa inducida por SAM involucra la formación de un enlace covalente entre una parte de la molécula de SAM, probablemente la porción 2-aminobutirato, y el centro activo del enzima. Yang et al. (1980) demostraron que vinilglicina inactivaba ACC sintasa en presencia de PLP, apoyando la idea de una reacción de eliminación β - γ sobre SAM (Figura 6).

4.4.1.3. Purificación y caracterización

ACC sintasa está presente en los tejidos en muy baja concentración siendo muy inestable después de su extracción. Los esfuerzos iniciales se dirigieron a caracterizar y purificar el enzima de tomate en fase de ripening, en el que los niveles de ACC sintasa

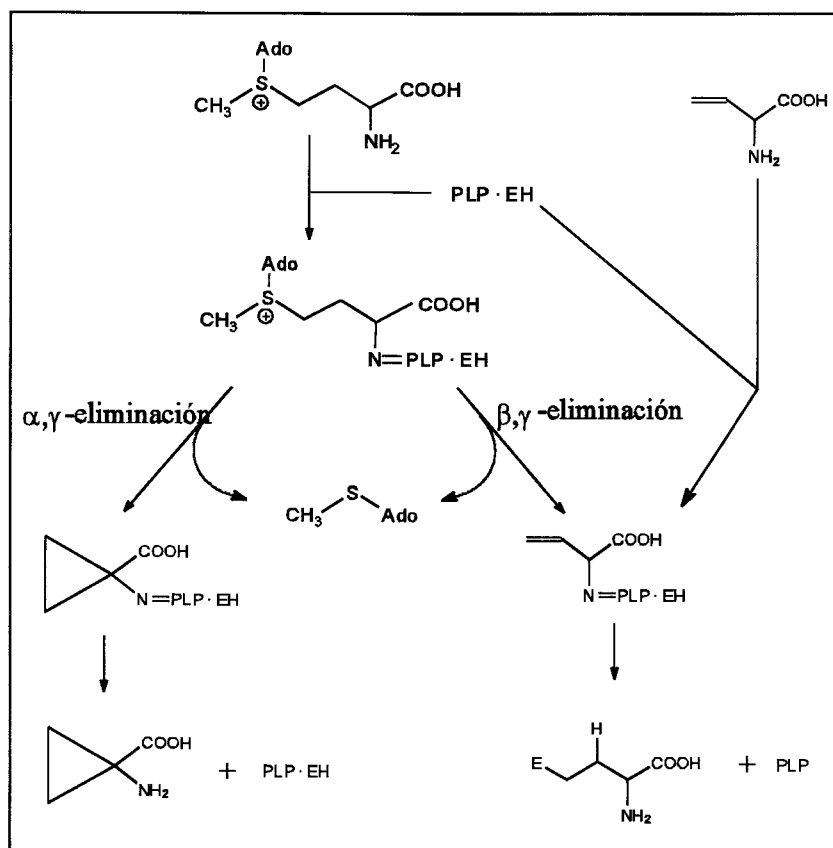


Figura 6. Esquema del mecanismo propuesto para la inactivación de ACC sintasa por SAM. Ado y EH representan al grupo adenosil y al apoenzima, respectivamente

fueron incrementados por diversos estímulos, como la lesión de los tejidos o el tratamiento con LiCl (Boller, 1984; Ramalingan *et al.*, 1985). La cromatografía de filtración en gel indica que ACC sintasa en homogenados de pericarpio lesionado tenía un peso molecular de 55 a 57 kDa (Acaster y Kende, 1983; Bleecker *et al.*, 1986; Yang, 1980). Se han obtenido anticuerpos monoclonales induciendo su producción en ratones mediante una preparación de ACC sintasa parcialmente purificada (Bleecker *et al.*, 1986; Bleecker, 1987). El enzima inmunopurificado ha mostrado un peso molecular de 50 kDa por electroforesis SDS en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Bleecker *et al.*, 1986; 1988). Rottmann *et al.* (1991) han sugerido que ACC sintasa sufre modificación proteolítica en el homogenado de tejidos. Basandose en los datos de secuencia aminoácida, Van der Straeten *et al.* (1990) han propuesto que aproximadamente 85 residuos aminoácidos están proteolíticamente adheridos al carboxilo terminal del enzima.

Diferentes esfuerzos para identificar isoformas de ACC sintasa por isoelectroenfoque han conducido a resultados contradictorios (Mehta *et al.*, 1988; Privalle y Graham, 1987; Van der Straeten, 1989; White y Kende, 1990). Parece que ACC sintasa *in vitro* presenta un pI comprendido entre 5.8 y 6.0 (Van der Straeten, 1989; White y Kende, 1990). *In vivo*, el enzima marcado y desnaturalizado se separa en cuatro manchas radiactivas de igual peso molecular con pIs comprendidos entre 6.6 y 6.9 (White y Kende, 1990). Sin embargo, no está claro si estas cuatro manchas corresponden a artefactos de la misma proteína o representan verdaderas isoformas de ACC sintasa.

Anticuerpos contra ACC sintasa de mesocarpo lesionado de *Cucurbita maxima* reconocieron al enzima inducido por herida de tomate e hipocotilos de *Cucurbita maxima*, pero no el enzima inducido por auxina en tomate, *Cucurbita maxima* o *Phaseolus vulgaris* (Nakagawa *et al.*, 1988). Estos resultados indican que existen dos isoformas de ACC sintasa, una inducida por herida y otra por auxina, y que son formas suficientemente diferentes para ser distinguidas inmunológicamente.

Sato *et al.* (1991) purificaron ACC sintasa de *Cucurbita pepo* unas 6000 veces por cromatografía convencional y HPLC. El peso molecular del enzima nativo determinado por cromatografía de exclusión fue 86 kDa, mientras que el del enzima desnaturalizado fue hallado 46 kDa por SDS-PAGE (Sato y Theologis, 1989; Sato *et al.*, 1991). Esto indica que ACC sintasa en *Cucurbita pepo* es un dímero formado por dos subunidades idénticas. También hay constancia de modificación post-translacional del enzima, pues el producto de la inmunoprecipitación del enzima *in vitro* y el marcaje *in vivo* del enzima rinden polipéptidos de 53 y 55 kDa respectivamente (Sato y Theologis, 1989; Sato *et al.*, 1991).

Bufler y Bangerth (1983) indicaron que ACC sintasa podía ser extraído de manzana en presencia de un detergente como Triton X-100. Yip *et al.* (1991) demostraron que ACC sintasa en homogenados de manzana permanecía asociado a la fracción corpuscular. Puesto que se encontró actividad en todas las fracciones de orgánulos, se asume que la unión del enzima a los corpúsculos celulares es un hecho artificial que se produce durante la homogenización de los tejidos.

4.4.1.4. Mecanismo de catálisis e identificación del Centro Activo

Los enzimas que requieren PLP como cofactor usualmente catalizan la eliminación de α -aminoácidos mediante reacciones de eliminación α,β ó β,γ (Walsh, 1979). Si esto fuera cierto para ACC sintasa, la conversión de SAM en ACC implicaría la formación de un intermediario tipo vinilglicina (Ramalingam *et al.*, 1985). Sin embargo, Adams y Yang (1979) y Yu *et al.* (1979a) propusieron que el mecanismo de la reacción catalizada por ACC sintasa tiene lugar a través de una reacción de α,γ -eliminación, vía un intermediario ciclopropano (Figura 6). Así, la base de Schiff formada entre el grupo amino en C2 del SAM y el complejo enzima-PLP elimina el protón de C2, generando un carbanión. El catión sulfonio de SAM activa el metileno en C4 y facilita la reacción de desplazamiento nucleofílico intracelular por el carbanión, dando como productos de la reacción ACC y MTA. El mecanismo de desplazamiento γ directo fue apoyado experimentalmente por

Ramalingam *et al.* (1985), quienes usando (\pm)-S-adenosil-L-(3R*,4S*)-[3,4- 2 H₂]metionina (cis-SAM) y (\pm)-S-adenosil-L-(3S*,4R*)-[3,4- 2 H₂]metionina (trans-SAM) como sustratos para ACC sintasa, en tomate, comprobaron que no existe participación del hidrógeno β . Este aspecto hace único al mecanismo de reacción de ACC sintasa entre los enzimas mediados por fosfato de piridoxal, puesto que la mayoría de las reacciones implican la participación del hidrógeno β , dando lugar a isomerización cis,trans. El hidrógeno amínico en C2 de SAM parece jugar un importante papel en la interacción sustrato-enzima, ya que la sustitución del grupo amino por el grupo hidroxilo ó dimetilamino elimina la reactividad del sustrato (Khani-OsKouee *et al.*, 1987).

Yip *et al.*, (1990) identificaron el centro activo de ACC sintasa usando métodos de marcaje. El enzima de manzana madura fue inmunopurificado, el doble enlace entre PLP y el enzima fue reducido por NaB³H₄, y la proteína sometida a digestión con tripsina. La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) del hidrolizado permitió aislar un péptido radiactivo, con una secuencia aminoácida Ser-Leu-Ser-X₁-Asp-Leu-Gli-Leu-Pro-Gli-Fen-Arg, donde X₁ era un derivado aminoácido radiactivo no conocido. El análisis por espectrometría de masas, permitió determinar que la masa calculada para X₁ coincide con la de lisina alquilada con vinilglicina. La secuencia Ser-Leu-Ser-Lis es consistente con la secuencia del sitio activo de otros enzimas que requieren PLP. Estos resultados también son coherentes con la noción de que el grupo ϵ -NH₂ de la lisina en posición 4 del dodecapéptido es el que se une a PLP mediante una unión aldimina. Este mismo grupo ϵ -NH₂ también puede unirse a la porción 2-aminobutirato del SAM, conduciendo a la inactivación irreversible del enzima.

Yip *et al.* (1990) también marcaron con [¹⁴C]SAM el enzima obtenido a partir de pericarpio de tomate lesionado y aislaron el péptido tríptico que contenía el sitio activo. La secuenciación demostró que estaban presentes dos dodecapéptidos. El primero de ellos tenía la secuencia exacta del fragmento portador del sitio activo de ACC sintasa de manzana madura. En el segundo, la leucina en posición 6 era sustituida por metionina (Ser-Leu-Ser-Lis-Asp-Met-Gli-Leu-Pro-Gli-Fen-Arg). Yip *et al.* (1990) sugirieron que estos dos

centros activos correspondían a dos isoformas de ACC sintasa, una de las cuales se expresa durante el ripening y la otra durante la lesión de los tejidos.

4.4.1.5. Clonación de ACC-sintasa

Sato y Theologis (1989) identificaron un clon que codificaba totalmente ACC sintasa, siendo determinada por Sato *et al.* (1991) su secuencia nucleotida y la secuencia aminoácida que de ella se deriva. Van Der Straeten *et al.* (1990) también publicaron la secuencia nucleotida de un clon de 420 bp que tenía un 82 % de similaridad con la región correspondiente del clon que codificaba totalmente ACC sintasa. Esto fue una nueva evidencia de la existencia de más de un gen para ACC sintasa en tomate. Las secuencias nucleotida y aminoácida derivada de un segundo gen que codifica totalmente ACC sintasa, y que contiene la secuencia parcial de 420 bp de Van Der Straeten (1990), ha sido determinada por Olson *et al.* (1991). Rottmann *et al.* (1991) han mostrado la secuencia nucleotida de dos cADN para ACC sintasa de tomate que son prácticamente idénticas a las anteriores. Por su parte, Nakajima *et al.* (1990) y Nakagawa *et al.* (1991) han presentado las secuencias nucleotida y aminoácida de dos clones obtenidos de *Cucurbita maxima*, mientras que Park *et al.* (1992) han hecho lo propio con un gen que codifica ACC sintasa en pétalo de clavel. La identidad de las secuencias aminoácidas de las anteriores ACC sintasas varían entre un 48 y un 97 %.

La estructura primaria de ACC sintasa, deducida de la secuencia nucleotida de los clones, muestra que el peso molecular del enzima de diferentes fuentes es bastante similar, oscilando entre los 53 kDa para el enzima de tomate (Rottmann et al., 1991) y 58 kDa para el de clavel (Park *et al.*, 1992). El mayor nivel de homología entre diferentes ACC sintasas se produce en la parte interna del polipéptido, mientras que los terminales carboxilo son más divergentes. Existen siete regiones de alta homología entre ACC sintasas, a juzgar por sus secuencias aminoácidas. La homología más notable se observa en torno al sitio activo del enzima. Se ha apuntado que todas las ACC sintasas conocidas

presentan invariablemente 11 ó 12 aminoácidos que se creen implicados en la unión al fosfato de piridoxal y al sustrato, como en otras aminotransferasas (Huang *et al.*, 1991; Rottmann *et al.*, 1991).

4.4.1.6. Inducción de ACC sintasa

Un hecho característico de la biosíntesis de etileno en vegetales superiores es que su velocidad de producción resulta dramáticamente incrementada por varios estímulos. En todos los casos, el factor limitante parece ser el nivel endógeno de ACC sintasa.

La evidencia directa de la síntesis *de novo* de ACC sintasa fue obtenida por medida de densidad de marcaje radiactivo para los enzimas inducidos por herida en tomate (Acaster y Kende, 1983), y por elicitadores fúngicos en cultivos celulares de perejil (Chappel *et al.*, 1984). La correlación entre el incremento de actividad ACC sintasa en tejidos estimulados y el incremento en el nivel de esta proteína pudo observarse una vez que estuvieron disponibles anticuerpos específicos para ACC sintasa (Bleecker *et al.*, 1988; Sato y Theologis, 1989). Dado que no se han encontrado otros compuestos con reacción positiva en extractos crudos o parcialmente purificados de tejidos que no exhibían niveles detectables de actividad ACC sintasa, resulta poco probable que tenga lugar, tras la lesión de los tejidos, la conversión de una pro-enzima a enzima activo.

Los incrementos de actividad ACC sintasa durante el ripening del fruto (Rottmann *et al.*, 1991; Van Der Straeten *et al.*, 1990; Yip *et al.*, 1992), la marchitez de las flores (Park *et al.*, 1992; Van der Straeten *et al.*, 1990; Woodson *et al.*, 1992), y en respuesta a estímulos exógenos como lesiones de los tejidos (Huang *et al.*, 1991; Nakajima *et al.*, 1990; Olson *et al.*, 1991; Sato y Theologis, 1989, Yip *et al.*, 1992), auxinas y citoquininas (Huang *et al.*, 1991; Nakagawa *et al.*, 1991; Sato y Theologis, 1989; Van Der Straeten *et al.*, 1990; Yip *et al.*, 1992) y etileno (Rottmann *et al.*, 1991; Woodson *et al.*, 1992), parecen estar basados en incrementos de los niveles de ARNm correspondientes a ACC

sintasa. La inducción de estos incrementos de actividad ACC sintasa resultan inhibidos tanto por inhibidores de la síntesis de proteínas (cicloheximida, MDMG) como de la síntesis de ARN (α -amanitina, actinomicina-D), lo que indica que el incremento de la actividad enzimática requiere la síntesis de ARN y proteínas (Imaseki, 1991). Sin embargo, Chapell *et al.* (1984) y Felix *et al.* (1991) encontraron que la adición de elicidores fúngicos a cultivos celulares de perejil y tomate, respectivamente, inducía la síntesis de etileno y la actividad ACC sintasa en presencia de inhibidores de la síntesis de ARN. No obstante, el incremento de actividad ACC sintasa resultaba bloqueado por cicloheximida, lo que revelaría la posibilidad de que ACC sintasa pueda ser regulada igualmente a nivel post-transcripcional

4.4.2. ACC N-Maloniltransferasa

Los niveles de ACC pueden incrementarse durante el desarrollo y la maduración o en respuesta a situaciones de estrés. Por ello, resulta sensato pensar que la planta ha de poseer algún sistema para secuestrar ACC y prevenir así, la sobreproducción de etileno. Es conocido que en algunos microorganismos el ACC es metabolizado a 2-oxoglutarato y amoníaco (Honma y Shimomura, 1978). Sin embargo, Amrhein *et al.* (1981) no pudieron detectar esta reacción de deaminación en plantas, sino que por el contrario descubrieron que el ACC exógeno, además de producir etileno, se conjugaba eficientemente originando un compuesto que fue identificado como N-Malonil-ACC (MACC). Hoffman *et al.* (1982) identificaron a MACC como el principal metabolito no volátil de ACC, tanto en tejidos estresados como no estresados.

Parece que el enzima responsable de esta conjugación (ACC N-Maloniltransferasa) es constitutivo (Amrhein *et al.*, 1982; Yang y Hoffman, 1984). Así, se formaría MACC tan pronto como se produjera la inducción de la síntesis de ACC. Puesto que MACC es un pobre productor de etileno, y la reacción de conjugación se considera prácticamente irreversible, se piensa que MACC es un producto final, biológicamente inactivo, en lugar

de una forma de reserva de ACC (Amrhein *et al.*, 1982; Hoffman *et al.*, 1983a). En apoyo de esta idea se comprobó que en semillas de cacahuete en germinación que contenían grandes cantidades de MACC (50-100 nmol g⁻¹), el etileno producido derivaba casi exclusivamente del ACC sintetizado *de novo*, y menos de un 2 % provenía del MACC acumulado (Hoffman *et al.*, 1983b). Una vez formado, el MACC puede ser transportado y almacenado en la vacuola (Bouzayen *et al.*, 1988; 1989).

La N-malonización de D-aminoácidos es un hecho constatado en vegetales superiores (Kawasaki *et al.*, 1982). Se piensa que la significación fisiológica de la N-malonización es inactivar sustancias extrañas potencialmente tóxicas tales como D-aminoácidos o herbicidas que pudieran ser nocivas para el vegetal (Lamoureux *et al.* 1981). Puesto que ACC carece de carbonos asimétricos, puede ser reconocido tanto como D- o como L-aminoácido. Por ello, no sería descabellado pensar que la malonización de ACC y D-aminoácidos pudieran estar interrelacionadas. Efectivamente, varios D-aminoácidos inhiben la malonización de ACC exógeno, resultando en un incremento de los niveles de ACC libre y de la tasa de producción de etileno; los L-enantiómeros son, sin embargo, inefectivos (Amrhein *et al.*, 1984; Liu *et al.*, 1983). Recíprocamente, ACC o D-Phe inhibieron poderosamente la formación de N-malonil-metionina a partir de D-metionina exógena. Estos resultados indican que existe una íntima relación entre la malonización de ACC y la de D-aminoácidos y, además, sugiere que ambas reacciones pudieran ser catalizadas por el mismo enzima.

En 1984, Kionka y Amrhein presentaron un extracto libre de células que catalizaba la formación de MACC a partir de ACC y Malonil-CoA. Estos autores han determinado las Km para ambos sustratos, resultando ser 0.15 mM para ACC y 0.25 mM para malonil-CoA. Como la K_m del enzima formador de etileno para el ACC está entre 10 y 100 μM, el MACC resulta un sumidero de ACC sólo cuando sus niveles son altos o cuando la actividad EFE se encuentra saturada. AEC, D-aminoácidos no polares (D-metionina, D-fenilalanina y D-alanina) y el ácido α-aminoisobutírico son sustratos de la maloniltransferasa. El enzima es inhibido por CoA y por altas concentraciones de malonil-

CoA. ACC maloniltransferasa resulta activada por aniones monovalentes, siendo NO_3^- el más efectivo. El enzima es muy sensible a la inhibición por reactivos sulfhidrilo, incluyendo el p-cloromercuribenzoato, Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{3+} y N-etilmaleimida. Estos resultados sugieren la implicación de un grupo sulfhidrilo en el centro activo del enzima (Su *et al.*, 1985).

Jiao *et al.* (1986) mostraron que secciones de tallo de berro o de hoja de tabaco exhibían una marcada producción de etileno inducida por MACC. El extracto libre de células obtenido a partir de tejido de berro tratado con MACC, cataliza la ruptura del enlace amida del MACC para originar ACC y, presumiblemente ácido malónico, pudiendo clasificarse esta actividad como aminoacilasa. Igualmente, Jiao *et al.* (1986) establecieron las condiciones requeridas para obtener una hidrólisis significativa de MACC en tejidos vegetativos: largos periodos de incubación (algunas horas), alta concentración de MACC para inducir la síntesis de la hidrolasa, y alta concentración de MACC para la expresión de su actividad. Los propios autores reconocen que puesto que la conversión de MACC a ACC sólo puede ser inducida por MACC exógeno, y los niveles de MACC endógeno se mantienen muy por debajo de su K_m (0.45 mM) para MACC hidrolasa, la significación fisiológica de este proceso es, cuando menos, oscura. Sin embargo, Jiao *et al.* consideran que aunque se produzca muy poco metabolismo de MACC bajo condiciones fisiológicas, el potencial existe para que MACC actúe como fuente de ACC y etileno, cuando sus niveles se incrementen.

El etileno puede incrementar los niveles de actividad maloniltransferasa en varios tejidos (Gupta y Anderson, 1989; Liu *et al.*, 1985a; Liu *et al.*, 1985b; Philosoph-Hadas *et al.*, 1985). Este efecto puede derivarse de la autoinhibición de la producción de etileno. El tratamiento de tomate verde con etileno provocó un aumento de actividad maloniltransferasa en cuestión de 60 minutos (Liu *et al.*, 1985b). La iluminación durante 10 min de hipocotilos etiolados de *Phaseolus vulgaris* inhibió la producción de etileno un 40 %. Esto vino acompañado de un incremento del contenido de MACC en un 32 % y una disminución del nivel de ACC en un 37 % (Vangronsveld *et al.*, 1988). La reversión de la

inhibición de la producción de etileno por exposición a luz roja de alta frecuencia incrementó los niveles de ACC pero mantuvo inalterado el contenido de MACC, indicando que la síntesis de este compuesto había cesado. Jiao *et al.* (1987) han observado un aumento de actividad maloniltransferasa mediado por el fitocromo. El tratamiento con ácido abscísico incrementó el nivel de MACC nueve veces en secciones de hoja de espinaca (Philosoph-Hadas *et al.*, 1989). Condiciones de sequía, que originan un gran aumento del contenido de ABA, incrementaron los niveles de MACC en trigo, pero no en maíz (Skorupka, 1985). Por su parte, el ácido indolacético causó un aumento transitorio del contenido de ACC y de la producción de etileno, pero un incremento sostenido del nivel de MACC en *Vigna radiata* (Riov y Yang, 1989).

5**EL ENZIMA FORMADOR DE ETILENO
o ACC OXIDASA**

La última etapa de la ruta biosintética MSAE es la conversión de ACC en etileno. Esta etapa está catalizada por un sistema enzimático oxidativo que históricamente fue denominado *Enzima Formador de Etileno*, y que hoy conocemos como *ACC oxidasa*.

El aislamiento y caracterización del enzima ha resultado extremadamente complicado, pues si bien se ensaya fácilmente *in vivo* suministrando ACC a los tejidos, su actividad se pierde totalmente al homogeneizar éstos. ACC oxidasa es muy lábil y ha sido generalizada la creencia de que se encontraba presente en los tejidos en muy baja concentración. Por ello, los avances en el conocimiento de este paso se deben a ensayos *in vivo* o con sistemas modelo.

Cuando se aplica ACC exógeno a diferentes órganos vegetales (con la excepción de flores y frutos preclimáticos) se observa un pronunciado incremento de la producción de etileno (Cameron *et al.*, 1979; Lürssen *et al.*, 1979). Este hecho sugiere que el enzima que convierte ACC en etileno es constitutivo de los tejidos, y que la síntesis de ACC es la etapa limitante de la velocidad del proceso.

5.1. ASOCIACIÓN CON LAS MEMBRANAS CELULARES

Aún en el tiempo en el que la ruta biosintética del etileno no había sido completamente esclarecida, se tenía la certeza de que al menos una parte del sistema productor de etileno estaba asociado a las membranas celulares. Esta creencia se basaba en los descubrimientos de que la biosíntesis de etileno era severamente reducida por compuestos lipofílicos y detergentes tales como fosfatidilcolina, Tween-20 ó Triton X-100,

y choques osmóticos (Imaseki y Watanabe, 1978; Odawara *et al.*, 1977). Además, cuando los tejidos se homogeneizan, la capacidad de síntesis de etileno se pierde totalmente. Por otro lado, la producción de etileno se estabiliza por iones Ca^{2+} y la representación de la velocidad de reacción vs. temperatura muestra discontinuidad a $11.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Field, 1981a; Mattoo *et al.*, 1977). Todas estas observaciones consideradas conjuntamente mostraban que la biosíntesis de etileno estaba altamente estructurada y requería la integridad de las membranas.

Puesto que en tomate ACC sintasa es un enzima soluble (Boller *et al.*, 1979) y no existen datos que apoyen la localización de este enzima en las membranas, se asumió por eliminación que la conversión de ACC a etileno sería con toda probabilidad la etapa que requería integridad de las membranas. Esta noción vino acompañada por un gran cuerpo de evidencias (Yang y Hoffman, 1984; Mattoo y White, 1991). El choque osmótico o térmico, así como los detergentes inhiben la conversión de ACC en etileno *in vivo* (Apelbaum *et al.*, 1981a), al igual que hacen los ionóforos (Apelbaum *et al.*, 1981b; Mayne y Kende, 1986; Yu *et al.*, 1980). John (1983) llegó a sugerir que la actividad EFE se encontraba acoplada al transporte protónico a través de la membrana plasmática y que la formación de etileno requería el mantenimiento del potencial de membrana. Sin embargo, esta hipótesis no ha resultado apoyada por evidencias experimentales (John *et al.*, 1985).

5.2. PROPIEDADES DE ACC OXIDASA IN VIVO

De resultados obtenidos *in vivo* resulta claro que la conversión de ACC en etileno es absolutamente dependiente de oxígeno (Adams y Yang, 1979). La dependencia que la producción de etileno muestra respecto de las concentraciones de ACC y O_2 ha sido estudiada en una amplia gama de tejidos vegetales (Yip y Yang, 1988). El valor de la K_m para el oxígeno es muy dependiente de la concentración endógena de ACC. Cuando los niveles de ACC en los tejidos son bajos (inferiores a su K_m) la concentración de O_2 que rinde la semimáxima velocidad de producción de etileno ($[\text{S}]_{0.5}$) oscila entre el 5 y el 7 %,

siendo similar entre diferentes tejidos. Cuando la concentración de ACC se incrementa por encima de su K_m , la $[S]_{0.5}$ para el oxígeno disminuyó marcadamente, encontrándose valores de 0.2 % en tejido de manzana (Burg, 1973) y 1 % en tejido de *Ipomoea tricolor* (Konze *et al.*, 1980). Por contra, el valor de K_m para el ACC no se muestra dependiente de la concentración de oxígeno, pero varía de forma muy importante entre distintos tejidos, registrándose valores entre 10 y 100 μM (McKeon y Yang, 1984).

Estudios con marcadores revelan que el etileno deriva de los carbonos 2 y 3 de la molécula de ACC. Además de etileno, en la reacción catalizada por ACC oxidasa se origina CO_2 (proveniente del grupo carboxilo) y HCN (C-1) (Peiser *et al.*, 1984). Puesto que en tejidos vegetales no se ha detectado HCN libre, Peiser *et al.* sugirieron que estos tejidos poseen una gran capacidad para detoxificar el HCN generado por la oxidación del ACC. Está bien establecido que el HCN es metabolizado por β -cianoalanina sintasa, un enzima que está ampliamente distribuido en todos los tejidos vegetales (Miller y Conn, 1980). El enzima cataliza la conversión de HCN y cisteína a H_2S y β -cianoalanina. En tejidos de frutos maduros y en hipocotilos de *Phaseolus vulgaris* tratados con auxina, que se caracterizan por producir etileno a alta velocidad, Yip y Yang (1988) han estimado que la concentración de HCN en estado estacionario se mantiene por debajo de 0.2 μM . Así, estos tejidos son capaces de mantener los niveles de HCN tan bajos que no pueden causar inhibición de la citocromo oxidasa ($K_I = 10 \mu\text{M}$), que es vital para la respiración del tejido vegetal.

La conversión enzimática de ACC en etileno es estereoespecífica (Hoffman *et al.*, 1982). La molécula de ACC contiene dos grupos metilénicos, posee simetría reflexiva, pero carece de simetría rotacional. Como resultado de esto, los dos grupos metileno que son químicamente equivalentes, pueden ser distinguidos por un enzima estereoespecífico.

La sustitución de uno de los 4 átomos de hidrógeno metilénicos por un grupo etilo origina cuatro estereoisómeros del ácido 1-amino-2-etilciclopropano-1-carboxílico (AEC), cuyas configuraciones absolutas son (1R,2R), (1S,2S), (1R,2S) y (1S,2R) (Figura 7). Hoffman *et al.* (1982) dedujeron que si el enzima actuaba estereoespecíficamente, los cuatro estereoisómeros del AEC no serían convertidos a 1-buteno con igual eficiencia. Efectivamente, después de tratar tejidos de manzana postclimática y segmentos de hipocotilos de *Phaseolus vulgaris* con

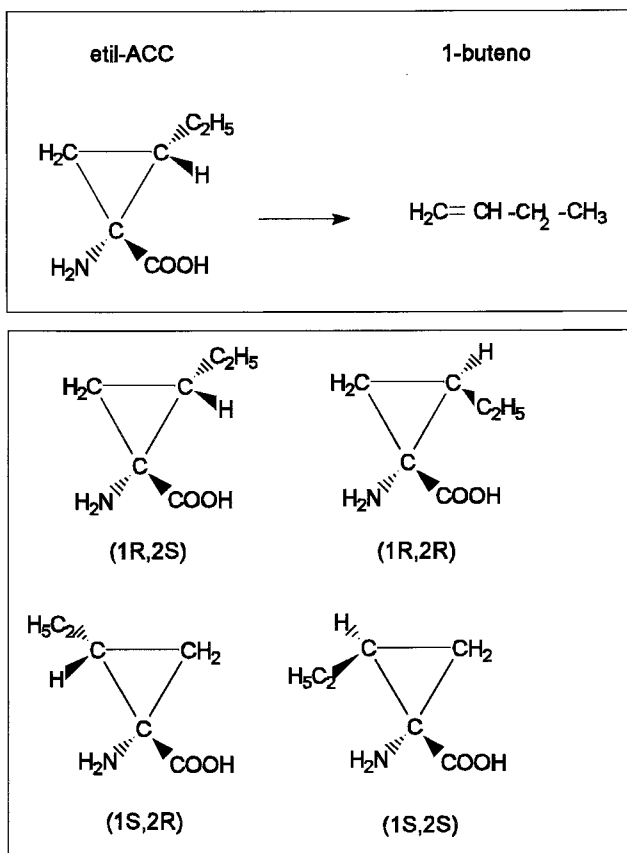


Figura 7. Estereoisómeros de etil-ACC

los citados estereoisómeros, observaron que, en ambos tejidos, (1R,2S)-AEC era el sustrato preferente. ACC y AEC parecen ser degradados por el mismo enzima puesto que la formación de etileno y 1-buteno resultan inhibidas en la misma extensión por atmósferas anóxicas y Co²⁺. Además, cuando ambos sustratos están presentes simultáneamente, ellos son mutuamente inhibidores (Hoffman *et al.*, 1982; McKeon y Yang, 1984).

5.3. SISTEMAS MODELO DESCRITOS

Aunque la oxidación de ACC a etileno fue inicialmente considerada una reacción altamente singular, desde 1979 se han descrito diversos sistemas enzimáticos aptos para catalizar la formación de etileno a partir de ACC, en presencia de diversos cofactores.

Muy poco tiempo después de la identificación del ACC como inmediato precursor del etileno, Konze y Kende (1979) obtuvieron un extracto enzimático de hipocotilos etiolados de *Pisum sativum* capaz de transformar ACC en etileno. El sistema se activa por el ión Mn^{2+} y se satura sólo a altas concentraciones de ACC. Cuando el extracto se pasa a través de una columna de Sephadex G-25, la fracción de alto peso molecular pierde la mayor parte de su actividad, que se restablece cuando un factor termoestable de bajo peso molecular, retenido en la columna, se añade de nuevo.

En 1981, Mayak *et al.* encontraron que la fracción microsómica aislada de pétalo de clavel catalizaba la formación de etileno a partir de ACC. Un año después, Mattoo *et al.* (1982) observaron el mismo efecto en microsomas de plántulas de guisante. Trabajando con membranas microsómicas, varios investigadores demostraron la participación del radical superóxido (McRae *et al.*, 1982) y de un hidroperóxido y un radical libre derivado de ACC (Legge y Thompson, 1983).

Otro sistema libre de células, capaz de transformar ACC en etileno, fue descrito por Vioque *et al.* (1981). Extractos enzimáticos de hojas de olivo con actividad AIA oxidasa/peroxidasa, en presencia de su sustrato (AIA), y de los cofactores diclorofenol (DCP), fosfato de piridoxal (PLP) y Mn^{2+} , liberan etileno a partir de ACC. Estos investigadores propusieron un esquema de reacción en dos etapas (Vioque y Vioque, 1985). En el primero de ellos, el ácido indolacético es oxidado por el enzima, que actúa como una oxidasa, generando un intermediario (posiblemente un peróxido o un hidroperóxido de AIA). En el segundo paso, el enzima, actuando como peroxidasa, utiliza este intermediario para, en presencia de fosfato de piridoxal, oxidar el ACC hasta etileno. El requerimiento de fosfato de piridoxal apoyaría el esquema propuesto por Lürssen *et al.* (1979), quienes sugerían que PLP permanecía unido al ACC hasta su degradación a etileno. La participación del sistema enzimático AIA oxidasa y su sustrato (AIA) en la biosíntesis de etileno explicaría, según Vioque *et al.* (1981), la conocida estimulación de la producción de etileno en tejidos vegetativos tratados con auxina (Lieberman, 1979), así

como el incremento de actividad peroxidasa detectada por Vioque y Albi (1975) en la zona de abscisión del fruto de *Olea europaea*.

En 1983, Shimokawa purificó un extracto enzimático con actividad AIA oxidasa de frutos de citrus unshiu, que cataliza igualmente la formación de etileno a partir de ACC, en presencia de AIA, PLP, DCP y Mn^{2+} . La formación de etileno tenía lugar específicamente en la fracción que contenía actividad AIA oxidasa. Los trabajos de Frenkel y Mukai, publicados en 1984, constituyeron otro fuerte apoyo a la participación del sistema AIA oxidasa en el último paso de la ruta biosintética del etileno. Estos investigadores, trabajando con carbofurano HDDB, un conocido inhibidor de AIA oxidasa, concluyeron que la formación de etileno se estimulaba por AIA y, que por el contrario, resulta reprimida cuando se inhibe la actividad AIA oxidasa. Frenkel y Mukai (1984) estiman que la producción de etileno en frutos puede venir regulada por los niveles de auxina, que a su vez resultan modulados por la actividad AIA oxidasa.

Vinkler y Apelbaum (1983) sugirieron que la actividad formadora de etileno se encontraba asociada a la membrana mitocondrial interna, y que el transporte de ACC al interior de la membrana era el paso limitante de la velocidad de reacción. Posteriormente, estudiaron la conversión de ACC en etileno por partículas submitocondriales aisladas de plántulas etioladas de *Pisum sativum* (Vinkler y Apelbaum, 1984). La reacción se incrementa por adición de Mn^{2+} y es similar al sistema soluble descrito por Konze y Kende (1979).

En 1984, Bousquet y Thimann describieron un sistema enzimático que constaba de ácido linoléico, PLP, Mn^{2+} y lipoxigenasa y que se mostraba capaz de oxidar el ACC a etileno. Este sistema modelo producía etileno más eficientemente que los sistemas anteriores y, además, relacionaba las dos fuentes primarias de etileno más estudiadas hasta entonces: metionina y ácido graso insaturado. En relación con esto, Lynch *et al.* (1985) indicaron que la conversión de ACC en etileno en microsomas de pétalo de clavel, estaba mediada por la acción de hidroperóxidos que derivaban del ataque de lipoxigenasa sobre

los lípidos de membrana. Esto explicaría la estimulación de la producción de etileno por los productos de peroxidación del ácido linolénico (Galliard *et al.*, 1968) y la no incorporación de radiactividad en el etileno cuando se utiliza ácido [¹⁴C]-linolénico (Mapson *et al.*, 1970). Kacperska y Kubacka-Zebalska (1985) han mostrado datos que apoyarían la conexión entre la producción de etileno y la actividad lipoxigenasa *in vivo*. Sin embargo, Pirrung (1986) encuentra suficientes divergencias entre el modelo de Bousquet y Thimann (1984) y el sistema fisiológico como para que pueda descartarse su participación *in vivo*.

Así, el primer problema que surge al describir un sistema con actividad EFE *in vitro* es probar su autenticidad. La oxidación de ACC a etileno *in vivo* aporta condiciones idóneas para la validación de los plausibles sistemas EFE *in vitro*. Los criterios empleados son características fundamentales del enzima *in vivo*: especificidad de sustrato, estereoespecificidad e inhibición competitiva por el ácido α -aminoisobutírico, análogo estructural del ACC.

Aunque estos sistemas pueden generar etileno a partir de su inmediato precursor, son dependientes de O₂, termodesnaturalizables e inhibidos por secuestradores de radicales libres como el galato de *n*-propilo, iones Co²⁺, etc., presentan características que no se asemejan a las exhibidas por el sistema enzimático fisiológico. Así, los sistemas libres de células descritos anteriormente presentan valores de K_m para el ACC altos (rango mM) cuando se comparan con el sistema que opera *in vivo*, carecen de estereoespecificidad para el sustrato y su reacción presenta una eficiencia muy pobre.

Estos hechos condujeron a la conclusión de que estos enzimas no representaban la auténtica actividad formadora de etileno. Además, el supuesto cuerpo de evidencias que se fue acumulando ha suministrado pistas falsas que a la postre han dificultado las investigaciones en la línea correcta.

El EFE fisiológico cataliza la oxidación directa del ACC para producir etileno, mientras que los sistemas libres de células descritos catalizan la generación enzimática de radicales libres, que posteriormente reaccionarían no enzimáticamente con el ACC para producir etileno. Esto explicaría la baja afinidad por el ACC, así como la carencia de estereoespecificidad hacia los isómeros del AEC.

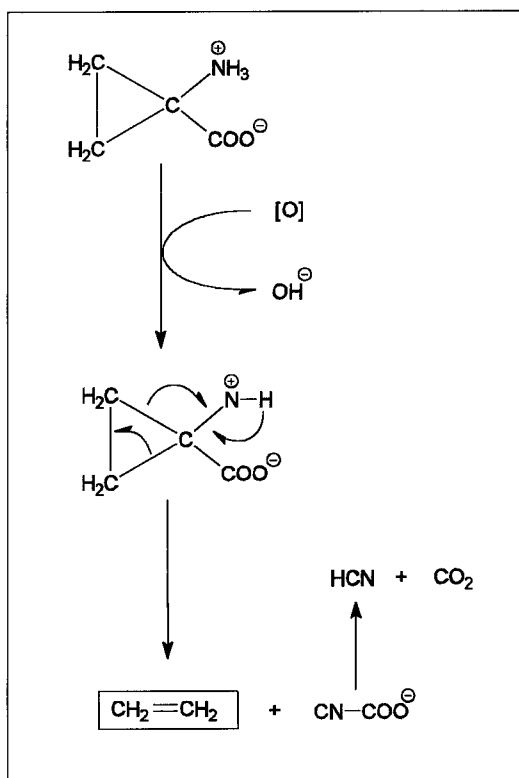
Guy y Kende mostraron en 1984 que vacuolas aisladas de protoplastos de *Pisum sativum* y *Vicia faba* catalizaban la oxidación de ACC a etileno de forma estereoespecífica. Este sistema presentaba alta afinidad por ACC (K_m 61 μ M), era inhibido por Co^{2+} , galato de *n*-propilo, ionóforos y atmósferas anaeróbicas. Por ello, las vacuolas aisladas de *Pisum sativum* y *Vicia faba* fueron los orgánulos celulares más pequeños que exhibían auténtica actividad EFE. Además, el hecho de que la producción de etileno cesara tras lisis de la vacuola, reforzaba la idea de que la actividad EFE requería la integridad y posiblemente un gradiente iónico a través de la membrana, así como que, al menos una parte de EFE se encontraba localizada en el tonoplasto (Mayne y Kende, 1986). Sin embargo, posteriormente, Guy (1990) ha podido demostrar que la actividad EFE en *Vicia faba* era independiente del potencial de membrana y que ni la despolarización ni la hiperpolarización de la membrana afectaban la producción de etileno. Igualmente Mitchell *et al.* (1988) han cuestionado la importancia de potenciales de membrana o gradientes de pH para la actividad del enzima. La localización de EFE en vacuolas derivadas de protoplastos de *Petunia hybrida* también fue demostrada por Erdmann *et al.* (1989). Estos investigadores mostraron que la evacuación del protoplasto eliminó la actividad EFE, y que la reorganización de la vacuola central permitió recuperar un 34 % de la actividad inicial. Porter *et al.* (1986) determinaron la actividad formadora de etileno en hojas de *Pisum sativum* y *Vicia faba*, así como en células, protoplastos y vacuolas obtenidas a partir de ellas. El aislamiento de células y protoplastos a partir de esas hojas condujo a la pérdida del 95 % de la actividad registrada *in vivo*. Por ello, estos autores sugirieron que, además de la integridad de las membranas la actividad EFE también requería integridad de los tejidos. La actividad formadora de etileno ha sido igualmente asociada con vesículas preparadas a partir de frutos de kiwi (John *et al.* 1989; Mitchell *et al.*, 1988; Serrano *et al.*,

1990a, 1990b). Estos sistemas basados en órganos celulares poseen auténtica actividad EFE. No obstante, se caracterizan por retener sólo una exígua fracción de la actividad registrada *in vivo*.

5.4. MECANISMOS PROPUESTOS A NIVEL MOLECULAR

Las primeras sugerencias fueron hechas ya en 1979 con el descubrimiento del ACC. Adams y Yang (1979) propusieron la acción de una oxidasa, una peroxidasa y H_2O_2 para formar etileno, CO_2 , ácido fórmico y amoníaco. Simultáneamente, Lürssen *et al.*, (1979) sugirieron como intermediario una base de Schiff entre el ACC y PLP, activada por CoA. Este compuesto puede recibir un ion hidruro de un donador común como el NADH, rompiéndose finalmente a etileno y glicina ó ácido glicoxílico.

Posteriormente, Yang (1981) propuso que ACC podría ser oxidado por una hidroxilasa a N-hidroxi-ACC, o por una deshidrogenasa para formar un intermediario



ion nitrenium, que se fragmentaría en etileno y ácido cianofórmico (Figura 8). El ácido cianofórmico se degradaría espontáneamente a CO_2 y HCN , siendo el HCN incorporado en asparragina, un hecho conocido hacía tiempo. Este mecanismo estaba apoyado por los trabajos de Peiser (1983), que muestran que en la conversión de ACC a etileno por tejidos de judías, el grupo carboxilo produce CO_2 y el C-1 produce HCN .

En 1982, Adlington y cols. aportaron una prueba rigurosa de la conversión de ACC en etileno *in vivo*. Ellos incubaron rodajas de manzana con 2,2,3,3-tetradeutero-ACC, obteniendo tetradeutero-etileno, indicando que en los tejidos no hay intercambio de los átomos de hidrógeno del anillo ciclopropano. Aceptando que el paso es oxidativo y la posible participación del PLP, estos autores propusieron un mecanismo con un intermediario imina unido al enzima, que ha tenido poca aceptación.

Asumiendo que EFE estaba localizado en la membrana, John (1983) sugirió que la síntesis de etileno a partir de ACC está acoplada a un flujo de protones desde fuera a dentro de la membrana plasmática. El ACC se oxida a ácido α -hidroxilaminociclopropano-1-carboxílico en la cara interna de la membrana, la cruza y se transforma en el ion nitrenium en las cercanías de la cara exterior. El ion nitrenium se rompe finalmente liberándose etileno. Este modelo explicaba la dependencia de la integridad de membrana y la inhibición por DNP (John, 1983).

Posteriormente, Pirrung (1983) exploró 3 posibles mecanismos. El más probable de ellos, se hizo evidente

tras los trabajos de Adlington y cols. (1983) y del propio Pirrung (1983). Adlington *et al.* (1983) trataron manzanas con *cis* o *trans*-2,3-dideutero-ACC y obtuvieron en ambos casos una mezcla equimolar de *cis* y *trans*-dideutero-etileno, lo que indica que en tejidos de manzana la configuración de los hidrógenos se pierde durante la reacción. Pirrung

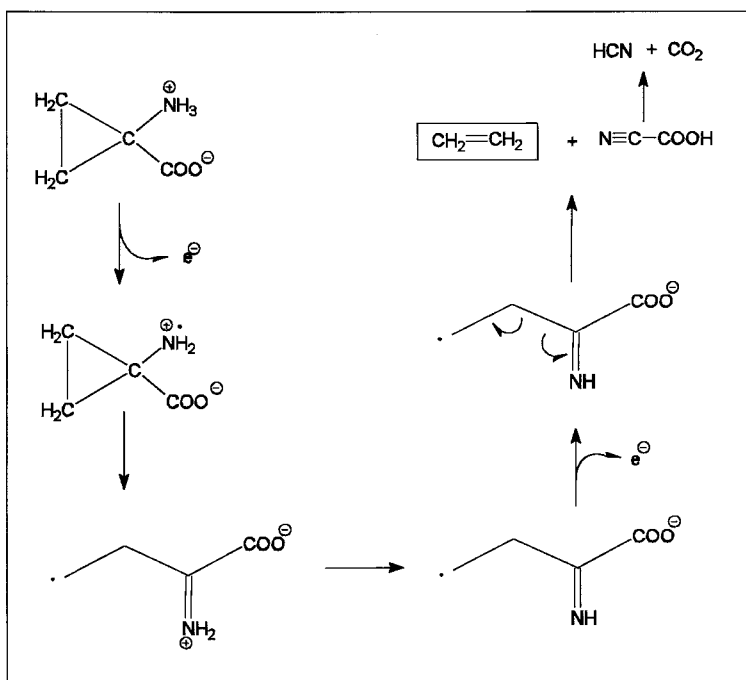


Figura 9. Esquema propuesto por Pirrung (1984).

(1983) igualmente suministró el *cis*-2,3-dideutero-ACC a varios tejidos vegetales y también observó el mismo hecho. Centra su atención en un radical amino catiónico y recurre a la electroquímica. Efectivamente oxidando electroquímicamente *cis*-dideutero-ACC se origina una mezcla equimolar de *cis* y *trans*-dideutero-etileno como en los vegetales. Pirrung (1986) postula que el ACC se convierte en etileno a través de un radical amino catiónico, mediante una oxidación en dos pasos. La pérdida de estereoisomería se debe a la libre rotación del enlace carbono-carbono implicado en la formación de etileno (Figura 9). El modelo de Pirrung ganó apoyo ya que predijo correctamente que era HCN y no ácido fórmico uno de los productos de la reacción. La formación de HCN por tejidos vegetales fue demostrada independientemente por Yang (1981) y por Pirrung (1983). Sin embargo, el modelo de Yang (Figura 8) se descartó, ya que el intermediario por él propuesto no permite el libre giro del enlace carbono-carbono implicado en el etileno.

Yang (1984) consideró que el mecanismo descrito por Pirrung es análogo al propuesto en la catálisis de aminooxidasas, sugiriendo que el EFE es una flavooxidasa que utiliza oxígeno molecular como último aceptor de electrones, y no una hidroxilasa como él había indicado previamente.

5.5. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

Bouzayen *et al.* (1990) han estudiado la localización subcelular de EFE comparando la radiactividad específica del etileno originado por cultivos celulares de *Vitis vinifera* y tejido de hojas de *Hordeum vulgare* y *Triticum aestivum* con la radiactividad de sus *pools* intracelular y extracelular de ACC. Estos autores sugirieron que las plantas poseen dos lugares en los que el ACC puede ser convertido en etileno: un sitio extracelular, en la membrana plasmática, al que tiene acceso el ACC del apoplasto y otro sitio intracelular, que se ha propuesto situado en la membrana vacuolar, y al que accede preferentemente el ACC intracelular. Bouzayén *et al.* (1990) demostraron que la plasmólisis y la digestión de la pared celular condujeron a la supresión del sitio

extracelular. Por ello, la plasmolisis representa una buena técnica para discriminar entre ambos sitios. Latché *et al.* (1993) comprobaron que el tratamiento con ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico (TNBS) inhibe fuertemente la producción extracelular de etileno, y se muestra como otra útil herramienta para diferenciar ambos puntos de generación de la fitohormona. Estos mismos investigadores han mostrado que la plasmolisis y el tratamiento con TNBS no tienen efecto sobre la producción de etileno en discos de frutos preclimáticos de melón. Sin embargo, cuando el fruto alcanza el climaterio, el tratamiento con TNBS o el choque osmótico afectaron severamente la generación de etileno. La parte de síntesis de etileno que permanece inalterada corresponde aproximadamente a la producción de etileno basal de los frutos preclimáticos. Consecuentemente Latché *et al.* (1993) han sugerido que el fuerte incremento en la producción de etileno que tiene lugar durante el ripening de los frutos climáticos se debe probablemente a un gran incremento del EFE apoplástico. Rombaldi *et al.* (1993) han estudiado la localización subcelular del enzima formador de etileno por métodos inmunocitológicos en tomate, y han observado que el enzima está localizado fundamentalmente en la pared celular. Un segundo sitio se descubre en el citoplasma, pero resulta difícilmente visible debido al pequeño volumen de este compartimento.

5.6. REQUERIMIENTO DE Fe²⁺

La participación de un metal de transición en la apertura del anillo ciclopropano había sido sugerida para la oxidación química del ACC (Boller *et al.*, 1979; Baldwin *et al.*, 1985), para la degradación del aminoácido por enzimas generadores de radicales libres (Vioque *et al.*, 1981; Bousquet y Thimann, 1984), y para la producción de etileno por extractos vegetales *in vitro* (Konze y Kwiatowski, 1981). La fuerte inhibición de la conversión de ACC a etileno por distintos agentes quelantes en tejidos intactos (Apelbaum *et al.*, 1981b) también indica la implicación de un metal en la actividad del auténtico enzima formador de etileno que opera fisiológicamente.

Bouzayen *et al.* (1991) observaron que la inhibición de la producción de etileno en cultivos celulares de tomate por 1,10-fenantrolina pudo ser resuelta por adición de bajas concentraciones de Fe^{2+} . Del mismo modo, células que no habían sido tratadas con el inhibidor, vieron estimulada su generación de etileno en presencia de Fe^{2+} , indicando que el ion metálico estaba limitando la actividad EFE. Por último, estos autores comprobaron que en células de tomate cultivadas en medios carentes de Fe^{2+} la producción de etileno era extremadamente baja y que la adición de este catión conseguía restablecer la velocidad de producción de etileno al nivel de las células control, sin que otros cationes de metales de transición tuvieran efecto alguno. Por ello, concluyeron que la conversión de ACC en etileno en plantas superiores requiere Fe^{2+} .

5.7. AVANCES EN BIOLOGIA MOLECULAR

Como hemos discutido en el apartado anterior, el enzima no pudo ser identificado por métodos bioquímicos tradicionales. Sin embargo, ha podido ser identificado por expresión funcional de un clon relacionado con el ripening de los frutos. Los progresos en este campo se basaron en una sistemática búsqueda y caracterización de ARN_m s que se expresaran bajo dos condiciones conocidas por incrementar la producción de etileno: el ripening del fruto y la lesión de los tejidos. Inicialmente, Grierson *et al.* (1985) aislaron ARN_m de tomates a diferentes estadios de madurez, lo trasladaron a un sistema compuesto por lisado de reticulocito de conejo, y analizaron los productos de traslación por SDS-PAGE. Identificaron entre 4 y 8 productos de traslación cuyos niveles se incrementaban durante el ripening. Uno de éstos fue identificado como poligalacturonasa. Se preparó una biblioteca de ADN_c a partir de poli(A)^+ ARN de tomates maduros y se realizó un *screening* por hibridación diferencial usando ADN_c de tomate maduro como sonda (Slater *et al.*, 1985). De los clones relacionados con el ripening que fueron identificados por este método, seis codificaban proteínas que se habían identificado previamente por traslación *in vitro* (Grierson *et al.* 1985). Uno de estos clones, designado pTOM13, codificaba una proteína de 35 kDa (Slater *et al.*, 1985). Durante el ripening del tomate y después del

lesionado de tomate verde maduro o de hojas, la aparición del ARN_m codificante de esta proteína de 35 kDa fue correlacionada con la síntesis de etileno, llegando a sugerirse que podría tratarse de uno de los enzimas implicados en su biosíntesis (Smith *et al.*, 1986). La acumulación de ARN_m homólogos a pTOM13 también pudo ser observada cuando tomates verdes fueron tratados con etileno (Maunder *et al.*, 1987).

El primer paso significativo en identificar la proteína codificada por pTOM13 como el enzima formador de etileno vino de los experimentos en los que plantas de tomate fueron transformadas con un fragmento de 1.1 kb de pTOM13 insertado en orientación antisentido (Hamilton *et al.*, 1990). En hojas sometidas a heridas y en frutos maduros de plantas transgénicas, la síntesis de etileno se redujo de forma dependiente de la dosis génica, y la acumulación de ARN_ms homólogos a pTOM13 fue poderosamente disminuida o indetectable. La secuencia aminoácida deducida de pTOM13 mostraba el 58 % de similitud con la secuencia aminoácida de flavonol-3-hidroxilasa de *Antirrhinum majus*. Esto implicaba que EFE podía ser miembro de una familia de hidroxilasas que requieren Fe²⁺ y ascorbato como cofactores. Esto sería coherente con el mecanismo de reacción propuesto por Yang y Hoffman (1984) que consideraba que ACC sería oxidado a etileno y ácido cianofórmico por una hidroxilasa, vía un intermediario N-hidroxil-ACC.

La última prueba de que pTOM13 codificaba efectivamente EFE se obtuvo de dos líneas independientes de experiencias. Los esfuerzos iniciales para expresar pTOM13 en levaduras, fracasaron porque el inserto de pTOM13 contenía un artefacto en su región 5'. La preparación de un clon corregido (pRC13) y su posterior introducción en levaduras, permitió la expresión de actividad EFE, que mostraba estereoespecificidad, requerimiento de ascorbato e inhibición por Co²⁺ y quelantes de hierro, como la 1,10-fenantrolina (Hamilton *et al.*, 1991). La segunda línea de investigación que permitió identificar el clon que codificaba EFE se fundamentaba en la formación de etileno inducida por elicitadores en cultivos celulares de tomate. En estas células la promoción de la síntesis de etileno se basa en la inducción de ACC sintasa y ACC oxidasa (Felix *et al.*, 1991; Spanu *et al.*, 1991). Oocitos de *Xenopus laevis* inyectados con ARN_m de células de tomate tratadas con

elicitadores adquirieron la capacidad de convertir ACC en etileno (Spanu *et al.*, 1991). El enzima expresado en oocitos tenía las mismas características que la auténtica actividad EFE con respecto a la cinética de saturación, dependencia de hierro y estereoespecificidad.

5.8. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

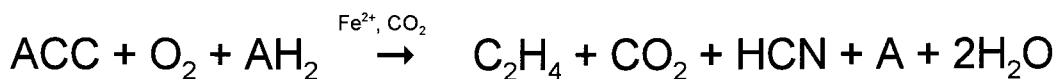
El conocimiento de que la secuencia aminoácida deducida de pTOM13 presentaba similitud con la de flavonona-3-hidroxilasa de *Antirrhinum majus* (Hamilton *et al.*, 1990), permitió a Ververidis y John (1991) recuperar actividad ACC oxidasa de frutos de melón en forma soluble, utilizando unas condiciones que sirvieron para preservar la actividad flavonona-3-hidroxilasa de pétalo de *Petunia hybrida* (Britsch y Grisebach, 1986). Éstas incluían la extracción en condiciones anaeróbicas y la adición de Fe^{2+} y ascorbato. Basándose en estos resultados, Ververidis y John (1991) propusieron que ACC oxidasa estaba relacionada con las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, todas las cuales requieren Fe^{2+} y ascorbato para expresar su actividad *in vitro*. A pesar de la similitud con las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, ACC oxidasa parece no requerir 2-oxoglutarato como cofactor (Smith *et al.*, 1992). El mecanismo de reacción de ACC oxidasa puede ser similar al de isopenicilin N sintetasa y giberelin A_{20} 3 β -hidroxilasa, dos enzimas dependientes de Fe^{2+} pero que no requieren 2-oxoglutarato (Smith *et al.*, 1992). ACC oxidasa *in vitro* y EFE *in vivo* son inhibidas en extensión comparable por Co^{2+} , reactivos de grupos SH-, secuestradores de radicales libres, ácido α -aminoisobutírico y EDTA; éste último actúa probablemente quelando el ion Fe^{2+} . El más potente inhibidor de ACC oxidasa *in vitro* ha resultado ser 1,2-dihidroxi-naftaleno, presumiblemente actuando igual que EDTA, acomplejando Fe^{2+} (Smith *et al.*, 1992). El requerimiento de Fe^{2+} por ACC oxidasa explica la inhibición del EFE *in vivo* por 1,10-fenantrolina (Apelbaum *et al.*, 1981a; Bouzayen *et al.*, 1991). Los ionóforos, que inhibían poderosamente la actividad EFE en tejidos vegetales (Apelbaum *et al.*, 1981b; Yu *et al.*, 1980) y vacuolas (Mayne y Kende, 1986) no afectaron la actividad ACC oxidasa de melón *in vitro* (Smith *et al.*, 1992).

ACC oxidasa también ha sido recuperado de manzana (Fernández-Maculet y Yang, 1992; Kuai y Dilley, 1992), aguacate (McGarvey y Christoffersen, 1992), *Cucurbita maxima* (Hyodo *et al.*, 1993), pera (Vioque y Castellano, 1994a, 1994b), pétalo de clavel (Nijenhuis-De Vries *et al.*, 1994), plántulas de *Helianthus annuus* (Finlayson y Reid, 1994), tomate (Zhang *et al.*, 1995) y ejes embrionarios de *Cicer arietinum* (Muñoz-Rueda *et al.*, 1995).

En homogenados de manzana, ACC oxidasa está asociado a la fracción corpuscular (Dong *et al.*, 1992, Fernández-Maculet y Yang, 1992). Sin embargo, es probable que ACC oxidasa en manzana sea un enzima soluble que se une a la fracción corpuscular durante la disrupción celular, como en el caso de ACC sintasa (Yip *et al.*, 1991). Se ha determinado el peso molecular de ACC oxidasa encontrándose un valor comprendido entre 35 y 40 kDa por SDS-PAGE y cromatografía de exclusión, lo que indicaría que el enzima se presenta en forma monomérica (Dong *et al.*, 1992; Dupille *et al.*, 1992; Pirrung *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1992; Moya-León y John, 1994). En manzana preclimática, el tratamiento con etileno exógeno induce la actividad ACC oxidasa *in vivo* e *in vitro* y promueve la expresión del gen que codifica el enzima (Dong *et al.*, 1992).

Kao y Yang (1982) propusieron que el CO₂ estimulaba la producción de etileno *in vivo* por modulación directa del enzima formador de etileno. Dong *et al.* (1992) mostraron que CO₂ y bicarbonato estimulan marcadamente la actividad ACC oxidasa. La eliminación del CO₂ del medio de reacción abolió completamente la actividad del enzima, indicando que CO₂ es un activador esencial de ACC oxidasa. Fernández-Maculet *et al.* (1993) identificaron al CO₂ como la especie activa, y presentaron evidencias que apoyarían la formación de un carbamato entre CO₂ y el grupo amino del enzima.

Usando el enzima purificado de manzana, Dong *et al.* (1992) han establecido la estequiometría de la reacción catalizada por ACC oxidasa. Por cada mol de ACC consumido se utiliza 1 mol de O₂ y se forman cantidades equimolares de etileno, HCN y CO₂. El ascorbato (AH₂) actuaría como cosustrato, oxidándose a dehidroascorbato (A).



Esta estequiometría es coherente con los resultados obtenidos *in vivo* por Peiser *et al.* (1984). El mecanismo exacto de la reacción permanece desconocido.

La localización intracelular de ACC oxidasa ha sido estudiada en levaduras transformadas para expresar actividad ACC oxidasa de tomate (Hamilton *et al.*, 1991). Los protoplastos preparados a partir de levadura transgénica retuvieron más del 80 % de la actividad de las células intactas. Esto contrasta con la situación observada en plantas, donde el 95 % de la actividad ACC oxidasa se perdía durante la preparación de los protoplastos (Porter *et al.*, 1986). A diferencia de las vacuolas vegetales, las vacuolas obtenidas de protoplastos de levaduras transgénicas no poseen actividad ACC oxidasa (Kende, 1993). Sin embargo, la centrifugación diferencial indicó que el enzima de levadura transformada estaba asociada a la fracción que precipita a 18000 g. La presencia de ACC oxidasa en la fracción corpuscular puede ser el resultado de una interacción proteína-proteína entre el enzima y una proteína de membrana. La región entre los aminoácidos 113 y 134 (que tal vez se extienda hasta el aminoácido 145) del enzima de tomate (Hamilton *et al.*, 1991) muestra una alta probabilidad de formación de una α -hélice anfipática, conteniendo múltiples residuos leucina sobre la cara hidrofóbica. La presencia de estos posibles puntos de anclaje (restos de leucina) puede provocar la unión del enzima a la fracción corpuscular en levaduras. Bouzayen *et al.* (1993) han sugerido que este dominio helicoidal hidrofóbico puede estar involucrado en la excreción del enzima al apoplasto o explicar la asociación de ACC oxidasa con las membranas.

6**REGULACION DE LA BIOSINTESIS
DE ETILENO**

La producción de etileno resulta inducida durante ciertas etapas del desarrollo vegetal y puede ser promovida por factores externos tales como la lesión de los tejidos, situaciones de estrés y ciertos compuestos químicos, incluyendo auxinas y otros reguladores del crecimiento (Abeles *et al.*, 1992).

6.1. REGULACIÓN POR FACTORES EXTERNOS**6.1.1. Temperatura**

La producción de etileno es óptima cuando la temperatura se encuentra próxima a 30 °C (Burg y Thimann, 1959) y cesa cuando sobrepasa los 40 °C. Así, Nakayama y Ota (1983) observaron que la producción de etileno en manzanas aumentaba de forma lineal al incrementar la temperatura entre -5 y 30 °C y declinaba de forma igualmente lineal entre 30 y 40 °C. La producción de etileno de estrés se ha observado cuando las plantas son expuestas a temperaturas inferiores a la crítica (Corbineau *et al.*, 1990; Field, 1981b) o cuando son calentados por encima de 40 °C (Kondo y Takahashi, 1989). Si el tratamiento térmico no es letal y el tejido se recupera, la producción de etileno vuelve a sus niveles basales (Corbineau *et al.*, 1990). La producción de etileno inducida por bajas temperaturas puede jugar un importante papel en el requerimiento de frío que muestran algunas variedades de pera para madurar (Knee *et al.*, 1983). Por otro lado, el etileno de estrés inducido por la temperatura se ha mostrado implicado en la abscisión prematura de frutos (Kondo y Takahashi, 1989).



6.1.2. Influencia del nivel de oxígeno

La influencia de bajos niveles de oxígeno sobre la biosíntesis de etileno es dependiente de la concentración de O₂ (Metlitskii *et al.*, 1977). El momento del inicio de la producción de etileno en manzana se muestra relacionado inversamente con la concentración de O₂, y la máxima velocidad de producción es directamente proporcional al nivel de oxígeno (Knee, 1980). Manzanas mantenidas en atmósferas con un 3 % de oxígeno produjeron de dos a tres veces menos etileno que los frutos almacenados en atmósfera de aire (Metlitskii *et al.*, 1977). Mapson y Robinson (1966) observaron que un nivel atmosférico de oxígeno del 10 al 13 % ralentizó la producción de etileno en plátano. Cuando el contenido en O₂ se redujo por debajo del 7.5 %, los frutos no sintetizaron cantidades significativas de la fitohormona. Hesselman y Freebairn (1969) comprobaron que la reducción del nivel de oxígeno en el rango 2.5-10 %, causaba reducciones proporcionales de la velocidad de ripening del plátano. La transferencia de una atmósfera con un 5 % de O₂ a una atmósfera de aire, restableció la velocidad de producción de etileno. Sin embargo, después de 11 días a 18 °C en 1 % O₂, los plátanos perdieron su capacidad para producir etileno tras la reexposición al aire (Mapson y Robinson, 1966).

6.1.3. Regulación por la luz y dióxido de carbono

Gepstein y Thimann (1980) fueron los primeros en observar que la luz blanca inhibía la conversión de ACC a etileno. Sus experiencias fueron llevadas a cabo tanto con plantas mono- como dicotiledóneas, demostrando que se trataba de un fenómeno general. Estos autores encontraron que la inhibición por la luz era totalmente reversible y de similares características a la ejercida por Co²⁺ en la oscuridad. La inhibición por luz fue parcialmente resuelta por ditiotreitól y totalmente abolida por mercaptoetanol, indicando que la luz actúa sobre el enzima formador de etileno oxidando grupos SH- esenciales. La luz, además, puede estimular la conjugación de ACC (Jiao *et al.*, 1987).

Grodzinski et al. (1982) y Kao y Yang (1982) observaron que cuando se aportaba CO₂ exógeno en presencia de luz, la tasa de producción de etileno aumentaba significativamente, igualando e incluso excediendo a la alcanzada en la oscuridad, apoyando la idea de que es el metabolismo del CO₂ *per se* el que regula la producción de etileno.

El dióxido de carbono puede reducir, promover o no tener efecto sobre la biosíntesis de etileno, dependiendo de la especie vegetal, su variedad, edad fisiológica, calidad inicial, concentración de CO₂, temperatura y duración de la exposición al gas (Chaves-Franco y Kader, 1993). Se han descrito efectos beneficiosos y nocivos, pero el modo de acción del CO₂ en tejidos vegetales aún no está totalmente esclarecido, aunque no parece ser resultado directo del control estomatal (Horton y Saville, 1984).

6.1.4. Nutrición

En general, una deficiencia ligera de nutrientes disminuye la producción de etileno, mientras que si la carencia es más importante, del tipo de las asociadas con lesiones necróticas, se produce una estimulación de la síntesis de la fitohormona. La carencia de nitrógeno y fósforo redujo los niveles de ACC y las actividades ACC sintasa y ACC oxidasa en plántulas de *Zea mays* (Drew *et al.*, 1989). Por contra, una carencia de hierro lo suficientemente importante como para causar clorosis a plantas de sorgo, incrementó la producción de etileno respecto de los controles (Morgan y Hall, 1962).

La fuente de nitrógeno puede alterar la velocidad de producción de etileno. La sustitución de amonio por nitrato incrementó 6 veces la velocidad de producción de etileno en plantas de tomate y provocó clorosis foliar (Barker y Corey, 1988). El calcio también estimuló la producción de etileno dependiente de ACC y AIA en hipocotilos de *Phaseolus vulgaris* y cotiledones senescentes de *Cucurbita pepo* (Ferguson, 1983). Sin embargo, este efecto tuvo lugar a concentraciones superiores a 0.1 mM, por lo que es posible que pueda

ser debido a un fenómeno de estrés o de toxicidad por parte del catión. Además, este efecto no fue específico ya que Mn, Mg y K provocaron un comportamiento similar en plántulas de *Zea mays* (Hasenstein y Evans, 1986).

El fosfato potásico (pH 5; 0.2 M) inhibió la síntesis de etileno en tomates intactos y en discos de pericarpio 24 horas después de la aplicación. En secciones de manzana, fosfato 0.1 M promovió la producción de etileno, mientras que 0.3 M la inhibió (Sobolewska y Plich, 1986). No obstante, a estas concentraciones resulta difícil distinguir entre efectos fisiológicos y fitotóxicos.

6.2. REGULACION POR FACTORES INTERNOS

6.2.1. Regulación por etileno

El etileno regula su propia biosíntesis, tanto positiva como negativamente. En algunos frutos maduros y en tejidos senescentes se produce un brusco incremento en la producción de etileno después de una exposición a etileno exógeno. Este fenómeno se denomina efecto autocatalítico. Peacock (1972) sugirió que en frutos preclimatéricos existen inhibidores de la maduración, y que la exposición a etileno exógeno destruye estos inhibidores. Tras la eliminación de estos compuestos, se induce el ripening y, como una consecuencia más, se registra un incremento en la producción de etileno (el climaterio).

Como ya hemos citado, McMurchie et al. (1972) propusieron un modelo de dos sistemas reguladores que controlan la biosíntesis de etileno. El Sistema I controlaría los niveles basales y la producción relacionada con situaciones de estrés, estando presente tanto en frutos climatéricos como no climatéricos, mientras que el Sistema II regularía la autoestimulación (autocatálisis) de etileno, operando sólo en frutos climatéricos. Según esta hipótesis, el receptor del Sistema I responde a etileno exógeno promoviendo la

actividad ACC oxidasa y la malonización de ACC. El receptor del Sistema II respondería temporalmente a etileno exógeno induciendo actividad ACC sintasa.

De diversos estudios sobre la biosíntesis de etileno en frutos preclimatéricos intactos de cantalupo y tomate se desprende que tratamientos con etileno exógeno aumentan inicialmente el nivel de actividad ACC oxidasa, para después producirse un análogo incremento en ACC sintasa (Liu *et al.*, 1985a), aunque esta secuenciación de los procesos durante la maduración natural de un fruto no está todavía confirmada.

El etileno puede igualmente modular su biosíntesis regulando la capacidad de la planta para conjugar ACC a malonil-ACC. El tratamiento con etileno de tejidos de pericarpio de tomate preclimatérico y flavedo de pomelo (Liu *et al.*, 1985a) y de hojas de tabaco (Amrhein *et al.*, 1984) promueve, de forma notoria, la formación de MACC a partir de ACC exógeno.

El etileno también inhibe su propia biosíntesis. Este fenómeno ha sido reconocido en numerosos frutos y tejidos vegetativos (Yang y Hoffman, 1984). Vendrell y McGlasson (1971) demostraron que la aplicación de etileno exógeno inhibió significativamente la producción de etileno inducida por herida en secciones de pulpa de plátano. Cuando higos inmaduros se introdujeron en frascos cerrados, la emisión de etileno cesó cuando la concentración de etileno en los frascos llegó a 0.6 $\mu\text{l/l}$ (Zeroni *et al.*, 1976). La aireación de los frascos permitió que la producción de etileno se reanudara.

En los últimos años se ha observado que la autoinhibición de la biosíntesis de etileno puede eliminarse por inhibidores de la acción del etileno. 2,5-Norbornadieno incrementó la síntesis de etileno en explantos de hojas de cítricos (Sisler *et al.*, 1985) y en internodos sumergidos de arroz (Bleecker *et al.*, 1987), de forma similar a como lo hizo el *trans*-ciclooctano en *Arabidopsis thaliana* (Guzman y Ecker, 1990). El tiosulfato o el nitrato de plata, antagonistas de la acción de etileno, también promovieron la síntesis de

etileno en tejido de tomate verde-maduro (Atta-Aly *et al.*, 1987) y en *Arabidopsis thaliana* (Guzmán y Ecker, 1990).

Los trabajos de Riov y Yang (1982) indicaron que la autoinhibición de la síntesis de etileno resultaba básicamente por una limitación de los niveles de ACC, y no por inhibición de la actividad ACC oxidasa. Hay que hacer notar que estos efectos autoreguladores no se producen en sistemas libre de células, lo que indicaría que etileno ejerce su acción de manera indirecta, por lo que los conceptos autocatálisis y autoinhibición hay que considerarlos más en términos fisiológicos que bioquímicos.

Woodson y Lawton (1987) examinaron poblaciones de ARNm en pétalos de clavel tras su exposición a etileno, indicando que los cambios fisiológicos provocados por el tratamiento con etileno podían ser el resultado de rápidos cambios en la expresión genética. Rottmann *et al* (1991) mostraron que la expresión de un gen para ACC sintasa (LE-ACC2) en frutos de tomate era inducido por etileno en forma dependiente de la dosis. La acción positiva del etileno sobre los genes que codifican los enzimas de la biosíntesis de etileno también ha sido demostrada en pétalo de clavel (Woodson *et al.*, 1992), en los que pudo detectarse la presencia de productos de translación de ACC sintasa y ACC oxidasa 6 horas después del tratamiento con etileno.

6.2.2. Interacción con la biosíntesis de poliaminas

Tanto la formación de etileno como la de poliaminas requieren SAM como intermediario y rinden MTA como producto secundario. El conocido carácter antisenescente de las poliaminas, y su papel como antagonistas de muchas de las respuestas provocadas por etileno, han obligado a reexaminar la capacidad de las poliaminas para controlar los niveles de SAM y/o influir en la biosíntesis de etileno (Slocum *et al.*, 1984). En pétalos senescentes de *Tridescantia* y en hipocotilos tratados con auxina de *Phaseolus vulgaris* la aplicación exógena de poliaminas inhibió la producción

de etileno (Suttle, 1981). Similares resultados han sido obtenidos con tejidos de manzanas senescentes y hojas de tabaco (Apelbaum *et al.*, 1981a)

Tanto la formación de ACC como su posterior conversión a etileno resultan inhibidas por las poliaminas. Cuando en piel envejecida de naranja se bloqueaba la síntesis de ACC a partir de SAM bien por adición de AVG, AOA ó por aplicación de poliaminas, se observaba un incremento de la incorporación de SAM en espermina (Even-Chen *et al.* 1982). Según esto, la acción antisenescente ejercida por las poliaminas exógenas resultaría tanto por inhibición de la biosíntesis de etileno como por la potenciación de la biosíntesis de poliaminas endógenas. Inversamente, la inhibición de la biosíntesis de poliaminas por α -difluorometilarginina (DFMA) o metilglioxalbis[guanilhidrazona] (MGBG) conducía a un incremento de las velocidades de producción de etileno y a una aceleración de la senescencia. Sin embargo, la inhibición de ACC oxidasa por ácido α -aminoisobutírico no tuvo efecto significativo sobre el nivel de poliaminas en los tejidos, sugiriendo que la acumulación de ACC en sí no influencia la biosíntesis de poliaminas.

Una de las posibles vías de inhibición de la producción de etileno por poliaminas puede ser la neutralización de la carga de las membranas celulares, ya que altas concentraciones de calcio previnieron o evitaron parcialmente este efecto (Apelbaum *et al.*, 1981a). En este sentido, la inhibición de la actividad EFE por poliaminas se debe probablemente a la formación de enlaces iónicos entre las poliaminas y las membranas, lo que originaría cambios conformacionales que obstaculizarían la función del enzima. Esto explicaría que la poliamina con mayor carga positiva neta (espermina) sea la más potente inhibidora.

Las poliaminas inhiben la síntesis proteica cuando se aplican exógenamente a concentraciones entre 0.1 y 1 mM. Resulta, pues, concebible que esta inhibición pueda ser responsable, al menos en parte, de la inhibición de la producción de etileno observada por Apelbaum *et al.* (1981a) y Suttle (1981). La inhibición de la síntesis proteica por parte de las poliaminas puede tener efectos de una naturaleza mucho más general que la inhibición

de la biosíntesis de etileno. El tratamiento con poliaminas a concentraciones similares a aquellas que inhiben la síntesis de proteínas ha resultado efectivo en retardar el fenómeno de senescencia. Por ello, es razonable pensar que algunos de los efectos producidos por poliaminas exógenas son debidos a efectos farmacológicos resultantes de una falta de continua síntesis *de novo* de proteínas en el tejido.

6.2.3. Carbohidratos

Se ha demostrado que periodos largos de incubación con varios mono-, di- y trisacáridos estimulan la producción de etileno en tejidos vegetales (Meir *et al.*, 1985). Una incubación prolongada (5 a 6 días) de discos de hoja de tabaco con sacarosa o glucosa resulta en una elevación de la tasa de producción de ACC y de su conversión a etileno (Meir *et al.*, 1984). Este parece ser también el caso de manitol en secciones de hoja de cítricos (Riov y Yang, 1982b). L-glucosa y 3-O-metilglucosa (ambos azúcares no catabolizables) no originan este efecto. Por ello, se especula con que su influencia sobre la biosíntesis de etileno, se produce vía propio metabolismo de los azúcares y no por fitotoxicidad.

La promoción de la evolución de etileno por galactosa puede tener significación fisiológica, ya que durante el ripening se produce en la pared celular una substancial pérdida de residuos galactosilo (Gross y Sams, 1984). La infiltración de galactosa en tomates verde-maduros no sólo estimula la producción de etileno, sino que también promovió el ripening (Gross, 1985). Estos resultados sugieren que la galactosa libre, solubilizada de los polisacáridos de la pared celular, puede estar implicada en la regulación del ripening de los frutos, a través de la estimulación de la biosíntesis de etileno. Sin embargo, galactosa no estimuló la actividad ACC sintasa *in vitro* (Kim *et al.*, 1987), lo que sugiere una acción indirecta sobre la producción de etileno. Entre los carbohidratos estudiados, el ácido galacturónico, dulcitol y manosa han demostrado su capacidad para incrementar la síntesis de etileno en forma similar a como lo hizo galactosa.

Watkins y Frenkel (1987) expusieron que manosa inhibía la producción de etileno durante el ripening de frutos de pera. Este efecto se ha asociado a la disminución de fosfato inorgánico y a la acumulación de manosa-6-fosfato, presumiblemente tóxico. En preparaciones de membranas microsómicas de pétalos de clavel, la actividad ACC oxidasa resulta inhibida por sacarosa, glucosa, fructosa y otros diferentes azúcares (Mayak y Borochoy, 1984). Presumiblemente, esta inhibición no está relacionada con efectos osmóticos, sugiriéndose que la represión de la actividad ACC oxidasa en este sistema puede deberse a interacción directa con el enzima.

6.2.4. Interacción con otros reguladores del crecimiento

Las hormonas vegetales interactúan entre sí para influir en el metabolismo celular. Entre las hormonas vegetales que afectan la biosíntesis de etileno, las mejor estudiadas son las auxinas. Otros reguladores del crecimiento que influyen la producción de etileno son el ácido abscísico (ABA), las citoquininas, el jasmonato de metilo y los brassinosteroides.

En tejidos vegetativos, que normalmente producen pequeñas cantidades de etileno, las auxinas inducen marcadamente su biosíntesis, mientras que en frutos generalmente la inhiben (Rhodes, 1980). Yoshii e Imaseki (1982) mostraron que AIA estimula la producción de etileno al inducir la síntesis de ACC a partir de SAM. Esta inducción de ACC sintasa ejercida por AIA resulta severamente inhibida por cicloheximida, actinomicin D y α -amanitina, sugiriéndose que la auxina estimula la síntesis *de novo* de ACC sintasa.

La conjugación de AIA juega un importante papel en la fisiología y metabolismo de las auxinas, ya que se considera como la forma de transporte, almacenamiento y subsiguiente reutilización de AIA en los tejidos (Cohen y Bandurski, 1982). En hipocotilos de *Phaseolus vulgaris* (Lau y Yang, 1973) y *Pisum sativum* (Kang *et al.*, 1971), se ha obtenido una correlación positiva entre la velocidad de producción de etileno y el nivel de AIA endógeno. En estos tejidos, la producción de etileno inducida por AIA sólo tuvo lugar

cuando sacarosa o algunos otros azúcares estaban presentes en el medio de incubación (Philosoph-Hadas *et al.*, 1983). Por ello, Aharoni *et al.* (1984) establecieron la hipótesis de que la regulación natural de la biosíntesis de etileno en la hoja es primeramente dependiente del tipo y nivel de conjugados endógenos de AIA en los tejidos y de su susceptibilidad a los enzimas hidrolíticos.

El ácido abscísico participa en la regulación de la embriogénesis, la maduración de la semilla, estreses ambientales y la senescencia (Sagee *et al.*, 1980). Su efecto sobre la biosíntesis de etileno es complejo. Algunas plantas responden al ABA produciendo más etileno. En otros tejidos, ABA inhibe la evolución de etileno inducida por senescencia (Kao y Yang, 1983), AIA (Yoshii e Imaseki, 1982) o estrés hídrico (McKeon *et al.*, 1982). La supresión de la producción de etileno inducida por estrés hídrico que origina el ABA tiene lugar fundamentalmente por inhibición de la actividad ACC sintasa (McKeon *et al.*, 1982), aunque en algunos casos puede registrarse un incremento de actividad ACC oxidasa (Tan y Thimann, 1989). Estos autores sugieren que la inhibición de la biosíntesis de etileno por ABA se produce por derivación de precursores del ACC a otras rutas metabólicas. Sin embargo, altas concentraciones de ABA promueven la producción de etileno, incrementando la síntesis de ACC y acelerando la conversión de ACC a etileno (Riov *et al.*, 1990).

Las citoquininas ejercen, igualmente, un efecto diverso sobre la biosíntesis de etileno. En pétalos de clavel, las citoquininas inhiben la producción de etileno (Cook *et al.*, 1985). Sin embargo, a baja concentración (10^{-7} M) pueden promover su biosíntesis en varios tejidos (Aharoni *et al.*, 1979; Yu *et al.*, 1981). Las citoquininas promueven la producción de ACC y/o etileno en tejidos sometidos a estrés o tratados con ABA (McKeon *et al.*, 1982; Khan *et al.*, 1988).

En combinación con AIA, las citoquininas estimulan la producción de etileno. Benziladenina (BA) estimula la producción de etileno en hipocotilos de *Phaseolus vulgaris* tratados con AIA, mediante la estimulación de la actividad ACC-sintasa (Yoshii e Imaseki,

1982). Sin embargo, en ausencia de auxina, BA promovió significativamente la producción de etileno, mientras que el contenido de ACC sólo resultó ligeramente afectado. Estos resultados sugieren que, en este sistema, la benziladenina puede estimular la producción de etileno a través de un mecanismo independiente de la auxina.

El jasmonato de metilo (MeJa) pertenece a una familia de compuestos de ciclopentano que producen efectos similares al ácido abscísico. La aplicación de MeJa a tomate inmaduro causa un aumento de la síntesis de etileno e inhibe la síntesis de licopeno. (Saniewski y Czapski, 1985). En discos de hojas de *Olea europaea*, la incubación con MeJa 45 μ M incrementó claramente el contenido de ACC y la actividad ACC oxidasa (Sanz *et al.*, 1993). Por contra, en hojas enteras, la incubación con MeJa incrementó el contenido de ACC, pero no alteró significativamente el desprendimiento de etileno.

Los Brassinosteroides son estimuladores del crecimiento que parecen actuar sinérgicamente con auxinas, y estimulan la producción de etileno en segmentos de *Phaseolus vulgaris* (Mandava, 1988). En ausencia de auxina, estos esteroides no estimulan la evolución de etileno en segmentos de hipocotilos de *Cucurbita maxima* (Eun *et al.* 1989). El aumento de la producción de etileno inducida por AIA que resulta mediada por brassinosteroides parece ocurrir a nivel de ACC sintasa.

6.3. CONTROL DE LA BIOSÍNTESIS DE ETILENO EN PLANTAS TRANSGÉNICAS

Dos estrategias diferentes para reducir la biosíntesis de etileno han sido empleadas por los ingenieros genéticos: la inhibición de la expresión de genes que codifican los enzimas implicados en la biosíntesis de etileno mediante transformación con los correspondientes genes en orientación antisentido, y la disminución de los niveles celulares de ACC por introducción de genes de origen bacteriano que codifican ACC deaminasa. Hamilton *et al* (1990) fueron los primeros en reducir la producción de etileno en tomates

por expresión de una construcción antisentido de pTOM13. El ripening de los frutos transgénicos fue retrasado y su vida postcosecha extendida. La expresión del gen antisentido para ACC oxidasa fue mucho más efectiva en retrasar el ripening cuando los frutos de tomate se recolectaron al comienzo del cambio de color que cuando permanecieron unidos a la planta (Picton *et al.*, 1992). Además de retrasar el ripening del fruto, las plantas con ACC oxidasa antisentido también retardaron la senescencia de sus hojas. Oeller *et al.* (1991) transformaron plantas de tomate con ACC sintasa antisentido. La producción de etileno en los frutos de la planta transformada resultó inhibida un 99.5 %, y el ripening fue suprimido. La aplicación de etileno o propileno restableció el ripening normal. Klee *et al.* (1991) clonaron un gen que codifica ACC deaminasa en *Pseudomonas* y lo expresaron en plantas de tomate. La biosíntesis de etileno en las plantas transformadas resultó inhibida un 97 % y el ripening de los frutos fue consecuentemente retrasado.

Un gen de tomate, designado E8, resulta activado durante el ripening del fruto y en frutos verde-maduros tratados con etileno exógeno (Lincoln *et al.*, 1987; Lincoln y Fisher, 1988). Su región codificada muestra un 53 % de identidad secuencial con el inserto de pTOM13, indicando que también puede estar relacionado con las dioxigenasas (Deikman y Fisher, 1988). La proteína E8 también comparte con todas las ACC oxidasas conocidas la predicha hélice anfipática. Sorprendentemente, cuando una construcción antisentido de E8 fue expresada en plantas de tomate, la producción de etileno resultó incrementada 6 veces (Peñarrubia *et al.*, 1992). Así, mientras que la acción de la proteína E8 no se conoce, su ausencia parece resultar en la desrepresión de la síntesis de etileno.

Materiales y Métodos

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIAL VEGETAL

Todas las experiencias relativas a la caracterización bioquímica de ACC oxidasa se han llevado a cabo utilizando frutos maduros de pera (*Pyrus communis* cv. Blanquilla) adquiridos en un mercado local y almacenados a 4 °C hasta su uso. Los frutos de otras especies vegetales utilizados en los experimentos preliminares fueron igualmente adquiridos en un mercado de la zona, cuando alcanzaron todos ellos sus estadios óptimos de madurez organoléptica.

El estudio de la evolución de la actividad ACC oxidasa a lo largo del desarrollo, conservación y maduración de pera Blanquilla se realizó gracias al suministro periódico de frutos que llevó a cabo la Sociedad Cooperativa de Regantes de Extremadura (CREX) desde su Central Hortofrutícola de Valdivia (Badajoz). Los frutos aportados procedían de una plantación establecida en la zona en 1971, en formación palmeta, a marco 3 x 2.75 m.

2. CUANTIFICACIÓN DE ETILENO

La medida de la concentración de etileno se lleva a cabo por cromatografía gaseosa en un cromatógrafo HEWLETT PACKARD 5890, dotado de un detector de ionización de llama y una columna de alúmina activada F1 80-100 mallas (Supelco, Inc. Bellefonte, USA) de 2 m x 3 mm d.i. Como gas portador se utiliza nitrógeno, con un flujo de 30 ml/min, manteniéndose el horno a 110 °C y el inyector y el detector a 150° C. En estas

condiciones, el etileno presenta un tiempo de retención de 1.05 min.

La cuantificación se realiza mediante una recta de calibrado obtenida con un patrón de concentración adecuada, preparado a partir de una mezcla gaseosa comercial denominada Azethyl (5.2 % de etileno en N₂), de la Sociedad Española del Oxígeno (S.E.O.) (Figura 10). La introducción del factor 2.8207e-4 en un integrador HEWLETT PACKARD 3392A permite convertir el área del pico de etileno en picomoles.

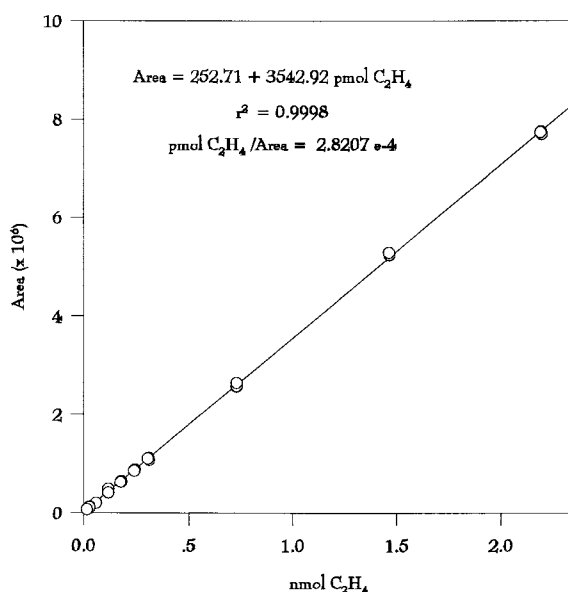


Figura 10. Recta de calibrado para la cuantificación de etileno. Para su obtención se ha utilizado un patrón de etileno preparado a partir de la mezcla comercial AZETHYL (S.E.O.).

3. CUANTIFICACIÓN DE DIÓXIDO DE CARBONO

El análisis del CO₂ se realiza igualmente por cromatografía gaseosa en un cromatógrafo HEWLETT PACKARD 5890 dotado de un detector de conductividad térmica y una columna de tamiz molecular CarboSieve SII 80-100 mallas (Supelco, Inc. Bellefonte, USA) de 3 m x 3 mm d.i. Se utiliza He como gas portador a un flujo de 30

ml/min, manteniéndose la temperatura del horno a 225 °C y el inyector y el detector a 250 °C. El detector utiliza como referencia una corriente de He a 45 ml/min. En estas condiciones el CO₂ muestra un tiempo de retención de 3.25 min.

La cuantificación se realiza mediante una recta de calibrado obtenida inyectando volúmenes conocidos de una mezcla gaseosa certificada (Carburos Metálicos) cuya composición es 5 % CO₂, 7.5 % O₂, 87.5 % N₂ (Figura 11).

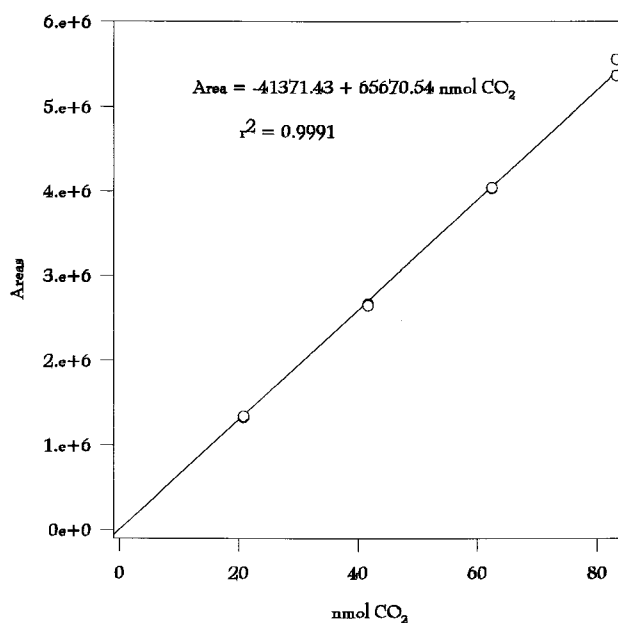


Figura 11. Recta de calibrado para la cuantificación de CO₂. Los valores representados corresponden a inyecciones de volúmenes conocidos de la mezcla gaseosa certificada 5 % CO₂ + 7.5 % O₂ + 87.5 % N₂ (Carburos Metálicos).

4. MEDIDA DE LA TASA RESPIRATORIA Y DE LA VELOCIDAD DE PRODUCCIÓN DE ETILENO

La elección del método de medida de la tasa respiratoria y la velocidad de producción de etileno es función de la fase de desarrollo del fruto. La utilización de un

sistema dinámico evita los problemas derivados de la reducción del nivel de O₂ y/o la acumulación de CO₂ y etileno, que pueden llegar a alterar el metabolismo normal de frutos maduros. Por contra, el sistema estático resulta apropiado para la cuantificación de la actividad respiratoria o la tasa de producción de etileno en frutos que no han alcanzado el climaterio, pues éstos se caracterizan por un intercambio gaseoso muy atenuado.

4.1. Sistema estático

Un número variable de frutos (con peso conjunto comprendido entre 100 g para estadios precoces y 1 kg para los más desarrollados) se ubicaron en contenedores de vidrio herméticos cuya capacidad fue elegida en función del tamaño de los frutos y de las tasas de producción de CO₂ y C₂H₄ esperadas. Después de 60 minutos a 20 °C y a través de un septum insertado en el cierre del frasco se extrae una muestra del espacio de cabeza, cuantificándose sus contenidos en CO₂ y C₂H₄ por cromatografía gaseosa. El volumen total del espacio de cabeza se determina por pesada. Una vez realizada la extracción gaseosa los frascos se abren y se enrasan con agua bidestilada manteniendo los frutos en su interior. El peso del agua requerida en esta operación corresponde exactamente al volumen vacío.

Estas determinaciones se llevan a cabo con 5 replicados, expresándose los resultados en *mg CO₂/kg h* y *μl C₂H₄/kg h*, respectivamente, como medias ± DE.

4.2. Sistema dinámico

Se ha diseñado un sistema (Figura 12) en el que lotes de 5 frutos (aproximadamente 1 kg) son introducidos en frascos de vidrio de 3.8 l (**H**), dotados de cierre hermético, a los que se han acoplado conducciones de entrada y salida para gases. Cada uno de estos frascos se encuentra conectado a una instalación que se compone, básicamente, de una bomba de membrana (**P**), un dispositivo capilar de expansión (**G**) y un complejo hidráulico

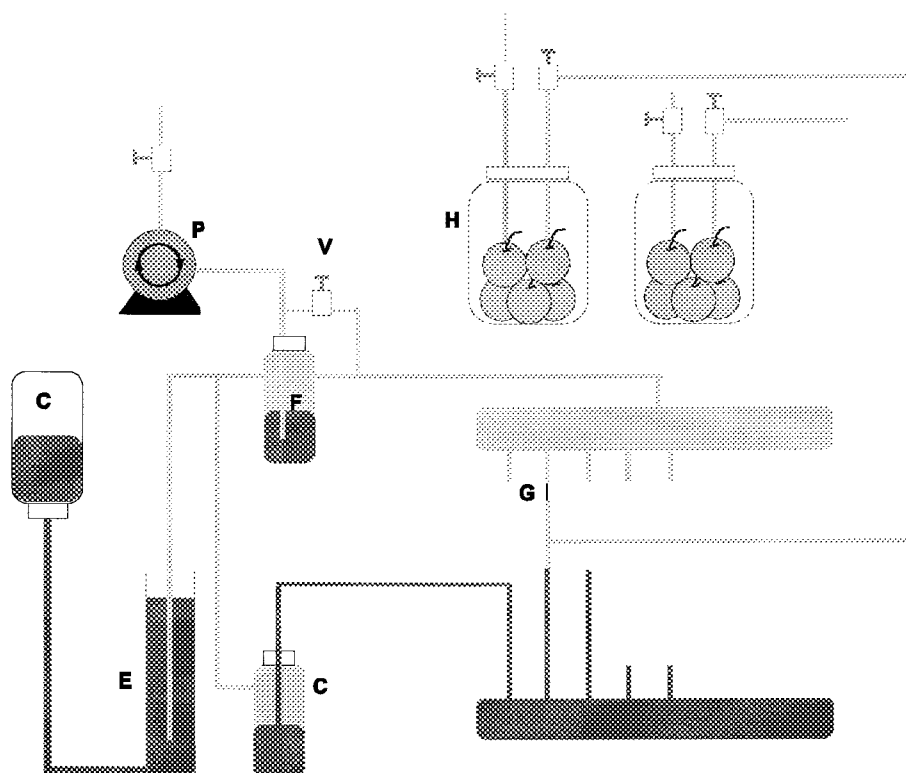


Figura 12. Esquema de una instalación para medida de la tasa respiratoria y velocidad de producción de etileno en flujo continuo.

de compensación de presiones e igualación de flujos (C, E y F). Una corriente de aire húmedo barre continuamente cada uno de los frascos. La manipulación de la válvula de aguja (V) permite establecer un flujo constante de aire que mantenga el contenido de CO₂ entre un 0.2 y un 0.5 %, y nunca por encima del 1 %, ya que este nivel se considera que marca el inicio del efecto inhibitorio del CO₂ sobre la actividad respiratoria. Una vez establecido el flujo en el valor adecuado es importante permitir que se produzca el desplazamiento de, al menos, 5 veces el volumen de espacio de cabeza de los frascos antes de realizar la primera medida. Así aseguramos la consecución de un equilibrio entre los frutos y la atmósfera circundante.

La medida de las concentraciones de CO₂ y C₂H₄ del gas efluente se realiza por cromatografía gaseosa. La conversión de las medidas ofrecidas por el cromatógrafo en unidades estándar de respiración o producción de etileno se consigue aplicando las siguientes ecuaciones

$$(1) \quad \text{mg CO}_2/\text{kg h} = 0.0115 \cdot v \cdot d \cdot x / p$$

$$(2) \quad \mu\text{l C}_2\text{H}_4/\text{kg h} = 1.4424 \cdot v \cdot y / p$$

donde **v** es la velocidad de flujo en ml/min
d la densidad del CO₂ respecto del aire, expresada en mg/ml. A 20 °C este valor es 1.84, debiendo corregirse por el factor 293/T (en K) caso de realizar la medida a distinta temperatura.
x es la medida de CO₂ ofrecida por el cromatógrafo de gases (nmol CO₂/125 μl)
y la facilitada para etileno (pmol/ml) y,
p el peso total de los frutos, expresado en kg.

En la ecuación (2) no aparece el término relativo a la densidad del etileno respecto del aire, pues este gas posee un peso molecular (Pm = 28) prácticamente idéntico al peso molecular medio del aire (Pm = 28.84). Por ello, su densidad relativa es en todo momento aproximadamente 1.

Todas las determinaciones se llevan a cabo con 5 replicados, expresándose los resultados como medias ± DE.

5. EXTRACCION DE ACC OXIDASA

5.1. Metodología de Ververidis y John (1991)

Se ha aplicado una adaptación del método descrito por estos autores, según la cual, 75 g de pericarpio de pera fueron congelados en nitrógeno líquido y homogeneizados en un mortero con arena lavada y 75 ml de tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7.2) que contenía un 10 % (v/v) de glicerol. El homogenado se filtra a través de cuatro capas de gasa

hidrófila y una de Miracloth, centrifugándose el filtrado resultante durante 35 min a 28000 g. Se descarta el precipitado, utilizándose el sobrenadante como extracto enzimático en el ensayo de actividad o almacenándose a -20 °C hasta su uso.

5.2. Modificaciones del método de Dong *et al.* (1992)

La recuperación del enzima de pera en forma soluble fue inicialmente llevada a cabo siguiendo una ligera modificación del procedimiento descrito por Dong *et al.* (1992). Trescientos gramos de pericarpio de pera fueron homogeneizados durante 1 min en una batidora con 400 ml de tampón fosfato 100 mM (pH 7.2), conteniendo bisulfito sódico 10 mM, β -mercaptoetanol 4 mM y ascorbato sódico 3 mM. El homogenado fue tamizado a través de 4 capas de gasa hidrófila y 1 de Miracloth. El filtrado se centrifuga a 28000 g durante 30 min. El precipitado así obtenido fue resuspendido en 20 ml de tampón HEPES 25 mM (pH 7.2) conteniendo ditioneitol (DTT) 1 mM, ascorbato sódico 3 mM y 30 % (v/v) glicerol. La suspensión se agita durante 15 min y se añade Triton X-100 0.3 % (p/v), agitándose de nuevo durante 15 min. El sobrenadante obtenido tras centrifugación a 28000 g durante 30 min puede utilizarse como preparación enzimática. Todas las operaciones descritas fueron llevadas a cabo manteniendo la temperatura entre 2 y 4 °C.

Posteriormente, se ha optimizado el procedimiento de extracción para ACC oxidasa de pera a partir del esquema anterior. En este nuevo protocolo el enzima se extrae a pH 6.5 con adición de DTT 5 mM, resuspendiéndose el precipitado a pH 6.7 y solubilizándose con 0.8 % de Triton X-100.

6. CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS

La cuantificación del contenido de proteínas se ha llevado a cabo por el método de Bradford (1976). Este método se basa en el desplazamiento en el máximo de absorbancia

de 465 a 595 nm que experimenta una solución ácida del colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 cuando se encuentra unido a una proteína.

Rutinariamente, una alícuota de la solución a cuantificar se completa hasta 0.3 ml con tampón HEPES 25 mM (pH 6.7) que contiene DTT 1 mM, ascorbato sódico 3 mM y 30 % (v/v) glicerol. Se añaden 3 ml del reactivo Azul de Coomassie, se agita y se mide la absorbancia a 595 nm tras 10 min de reposo. Para la cuantificación del contenido proteico se ha construido previamente una recta de calibrado utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón (Figura 13).

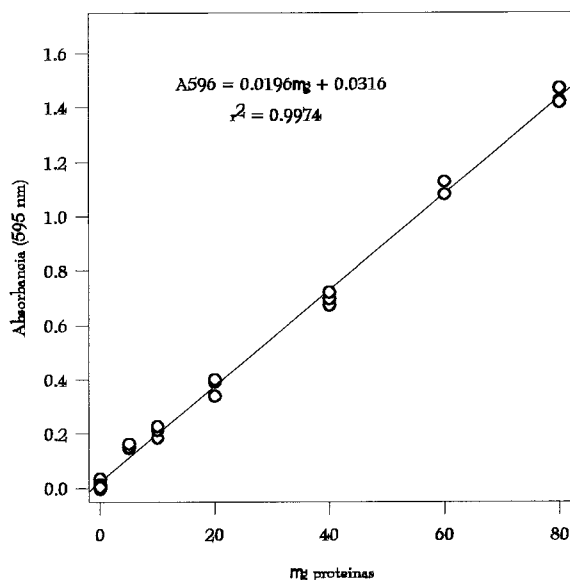


Figura 13. Recta de calibrado para la cuantificación de proteínas. En su construcción se ha utilizado albúmina de suero bovino como patrón.

7. ENSAYO DE ACTIVIDAD ACC OXIDASA

7.1. *in vivo*

La actividad ACC oxidasa se determinó en viales de 10 ml, incubando en un volumen total de 1 ml diez secciones de tejido de fruto (3 x 2 x 2 mm, peso aproximado 0.5 g) con ACC 10 mM y manitol 0.4 M, durante 1 hora a temperatura ambiente. Los viales se sellaron posteriormente, determinandose el etileno producido en la siguiente hora de incubación a 28 °C. La actividad se expresa en nmol C₂H₄/g pf h como media de 6 viales replicados de la que se ha sustraído el valor medio del etileno producido por tres

viales control sin ACC exógeno.

7.2. *in vitro*

La mezcla de reacción estándar, en un volumen total de 1 ml, conteniendo tampón HEPES 100 mM (pH 6.7) con 10 % glicerol (v/v), ACC 1 mM, FeSO₄ 0.2 mM, ascorbato sódico 30 mM, 14 % CO₂ (en fase gaseosa) y 0.1 ml de extracto enzimático fue incubada a 28 °C con agitación, en viales sellados de 10 ml. Se determinó el etileno producido tras 30 min de incubación. El extracto enzimático tiene un contenido en proteínas de aproximadamente 3.5-4.4 mg/ml. Las determinaciones se realizaron con 5 replicados, expresándose la actividad como media ± DE en nmol C₂H₄/g pf h.

8. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA RESIDUAL

Para las determinaciones de la actividad enzimática residual los viales se abrieron y airearon a distintos tiempos de reacción (según se indica en cada Figura) añadiéndose de nuevo todos los sustratos y cofactores requeridos. La actividad enzimática se determinó tras un periodo adicional de incubación de 30 min.

9. PREINCUBACIONES

La preparación enzimática se preincubó durante 30 min ó 1 hora a 28 °C con agitación, en presencia de tampón HEPES 100 mM (pH 6.7) con 10 % (v/v) glicerol y los requerimientos indicados en cada caso. Las concentraciones de los sustratos y cofactores fueron las óptimas del ensayo de actividad *in vitro*. Los viales se airearon posteriormente, si era necesario, y se añadieron los sustratos y cofactores que no estaban presentes en la preincubación, determinándose la actividad tras 30 min de reacción.

10. COMPORTAMIENTO CROMATOGRÁFICO. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR

Alícuotas de 2.5 ml de la preparación enzimática fueron desaladas en una columna PD10 (Sephadex G-25; Pharmacia, Uppsala, Sweden) equilibrada con tampón HEPES 25 mM (pH 6.7) conteniendo DTT 1mM, ascorbato sódico 3mM y glicerol 30 % (v/v) (Tampón A).

Las distintas etapas cromatográficas fueron llevadas a cabo en un cromatógrafo líquido Pharmacia FPLC-System.

El extracto desalado fue directamente descargado (máximo 40 mg de proteínas) en una columna Mono Q HR 5/5 (Pharmacia) previamente equilibrada con tampón A. Las proteínas se eluyeron a un flujo de 0.5 ml/min utilizando el gradiente de NaCl en tampón A mostrado en la Figura 14. Se recogieron fracciones de 2 ml.

Una alícuota de 200 μ l de la fracción con mayor nivel de actividad ACC oxidasa eluída de la columna Mono Q fue inyectada en una columna Superose 12 HR 10/30 (Pharmacia) equilibrada previamente con tampón A que contenía NaCl 0.5 M (Tampón B). La elución de las distintas proteínas se realizó con 25 ml del mismo tampón B a un flujo de 0.5 ml/min, recogiendo fracciones de 0.7 ml. Para la estimación del peso molecular, esta columna se calibró con distintas proteínas patrón (Tabla IV).

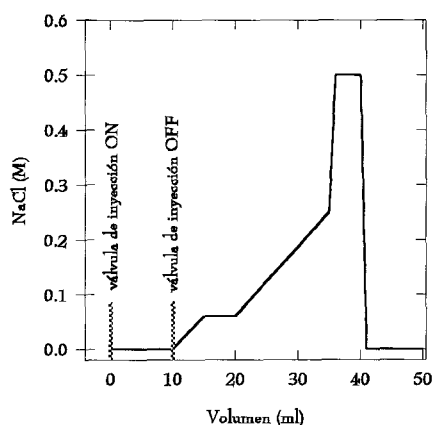


Figura 14. Cromatografía de intercambio iónico en columna Mono Q. Gradiente de concentración de NaCl utilizado.

Tabla IV. Calibración de la columna Superose 12 para la estimación de pesos moleculares. Proteínas patrón utilizadas y recta de calibrado.

Proteína	P _m	v _e	v _e / v _o
Ferritina	440000	7,40	1,00
Catalasa	232000	11,50	1,55
Aldolasa	158000	11,75	1,59
BSA	67000	12,50	1,69
Chimotripsina	25000	14,94	2,02

$$v_e/v_o = 4.0759 - 0.4777 \log P_m$$

Las fracciones con actividad ACC oxidasa de la columna Superose 12 fueron reunidas y aplicadas a una columna Phenyl-Superose HR 5/5 (Pharmacia) equilibrada con tampón A sin glicerol y suplementado con (NH₄)₂SO₄ 1.7 M (tampón C). Después de lavar la columna con 12 ml de tampón C, se eluyó con 15 ml de un gradiente lineal de tampón C → tampón A, continuándose la elución con 12 ml de tampón A. El flujo se mantuvo en todo momento en 0.5 ml/min, recogiendo fracciones de 2 ml.

De todas las fracciones obtenidas en todas las etapas cromatográficas se obtuvo una alícuota en la que se evaluó el nivel de actividad ACC oxidasa y el contenido en proteínas.

11. EXTRACCIÓN DE ACC

Para la extracción del ACC presente en el pericarpio de pera se ha utilizado el procedimiento descrito por Sitrit *et al.* (1987) ligeramente modificado. Un gramo de tejido se homogeneiza en batidora con 6 ml de agua desionizada, se filtra a través de lana de vidrio y una capa de Miracloth y se centrifuga durante 10 min a 10000 g. El sobrenadante obtenido se mezcla en un embudo de decantación con 6 ml de cloroformo. Tras vigorosa

agitación se deja decantar durante 10 minutos, desechando la fase orgánica. Este proceso de extracción con disolvente se repite tres veces. La fase acuosa resultante se somete a burbujeo con corriente de N_2 para eliminar restos de cloroformo, destinándose posteriormente a la cuantificación del ACC presente según el método de Lizada y Yang (1979).

12. CUANTIFICACIÓN DE ACC

Para la cuantificación del ACC se utiliza el procedimiento descrito por Lizada y Yang (1979). Este método se basa en la conversión química de ACC en etileno, mediante la acción del ClO^- como oxidante y Hg^{2+} como catalizador.

En un vial de 11 ml previamente enfriado, se introduce una alícuota de la solución a analizar y se añade 1 μ mol de $HgCl_2$, completando con agua desionizada hasta 900 μ l. Los viales se sellan y se colocan en baño de hielo con agitación. A través del tapón se inyectan 100 μ l de una mezcla fría de $NaClO$ al 5 % y $NaOH$ saturada (2 : 1 v/v). Tras 10 minutos de agitación se determina el etileno por cromatografía gaseosa con 1 ml del espacio de cabeza. La eficiencia de la reacción se calcula en cada caso con un patrón interno de ACC.

13. TRATAMIENTOS CON ETILENO EXÓGENO

Lotes de 3 frutos de pera intactos (500 - 550 g) se colocan en frascos de vidrio de 3.8 l de capacidad. Una vez conocido el espacio de cabeza después de introducir los frutos (según apartado 4.1. de Materiales y Métodos), se cierran herméticamente y se inyecta la cantidad adecuada de la mezcla Azethyl (5.2 % de C_2H_4 en N_2) para conseguir una concentración de etileno en los frascos de 90 μ l/l, comprobándose posteriormente por

cromatografía gaseosa. Los frascos se mantienen a 20 °C durante 24, 48 y 72 horas. Después del tratamiento, los frutos se utilizaron para ensayar las actividades ACC oxidasa *in vivo* e *in vitro*. Para ello, se corta una porción ecuatorial del pericarpio de cada fruto de la que se obtienen secciones de 3 x 2 x 2 mm. Las secciones provenientes de los tres frutos de cada frasco se mezclan cuidadosamente y se destinan al ensayo de actividad *in vivo*. El resto del pericarpio se homogeneiza para la obtención del extracto enzimático.

14. ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE PERA BLANQUILLA DURANTE EL DESARROLLO, CONSERVACIÓN Y MADURACIÓN

La evolución del fruto de pera Blanquilla durante el desarrollo, conservación y maduración controlada se ha llevado a cabo a lo largo de la campaña hortofrutícola 1995. Se ha puesto especial énfasis en el seguimiento de la actividad ACC oxidasa, si bien, se ha intentado correlacionar sus cambios con otros eventos fundamentales de la vida del fruto.

Para el aporte periódico de los frutos hemos contado con la colaboración de la Sociedad Cooperativa de Regantes de Extremadura (CREX). La edad de los frutos de pera se ha identificado con los días transcurridos desde la fecha de floración plena (DDF). En la campaña 1995 la fecha de floración plena en el área de Valdivia (Badajoz) quedó fijada el 26 de Febrero, llevándose a cabo la recolección comercial 150 días después, es decir, el 26 de Julio. Por ello, entre Abril y final de Julio hemos recibido cada 13-16 días (dentro de las 10 horas siguientes a la recolección) cantidades suficientes de frutos con los que realizar las determinaciones programadas. Finalmente, y coincidiendo con el momento de la recolección comercial recibimos 50 kg de peras que fueron conservadas en nuestras cámaras frigoríficas a -1 °C y 95 % Hr.

14.1. Desarrollo

En cada toma de muestra se seleccionaron aleatoriamente 25 frutos a los que se determinó individualmente su peso fresco (granatario METTLER, precisión ± 0.5 mg) y el diámetro ecuatorial máximo (calibrador MITUTOYO, precisión ± 0.05 mm). Por otro lado, un número apropiado de frutos fueron introducidos en frascos de vidrio herméticos donde se cuantificó estáticamente la tasa respiratoria y la velocidad de producción de etileno. Finalmente, frutos que no participaron en la experiencia anterior fueron pelados, extrayéndose una porción de pericarpio de cada uno de ellos. Estas porciones fueron reunidas y divididas en pequeñas secciones con las que ensayar actividad ACC oxidasa *in vivo*. El resto del pericarpio fue triturado y utilizado en la preparación de un extracto donde medir actividad ACC oxidasa *in vitro*.

14.2. Conservación y maduración

Los frutos que fueron recolectados con criterios comerciales se sometieron a un periodo de 30 días de conservación frigorífica en las condiciones ya indicadas, al objeto de homogeneizar sus estadios de madurez. Durante este periodo, se tomaron muestras cada 10 días para evaluar la tasa respiratoria y la velocidad de producción de etileno.

Finalizado el tratamiento a baja temperatura, los frutos fueron sumergidos durante 1 minuto en una solución de NaClO al 5 %, para eliminar la flora microbiana patógena. Posteriormente, se sometieron a un intenso lavado con abundante agua desionizada y fueron cuidadosamente secados.

Veinticinco frutos fueron distribuidos en 5 lotes de 5 frutos cada uno y se introdujeron en frascos de vidrio herméticos (volumen total 3.8 l), donde tras ser conectados a un sistema dinámico, se determinó durante 10 días la evolución de la actividad respiratoria y la velocidad de producción de etileno.

Frutos distintos fueron empleados diariamente para la determinación de la actividad ACC oxidasa *in vivo*, así como para la preparación de extractos enzimáticos en los que cuantificar la actividad del enzima *in vitro*.

Resultados y Discusión

1

**ELECCIÓN DEL MATERIAL
VEGETAL**

Con objeto de elegir el material vegetal adecuado para el posterior estudio de la actividad ACC oxidasa *in vitro*, hemos determinado previamente la actividad *in vivo* de diferentes frutos, en su estadio de madurez comercial. La Tabla V recoge los valores de actividad ACC oxidasa *in vivo* de secciones de diversos frutos, observándose que, de los frutos considerados sólo manzana Golden delicious presenta mayor nivel de actividad que pera Blanquilla.

Tabla V. Actividad ACC oxidasa in vivo en secciones de diferentes frutos.

Fruto	nmol C ₂ H ₄ / g h
Manzana Golden Delicious	7.84 ± 1.21
Pera Blanquilla	6.79 ± 0.39
Pera Alejandrina	1.68 ± 0.14
Kiwi	2.09 ± 0.09
Plátano	0.41 ± 0.04
Chirimoya	5.08 ± 0.88
Tomate	0.64 ± 0.05

La pera (*Pyrus communis* cv Blanquilla) es un fruto climatérico poco percedero con altas tasa respiratoria y velocidad de producción de etileno. La medida de estos dos parámetros en un sistema dinámico, revela que los frutos intactos en fase climatérica, conservados a 20 °C en presencia de luz, poseen una tasa respiratoria comprendida entre 66 y 88 mg CO₂/ kg h, y una velocidad de producción de etileno de aproximadamente 43 µl/kg h. Estas características hacen que la pera Blanquilla sea considerada una buena

candidata para el estudio de la biosíntesis de etileno, y en concreto del enzima formador de etileno o ACC oxidasa.

2

ACTIVIDAD ACC OXIDASA *in vivo* DE PERA BLANQUILLA

La actividad ACC oxidasa en pera parece concentrarse mayoritariamente en el pericarpio (Tabla II). La eliminación del manitol del medio de incubación redujo la actividad al 40 %. Riov y Yang (1982b) demostraron que el manitol estimulaba significativamente la producción de etileno en discos de hojas de cítricos, aportando evidencias de que la presencia de manitol en el medio de incubación incrementaba tanto la síntesis de ACC como su conversión en etileno.

El estadio de madurez del fruto influye también poderosamente en el nivel de actividad del enzima. Así, el fruto senescente sólo rinde el 3 % de la actividad mostrada por el fruto maduro. La máxima actividad (7 nmol C₂H₄/g h, aproximadamente) se obtiene en pericarpio de fruto maduro en presencia de ACC 10 mM y manitol 0.4 M.

Tabla VI. Actividad ACC oxidasa *in vivo* de pera.

Medio de incubación	nmol C ₂ H ₄ /g h
(1) estándar	6.92 ± 0.42
(2) (1) pericarpio con piel	4.91 ± 0.45
(3) (1) sin manitol	2.77 ± 0.35
(4) (1) con ACC 1 mM	5.09 ± 0.19
(5) (1) con fruto senescente	0.21 ± 0.05

Bajo estas condiciones, la actividad ACC oxidasa de secciones de pericarpio de fruto maduro se mantiene proporcional al tiempo de incubación a 28 °C durante al menos 2 horas (Figura 15).

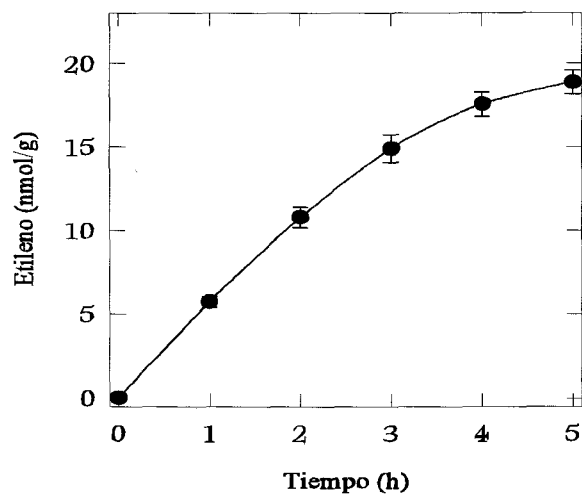


Figura 15. Evolución con el tiempo de la actividad ACC oxidasa in vivo

3

EXTRACCIÓN DE ACC OXIDASA DE PERA BLANQUILLA

3.1. RECUPERACIÓN DE LA ACTIVIDAD IN VITRO

Durante más de una década los estudios desarrollados con el enzima formador de etileno hubieron de ser llevados a cabo *in vivo* debido a que su actividad era totalmente abolida cuando los tejidos se homogeneizaban (Yang y Hoffman, 1984). Hamilton *et al* (1990) pusieron de manifiesto que el EFE presenta una secuencia aminoácida semejante a flavonona-3-hidroxilasa. Para su estabilización, el enzima de *Petunia hybrida* requería condiciones anóxicas y la adición de Fe^{2+} y ascorbato (Britsch y Grisebach, 1986). Utilizando estas mismas condiciones, Ververidis y John (1991) fueron los primeros en extraer auténtica actividad ACC oxidasa a partir de frutos de melón. Tras trituración y posterior centrifugación del homogenado, la actividad fue recuperada en forma soluble. Fernández-Maculet y Yang (1992) observaron en homogenados de manzana, un notable incremento en la recuperación de la actividad en presencia de PVPP o Triton X-100, en el medio de extracción. Dong *et al.* (1992) describieron un nuevo procedimiento de extracción y condiciones de ensayo para ACC oxidasa de manzana, poniéndose de manifiesto una asociación del enzima con la fracción corpuscular, y la necesidad de CO_2 para su completa actividad. Parece probable que la ACC oxidasa de manzana sea igualmente un enzima soluble que puede unirse a la fracción corpuscular durante la disrupción celular (Dong *et al.*, 1992).

Nosotros comenzamos aplicando sin éxito a frutos de pera el procedimiento de extracción y condiciones de ensayo similares a los requeridos para el enzima de melón (Ververidis y John, 1991).

Utilizando el método de extracción y condiciones de ensayo descritas por Dong *et*

al. (1992), ligeramente modificadas, hemos obtenido extractos de pera que exhiben alta actividad ACC oxidasa, consiguiéndose una recuperación superior al 75 % de la actividad registrada *in vivo*, Tabla VII (1). La velocidad de producción de etileno en pera, en presencia de ACC exógeno era de 6 nmol/g h, antes de la homogeneización. Al igual que en manzana, el enzima de pera se encuentra asociado a la fracción corpuscular y puede extraerse en forma soluble mediante tratamiento con detergente (Triton X-100).

Tabla VII. Actividad enzimática en diferentes mezclas de reacción. La mezcla de reacción completa consiste en: 100 mM Hepes (pH 7.2); 20 μ M FeSO₄; 1 mM ascorbato sódico; 10 % (v/v) glicerol; 1 mM ACC; 5 % CO₂ (en fase gaseosa) y 100 μ l de extracto enzimático.

Mezclas de reacción	Etileno nmol/g h
(1) Completa	4.67 \pm 0.90
(2) no extracto	0.11 \pm 0.00
(3) extracto hervido	0.16 \pm 0.01
(4) no O ₂	0.36 \pm 0.12
(5) no Fe ²⁺	0.16 \pm 0.02
(6) no ascorbato	0.20 \pm 0.02
(7) no CO ₂	0.40 \pm 0.03
(8) extracto G-25	4.48 \pm 0.36
(9) 20 mM NaHCO ₃	3.64 \pm 0.08

3.2. REQUERIMIENTO DE COFACTORES

En la tabla VII se recogen los resultados obtenidos tras incubación de un extracto de pera en diferentes medios de reacción. La pérdida de actividad con extracto hervido pone de manifiesto la naturaleza enzimática de la reacción (3). El establecimiento de condiciones anóxicas por desplazamiento del aire con N₂ conduce a la pérdida de

actividad (4). Además de los sustratos ACC y O₂, el enzima de pera muestra absoluto requerimiento de Fe²⁺ (5), ascorbato (6), y CO₂ (7). La eliminación de los compuestos de bajo peso molecular del extracto por cromatografía de filtración en gel no implica pérdida significativa de actividad (8), lo que indica que ningún otro compuesto de bajo Pm presente en el extracto está actuando como cofactor. Cuando sustituimos el 5 % de CO₂ de la fase gaseosa por 20 mM NaHCO₃ en la mezcla de reacción, la actividad resulta igualmente estimulada, aunque en menor extensión (9), indicando que es el CO₂ y no el HCO₃⁻ la especie activa.

El absoluto requerimiento de Fe²⁺ que exhibe el enzima de pera es coherente con la fuerte inhibición de EFE que causan diversos agentes quelantes de metales, en distintos vegetales intactos (Apelbaum *et al.*, 1981b), y con las evidencias aportadas por Bouzayen *et al.* (1991) que demuestran la participación de Fe²⁺ como cofactor esencial para la actividad ACC oxidasa en cultivos en suspensión de células de tomate.

Kao y Yang (1982) propusieron que CO₂ activaba el enzima formador de etileno *in vivo*, siendo Dong *et al.* (1992) los primeros en demostrar que ACC oxidasa requiere imprescindiblemente CO₂ para la expresión de su actividad *in vitro*. Por su parte, McRae *et al.* (1983) describieron un marcado aumento de la producción de etileno *in vivo* a partir de ACC por HCO₃⁻/CO₂, e indicaron que era CO₂ y no HCO₃⁻ la especie molecular activa en este proceso. Smith y John (1993) mostraron igualmente que ACC oxidasa de melón era activada *in vitro* por CO₂ y no por HCO₃⁻, ya que COS (un análogo a CO) inhibía poderosamente la actividad del enzima, mientras que formiato (análogo estructural de HCO₃⁻) la inhibió débilmente. Por su parte, Fernández-Maculet *et al.* (1993) demostraron que la actividad ACC oxidasa extraída de manzana era dependiente del nivel de CO₂ y no de la concentración de HCO₃⁻, por lo que concluyeron que la ACC oxidasa era activada por CO₂ y no por HCO₃⁻. Estos autores determinaron que la concentración de CO₂ que rinde semimáxima actividad en extractos de manzana era del 0.5 %. Este valor es ligeramente superior al que podemos encontrar en cualquier ambiente normal, y podría explicar el hecho de que la actividad ACC oxidasa haya podido ser observada en aquellos extractos

obtenidos y ensayados según el procedimiento descrito por Ververidis y John (1991), que no contempla la adición de CO₂ exógeno.

La activación de ACC oxidasa de manzana por dióxido de carbono se maximiza a pH 9.0, indicando que el grupo del enzima con el que reacciona el CO₂ está en forma no protonada y posee un pK_a alcalino (Fernández-Maculet *et al.*, 1993). Este comportamiento es similar al observado por Lorimer *et al.* (1976) para la activación de la ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa por CO₂, donde la formación de un carbamato entre el dióxido de carbono y el grupo ε-amino de un residuo lisina del enzima, parece estar en la base del proceso. Por ello, Fernández-Maculet *et al.* (1993) han sugerido que ACC oxidasa es activada por CO₂ de igual manera, vía formación de un carbamato entre CO₂ y un grupo amino no disociado del enzima.

Los resultados presentados en la Tabla VII, por su semejanza con los requerimientos del enzima extraído de otros frutos (Ververidis y John, 1991; Fernández-Maculet y Yang, 1992; McGarvey y Christoffersen, 1992), indican que la actividad recuperada de frutos de pera representa la auténtica actividad ACC oxidasa.

3.3. ESTABILIDAD DE LA PREPARACIÓN ENZIMÁTICA

Uno de los principales problemas con el que nos encontramos al trabajar con ACC oxidasa es su rápida pérdida de actividad *in vitro*. La preparación enzimática de pera, obtenida según se recoge en Materiales y Métodos (Modificación de Dong *et al.*, 1992), conserva a -20 °C el nivel inicial de actividad durante al menos 11 días. No obstante, si el extracto se mantiene a 2 °C, éste pierde el 30 % de su actividad a las 24 horas, el 60 % a los 3 días y el 85 % tras una semana (Figura 16).

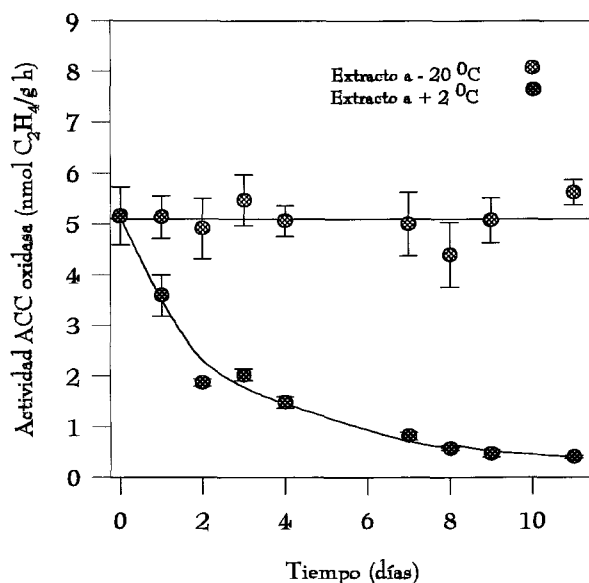


Figura 16. Evolución de la actividad ACC oxidasa de la preparación enzimática mantenida a -20°C y 2°C .

La Tabla VIII muestra cómo tanto el almacenamiento del extracto bajo atmósfera de nitrógeno, como la adición al mismo de $10\ \mu\text{M}$ *o*-fenantrolina, posibilita la completa estabilización de la actividad a 2°C durante al menos 18 horas. Durante este periodo de tiempo, el extracto mantenido en condiciones aeróbicas ha perdido aproximadamente el 20 % de su actividad inicial (Tabla VIII). Resultados similares fueron obtenidos por Dupille *et al.* (1992) con ACC oxidasa de manzana. La falta de estabilidad de ACC oxidasa, como probablemente la de otras hidroxilasas (Britsch y Grisebach, 1986) puede deberse a la autooxidación del ascorbato en condiciones aeróbicas catalizada por Fe^{2+} y/o a la desnaturalización del enzima por Fe^{3+} generado por oxidación de Fe^{2+} . La presencia de *o*-fenantrolina probablemente previene estos procesos por quelación de Fe^{2+} (Dupille *et al.*, 1992).

Tabla VIII. Estabilidad de la preparación enzimática bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

Condiciones	Actividad ACC oxidasa	
	nmol C ₂ H ₄ /g h	%
(1) Control	8.96 ± 0.55	100
(2) Extracto 18 h a 2 °C	7.08 ± 0.05	79
(3) (2) + atmósfera de N ₂	9.13 ± 0.53	102
(4) (2) + 10 µM o-fenantrolina	9.50 ± 0.69	106

Por otra parte, el extracto crudo parece contener algún(os) factor(es) de bajo peso molecular que confieren estabilidad a la preparación. El extracto crudo conservado a -20 °C pierde el 33 % de su actividad inicial a los 15 días. Sin embargo, si se eliminan los compuestos de bajo Pm por cromatografía de exclusión en Sephadex G-25, la estabilidad

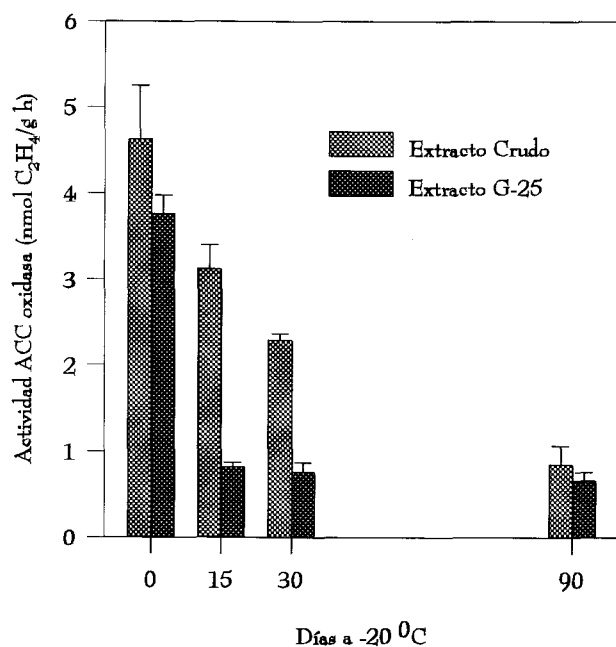


Figura 17. Evolución de la actividad ACC oxidasa del extracto crudo y del extracto G-25 durante el almacenamiento a -20 °C.

del enzima es mucho menor, perdiendose el 88 % de su actividad a los 15 días (Figura 17). La existencia de estos compuestos estabilizantes de la actividad viene tambien apoyada por el hecho de que un extracto crudo sometido a diálisis a 2 °C durante 20 horas pierde el 75 % de su actividad original.

3.4. INFLUENCIA DEL TIEMPO Y DE LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA

La Figura 18 muestra la evolución con el tiempo de la acumulación de etileno durante un típico ensayo de actividad ACC oxidasa *in vitro*. En esta Figura vemos cómo la cantidad de etileno formado es lineal con el tiempo de incubación hasta aproximadamente 50 min y, cómo tras 2 horas de incubación no hay mayor producción de etileno. Bajo las condiciones de ensayo utilizadas, la actividad ACC oxidasa de la preparación de pera es proporcional a la cantidad de extracto añadido al medio de reacción hasta 200 µl (Figura 19).

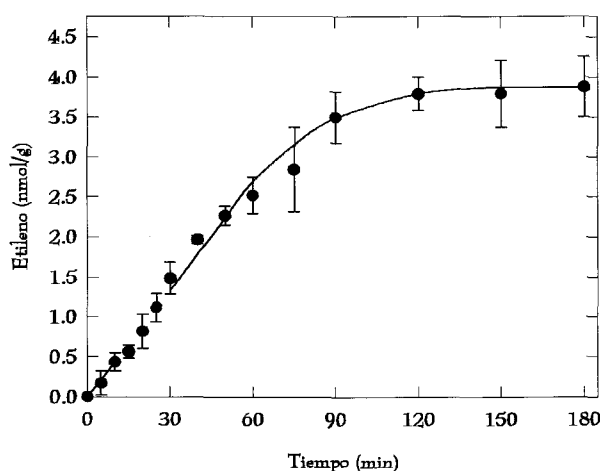


Figura 18. Evolución con el tiempo de la actividad ACC oxidasa *in vitro*.

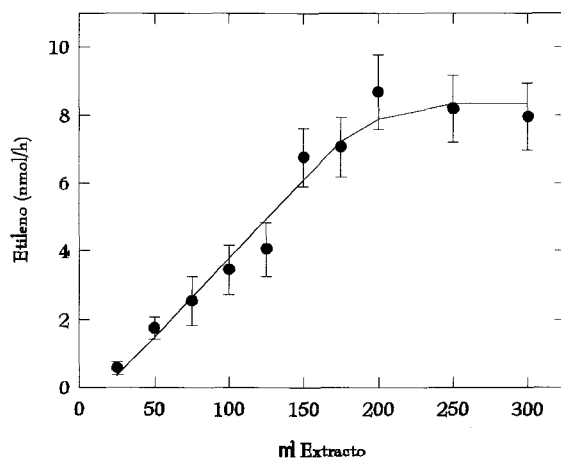


Figura 19. Influencia de la cantidad de extracto presente en la mezcla de reacción sobre la velocidad de producción de etileno (4.4 mg proteínas/ml extracto).

3.5. CONDICIONES ÓPTIMAS DE EXTRACCIÓN

3.5.1. Efecto de distintos agentes solubilizantes

En ensayos preliminares, siguiendo el método descrito por Dong *et al.* (1992) quienes utilizan 0.1 % de Triton X-100 para la solubilización del enzima de manzana, se comprobó que, en frutos de pera, la mayor parte de la actividad enzimática no era recuperada del precipitado. Por ello, se ha estudiado la influencia de la concentración de Triton X-100 en la solubilización del enzima de pera, así como su posible sustitución por otros agentes solubilizantes (Tabla IX). La máxima recuperación se obtiene con una concentración de Triton X-100 igual o superior al 0.8 %. Ni PVPP ni Tween 20 a las concentraciones ensayadas se muestran más efectivos que 0.8 % de Triton X-100.

Tabla IX. Efecto de distintos agentes solubilizantes en la extracción de ACC oxidasa de pera.

Agente Solubilizante		Actividad ACC oxidasa nmol C ₂ H ₄ /g h
Triton X-100	0.1 %	1.51 ± 0.50
	0.3 %	5.13 ± 0.43
	0.8 %	8.56 ± 1.42
	2.0 %	8.16 ± 0.71
PVPP	2.0 %	0.75 ± 0.10
Tween 20	0.1 %	2.18 ± 0.60
	0.8 %	5.85 ± 0.59

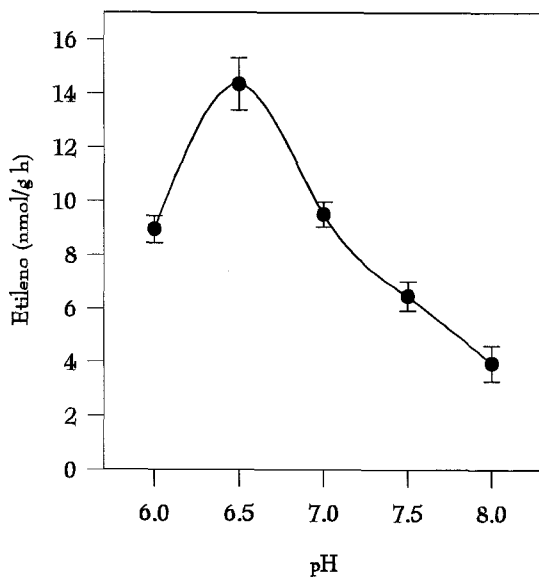


Figura 20. Influencia del pH de extracción.

para la extracción del enzima de melón
manzana.

3.5.2. Influencia del pH de extracción

En un rango de 6.0 a 8.0, se ha estudiado la influencia que el pH del tampón de extracción (400 mM fosfato) tiene sobre la recuperación de la actividad ACC oxidasa en homogenados de pera. La Figura 20 muestra cómo la actividad fue máxima cuando el extracto se obtuvo a pH 6.5. Este valor es 0.7 unidades de pH inferior al utilizado por Ververidis y John (1991) y por Dong *et al.* (1992)

y

3.6. REVISIÓN DEL PROTOCOLO DE VERVERIDIS Y JOHN (1991)

Utilizando modificaciones del método de extracción y ensayo descrito por Ververidis y John para la ACC oxidasa de melón, el enzima ha sido ensayado en otros tejidos vegetales (Kuai y Dilley, 1992; McGarvey y Christoffersen, 1992; Pirrung *et al.*, 1993; Hyodo *et al.*, 1993; Nijenhuis-De Vries *et al.*, 1994; Muñoz-Rueda *et al.*, 1995).

Como ya comentamos en el apartado 3.1., nosotros comenzamos aplicando sin éxito a frutos de pera el procedimiento de extracción y condiciones de ensayo similares a las requeridas para el enzima de melón (Ververidis y John, 1991). Puesto que estos autores no contemplan la adición de $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ en el ensayo de actividad, y dada la absoluta necesidad de CO_2 para la ACC oxidasa de pera (Tabla VII), se pensó que la ausencia de este cofactor esencial podría explicar la falta de actividad en los extractos. Sin embargo, la adición de 5 % de CO_2 al medio de reacción no reportó resultados positivos, indicando que la ACC oxidasa de pera no se extrae satisfactoriamente siguiendo el método de extracción de Ververidis y John para melón.

Fernández-Maculet y Yang (1992) consiguieron aplicar con éxito a manzanas esta metodología, aunque la recuperación de la actividad de sus extractos fue baja. Esta actividad aumentó en presencia de 30 mM ascorbato en el buffer de extracción. Estos mismos autores comprobaron que la mayor parte de la actividad se encontraba asociada a la fracción corpuscular pudiendo ser recuperada en presencia de PVPP o Triton X-100 en el medio de extracción. Las evidencias acumuladas por estos investigadores dieron lugar al establecimiento del método de extracción descrito por Dong *et al.* (1992) para la ACC oxidasa de manzana, cuya aplicación a frutos de pera nos ha permitido obtener extractos con un alto nivel de actividad enzimática.

Teniendo en cuenta estos conocimientos, hemos revisado nuevamente (Tabla X) el protocolo de Ververidis y John (1), añadiendo ascorbato (2) y ascorbato + Triton X-100 (3) al medio de extracción. Los homogenados preparados con los medios de extracción

especificados fueron fraccionados en sobrenadante y precipitado por centrifugación a 28000 g durante 30 minutos. Los precipitados obtenidos con los medios de extracción (1) y (2) fueron redissueltos en tampón de resuspensión con 0.8 % de Triton X-100 y centrifugados nuevamente a 28000 g/ 30 min. Los sobrenadantes fueron utilizados para ensayar actividad en condiciones óptimas.

Tabla X. Recuperación de la actividad ACC oxidasa del homogenado, localización del enzima en la fracción corpuscular y su solubilización por Triton X-100.

Medio Extracción	Actividad ACC oxidasa (nmol C ₂ H ₄ /g h)	
	Sobrenadante	Ppdo. resuspendido
(1) 0.1 M Tris, 10 % Glicerol	N.D.	0.82 ± 0.13
(2) (1) + 30 mM Ascorbato	0.55 ± 0.19	9.43 ± 0.73
(3) (2) + 0.8 % Triton X-100	4.86 ± 0.66	

La Tabla X muestra que en frutos de pera el método de extracción original de Ververidis y John no permite la recuperación del enzima en forma soluble y que tanto el ascorbato como el Triton X-100 son necesarios para la extracción del enzima. La Tabla X también indica que la máxima actividad se obtiene tras extracción en presencia de ascorbato y posterior solubilización del precipitado en presencia de Triton X-100.

ACC sintasa ha sido largamente reconocido como un enzima citosólico (Boller *et al.*, 1979). Sin embargo, el enzima de manzana parece asociado con la fracción corpuscular Yip *et al.* (1991). Estos autores sugirieron que el enzima de este fruto podía estar localizado en el citosol, si bien durante la disrupción celular se asocia estrechamente a la fracción corpuscular. Este puede ser el caso de ACC oxidasa, que ha sido extraído en forma soluble de diversos tejidos, si bien, exige en manzana (Dong *et al.*, 1992), y en pera la acción de Triton X-100 o PVPP para disociarse de las fracciones membranas.

4

OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO DE ACTIVIDAD *in vitro***4.1. CONCENTRACIONES ÓPTIMAS DE COFACTORES**

Conocidos los requerimientos que ACC oxidasa de pera presenta respecto de Fe^{2+} , ascorbato y CO_2 , y con objeto de maximizar la velocidad de reacción, se han calculado las concentraciones óptimas de los distintos cofactores.

4.1.1. Dependencia de la concentración de Fe^{2+}

La Figura 21 muestra el efecto de la concentración de Fe^{2+} sobre el nivel de actividad enzimática. Así, para mantener la máxima velocidad de reacción se requiere una concentración de Fe^{2+} igual o superior a 0.2 mM. Este valor es del mismo orden que los presentados para el enzima de tomate, 0.4 mM (Bouzayen *et al.*, 1991); melón, 0.1 mM (Ververidis y John, 1991); manzana, 0.05-0.1 mM (Fernández-Maculet y Yang, 1992; Kuai y Dilley, 1992; Pirrung *et al.*, 1993) y aguacate, 0.1 mM (McGarvey y Christoffersen, 1992). Hyodo

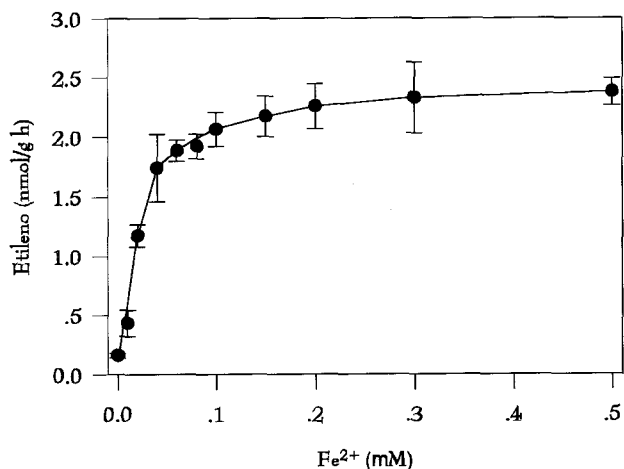


Figura 21. Influencia de la concentración de Fe^{2+} sobre la actividad ACC oxidasa. La mezcla de reacción contiene: 100 mM Hepes (pH 7.2); 10 % glicerol; 1 mM ACC; 1 mM ascorbato sódico; 5 % CO_2 (en fase gaseosa); 100 μl extracto enzimático y las concentraciones de Fe^{2+} que se indican.

et al., 1993 han calculado que la concentración de Fe^{2+} que maximiza la velocidad de reacción en *Cucurbita maxima* es 25 μM , siendo este valor seis veces superior al encontrado para el enzima de *Cicer arietinum* (Muñoz-Rueda *et al.*, 1995). Estos dos grupos de investigadores presentan evidencias que indican que se produce inhibición de la actividad enzimática cuando Fe^{2+} está presente a concentraciones superiores a la óptima.

4.1.2. Dependencia de la concentración de ascorbato

La concentración de ascorbato que optimiza la velocidad de reacción en pera ha quedado establecida en 10 mM (Figura 22), observándose una ligera inhibición de la actividad enzimática a concentraciones superiores a 30 mM.

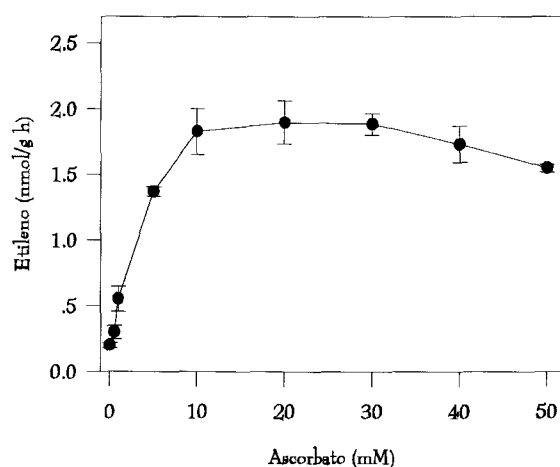


Figura 22. Influencia de la concentración de ascorbato sobre la actividad ACC oxidasa. La mezcla de reacción contiene: 100 mM HEPES (pH 7.2); 10 % glicerol; 1 mM ACC; 0.2 mM SO_4Fe ; 5 % CO_2 (en fase gaseosa); 100 μl extracto enzimático y las concentraciones de ascorbato que se especifican.

McGarvey y Christoffersen (1992) determinaron que la concentración de ascorbato

que rinde máxima actividad en aguacate era 20 mM, idéntico valor al hallado por Nijenhuis-De Vries *et al.* (1994) en pétalos de clavel. Smith *et al.* (1992) en melón, Hyodo *et al.* (1993) en *Cucurbita maxima* y Muñoz-Rueda *et al.* (1995) en eje embrionario de *Cicer arietinum* han mostrado que la concentración óptima de ascorbato se mantiene en torno a 5 mM. Al igual que en pera, estos grupos de investigación han observado que un incremento en la concentración de ascorbato por encima del nivel óptimo, origina una clara inhibición de la actividad del enzima.

En ausencia de CO₂, Finlayson y Reid (1994) obtienen máxima actividad en plántulas de *Helianthus annuus* cuando la concentración de ascorbato se mantiene entre 2.5 y 5 mM, pasando a 20 mM en presencia de 5 % CO₂.

4.1.3. Dependencia de la concentración de CO₂

La Figura 23 recoge la dependencia que presenta ACC oxidasa de la concentración de CO₂, observándose una actividad máxima con un nivel de CO₂ igual o superior al 14 % en la atmósfera del medio de reacción. La concentración de CO₂ que da una actividad semimáxima es 5 %. Dong *et al.* (1992) han mostrado que el enzima extraído de manzana opera en condiciones óptimas con un 4 % de CO₂, mientras que Smith y John (1993) en melón y Zhang *et al.* (1995) con el enzima recombinante de tomate, elevan este nivel al 10 %.

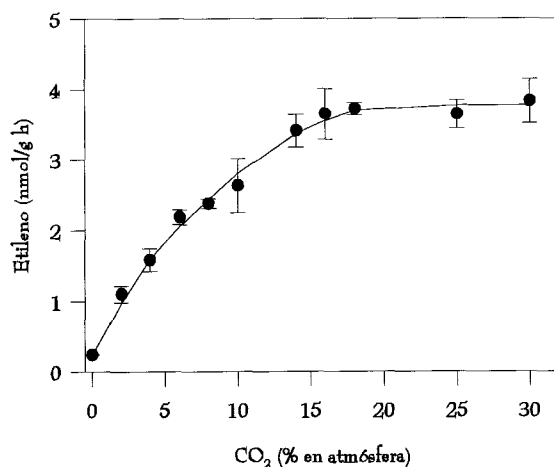


Figura 23. Influencia de la concentración de CO₂ sobre la actividad ACC oxidasa. La mezcla de reacción contiene: 100 mM HEPES (pH 7.2); 10 % glicerol; 1 mM ACC; 0.2 mM SO₄Fe; 10 mM ascorbato sódico; 100 μl extracto enzimático y las concentraciones de CO₂ que se indican.

4.2. EFECTO DEL pH

El efecto del pH sobre la actividad ACC oxidasa de pera se ha determinado utilizando cuatro sistemas amortiguadores (Figura 24). El pH óptimo se ha situado en 6.7 con tampones HEPES, MES y MOPS, mientras que se desplaza hasta 7.0 con tampón fosfato. De los tampónes empleados, HEPES es el que rinde la máxima actividad relativa, mientras que con fosfato el nivel de actividad se reduce considerablemente. El pH óptimo de pera es ligeramente más ácido que el hallado para el enzima

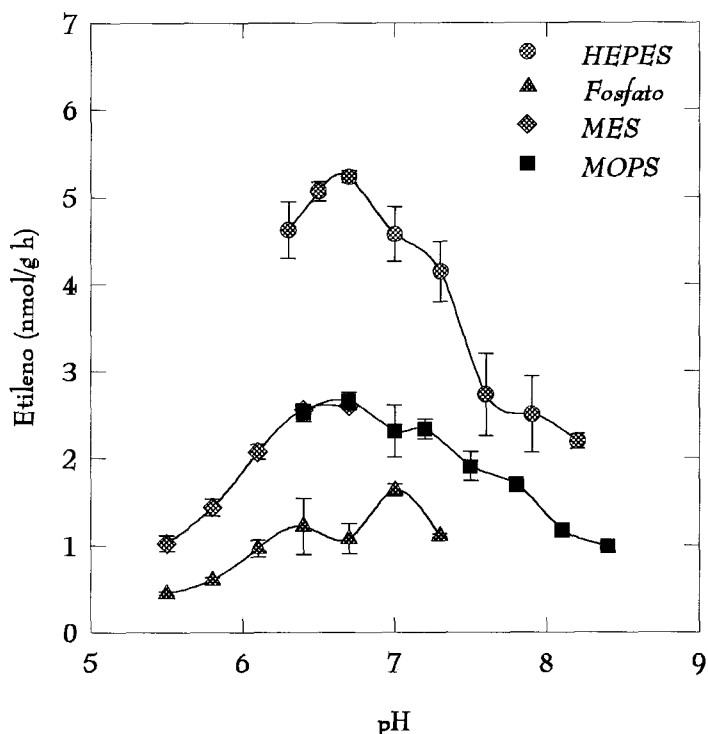


Figura 24. Influencia del pH del medio de reacción sobre la actividad ACC oxidasa. La mezcla de reacción consta de 10 % glicerol; 1 mM ACC; 0.2 mM SO_4Fe ; 10 mM ascorbato; 14 % CO_2 (en fase gaseosa) y 100 μ l de preparación enzimática, en los diferentes tampones ensayados a 100 mM.

extraído de otros frutos, entre 7.2 y 8.0 (McGarvey y Christoffersen, 1992; Smith *et al.*, 1992; Fernández-Maculet *et al.*, 1993; Dupille *et al.*, 1992), aunque coincide plenamente con el mostrado para manzana (Poneleit y Dilley, 1993), clavel (Nijenhuis-De Vries *et al.*, 1994) y eje embrionario de *Cicer arietinum* (Muñoz-Rueda *et al.*, 1995).

La menor actividad enzimática con tampón fosfato fue también observada por Kuai y Dilley (1992) en manzana. Fuchs *et al.* (1981) sugirieron que fosfato era un inhibidor de la biosíntesis de etileno en plantas superiores, y que uno de los sitios de actuación era la conversión de ACC en etileno. Smith *et al.* (1992) han aportado evidencias que indican que la naturaleza de los tampones afecta la actividad ACC oxidasa, probablemente debido

a la formación de diferentes complejos Fe^{2+} -tampón.

Fernández-Maculet *et al.* (1993) indican que el pH óptimo mostrado por el enzima de manzana refleja tanto la respuesta de la reacción catalítica como la activación del enzima por CO_2 . Asumiendo que ACC oxidasa se activa por CO_2 vía formación de un carbamato, la caída de la actividad a pH alcalinos podría atribuirse a la dificultad de mantener una concentración saturante de CO_2 debido a su conversión en HCO_3^- , mientras que la disminución del nivel de actividad a pH más ácidos que el óptimo reflejaría la dificultad de formación del carbamato, debido a que el grupo amino del enzima, con el que reaccionaría el CO_2 estaría en forma protonada no reactiva.

4.3. TEMPERATURA ÓPTIMA

La producción de etileno en la mayoría de las plantas superiores se maximiza entre 30 y 35 °C, pudiendo detectarse emisiones de este gas hasta los 42 - 50 °C (Tabla XI) (Field, 1985). ACC oxidasa *in vivo* exhibe un máximo de actividad en torno a 30 °C (Yang y Hoffman, 1984).

La Figura 25 muestra la dependencia de la actividad ACC oxidasa extraída de pera respecto de la temperatura, en el intervalo 18 - 50 °C. La preparación enzimática presenta dos máximos relativos de actividad a 28 y 38 °C, un hecho sólo repetido posteriormente en el enzima de eje embrionario de *Cicer arietinum* (Muñoz-Rueda *et al.*, 1995). McGarvey y Christoffersen (1992), purificando el enzima de aguacate por precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, encontraron dos fracciones con actividad que denominaron *EFE1* y *EFE2*, respectivamente. El estudio de las características de *EFE1* ha revelado un máximo de actividad entre 25 y 30 °C, que coincide plenamente con el primer máximo encontrado para el enzima de pera, 28 °C.

Tabla XI. Efecto de la temperatura sobre la producción de etileno

Temperatura óptima (°C)	Máxima temperatura a la que se produce etileno (°C)	Tejido vegetal	Referencia
32	40	Mesocarpo de manzana	Burg y Thimann (1959)
35	42.5	Hoja de <i>Phaseolus vulgaris</i>	Field (1981)
30	--	Mesocarpo de manzana	Mattoo <i>et al.</i> (1977)
20	--	Pericarpio de tomate	Mattoo <i>et al.</i> (1977)
30	> 50	Homogenado de tallo de <i>Pisum sativum</i>	Konze y Kende (1979)
36	38	Secciones subapicales de <i>Pisum sativum</i> etiolado	Salveit y Dilley (1978)
29	> 35	Mesocarpo de manzana	Apelbaum <i>et al.</i> (1981)
30	40	Mesocarpo de manzana	Yu, Adams y Yang (1980)
30	40	Hipocotilos de <i>Phaseolus vulgaris</i>	Yu, Adams y Yang (1980)

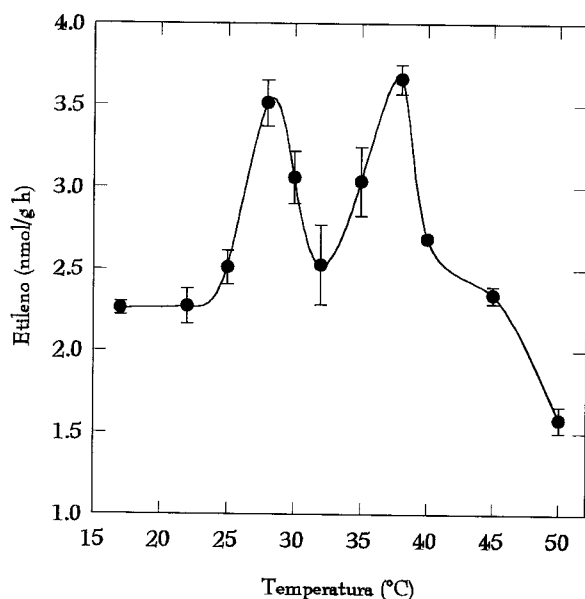


Figura 25. Dependencia de la actividad ACC oxidasa respecto de la temperatura.

El rango óptimo de temperatura para un ripening normal del fruto ha quedado establecido en 18 - 22 °C. Curiosamente, el fruto de pera muestra un nivel de actividad ACC oxidasa a 45 °C similar al exhibido entre 18 y 22 °C (Figura 25). Las plantas expuestas a temperaturas elevadas pueden producir etileno de estrés (Kondo y Takahashi, 1989). La velocidad de producción de etileno alcanza su máximo en torno a los 35 °C, y se encuentra fuertemente

inhibida por encima de los 40 °C (Abeles, 1992). La existencia del máximo relativo de actividad que se observa en pera Blanquilla a 38 °C podría representar una nueva manifestación de la existencia de dos isoformas de ACC oxidasa, como postulan McGarvey y Christoffersen (1992), o bien estar relacionada con la maquinaria involucrada en la generación de etileno de estrés, como respuesta a la exposición a temperaturas elevadas.

5

CARACTERIZACION DE ACC OXIDASA

5.1. EFICIENCIA DE LA REACCIÓN

La realización de un balance de materia referido al ACC, durante el transcurso de la reacción catalizada por ACC oxidasa, ha permitido observar que la eficiencia de la reacción es baja, ya que el etileno formado después de 3 horas de incubación corresponde a menos del 1 % del ACC inicial. Este dato se ajusta bien a las observaciones realizadas por Dong *et al.* (1992), quienes tras encontrar que ACC oxidasa purificada de manzana presenta baja actividad específica sugieren que el enzima pudiera tener bajo poder catalítico.

Por otro lado, nuestras experiencias indican que en el medio no tiene lugar ninguna reacción colateral, ya que todo el ACC no utilizado en la producción de etileno permanece inalterado como ACC libre. En este sentido, Vioque y Fernández-Maculet (1990), trabajando con un sistema enzimático extraído de hojas de olivo que cataliza la formación de etileno a partir de ACC, encuentran que, a tiempos largos de incubación (24- 48 horas), se acumula en el medio 3-hidroxiopropano-amida (HPA). La HPA formada puede llegar a responder del 85 % del ACC inicial. HPA fue identificada como un producto final de una reacción colateral y no como un intermediario en la biosíntesis de etileno. Sin embargo, en la preparación enzimática de pera, la inalterabilidad del ACC residual en el medio de reacción permite descartar la formación de este compuesto como justificante de la baja eficiencia de la producción de etileno.

5.2. POSIBLE PARTICIPACIÓN DE 2-OXOGLUTARATO

La homología secuencial entre flavonona-3-hidroxilasa, una dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato, y el enzima formador de etileno (Hamilton *et al.*, 1990), suscitó la cuestión de si ACC oxidasa requería igualmente 2-oxoglutarato para la manifestación de su actividad.

A diferencia de flavonona-3-hidroxilasa, la ACC oxidasa de pera no ve estimulada su actividad por adición de 2-oxoglutarato, a ninguna de las concentraciones ensayadas (Tabla XII). Este mismo resultado ya fue adelantado por Ververidis y John (1991) para la ACC oxidasa de melón. Smith *et al.* (1992) trabajando con el enzima de este mismo fruto, encontraron que análogos estructurales del 2-oxoglutarato inhibían la actividad ACC oxidasa, si bien esta inhibición no pudo revertirse por adición de cantidades en exceso de 2-oxoglutarato, por lo que atribuyeron el efecto inhibitor de estos compuestos a su acción quelante sobre el Fe²⁺.

Tabla XII. Influencia de la concentración de 2-oxoglutarato sobre la actividad ACC oxidasa de extractos de pera.

Concentración 2-oxoglutarato	Actividad ACC oxidasa	
	nmol C ₂ H ₄ /g h	%
--	5.58 ± 0.55	100
0.1 mM	5.07 ± 0.59	91
0.5 "	5.18 ± 0.73	93
1.0 "	4.18 ± 0.51	75
5.0 "	2.72 ± 0.15	49
10.0 "	1.30 ± 0.12	23

Las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato catalizan generalmente reacciones que transcurren con la incorporación de uno de los átomos de oxígeno en el

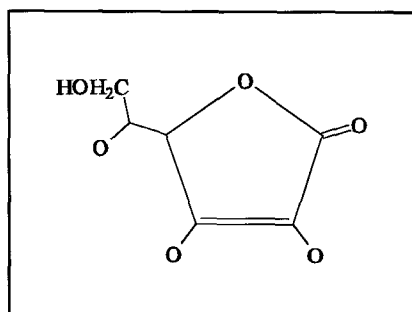


Figura 26. Ácido L-ascórbico

sustrato, emplazándose el otro en la molécula de succinato que resulta de la descarboxilación oxidativa del 2-oxoglutarato (De Carolis y De Luca, 1994). En dos dioxigenasas que requieren Fe^{2+} y son independientes de 2-oxoglutarato, la 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa y la α -cetoisocaproato oxigenasa, los propios sustratos aportan la función 2-oxoácido (Hamilton, 1971). Sin embargo, este no es el caso de ACC oxidasa, pues el ACC carece de grupo 2-oxo. La contemplación de la molécula de ascorbato revela que al igual que 2-oxoglutarato, posee un grupo oxo en C-2 (Figura 26), por lo que puede ser considerado un 2-oxoácido cíclico (De Carolis y De Luca, 1994). Por ello, el papel del ascorbato en la reacción catalizada por ACC oxidasa, parece más relevante que el de mero cofactor, pudiendo estar implicado en la transferencia de oxígeno.

En este contexto, la represión de la actividad ACC oxidasa de pera, observada a altas concentraciones de 2-oxoglutarato (Tabla XII), podría tener su origen en una inhibición competitiva de este compuesto sobre la acción del ascorbato.

5.3. REQUERIMIENTO DE AGENTES REDUCTORES

Como hemos podido ver en la Tabla VII y en la Figura 22, la ACC oxidasa de pera muestra, al igual que el enzima extraído de otros tejidos vegetales, absoluto requerimiento de ascorbato. Al objeto de poder estudiar la posible sustitución de este cofactor por otros agentes reductores, hemos privado de este compuesto la preparación enzimática, mediante cromatografía de exclusión en columna de Sephadex G-25. La Tabla XIII pone de manifiesto que el extracto G-25 de pera requiere invariablemente la adición de ascorbato para manifestar actividad ACC oxidasa. Glutación, NADH, NADPH y DTT fueron incapaces de reemplazar al ascorbato como agente reductor, aunque se obtuvieron niveles traza de actividad con DTT 5mM. El reforzamiento del ambiente reductor por adición de

DTT 5mM al medio de reacción que ya contenía ascorbato, se tradujo en un ligerísimo incremento del nivel de actividad. McGarvey y Christoffersen (1992) obtuvieron con el enzima de aguacate resultados similares a los nuestros, si bien encontraron que la actividad del extracto en presencia de ascorbato se incrementaba dos o tres veces cuando se adicionaba DTT 5 mM. Por su parte, Smith *et al.* (1992) han comprobado que el

Tabla XIII. Posible sustitución de ascorbato por otros agentes reductores.

Reductor	Actividad ACC oxidasa	
	nmol C ₂ H ₄ /g h	%
Ninguno	n.d.	-
Ascorbato 10 mM	14.85 ± 0.75	100
Glutati6n 5 mM	n.d.	-
NADH 1 mM	n.d.	-
NADPH 1 mM	n.d.	-
DTT 5 mM	0.10 ± 0.02	< 1
Ascorbato 10 mM + DTT 5 mM	15.20 ± 0.84	103

isoascorbato puede sustituir parcialmente al ascorbato en extractos de mel6n, aunque se produce un 25 % de reducci6n de la actividad del enzima. Estos autores tambi6n pusieron de manifiesto que dehidroascorbato, NADH y NADPH son inefectivos como cofactores de ACC oxidasa.

En este sentido, ACC oxidasa se asemeja a las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, donde actividades m6ximas se obtienen invariablemente con ascorbato. En 6β-hidroxisasa, el DTT puede sustituir parcialmente al ascorbato (Hashimoto y Yamada, 1987), mientras que en otras dioxigenasas, como giberelin A₂₀ 3β-hidroxisasa, la actividad del enzima es totalmente dependiente de ascorbato, mostrandose DTE (un is6mero de DTT) absolutamente inefectivo (Smith *et al.*, 1986).

Nuestros resultados apoyan otras evidencias acumuladas según las cuales el ascorbato actuaría como cosustrato de ACC oxidasa y no como simple agente reductor (Dong *et al.*, 1992).

5.4. AFINIDAD POR ACC. CÁLCULO DE LA K_m

ACC oxidasa muestra una alta afinidad por su sustrato, el ACC. Esto fue inicialmente demostrado *in vivo* por McKeon y Yang (1984), basándose en la dependencia que la velocidad de formación de etileno mostraba respecto de la concentración endógena de ACC en secciones de epicotilos de *Pisum sativum*. La K_m para el ACC *in vivo* en este tejido resultó ser 66 μM . Los valores de K_m encontrados en otros tejidos oscilan entre 8 μM en manzana (Yip *et al.*, 1988) y 200 μM en segmentos de cotiledones de *Xanthium pennsylvanicum* (Sato y Esashi, 1980). Estas variaciones pueden ser el resultado de la diferente localización del ACC celular en distintos tejidos. Es conocido que el ACC está parcialmente secuestrado en la vacuola. La proporción de ACC en éste orgánulo va desde el 65 % en trigo (Tophof *et al.*, 1989) hasta el 90 % en hoja de *Vicia faba* (Mayne y Kende, 1986).

En experimentos previos, hemos observado que el enzima extraído de pera Blanquilla es sensible a inhibición por exceso de sustrato (Tabla XIV). La velocidad de reacción se muestra saturable respecto de la concentración de ACC entre 0.5 y 1.0 mM, y concentraciones del aminoácido iguales o superiores a 5 mM producen inhibición de la actividad del enzima. Por ello, la determinación de la K_m para el ACC se ha llevado a cabo en el rango de 0 a 1.0 mM. La Figura 27 muestra la dependencia de la velocidad de reacción respecto de la concentración de sustrato. La K_m aparente para el ACC del enzima extraído de pera es de 57.5 μM , medida en condiciones óptimas, según la representación de Lineweaver-Burk.

Tabla XIV. Inhibición de ACC oxidasa por exceso de ACC

ACC	Actividad ACC oxidasa nmol C ₂ H ₄ /g h
0.1 mM	1.81 ± 0.05
0.5 "	3.04 ± 0.40
1.0 "	3.01 ± 0.31
5.0 "	1.49 ± 0.12
10.0 "	1.27 ± 0.13

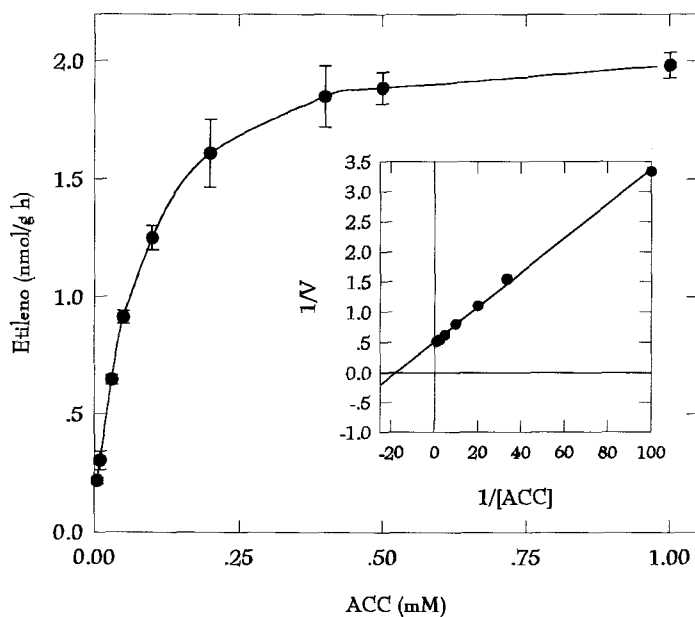


Figura 27. Efecto de la concentración de ACC sobre la actividad ACC oxidasa.

Junto con la requerida estereoespecificidad que el enzima muestra respecto de los isómeros del ácido 1-amino-2-etilciclopropano-1-carboxílico (AEC), análogo de ACC, el

segundo criterio que se ha utilizado para comprobar la autenticidad de la actividad ACC oxidasa *in vitro*, es la afinidad que el enzima muestra respecto de su sustrato, el ACC.

La K_m aparente para ACC de ACC oxidasa *in vivo* es aproximadamente 100 μM o menor (Yang y Hoffman, 1984). El valor de K_m obtenido para la ACC oxidasa de pera es perfectamente equiparable con las obtenidas para el enzima extraído de otras especies vegetales (Tabla XV) y corrobora la autenticidad del enzima extraído.

TEJIDO DE PROCEDENCIA	K_m (μM)	REFERENCIA
MELÓN	85	VERVERIDIS Y JOHN, 1991
	60	SMITH <i>ET AL.</i> , 1992
	24	SMITH Y JOHN, 1993
MANZANA	6.4	KUAI Y DILLEY, 1992
	17	FERNÁNDEZ-MACULET Y YANG, 1992
	12	PIRRUNG <i>ET AL.</i> , 1993
	20	DUPILLE <i>ET AL.</i> , 1992
	28	FERNÁNDEZ-MACULET <i>ET AL.</i> , 1993
AGUACATE	32	MCGARVEY Y CHRISTOFFERSEN, 1992
PÉTALO DE CLAVEL	30	NIJENHUIS-DE VRIES <i>ET AL.</i> , 1993
<i>CUCURBITA MAXIMA</i>	175	HYODO <i>ET AL.</i> , 1993
<i>HELIANTHUS ANNUUS</i>	48	FINLAYSON Y REID, 1994
<i>CICER ARIETINUM</i>	28	MUÑOZ-RUEDA <i>ET AL.</i> , 1995
TOMATE	23.2	ZHANG <i>ET AL.</i> , 1995

Tabla XV. Constantes de Michaelis para ACC del enzima extraído de diferentes tejidos vegetales

Fernández-Maculet *et al.* (1993) encuentran al estudiar la activación de ACC oxidasa por CO_2 , que la presencia de este cofactor aumenta la velocidad máxima de la reacción, pero disminuye la afinidad del enzima por su sustrato, que se traduce en un aumento de la K_m . Así, en manzana, la K_m pasó de 28 μM en atmósfera de aire a 121 μM

con un 4 % de CO₂. Similares resultados se han obtenido con el enzima de melón, donde de 24 μM se pasó a 250 μM en presencia de 30 mM CO₃H⁻ (Smith y John, 1993). Igualmente sucede en pétalos de clavel (de 30 μM a 425 μM con 30 mM HCO₃⁻) (Nijenhuis-De Vries *et al.*, 1994) y plántulas de *Helianthus annuus* (de 48 μM a 98 μM en atmósfera con un 5 % de CO₂) (Finlayson y Reid, 1994). Sin embargo, Muñoz-Rueda *et al.* (1995) no encuentran variaciones en los valores de K_m para el ACC del enzima de eje embrionario de *Cicer arietinum*, cuando el nivel de CO₂ se incrementa del 0.03 al 3 %.

La influencia del CO₂ sobre la K_m aparente para el ACC puede explicar el amplio rango de valores obtenidos en ensayos *in vivo*, donde los niveles de HCO₃⁻/CO₂ no están controlados (Yip *et al.*, 1988), así como los bajos valores de K_m para el enzima extraído de manzana que se obtuvieron en ausencia de HCO₃⁻/CO₂ (Kuai y Dilley, 1992; Pirrung *et al.*, 1993).

5.5. AFINIDAD POR EL OXÍGENO. CÁLCULO DE LA K_m

En 1979, Adams y Yang establecieron que la conversión de ACC en etileno era dependiente de la concentración de oxígeno. Los valores de la constante de Michaelis determinados para el O₂ han mostrado grandes variaciones dependiendo del contenido endógeno de ACC en los tejidos (Yip *et al.*, 1988). Cuando los niveles de ACC son bajos (inferiores a su K_m) la concentración de $\frac{1}{2}O_2$ que rinde la semimáxima velocidad de producción de etileno [S_{0.5}] se mantuvo entre el 5 y el 7 % según el tejido, y disminuía marcadamente cuando la concentración endógena de ACC aumentaba por encima de su K_m. En secciones de hipocotilos de *Phaseolus vulgaris* se obtuvo un valor de K_m para el oxígeno de 1.3 % (Yip *et al.*, 1988).

La Figura 28 muestra la dependencia que la ACC oxidasa extraída de pera muestra respecto de la concentración de O₂. Según la ecuación de Lineweaver-Burk, la K_m para el O₂, determinada en condiciones óptimas era 0.44 %. Este valor es idéntico al determinado

para manzana, 0.4-0.5 % (Kuai y Dilley, 1992; Fernández-Maculet *et al.*, 1992) y plántulas de *Helianthus annuus*, 0.6 % (Finlayson y Reid, 1994) y es significativamente más bajo

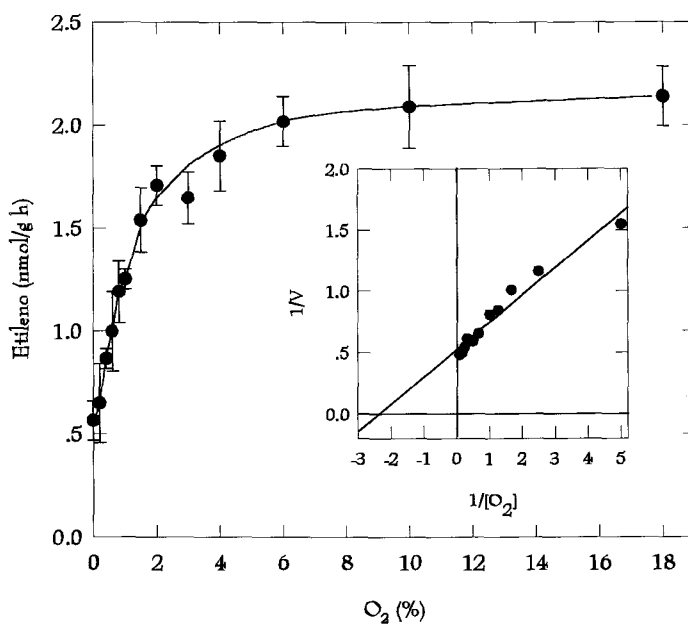


Figura 28. Efecto de la concentración de O₂ sobre la actividad ACC oxidasa.

que el encontrado para el enzima de melón, 1.3 % (Smith y John, 1993), eje embrionario de *Cicer arietinum*, 1.2 % (Muñoz-Rueda *et al.*, 1995 Tesis) y aguacate, 4.6 % (McGarvey y Christoffersen, 1992).

La introducción de CO₂ en el medio de reacción disminuye la afinidad del enzima por el O₂, lo que implica un incremento de la constante de Michaelis. Así, en manzana se incrementa hasta el 2 % en presencia de 4 % de CO₂ (Fernández-Maculet *et al.*, 1993) y en melón hasta el 3.3 % en presencia de 30 mM HCO₃⁻ (Smith y John, 1993). Sin embargo, en plántulas de *Helianthus annuus* se observa una ligera disminución en el valor de la K_m en presencia de 5 % de CO₂, de 0.6 % a 0.5 % (Finlayson y Reid, 1994).

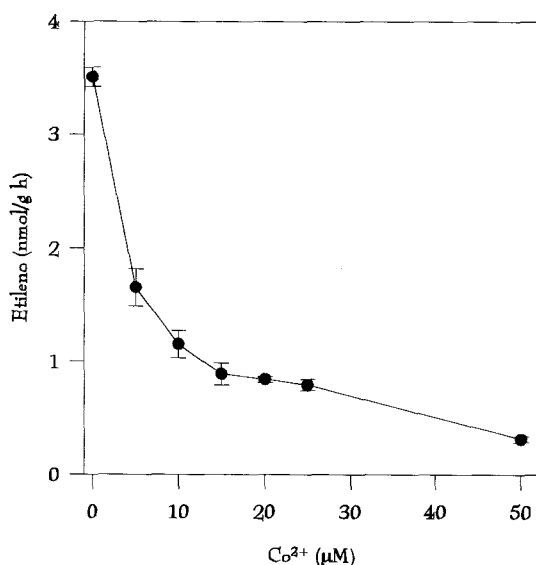


Figura 29. Inhibición de la actividad ACC oxidasa por Co^{2+} .

5.6. INHIBICIÓN POR IONES Co^{2+}

En 1956, Thimann observó que la producción de etileno era inhibida por iones Co^{2+} , sugiriendo que el cobalto ejercía su efecto inhibitorio al unirse a los grupos sulfhidrilo de las proteínas. Posteriormente, Yu y Yang (1979) identificaron la conversión de ACC en etileno como la etapa sensible a Co^{2+} , comprobando que

otros potentes inhibidores de grupos SH- no se mostraban tan efectivos como el cobalto. La inhibición de la producción de etileno por Co^{2+} podría explicar la influencia de este ion como promotor de la elongación y expansión en segmentos de tallos tratados con AIA (Lau y Yang, 1976).

La ACC oxidasa extraída de pera resulta severamente inhibida por iones cobalto (Figura 29). Una concentración de Co^{2+} tan baja como 10 μM es suficiente para causar una inhibición próxima al 70 %. Estos resultados son coherentes con los obtenidos por otros investigadores. Así, Ververidis y John (1991) encontraron que Co^{2+} 25 μM inhibía un 50 % la reacción catalizada por ACC oxidasa en melón. En manzana, se obtiene un nivel de inhibición del 7 % con Co^{2+} 2 μM , que se eleva al 46 % con una concentración del ion 10 μM (Kuai y Dilley, 1992). Fernández-Maculet y Yang (1992) cifraron en un 70 % la inhibición obtenida con una concentración 50 μM de iones Co^{2+} . Por su parte, McGarvey y Christoffersen (1992) consiguieron inhibir un 98 % la actividad del enzima en extractos de aguacate con Co^{2+} 100 μM . Los iones cobalto también se han mostrado efectivos inhibidores de la última etapa de la biosíntesis de etileno en extractos de mesocarpo de

Cucurbita maxima (Hyodo *et al.*, 1993), pétalo de clavel (Nijenhuis-De Vries *et al.*, 1994) y eje embrionario de *Cicer arietinum* (Muñoz-Rueda *et al.*, 1995).

5.7. INHIBICIÓN COMPETITIVA POR ÁCIDO α -AMINOISOBUTÍRICO

Varios investigadores han examinado la influencia de análogos estructurales de ACC, incluyendo ácidos orgánicos de cadena corta, sobre la producción de etileno (Satoh y Esashi, 1980; Apelbaum *et al.*, 1981a; Satoh y Esashi, 1982). El ácido α -

aminoisobutírico (AIB) inhibe de forma competitiva la conversión de ACC en etileno *in vivo* (Satoh y Esashi, 1983). Estos autores, trabajando con segmentos de cotiledones de *Xanthium pennsylvanicum*, han determinado la constante de inhibición para el AIB *in vivo*, obteniendo un valor de 3 mM.

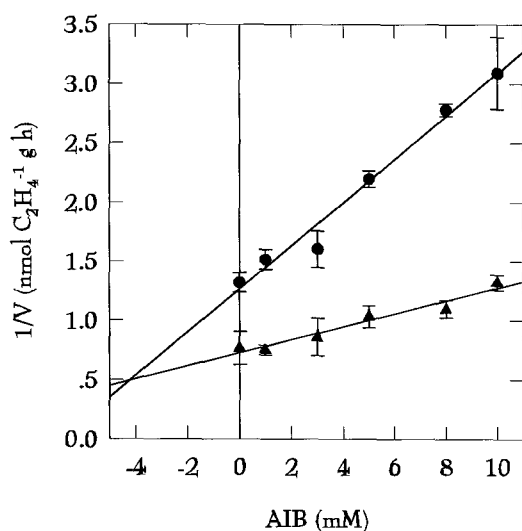


Figura 30. Inhibición competitiva de ACC oxidasa de pera por AIB. El ensayo de actividad se llevó a cabo tal y como se recoge en Materiales y Métodos, con (●) 0.1 mM ACC y (▲) 1 mM ACC (Representación de Dixon).

oxidasa, si bien su poder inhibitorio es débil, ya que su K_i es 4.28 mM, más de 70 veces el valor de la K_m para el ACC (57.5 μ M). Este valor es ligeramente inferior a los encontrados por Fernández-Maculet y Yang (1992) en extractos de manzana ($K_i = 5.7$ mM) y Nijenhuis-De Vries *et al.* (1994) para el enzima de pétalos de clavel ($K_i = 5$ mM), aunque

La Figura 30 muestra el efecto de diferentes concentraciones de AIB sobre la actividad ACC oxidasa extraída de pera. Esta representación de Dixon demuestra que, al igual que *in vivo*, el AIB inhibe competitivamente la actividad ACC

resulta superior a los obtenidos para aguacate, $K_i = 0.3$ mM (McGarvey y Christoffersen, 1992) y eje embrionario de *Cicer arietinum*, $K_i = 0.5$ mM (Muñoz-Rueda *et al.*, 1995). En cualquiera de estos casos, el enzima muestra mayor afinidad por el ACC que por el AIB.

5.8. COMPORTAMIENTO CROMATOGRÁFICO. ESTIMACIÓN DEL PESO MOLECULAR

La preparación enzimática de pera, previamente desalada (Sephadex G-25) fue inyectada en una columna de intercambio aniónico (Mono Q HR 5/5), eluyendo ACC oxidasa como un pico agudo en torno a la fracción 13, que equivale a una concentración de NaCl de 0.125 M (Figura 31). La recuperación de la actividad ha sido alta, alcanzando el 83.3 % de la que exhibía el extracto G-25.

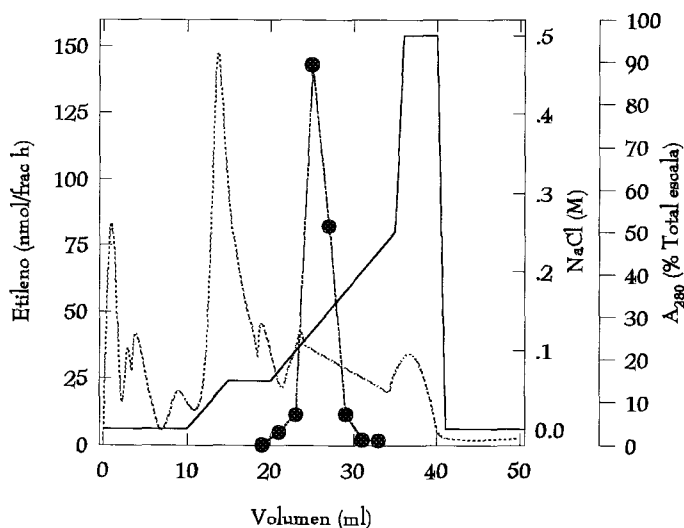


Figura 31 . Cromatografía de intercambio iónico en columna Mono Q. Perfil de elución de ACC oxidasa (●—●), proteína total (A₂₈₀) (-----) y gradiente de NaCl (—).

Las fracciones activas eluidas de la columna Mono Q fueron reunidas y utilizadas para la estimación del peso molecular del enzima mediante cromatografía de exclusión en columna Superose 12 HR 10/30. ACC oxidasa abandona esta columna como un único pico, con un volumen de elución de 14 ml (Figura 32). Este volumen de elución corresponde a un peso molecular de 37900 Da (Figura 33).

Este valor resulta consistente con los obtenidos igualmente por cromatografía de exclusión en extractos de manzana (Dong *et al.*, 1992; Dupille *et al.*, 1993), melón (Smith *et al.*, 1992) y pulpa de plátano (Moya-León y John, 1994), que oscilan entre 39 y 41 kDa. Dupille *et al.* (1993) también han determinado el peso molecular del enzima de manzana mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, obteniendo, de nuevo, un valor de 40 kDa, por lo que han concluido que el enzima se presenta en forma monomérica. Por su parte, Pirrung *et al.* (1993) y Zhang *et*

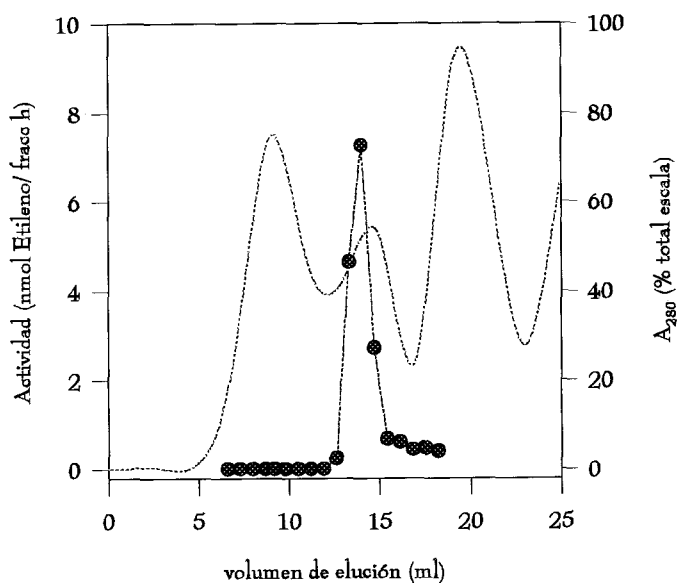


Figura 32. Cromatografía de exclusión en columna Superose 12. Perfiles de elución de ACC oxidasa (●—●) y proteína total (A₂₈₀) (—).

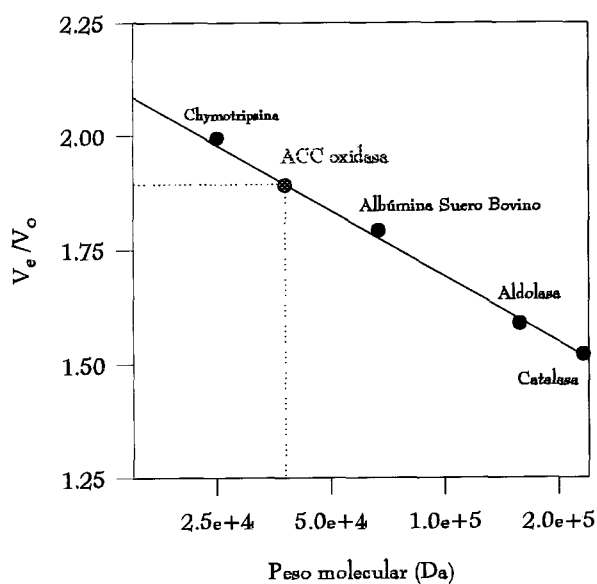


Figura 33. Determinación del peso molecular de ACC oxidasa por cromatografía de exclusión.

al. (1995) han empleado espectrometría de masas “electrospray ionization” para determinar la masa molecular de los enzimas de manzana y tomate, respectivamente, habiendo calculado unos valores de 35332 y 35817 Da.

Estos pesos moleculares coinciden con el registrado para flavonona-3-hidroxilasa, 34 kDa, y el deducido para el polipéptido codificado por pTOM13, 35 kDa (Hamilton *et al.*, 1990), si bien son inferiores a los publicados para diferentes dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, que se mantienen entre 41 y 45 kDa.

ACC oxidasa de pera es una proteína bastante hidrófoba. Una alícuota de la colección de fracciones activas eluidas de la columna Superose 12 fue cromatografiada en

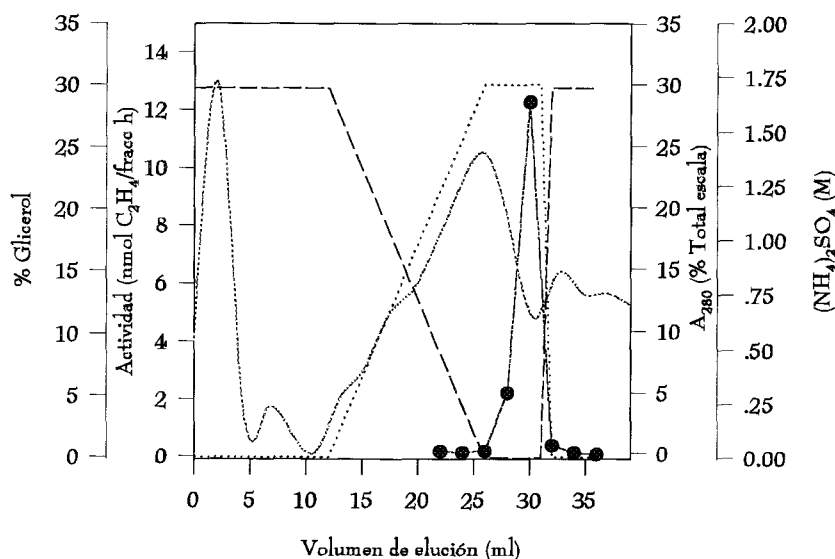


Figura 34. Cromatografía de interacción hidrofóbica en columna Phenyl-Superose. Perfiles de elución de ACC oxidasa (●—●) y proteína total (A_{280}) (.....). Gradientes de glicerol (—) y sulfato amónico (.....).

una columna de interacción hidrofóbica Phenyl-Superose HR 5/5. La mayor parte de las proteínas que acompañaban al enzima eluyeron dentro del gradiente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,

mientras que ACC oxidasa fue recuperada de la columna con medio carente de sulfato amónico (Figura 34).

Dupille *et al.* (1993) y Pirrung *et al.* (1993) han observado el mismo comportamiento durante la purificación del enzima de manzana. Pirrung *et al.* (1993), para explicar este fenómeno, sugirieron que el enzima presenta una hélice anfipática estructurada en torno a los aminoácidos hidrófobos que ACC oxidasa posee cada 4 ó 5 posiciones. Este es el caso de la proteína *ncd*, una proteína segregada por *Drosophila*, que presenta homología con ACC oxidasa, y que es conocida por formar agregados a través de un dominio central hidrofóbico helicoidal (Endow, 1991). Esta característica de ACC oxidasa podría explicar la asociación del enzima con superficies hidrofóbicas.

5.9. EFECTO DE IONES METÁLICOS

5.9.1. Como sustitutos de Fe^{2+}

La Tabla XVI muestra los resultados obtenidos cuando en la mezcla de reacción completa se sustituye el Fe^{2+} por otros cationes divalentes. Puede observarse que Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} y Mg^{2+} carecen de capacidad para generar etileno. Por contra, en presencia de Co^{2+} y Cu^{2+} se genera más etileno que en presencia de Fe^{2+} . Producción de etileno a partir de ACC por vía no enzimática, catalizada por diversos cationes metálicos divalentes, bajo diferentes condiciones, ha sido descrita anteriormente (Yang y Hoffman, 1984). Con vistas a dilucidar la naturaleza del etileno formado se ha realizado un segundo grupo de experiencias, cuyos resultados se recogen en la Tabla XVII. Esta Tabla muestra que Co^{2+} y Cu^{2+} catalizan la producción de etileno por vía no enzimática, pues ésta es independiente de la presencia de extracto en la mezcla de reacción. Estos resultados permiten concluir que ACC oxidasa de pera requiere invariablemente Fe^{2+} como cofactor, ya que ninguno de los cationes metálicos ensayados es capaz de reemplazar al Fe^{2+} en la reacción.

Tabla XVI. Efecto de cationes metálicos divalentes (0.2 mM) como sustitutos de Fe^{2+} en la mezcla de reacción.

Ión en la mezcla de reacción	Etileno nmol/g h
Fe^{2+}	8.38 ± 1.00
Co^{2+}	21.03 ± 2.19
Cu^{2+}	9.39 ± 0.37
Zn^{2+}	0.21 ± 0.11
Mn^{2+}	0.27 ± 0.07
Ni^{2+}	0.25 ± 0.02
Mg^{2+}	0.30 ± 0.13

Tabla XVII. Producción no enzimática de etileno a partir de ACC.

Ión en la mezcla de reacción	Etileno nmol/g h
Fe^{2+}	8.57 ± 1.17
Fe^{2+} (sin extracto)	0.05 ± 0.01
Co^{2+}	21.51 ± 1.86
Co^{2+} (sin extracto)	21.17 ± 1.46
Cu^{2+}	9.60 ± 0.39
Cu^{2+} (sin extracto)	10.54 ± 0.43

Bouzayen *et al.* (1991) en cultivos celulares de tomate comprobaron que la inhibición de EFE por 1,10-fenantrolina sólo podía ser revertida por adición de bajas concentraciones de Fe^{2+} . Igualmente, en células cultivadas en medios carentes de Fe^{2+} , la producción de etileno observada fue muy baja, siendo Fe^{2+} el único catión metálico de los

ensayados capaz de restablecer la actividad de EFE. Por su parte, Smith *et al.* (1992) observaron que concentraciones de Co^{2+} superiores a 20 μM estimulaban la producción de etileno. La carencia de cinética de saturación respecto de la concentración de Co^{2+} y la formación de etileno en ausencia de preparación enzimática, hablan claramente del origen químico del etileno producido. Ni McGarvey y Christoffersen (1992), en extractos de aguacate, ni Zhang *et al.* (1995), con el enzima recombinante de tomate han podido determinar producción alguna de etileno cuando en la mezcla de reacción el Fe^{2+} era sustituido por otros cationes metálicos.

5.9.2. Como inhibidores

La inhibición de la síntesis de etileno por cationes metálicos divalentes ha sido reconocida desde hace 30 años (Lau y Yang, 1976). La Tabla XVIII muestra que Cu^{2+} y Zn^{2+} son tan potentes inhibidores de ACC oxidasa como el Co^{2+} , aboliendo de forma prácticamente total la actividad del enzima, cuando se introducen en el medio de reacción, a una concentración 0.1 mM. A esta misma concentración, Ni^{2+} inhibe la reacción un 71 %, mientras que Mn^{2+} y Mg^{2+} aparecen como represores más débiles, con un 50 y 25 % de inhibición respectivamente.

McGarvey y Christoffersen (1992) trabajando con extractos de aguacate, han obtenido idénticos resultados. Así, Co^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} inhiben poderosamente la actividad del enzima, Mn^{2+} y Ni^{2+} inhiben parcialmente, mientras que Mg^{2+} y V^{4+} tuvieron poco efecto. En extractos de melón (Smith *et al.*, 1992), *Cucurbita maxima* (Hyodo *et al.*, 1993) y eje embrionario de *Cicer arietinum* (Muñoz-Rueda *et al.*, 1995) los iones Co^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} se han mostrado, igualmente, como los inhibidores más enérgicos de la conversión de ACC en etileno. La sensibilidad de ACC oxidasa a iones metálicos divalentes es consistente con el conocido efecto inhibitor de Co^{2+} *in vivo* (Yu y Yang, 1979) y con el efecto inhibitor de estos iones sobre las dioxigenasas en general (Hashimoto y Yamada, 1987; Britsch, 1990). Aunque el mecanismo de inhibición por estos cationes no está demostrado,

Tabla XVIII. Efecto de cationes metálicos divalentes (0.1 mM) como inhibidores de ACC oxidasa.

Mezcla de reacción	Actividad ACC oxidasa nmol C ₂ H ₄ /g h	% inhibición
Completa	8.66 ± 1.30	---
+ Co ²⁺	0.79 ± 0.37	91
+ Cu ²⁺	0.10 ± 0.03	99
+ Zn ²⁺	0.44 ± 0.17	95
+ Mn ²⁺	4.35 ± 0.86	50
+ Ni ²⁺	5.51 ± 0.41	71
+ Mg ²⁺	6.50 ± 1.02	25

se asume que podrían ejercer su acción por bloqueo de grupos SH- esenciales para la actividad del enzima (Yang y Hoffman, 1984).

5.10. ESTUDIO DE OTROS POSIBLES INHIBIDORES

5.10.1. Inhibidores de hemoproteínas

El hallazgo de Bouzayen *et al.* (1991) de que el ion Fe²⁺ era esencial para la actividad EFE *in vivo*, cuestionó la naturaleza molecular del enzima. Pirrung *et al.* (1993) han encontrado varios enzimas homólogos a ACC oxidasa en los que el hierro no forma parte de un grupo hemo. La comprobación de que ACC oxidasa no es una hemoproteína puede obtenerse también observando el efecto que sobre su actividad ejercen compuestos inhibidores de enzimas con grupo hemo. En esta Memoria, hemos estudiado dos de ellos: la fenilhidrazina y el 2-metil-1,2-di-3-piridil-1-propanona (MDPP). La Tabla XIX muestra que la reacción catalizada por ACC oxidasa de pera no es significativamente inhibida por estos compuestos, a concentraciones tan altas como 1 mM. Idénticos resultados han sido

presentados por Dupille *et al.* (1993) para el enzima purificado de manzana. Estos datos, junto con la dependencia de Fe^{2+} y la extrema labilidad de ACC oxidasa, son consistentes con la hipótesis de que el enzima no es una hemoproteína del tipo de la citocromo P450-oxidasa (Ortiz de Montellano y Reich, 1986).

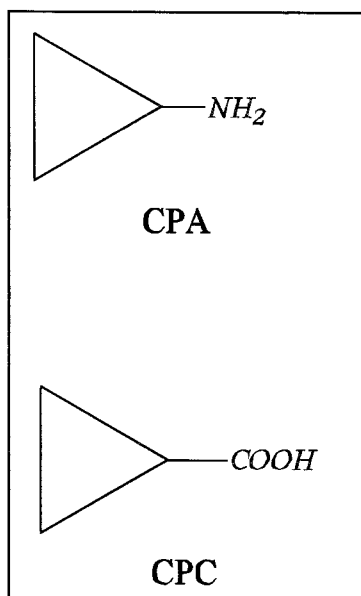
Tabla XIX. Efecto de inhibidores de hemoproteínas.

Mezcla de reacción	Actividad ACC oxidasa	
	nmol $\text{C}_2\text{H}_4/\text{g h}$	%
Completa	9.52 ± 0.43	100
Fenilhidrazina 0.5 mM	9.71 ± 0.47	102
“ 1.0 mM	9.31 ± 0.39	98
MDPP 0.5 mM	9.18 ± 0.72	96
“ 1.0 mM	8.18 ± 0.29	86

5.10.2. Análogos estructurales de ACC

Frecuentemente se ha recurrido al empleo de análogos estructurales de sustratos como inhibidores competitivos de reacciones enzimáticas y así obtener evidencias respecto de los grupos funcionales o porciones de la molécula de sustrato que resultan esenciales para la actividad del enzima.

Después de haber considerado la inhibición competitiva por AIB, dirigimos nuestra atención a la ciclopropilamina (CPA) y el ácido ciclopropanocarboxílico (CPC). El estudio de estos análogos estructurales se ha llevado a cabo con una doble finalidad: determinar su aptitud como sustratos de ACC oxidasa y evaluar sus efectos como posibles inhibidores competitivos frente a ACC.



Los resultados obtenidos *in vivo* (Tabla XX) muestran que CPA Y CPC no son sustratos de ACC oxidasa, ya que sólo se produce etileno al incubar los tejidos de pericarpio de pera con ACC. Cuando los tejidos se incuban con CPC no se obtienen niveles detectables de etileno, indicando que este compuesto no sólo no es sustrato del enzima sino que elimina la producción de etileno a partir del ACC endógeno. Así mismo, la Tabla XX expone que cuando las secciones de tejido se incuban con CPA ó CPC en presencia de ACC exógeno, hay inhibición de la síntesis de etileno. CPA 10 mM reprime débilmente la reacción (14 %), mientras que CPC se

muestra como un potente inhibidor (99 %) a la misma concentración.

Tabla XX. Efecto de análogos estructurales de ACC sobre la actividad ACC oxidasa *in vivo*. La incubación contiene 10 secciones de pericarpio de pera (aprox. 0.5 g), manitol 0.4 mM y ACC, CPA ó CPC (1 mM) según se indica.

Incubación de tejido con:	Actividad ACC oxidasa	
	nmol C ₂ H ₄ /g h	% Actividad
ACC	5.11 ± 0.27	100
CPA	0.09 ± 0.00	2
CPC	N.D.	N.D.
---	0.11 ± 0.02	2
ACC + CPA	4.41 ± 0.59	86
ACC + CPC	0.07 ± 0.04	1

Satoh y Esashi (1980) observaron que CPA, CPC, ciclopropilmetanol y ciclopropilmetil-amina resultaban inefectivos como sustratos del enzima formador de etileno en *Xanthium pennsylvanicum*, llegando a la conclusión de que la presencia simultánea de los grupos amino y carboxilo en el carbono α era esencial para la acción catalítica. De igual

modo, Apelbaum y cols. (1981a) estudiaron los efectos de diversos derivados de ciclopropano, comprobando que, de los compuestos ensayados, sólo CPC y 2,2-dicloro-3-dimetil-ciclopropano-1-carboxílico inhibían la formación de etileno. Estos compuestos, a concentraciones 1 mM, inhibieron el 40 y el 26 % respectivamente en tejidos de manzana, y el 38 y 20 % en *Phaseolus vulgaris*.

Los ensayos llevados a cabo *in vitro* con extractos de pera (Tabla XXI) revelan igualmente la incapacidad de CPA y CPC para sustituir a ACC como sustratos de ACC oxidasa. Al igual que ocurre con los ensayos *in vivo*, ciclopropilamina inhibe débilmente la reacción de conversión de ACC en etileno (17 %). Sin embargo, el ácido ciclopropanocarboxílico que *in vivo* se mostró como un muy poderoso inhibidor de ACC oxidasa, ahora aparece con una efectividad similar a CPA, pues sólo reprime un 15 % la producción enzimática de etileno. La menor inhibición de CPC *in vitro* nos sugiere que el efecto de este compuesto sobre la producción de etileno dependiente de ACC *in vivo*

Tabla XXI. Efecto de los análogos estructurales CPA y CPC sobre la actividad ACC oxidasa *in vitro*.

Mezcla de reacción	Actividad ACC oxidasa	
	nmol C ₂ H ₄ /g h	%
Completa	16.40 ± 1.06	100
- ACC + CPA	N.D.	N.D.
- ACC + CPC	N.D.	N.D.
+ CPA	13.67 ± 1.26	83
+ CPC	13.91 ± 0.73	85

puede ser mixto. Así, además de unirse al enzima originando un complejo catalíticamente inactivo, el ácido ciclopropanocarboxílico podría bloquear el transporte del ACC hasta el compartimento celular en el que se produce su conversión en etileno. Esta misma línea

argumental fue sostenida por Satoh y Esashi (1980) para explicar la inesperada inhibición no competitiva del enzima de *Xanthium pennsylvanicum* por AIB *in vivo*.

5.10.3. Sensibilidad a inhibidores de la biosíntesis de etileno *in vivo*

Como hemos comentado repetidamente, durante 30 años la caracterización del sistema productor de etileno sólo ha podido ser considerada a nivel de tejidos. La pérdida de actividad al homogeneizar los tejidos se interpretó como indicación de que el mantenimiento de la integridad de las membranas era esencial para la actividad EFE. Por ello, aunque no han existido evidencias, se ha apoyado con fuerza la existencia de una asociación del enzima con las membranas celulares. La evolución de estos hechos explica el por qué algunas familias de compuestos han sido históricamente implicadas en la biosíntesis de etileno.

5.10.3.1. Desacopladores de la fosforilación oxidativa

Los desacopladores de la fosforilación oxidativa, tales como 2,4-dinitrofenol (DNP) y la *m*-clorofenilhidrazona del cianuro de carbonilo (CCCP), son potentes inhibidores de la producción de etileno *in vivo* (Yu *et al.*, 1980; Apelbaum *et al.*, 1981a). Aunque se requiere ATP en el primer paso de la ruta biosintética de la hormona, el principal proceso afectado por estos inhibidores es la conversión de ACC en etileno. Bajas concentraciones de DNP inhiben la acción catalítica del enzima formador de etileno sin afectar la síntesis de SAM a partir de metionina (Yu *et al.*, 1980). Aunque el mecanismo del proceso de inhibición no está claro, se ha sugerido que estos compuestos podrían alterar la estructura de las membranas, cuya integridad parecía esencial para la actividad EFE (John, 1983; Lieberman, 1979; Yu *et al.*, 1980).

La Tabla XXII recoge la influencia que el DNP y el CCCP ejercen sobre la actividad ACC oxidasa extraída de pera. El enzima sólo resulta inhibido *in vitro* por CCCP a concentración 1 mM (68 %). La insensibilidad que la preparación enzimática muestra respecto de estos compuestos está en marcado contraste con la aparente sensibilidad *in vivo*. Smith *et al.* (1992) han observado que CCCP 1 mM no inhibe la actividad ACC oxidasa parcialmente purificada de melón, mientras que DNP 1 mM inhibió la actividad del enzima un 60 %. Estos autores atribuyen la inhibición por alta concentración de DNP al efecto nocivo que derivados fenólicos ejercen sobre una amplia gama de enzimas solubles, sin que tenga relación con su actividad protonófora en las membranas. Muñoz-

Tabla XXII. Efecto de inhibidores de la biosíntesis de etileno *in vivo* sobre la actividad ACC oxidasa *in vitro* (I).

Inhibidor	Actividad ACC oxidasa	
	nmol C ₂ H ₄ /g h	%
Control	12.94 ± 1.04	100
DNP	0.1 mM	14.77 ± 0.12
	1.0 mM	12.37 ± 0.23
CCCP	0.1 mM	13.26 ± 0.54
	1.0 mM	4.14 ± 0.45
Galato de <i>n</i> -propilo	0.5 mM	0.10 ± 0.02
	3.0 mM	0.14 ± 0.02
Benzoato sódico	0.1 mM	11.55 ± 0.64
	1.0 mM	13.04 ± 1.69
EDTA	0.5 mM	0.14 ± 0.00
	5.0 mM	0.14 ± 0.03
1,2-DHN	0.01 mM	8.02 ± 0.27
	0.10 mM	2.29 ± 0.23
	1.00 mM	0.13 ± 0.01

Rueda *et al.* (1995) han mostrado que el extracto enzimático de ejes embrionarios de *Cicer arietinum* resulta inhibido por DNP y CCCP. A concentraciones 0.1 mM, ambos compuestos producen una represión de la actividad próxima al 25 %, mientras que a 1 mM, el DNP inhibe un 45 % y el CCCP un 79 %.

5.10.3.2. Secuestradores de Radicales Libres

Los secuestradores de radicales libres, tales como el galato de *n*-propilo (PG) o el benzoato sódico (BS), son otro grupo de compuestos conocidos por inhibir la producción de etileno en secciones de frutos, flores y tejidos vegetativos (Apelbaum *et al.*, 1981a; Baker *et al.*, 1977; Baker *et al.*, 1978), habiéndose determinado que la etapa sensible es la conversión de ACC en etileno (Apelbaum *et al.*, 1981a; Konze *et al.*, 1980). Esta inhibición es consistente con el requerimiento de oxígeno en este paso y la implicación de radicales libres en los distintos sistemas modelo generadores de etileno que se han descrito (Yang y Hoffman, 1984). No obstante, su acción no es muy específica y se requieren concentraciones relativamente elevadas para apreciar su efecto. Por ello, Apelbaum *et al.* (1981a) han sugerido que la inhibición de la síntesis de etileno por benzoato sódico puede estar enmarcada dentro de una represión generalizada del metabolismo.

La Tabla XXII muestra los resultados obtenidos con galato de *n*-propilo y benzoato sódico. ACC oxidasa extraída de pera es sensible a PG, una concentración 0.5 mM inhibe totalmente su actividad. Por contra, BS a las concentraciones ensayadas, resulta inefectivo. Al igual que en pera, el PG aparece como un potente inhibidor del enzima extraído de melón (Smith *et al.*, 1992) y eje embrionario de *Cicer arietinum* (Muñoz-Rueda *et al.*, 1995). Sin embargo, benzoato sódico ejerce una ligera inhibición del enzima de garbanzo, 20 % a 1.0 mM (Muñoz-Rueda *et al.*, 1995).

5.10.3.3. Quelantes de Hierro (II)

El enzima formador de etileno se ve fuertemente afectado por la presencia de agentes acomplejantes de metales (Lieberman *et al.*, 1966; Apelbaum *et al.*, 1981a). Konze y Kende (1979) han indicado que EDTA es un potente inhibidor de la producción de etileno dependiente de ACC *in vivo*. Más recientemente, Bouzayen *et al.* (1991) han puesto de manifiesto que 1,10-fenantrolina inhibe fuertemente la actividad formadora de etileno en cultivos celulares de tomate.

Smith *et al.* (1992) comprobaron una fuerte represión de la actividad ACC oxidasa extraída de melón por 1,2-dihidroxinaftaleno, un análogo a 2-oxoglutarato. Puesto que esta inhibición no fue revertida por excesos de 2-oxoglutarato y sí por adición de un exceso molar de Fe^{2+} , Smith *et al.* (1992) sugirieron que, como en el caso de propil-4-hidroxilasa (una dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato), el mecanismo de acción del 1,2-dihidroxinaftaleno puede estar relacionado con su habilidad para unirse al hierro en el sitio activo del enzima.

En nuestro caso, ACC oxidasa extraída de pera resulta inhibida un 99 % por incubación con EDTA 0.5 mM (Tabla XXII). Así mismo, la adición de 1,2-dihidroxinaftaleno 0.1 mM al medio de reacción, provoca la inhibición de la actividad del enzima en un 82 %. ACC oxidasa de pera es más sensible a EDTA que el enzima de otros tejidos vegetales. Así, Smith *et al.* (1992) con extractos de melón y Muñoz-Rueda *et al.* (1995) con el enzima extraído de *Cicer arietinum*, han precisado una concentración de EDTA 5 mM para bloquear totalmente la actividad ACC oxidasa.

5.10.3.4. Reactivos de grupos -SH y ácido salicílico

La actividad EFE ensayada *in vivo* es sensible a reactivos de grupos -SH, tales como *p*-cloromercurifenilsulfonato (PCMFS), N-etilmaleimida (Yu y Yang, 1979) y 2,4,6-

trinitrobenzensulfonato (TNBS) (Dupille *et al.* datos no publicados), y al ácido salicílico (Leslie y Romani, 1986). Yu y Yang (1979) indicaron que los grupos sulfhidrilos del enzima formador de etileno son esenciales para la manifestación de su actividad.

El enzima extraído de pera, se ve igualmente afectado por estos compuestos (Tabla XXIII), confirmandose la importancia de los grupos -SH para la actividad ACC oxidasa. Resultados similares fueron obtenidos con el enzima extraído de melón (Smith *et al.*, 1992), de *Cucurbita maxima* (Hyodo *et al.*, 1993) y de ejes embrionarios de *Cicer arietinum* (Muñoz-Rueda *et al.*, 1995). De los reactivos -SH ensayados, la N-etilmaleimida parece el inhibidor más débil, tanto para el enzima extraído de pera como de otros tejidos (Smith *et al.*, 1992; Muñoz-Rueda *et al.*, 1995). La inhibición de la actividad ACC oxidasa de pera por el ácido salicílico (Tabla XXIII) puede explicarse bien por su capacidad como secuestrador de radicales libres, bien por su habilidad para originar complejos de coordinación con diversos cationes metálicos (Leslie y Romani, 1988).

Tabla XXIII. Efecto de inhibidores de la biosíntesis de etileno in vivo sobre la actividad ACC oxidasa in vitro (II).

Inhibidor		Actividad ACC oxidasa	
		nmol C ₂ H ₄ /g h	%
Control		16.28 ± 1.22	100
PCMFS	0.1 mM	5.49 ± 0.57	34
	1.0 mM	2.63 ± 0.06	16
N-etilmaleimida	0.1 mM	11.72 ± 1.02	72
	1.0 mM	5.92 ± 0.57	34
TNBS	0.5 mM	4.73 ± 0.12	29
	5.0 mM	0.30 ± 0.05	2
Ac. salicílico	1.0 mM	3.78 ± 0.14	23
	5.0 mM	1.63 ± 0.12	10
Cicloheximida	0.01 mM	14.50 ± 0.66	89
	0.10 mM	13.51 ± 0.30	83

5.10.3.5. Inhibidores de la síntesis de proteínas

La cicloheximida (CHI) aplicada a concentraciones relativamente bajas inhibe la actividad EFE en tejidos vegetales (Yu *et al.*, 1979). Sin embargo, una concentración similar de cicloheximida no tiene efecto significativo sobre la actividad ACC oxidasa extraída de pera (Tabla XXIII). Así, una concentración de CHI 100 μ M sólo produce una inhibición del 17 %. Smith *et al.* (1992) han obtenido resultados similares con el enzima extraído de melón, y concluyen que la inhibición por cicloheximida observada *in vivo* (Yu *et al.*, 1979) es indirecta. Además de inhibir la síntesis proteica, la CHI puede afectar otros procesos, tales como la transferencia de energía (Ellis y MacDonald, 1970) o interferir con el metabolismo nucleótido (McMahon, 1975)

5.11. EFECTO DE AUXINA Y PCIB

El ácido α -*p*-clorofenoxiisobutírico (PCIB) es una sustancia con propiedades antiauxina que ha sido ampliamente empleada para demostrar el papel de las auxinas endógenas en procesos del desarrollo de las plantas y su implicación en la regulación de la producción de etileno (Trebitch y Riov, 1987). Entre otros aspectos, PCIB inhibe la evolución de etileno en peras Barlett (Frenkel y Haard, 1973), la síntesis de etileno inducida por auxina en hipocotilos de *Phaseolus vulgaris* (Odawara *et al.*, 1977; Tsai y Arteca, 1984), y la conversión de ACC exógeno en etileno por hipocotilos de *Phaseolus* y tejidos de manzana (Trebitch y Riov, 1987).

Está bien documentado que la auxina (AIA) estimula la producción de etileno al inducir la actividad ACC sintasa (Yang y Hoffman, 1984), habiéndose sugerido que las auxinas podrían también jugar un papel en la modulación de la actividad EFE (John, 1983; Balagué y Pech, 1985).

Tabla XXIV. Inhibición de la actividad ACC oxidasa en secciones de pera por PCIB. La actividad se ensayó como se indica en Materiales y Métodos, con la adición de 0.5 y 1.0 mM PCIB.

Incubación	Actividad ACC oxidasa	
	nmol C ₂ H ₄ /g h	%
Control	6.88 ± 0.90	100
0.5 mM PCIB	2.61 ± 0.77	38
1.0 mM PCIB	1.28 ± 0.25	19

En la Tabla XXIV se recoge el efecto del PCIB sobre la actividad ACC oxidasa *in vivo* en tejidos de pera. PCIB inhibe la conversión de ACC exógeno en etileno. Una concentración de PCIB 0.5 mM produce una inhibición del 60 %, mientras que 1 mM inhibe casi totalmente.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Trebitsh y Riov (1987) con el EFE de hipocotilos de *Phaseolus* (75 % de inhibición con 0.5 mM PCIB) y de piel de manzana (70 % de inhibición con 1 mM PCIB). Debido a las propiedades antiauxina del PCIB y a que entonces el EFE sólo podía medirse *in vivo*, los resultados fueron interpretados por estos autores indicando que las auxinas también podían regular la actividad EFE.

Por ello, ensayamos el efecto de la auxina y PCIB sobre la actividad ACC oxidasa extraída de frutos de pera. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla XXV. Como puede verse, ni AIA ni PCIB tienen efecto alguno sobre la actividad del enzima *in vitro*. Estos resultados indicarían que las auxinas no parecen estar implicadas en la regulación de la actividad ACC oxidasa y que el efecto inhibitor del PCIB *in vivo* no se debe a su acción antiauxina.

Recientemente, Dong *et al.* (1992) han observado que ACC oxidasa purificada de manzana presenta una baja actividad específica (20 nmol/ mg prot min). Además de su

Tabla XXV. Efecto de auxina y PCIB sobre la actividad ACC oxidasa *in vitro* de pera. La actividad de ensayo tal y como se indica en Materiales y Métodos, con la adición de AIA ó PCIB, a las concentraciones indicadas. El extracto utilizado en estos ensayos ha sido pasado por una columna de Sephadex G-25 (PD10).

Incubación	Actividad ACC oxidasa	
	nmol C ₂ H ₄ /g h	%
Control	6.81 ± 1.07	100
AIA 0.5 mM	6.59 ± 0.26	97
1.0 mM	7.14 ± 0.69	105
PCIB 0.5 mM	7.12 ± 0.40	105
1.0 mM	6.75 ± 0.65	99

bajo poder catalítico, podrían considerarse otras dos explicaciones para este hecho: la inactivación del enzima durante la purificación y/o que el enzima no estuviere siendo ensayado en condiciones óptimas, por lo que Dong *et al.* (1992) sugirieron que era bastante posible que ACC oxidasa pudiera requerir otro cofactor, aún no identificado, para una máxima actividad. Si así fuera y, a la vista de nuestros resultados, podríamos descartar las auxinas como candidatas a cofactores para ACC oxidasa.

De estudios sobre el efecto estimulador del Tidiazurón en la producción de etileno, Yip y Yang (1986) concluyen que el PCIB no parece ser un inhibidor específico de la producción de etileno mediada por auxina. Varios fenoxiácidos, incluyendo algunos que poseen actividad auxínica, también inhiben la actividad EFE de hipocotilos de *Phaseolus*, apuntando que esta inhibición no está probablemente relacionada con sus propiedades antiauxina.

La falta de inhibición del PCIB sobre la actividad ACC oxidasa *in vitro* (Tabla XXV), demuestra que este compuesto no ejerce su acción directamente sobre el enzima. Por ello, el efecto inhibitorio observado *in vivo* revelaría un mecanismo indirecto. Odawara *et al.* (1977) concluyen que la inhibición de la producción de etileno inducida por auxina que ejerce PCIB en segmentos de *Phaseolus vulgaris*, viene originada por los cambios estructurales que una sustancia lipofílica como el PCIB causa en las membranas celulares. Así, este efecto sólo podría observarse *in vivo*, donde la alteración del entorno ambiental del enzima, puede resultar nocivo para su actividad.

Por ello, e independientemente del mecanismo de inhibición de la actividad ACC oxidasa *in vivo* por PCIB, todos los estudios que hacen uso del PCIB para demostrar la participación de las auxinas en diferentes procesos fisiológicos, y particularmente aquellos en los que el etileno está implicado, deberían considerarse con cautela.

6

INDUCCION DE ACC OXIDASA POR
ETILENO

La capacidad del etileno para regular su propia biosíntesis, tanto positiva como negativamente, ha sido largamente reconocida (Yang y Hoffman, 1984). Diversos estudios con secciones de frutos de melón (Hoffman y Yang, 1982), hojas y piel de limón (Riov y Yang, 1982 a y b), frutos preclimáticos de melón y tomate (Liu *et al.*, 1985a), y discos de piel de manzana (Bufler, 1986), han puesto de manifiesto que el etileno está estrechamente relacionado con la inducción de ACC oxidasa. Posteriormente, se ha observado inducción por etileno exógeno de la actividad ACC oxidasa extraída de manzana preclimática (Fernández-Maculet y Yang, 1992) y de mesocarpo de Cucurbita maxima (Hyodo *et al.*, 1993).

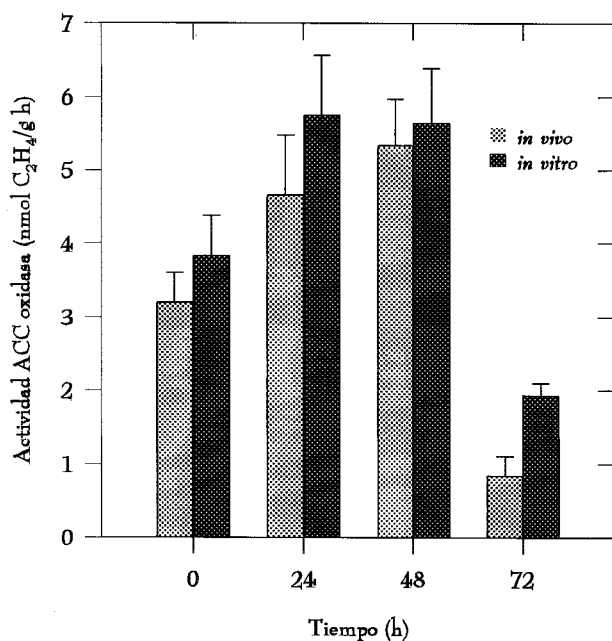


Figura 35. Actividades ACC oxidasa *in vivo* e *in vitro* de frutos de pera tratados con etileno exógeno (90 µl/l).

En nuestros ensayos, hemos tratado frutos de pera con etileno exógeno (90 µl/l) durante 72 horas, estudiando la evolución de la actividad ACC oxidasa *in vivo* e *in vitro*, a lo largo de este periodo. La Figura 35 muestra que el tratamiento con etileno exógeno de los frutos durante 24 ó 48 horas provoca un incremento de la actividad ACC oxidasa *in vivo*, que viene asociado a un incremento paralelo de la actividad recuperada *in vitro*. Si

se prolonga la exposición de los frutos al etileno hasta las 72 horas, se observa una supresión de la inducción del enzima *in vivo*, que va acompañada de una disminución en la actividad del enzima extraído. Estos datos proporcionan evidencia adicional de la autenticidad del enzima extraído, y confirman el efecto regulador del etileno sobre la actividad ACC oxidasa.

Riov y Yang (1982a) también observaron que, como consecuencia de la incubación de secciones de hojas de limonero con etileno exógeno, se produce una progresiva acumulación de ACC en los tejidos, a la vez que se registra una disminución de la velocidad de producción de etileno a partir de las 72 horas. Estos datos indican que el tratamiento prolongado con etileno origina la represión de la actividad ACC oxidasa *in vivo*, que pasa a constituirse en la etapa limitante de la velocidad del proceso. La inducción y posterior inhibición de la actividad ACC oxidasa por etileno exógeno, en función de la duración del tratamiento, han sido también observadas recientemente con el enzima extraído de mesocarpo lesionado de *Cucurbita maxima* (Hyodo *et al.*, 1993).

7

INACTIVACION DE ACC OXIDASA

7.1. PÉRDIDA DE LINEALIDAD IN VITRO

En la Figura 18 se mostró la evolución con el tiempo de la acumulación de etileno durante un típico ensayo de actividad ACC oxidasa *in vitro*. En esta figura vimos cómo la linealidad se pierde a partir de los 50 minutos de incubación y cómo tras 2 horas de reacción no hay mayor producción de etileno. La falta de linealidad observada demuestra claramente el declive de la actividad durante la incubación.

Esta depresión de la actividad del enzima no es debida a la limitación de los sustratos o cofactores durante la reacción, puesto que la producción de etileno se muestra directamente proporcional a la cantidad de extracto añadido al medio de reacción (Figura 19). Una similar pérdida de actividad con el tiempo se ha observado con el enzima extraído de melón (Smith *et al.*, 1992), manzana (Poneleit y Dilley, 1993), pétalos de clavel (Nijenhuis-De Vries *et al.*, 1994), tomate (Smith *et al.*, 1994) y pulpa de banana (Moya-León y John, 1994).

7.2. EFECTO DE LA CATALASA

Una evolución con el tiempo no lineal se ha observado igualmente con muchas otras dioxigenasas (Abbott y Udenfriend, 1974; Hashimoto y Yamada, 1986; Perry *et al.*, 1988). La catalasa se ha venido utilizando para estabilizar las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (Abbott y Udenfriend, 1974). Aunque ACC oxidasa no requiere 2-oxoglutarato, hemos ensayado el efecto de la adición de varias concentraciones de catalasa al medio de reacción (Figura 36).

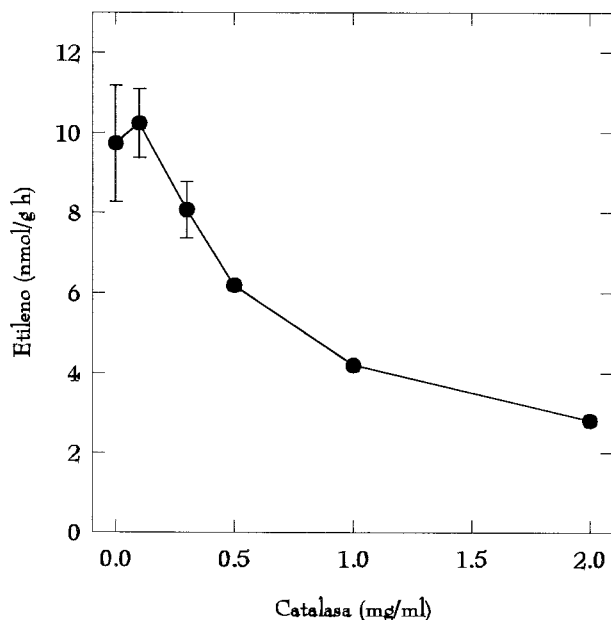


Figura 36. Inhibición de la actividad ACC oxidasa por catalasa. La actividad se ensayó como se indica en Materiales y Métodos, añadiendo catalasa a las concentraciones indicadas.

sin embargo, no tuvo efecto sobre la actividad del enzima no purificado de extractos de melón, posiblemente debido a la presencia de catalasa endógena (Smith *et al.*, 1992). Este efecto estimulador de la catalasa (Smith *et al.*, 1994) no se ha observado en ninguna otra ACC oxidasa.

7.3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA RESIDUAL

En ensayos previos hemos comprobado que la inactivación observada en nuestros experimentos no se debe a limitación de los sustratos o cofactores durante el curso de la reacción. La inclusión de Fe^{2+} en una mezcla de reacción conteniendo ascorbato, conduce a un significativo consumo de oxígeno, debido a la autooxidación del ascorbato (Martell,

Los resultados obtenidos indican claramente que la inclusión de catalasa en el medio de reacción inhibe la actividad del enzima. Resultados similares se han obtenido empleando una preparación enzimática de la que se han eliminado los compuestos de bajo peso molecular por cromatografía de exclusión en una columna de Sephadex G-25 (PD10). Smith *et al.* (1994) han observado una estimulación de la actividad ACC oxidasa purificada de tomate por la inclusión de catalasa en la mezcla de reacción. La catalasa,

1982; Smith *et al.*, 1990). Para constatar que el declive en la velocidad de reacción no se debe a falta de O_2 , limitando así la actividad del enzima, hemos aireado el medio de reacción después de un periodo de catálisis, pero este tratamiento no evitó la caída de la velocidad de reacción. Igualmente, la readición de ACC y cofactores (Fe^{2+} , ascorbato y CO_2) al medio, transcurrido un periodo de tiempo, no restableció la actividad original.

Se ha determinado la actividad enzimática residual a distintos tiempos a lo largo del curso de la reacción (Figura 37 A). Los resultados corroboran que el enzima pierde actividad a medida que avanza la reacción. Una representación del logaritmo de la actividad enzimática residual frente al tiempo (Figura 37 B) da una línea recta que permite calcular la vida media de la actividad del enzima durante la catálisis, que rinde un valor de 47 min.

Smith *et al.* (1994) cifraron en 14 minutos la vida media del enzima purificado de tomate, mientras que Pirrung *et al.* (1993) la estiman en 2 horas aproximadamente para la ACC oxidasa de manzana.

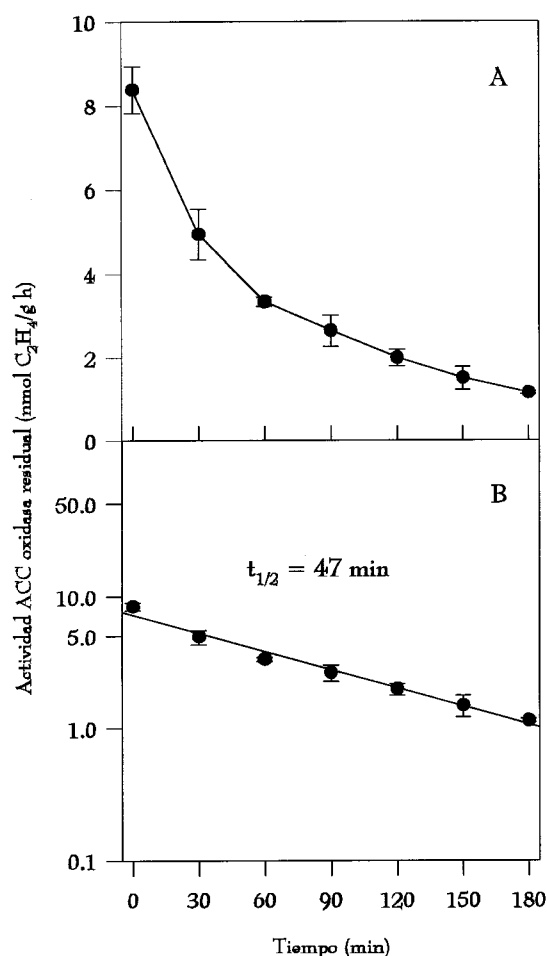


Figura 37. Actividad enzimática residual. A) Evolución de la actividad ACC oxidasa residual durante la reacción. B) Representación del logaritmo de la actividad en función del tiempo.

7.4. POSIBLES CAUSAS DE LA INACTIVACIÓN

Una vez determinado que ACC oxidasa de pera se inactiva durante el transcurso de la reacción, hemos estudiado las posibles causas de esta inactivación. Para ello, se ha utilizado una preparación enzimática obtenida según el protocolo presentado en Materiales y Métodos, que se somete a cromatografía en una columna de Sephadex G-25 (PD10), eluyendose el enzima con tampón de resuspensión desprovisto de ascorbato y DTT, para eliminar estos compuestos del extracto resultante.

Se ha comprobado que la inactivación no se debe a inhibición de ACC oxidasa por compuestos de bajo peso molecular presentes en el extracto, ya que el paso de la preparación enzimática a través de una columna de Sephadex G-25 no modificó la actividad enzimática residual respecto del extracto original.

En una segunda etapa, la preparación enzimática se ha sometido a distintos tratamientos de preincubación (30 min), determinandose posteriormente la actividad enzimática residual (Tabla XXVI). Como puede verse en esta Tabla, la inactivación

Preincubación	Actividad ACC oxidasa	
	nmol C ₂ H ₄ /g h	%
sin preincubar	3.14 ± 0.20	100
sin adiciones	1.83 ± 0.08	58
BSA	2.35 ± 0.05	75
BSA + Ascorbato	1.60 ± 0.15	51
BSA + mezcla completa	0.97 ± 0.12	31

Tabla XXVI. Efecto de la preincubación del enzima en presencia de BSA, ascorbato y la mezcla de reacción completa sobre la actividad ACC oxidasa de pera. El enzima se preincubó durante 30 min con las adiciones indicadas, a las concentraciones 1mM BSA, 0.2 mM SO₄Fe, 10 mM ascorbato, 1 mM ACC y 14 % CO₂. La actividad se ensayó posteriormente, añadiendo los cofactores y sustratos requeridos, si estos no estaban presentes en la preincubación.

observada en nuestras experiencias se debe parcialmente a inestabilidad del enzima por incubación a 28 °C. La preincubación del enzima con tampón de actividad durante 30 min a 28 °C redujo la actividad residual al 58 %. Esta pérdida de actividad fue parcialmente prevenida por la adición de BSA (1 mg/ml) durante la preincubación, indicando que parte de la inactivación era debida a la incubación del enzima a baja concentración de proteínas. La Tabla XXVI también muestra que la preincubación del enzima en presencia de BSA y ascorbato reduce la actividad del enzima al 51 %. La inactivación enzimática por ascorbato es dependiente del tiempo de preincubación (Figura 38). Finalmente, la preincubación del enzima en presencia de BSA y la mezcla de reacción completa redujo la actividad residual al 31 % (Tabla XXVI).

Los resultados presentados muestran que ACC oxidasa de pera se inactiva por preincubación con ascorbato y que la inactivación es mayor cuando el enzima se preincuba con todos los sustratos y cofactores requeridos para la catálisis enzimática.

La pérdida de actividad inducida por incubación del enzima con todos los sustratos y cofactores, no pudo ser revertida por el paso posterior a través de una columna de Sephadex G-25 (Tabla XXVII). Esto indica que la acumulación de algún compuesto de bajo peso molecular generado durante la reacción enzimática no es el responsable de la inactivación catalítica observada.

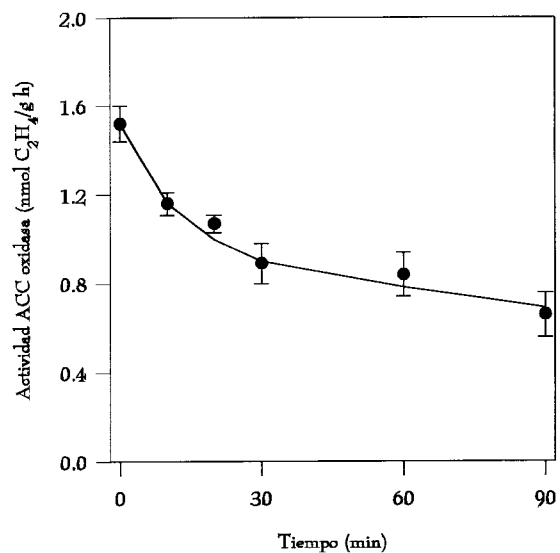


Figura 38. Dependencia del tiempo de la inactivación de ACC oxidasa por preincubación con 10 mM ascorbato. El enzima se preincubó con 10 mM ascorbato y 1 mg/ml de BSA, como se indica en Materiales y Métodos. La actividad se ensayó después de la adición de 0.2 mM SO_4Fe , 1mM ACC y 14 % CO_2 .

Tabla XXVII. La inactivación de pera no se revierte por cromatografía de exclusión (Sephadex G-25). El enzima se preincubó durante 1 h en presencia de 1 mg/ml BSA, 0.2 mM SO_4Fe , 10 mM ascorbato, 1 mM ACC y 14 % CO_2 . La actividad se ensayó posteriormente, antes y después del paso de la mezcla por Sephadex G-25, añadiéndose los sustratos y cofactores requeridos si estos no estaban presentes en la preincubación o si habían sido separados por Sephadex G-25.

Tratamiento	Actividad ACC oxidasa (nmol C_2H_4/g h)	
	antes Sephadex	después Sephadex
sin preincubar	5.38 ± 0.36	4.95 ± 0.33
BSA + Fe^{2+} + ascorbato + ACC + CO_2	1.27 ± 0.04	0.66 ± 0.10

Smith *et al.* (1994) han investigado igualmente las causas de la pérdida de linealidad durante la catálisis de ACC oxidasa con el enzima purificado de tomate. Estos autores han revelado que el declive de la actividad enzimática no se debe a los productos finales de la reacción, aunque requiere catálisis activa. Una segunda y distinta inactivación dependiente de ascorbato, que es independiente de la catálisis enzimática, ha sido igualmente identificada por estos autores.

7.5. PREINCUBACIÓN CON ETILENO

Además del etileno, los principales productos de la reacción catalizada por ACC oxidasa son el ácido dehidroascórbico (DHA) y el cianuro (Dong *et al.*, 1992). Sobre la base de que la pérdida de actividad durante el ensayo podía ser el resultado de la acumulación de productos finales inhibidores, Smith *et al.* (1994) estudiaron la toxicidad de la ACC oxidasa purificada de tomate por ácido dehidroascórbico y cianuro, eliminando la posibilidad de que la inactivación observada se deba a inhibición por estos compuestos.

A la vista de estos resultados, nosotros decidimos estudiar la posible inactivación de ACC oxidasa de pera por etileno. Para ello, determinamos la actividad del enzima tras

preincubación del extracto, durante 30 min, con una concentración de etileno semejante a la producida por la mezcla de reacción completa. Los resultados se recogen en la Tabla XXVIII. Se pone de manifiesto que el etileno producido en la catálisis enzimática no es el causante de la inactivación observada.

Tabla XXVIII. Efecto de la preincubación de ACC oxidasa con etileno sobre la posterior actividad ACC oxidasa. El extracto se preincubó según se indica con 6 nmol de etileno, 0.2 mM SO_4Fe , 10 mM ascorbato, 1 mM ACC y 14 % CO_2 . En todos los casos el medio de preincubación contenía 1 mg/ml BSA. La actividad se ensayó tras airear los viales y añadir los cofactores y sustratos requeridos si no estaban presentes en el medio de preincubación.

Medio de preincubación	Actividad ACC oxidasa nmol C_2H_4 /g h
sin adiciones	7.37 ± 0.88
etileno	7.52 ± 0.19
mezcla reacción completa	4.38 ± 0.71

Así, la contemplación conjunta de nuestros resultados y los de Smith *et al.* (1994) indican que la inactivación de ACC oxidasa no se debe a la inhibición de su actividad por los productos finales de la reacción.

7.6. EFECTO DE LOS COMPONENTES DE LA REACCIÓN EN LA INACTIVACIÓN

La Tabla XXVI puso de manifiesto que ACC oxidasa de pera se inactivaba por preincubación con la mezcla de reacción completa. Por ello, estudiamos ahora el efecto en la preincubación de cada uno de los componentes de la mezcla de reacción completa sobre la posterior actividad del enzima (Figura 39).

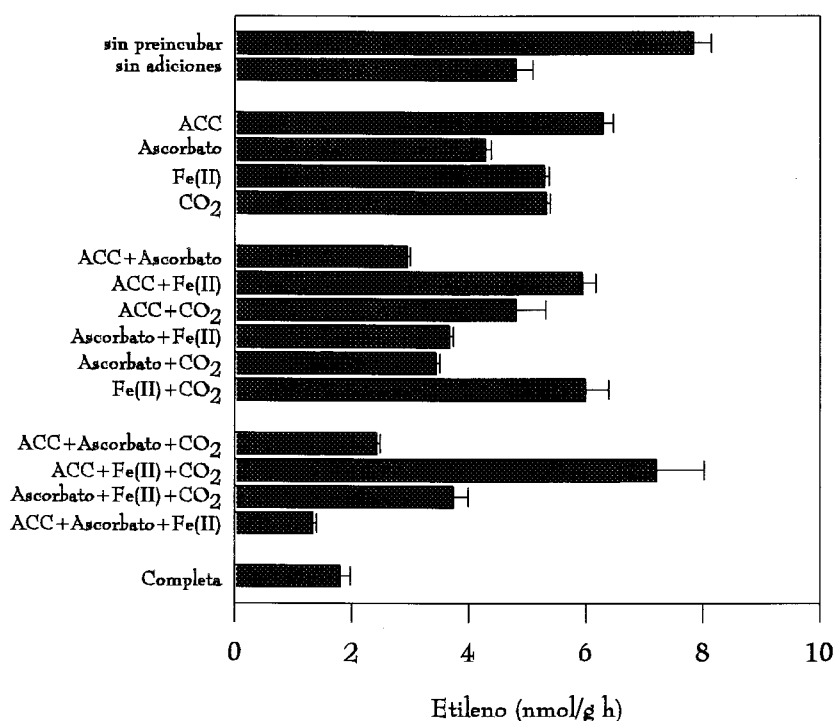


Figura 30. Efecto de la preincubación con los diferentes componentes de la reacción sobre la actividad ACC oxidasa. El extracto se preincubó durante 30 min con los cofactores y sustratos indicados: 0.2 mM SO_4Fe , 10 mM ascorbato, 1 mM ACC y 14 % CO_2 . La actividad se ensayó posteriormente adicionándose los cofactores y sustratos requeridos, si estos no estaban presentes en la preincubación.

Como puede verse en la Figura 39, cuando el enzima se preincuba en presencia de ACC, Fe^{2+} y/o CO_2 (sólamente o en distintas combinaciones) la actividad registrada es, en todos los casos, superior a la del enzima preincubado sin adiciones, lo que apunta que estos compuestos estabilizan el enzima. La estabilización del enzima es máxima (92 % de actividad respecto del control sin preincubar) cuando el extracto se preincuba en presencia de los tres componentes (ACC + Fe^{2+} + CO_2).

Cuando la preparación enzimática se preincuba en presencia de ascorbato (solo o en combinación con uno o varios de los otros componentes de la mezcla de reacción), el

enzima se inactiva, ya que las actividades medidas son siempre inferiores a la registrada con el enzima preincubado sin adiciones. La inactivación es máxima cuando el enzima se preincuba en presencia de ascorbato, Fe^{2+} y ACC (17 % de la actividad del control sin preincubar). La adición de CO_2 al medio anterior no afectó la inactivación del enzima (23 % respecto al mismo control). Los resultados obtenidos y recogidos en la Figura 39 muestran que ACC oxidasa de pera se inactiva severamente por preincubación con ascorbato + Fe^{2+} + ACC, y que esta inactivación no se afecta por la presencia de CO_2 , a pesar del notable efecto del CO_2 en la catálisis. Esto indica que la inactivación de ACC oxidasa en pera Blanquilla no parece estar directamente relacionada con la catálisis enzimática.

La ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa es un enzima que se activa igualmente por CO_2 y presenta una evolución no lineal con el tiempo, aunque en este caso, la adición de HCO_3^- resulta en la estabilización del enzima (Laing *et al.*, 1975). En nuestros experimentos, el CO_2 no parece estar implicado en el mecanismo de inactivación (Figura 39). La incapacidad del dióxido de carbono para prevenir la inactivación de ACC oxidasa durante la incubación en condiciones óptimas para la catálisis ha sido también observada por Smith y John (1993) con el enzima de melón. Sin embargo, utilizando ACC oxidasa purificado de tomate, Smith *et al.* (1994) sugieren que, como en el caso de la isopenicilin-N-sintasa, la inactivación es la consecuencia de un intermediario generado durante la catálisis enzimática.



8

OPTIMIZACION DEL ENSAYO DE ACTIVIDAD *IN VIVO*

La actividad ACC oxidasa *in vitro*, además de ACC requiere Fe^{2+} , ascorbato y CO_2 como cofactores esenciales para su completa actividad. Hasta ahora, la actividad ACC oxidasa *in vivo* ha sido siempre ensayada incubando los tejidos con ACC exógeno. En nuestras experiencias, hemos comprobado repetidas veces (por ejemplo en las Figuras 35, 41 C y 42 B) que el modelo de actividad ACC oxidasa extraída de frutos de pera es similar a la actividad ensayada *in vivo*. Sin embargo, las actividades expresadas por gramo de peso fresco son superiores *in vitro* debido a que estas fueron llevadas a cabo bajo condiciones óptimas. Esto indica que la actividad ACC oxidasa *in vivo* está siendo probablemente subestimada.

Para comprobar esto, hemos reevaluado la actividad del enzima *in vivo* en secciones de pericarpio de pera, teniendo en cuenta los requerimientos del enzima *in vitro*. Se ha ensayado la actividad ACC oxidasa a lo largo del tiempo, en presencia de ACC y de ACC más los cofactores Fe^{2+} , ascorbato y CO_2 , a las concentraciones que se mostraron óptimas para el ensayo *in vitro* (Figura 40). Los resultados muestran que la actividad medida en presencia de cofactores exógenos es superior a la actividad medida

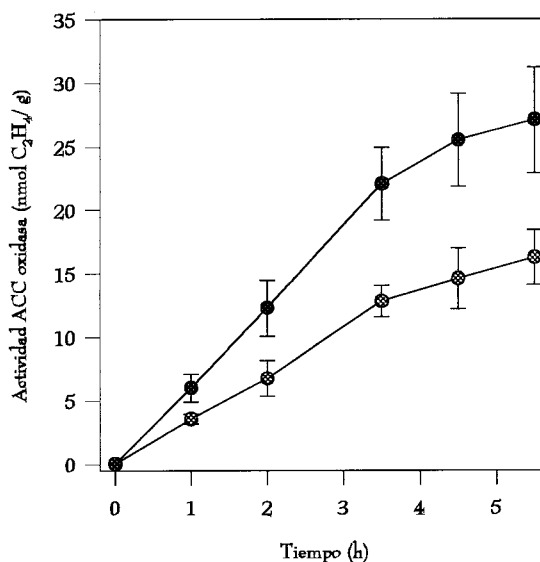


Figura 40. Evolución con el tiempo de la actividad ACC oxidasa *in vivo* de secciones de pericarpio de pera. La actividad se ensayó en presencia de (⊗) 10 mM ACC + 0.4 M manitol; (●) 10 mM ACC + 0.4 M manitol + 0.2 mM SO_4Fe + 10 mM ascorbato + 14 % CO_2 .

incubando los tejidos con ACC sólo. Esto indica que la actividad ACC oxidasa *in vivo* estaba siendo infravalorada. En la Figura 40 se observa igualmente que la producción de etileno decae conforme avanza la reacción, tanto en presencia como en ausencia de cofactores, indicando que *in vivo* también puede tener lugar inactivación del enzima. Una evolución con el tiempo no lineal e inactivación, en presencia de todos los sustratos y cofactores ha sido también observada para el enzima ensayado *in vivo* con discos de melón (Smith *et al.*, 1994).

En la Tabla XXIX se recoge el efecto de distintas adiciones de los cofactores requeridos, a las concentraciones óptimas del ensayo *in vitro*, sobre la actividad ACC oxidasa *in vivo* de secciones de tejido de pera. Como puede verse en dicha Tabla, la actividad ACC oxidasa *in vivo* se estimula por adición de 0.2 mM Fe²⁺ (181 %) y 14 % de CO₂ (126 %) y se inhibe por adición de 10 mM ascorbato (89 %). La adición de Fe²⁺ al medio que ya contiene ascorbato no consigue resolver la inhibición por este último compuesto (92 %). Contrariamente, Ververidis y John (1991) mostraron que la actividad

Tabla XXIX. Efecto de diferentes adiciones sobre la actividad ACC oxidasa *in vivo* de secciones de pericarpio de pera. La actividad se ensayó después de 2 horas de incubación en presencia de 10 mM ACC, 0.4 M manitol y las adiciones indicadas: 0.2 mM SO₄Fe, 10 mM ascorbato y 14 % CO₂.

Adiciones	Actividad ACC oxidasa <i>in vivo</i>	
	nmol C ₂ H ₄ /g h	%
--	2.88 ± 0.72	100
Fe ²⁺	5.20 ± 1.33	181
Ascorbato	2.56 ± 0.29	89
CO ₂	3.62 ± 0.36	126
Fe ²⁺ + Ascorbato	2.65 ± 0.68	92
Fe ²⁺ + CO ₂	9.49 ± 1.76	330
Ascorbato + CO ₂	3.76 ± 0.50	131
Fe ²⁺ + Ascorbato + CO ₂	5.81 ± 1.04	202

ACC oxidasa en discos de melón en fase de ripening o senescente se incrementaba cuando en el medio de incubación además de ACC estaban presentes Fe^{2+} y ascorbato, si bien este efecto no fue observado cuando el tejido estaba en un estadio más inmaduro. Coincidiendo con las observaciones de Nijenhuis-De Vries *et al.* (1994) en pétalos de clavel, nosotros contemplamos que se obtiene mayor actividad ACC oxidasa *in vivo* por incubación de los tejidos de pera con Fe^{2+} , ascorbato y CO_2 conjuntamente (202 %). Sin embargo, la máxima estimulación se obtiene en presencia de Fe^{2+} y CO_2 (330 %), lo que vuelve a poner de manifiesto la acción inhibitoria del ascorbato *in vivo*.

Moya-León y John (1994) han estudiado el efecto de los cofactores en la actividad ACC oxidasa *in vivo* de discos de pulpa y piel de plátano, durante el curso de la maduración. Estos autores encuentran estimulación de la actividad por adición de los tres cofactores juntos en el caso de tejidos de pulpa, pero no encuentran efecto estimulador en tejidos de piel, a pesar del claro requerimiento de ellos en el ensayo *in vitro*. Estas diferencias son interpretadas por los autores por la distinta disponibilidad según el tejido, del enzima por los cofactores *in vivo*. Sin embargo, hasta que no se conozca la localización subcelular de ACC oxidasa (Kende 1993) es prematuro especular acerca de la disponibilidad para el enzima de ACC y cofactores *in vivo*. Al igual que nosotros, Moya-León y John (1994) encuentran una clara inhibición de la actividad del enzima *in vivo* por incubación de los tejidos de pulpa de plátano en presencia de ascorbato sólo.

El efecto inhibitorio del ascorbato *in vivo* es consistente con la inhibición observada *in vitro* a altas concentraciones del mismo (Figura 22), y con la inactivación del enzima *in vitro* por ascorbato en pera (Tabla XXVI) y en tomate (Smith *et al.*, 1994).

Los resultados recogidos en la Tabla XXIX indican que *in vivo* existe un efecto sinérgico entre Fe^{2+} y CO_2 , y que la actividad ACC oxidasa *in vivo* medida en presencia de ACC sólo no está siendo ensayada en condiciones óptimas. Una más correcta cuantificación de la actividad ACC oxidasa *in vivo* de secciones de tejidos de pera requiere, además de ACC la presencia de Fe^{2+} y CO_2 . Ya que estos ensayos se han

realizado a las concentraciones óptimas del ensayo *in vitro* y que estos compuestos tienen que transportarse al sitio de acción del enzima, las concentraciones de estos cofactores deben todavía optimizarse para el ensayo *in vivo*.

9

***EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD ACC
OXIDASA A LO LARGO DEL
DESARROLLO Y MADURACIÓN DEL
FRUTO***

Durante la campaña hortofrutícola 1995 hemos estudiado la evolución de la actividad ACC oxidasa durante el desarrollo y maduración de pera Blanquilla. Esto se ha hecho en conexión con otros parámetros asociados al desarrollo y maduración de los frutos, como son el peso fresco, las dimensiones y las tasas respiratoria y de producción de etileno.

9.1. CRECIMIENTO Y DESARROLLO

Pera Blanquilla muestra un patrón de crecimiento que se ajusta bien a una curva sigmoideal simple, si se atiende a la evolución de las dimensiones o el peso fresco del fruto (Figura 41 A). En estas curvas, podemos distinguir claramente tres fases: Se observa un periodo inicial de lento crecimiento (FI), caracterizado por un proceso muy activo de división celular, que se considera concluído aproximadamente 60 días después de la floración plena (DDF). Tras este periodo, el fruto se introduce en una fase de rápidos incrementos de peso y tamaño (FII) debidos a la expansión celular. En este estadio tiene lugar la acumulación de sustancias de reserva en el pericarpio (Bondoux, 1994). Por último, después de 120 días desde la floración plena, aparece una segunda etapa de crecimiento lento (FIII), en la que el fruto, con un tamaño prácticamente definitivo, prepara su maquinaria metabólica para el ripening, aproximadamente a los 150 DDF.

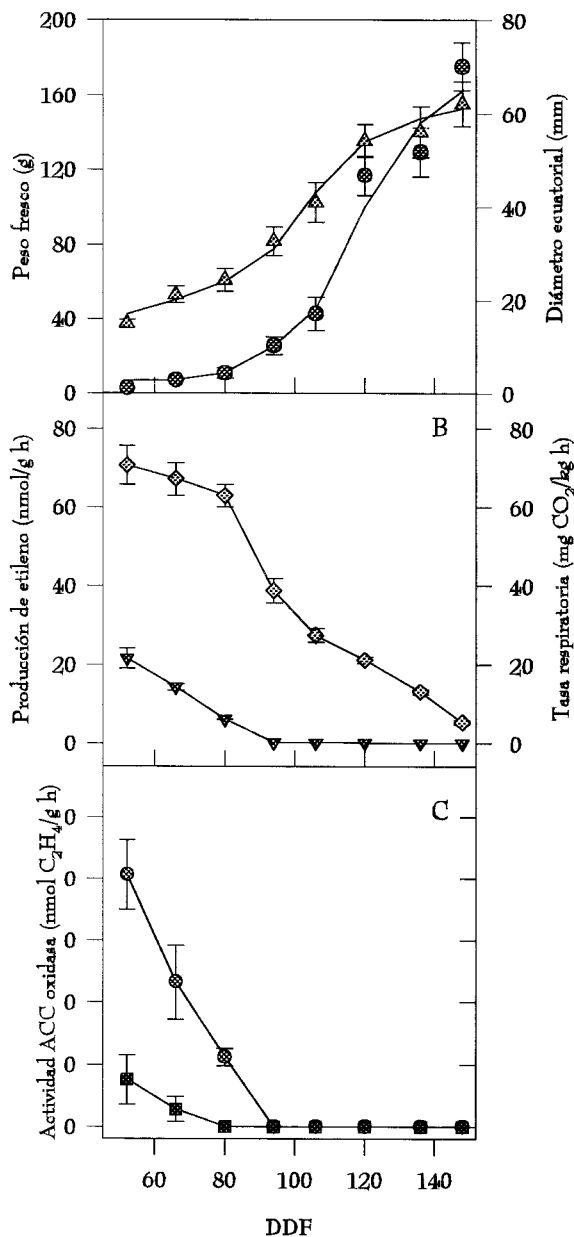


Figura 41. Evolución de diferentes parámetros a lo largo del crecimiento y desarrollo de pera Blanquilla. A) peso fresco (●) y diámetro ecuatorial máximo (▲). B) tasa respiratoria (◆) y velocidad de producción de etileno (▼). C) actividad ACC oxidasa in vivo (⊙) e in vitro (■). Los resultados se expresan como medias ± DE.

Los estadios muy precoces exhiben una alta tasa respiratoria (Figura 41B) que se considera imprescindible para el mantenimiento de la intensa actividad metabólica asociada a FI. A medida que avanza FII se observa un progresivo declinar de la actividad respiratoria. Esta tendencia se mantiene en FIII hasta alcanzar el mínimo preclimaterico 150 días después de la floración plena. La Figura 41 B también recoge la evolución de la producción de etileno por frutos intactos. El perfil mostrado es típico y coincide con muchos otros frutos (Quintana *et al.*, 1984; Looney *et al.*, 1974). Igualmente puede observarse que la fitohormona se produce a mayor velocidad durante los primeros estadios de desarrollo del fruto. La tasa de producción de etileno registra una acusada caída desde los 50 hasta los 90 DDF, momento en el que la emisión de etileno raramente alcanza el límite de detección de la cromatografía gaseosa (1 pmol/ml), manteniéndose así durante toda la fase II y la porción de FIII que hemos

estudiado antes de la recolección del fruto. Brady y Speirs (1991) han asociado la mayor

velocidad de producción de etileno durante los estadios más precoces con los elevados niveles de auxina que existen en estos periodos en los tejidos.

El perfil de evolución de la actividad ACC oxidasa durante el crecimiento y desarrollo del fruto es idéntico al observado para la producción de etileno (Figura 41 C). Esta gráfica también revela el paralelismo existente entre la actividad medida en secciones de pericarpio y la registrada en las preparaciones enzimáticas. Desde los 50 DDF tiene lugar el derrumbe de la actividad ACC oxidasa, que llega a desaparecer en torno a los 90 DDF. No se vuelve a registrar actividad hasta el momento de inicio del ripening. Este comportamiento del enzima sugiere que la biosíntesis de etileno pudiera estar regulada, en estos estadios, por modulación de la actividad ACC oxidasa. La observación de que los niveles de ACC se mantienen en valores muy bajos sugiere que ACC sintasa también ve reprimida su actividad, evidenciando una cierta coordinación entre ambas enzimas. Diversos autores han observado que en algunos frutos inmaduros o en desarrollo, la adición de ACC exógeno no incrementa la producción de etileno, presumiblemente por insuficiente concentración de ACC oxidasa en los tejidos (Bufler, 1986; Liu *et al.*, 1985a).

9.2. CONSERVACIÓN Y MADURACIÓN POSTCOSECHA

Recolectar el fruto en el momento óptimo es fundamental para obtener productos de alta calidad, sobre todo si se desea maximizar su vida postcosecha. En frutos climatéricos, este momento suele coincidir con el mínimo preclimatérico. Si los frutos son recogidos prematuramente, tendrán un buen comportamiento en lo que hace referencia a la conservación, pero no estarán capacitados para adquirir una buena calidad organoléptica, y además serán más susceptibles a desórdenes fisiológicos como el escaldado. Por contra, si la recolección es más tardía, se obtendrán frutos con buena calidad organoléptica, pero su conservación será corta por la rápida pérdida de textura y por la mayor incidencia de alteraciones, tanto fúngicas como fisiológicas.

En España, la pera Blanca de Aranjuez o Blanquilla es, cuantitativamente considerada, la pera más importante en lo que se refiere a la conservación frigorífica. El primer problema que se plantea, y al que suelen ir asociados algunos otros, es que la Blanquilla es realmente una pera de verano, a la que gracias a su buena adaptación al frío y a la carencia en nuestro País de unas variedades propias de otoño-invierno, se le está haciendo jugar un papel que en buena medida no le corresponde: el de una pera de invierno y, por tanto, de larga conservación. Con este objetivo, los frutos se cosechan muchas veces excesivamente pronto, buscando una alta resistencia mecánica, con lo cual queda muy perjudicada la calidad organoléptica, que puede ser deficiente (Delhom, 1986).

Después de la recolección comercial (150 DDF), los frutos fueron trasladados al Instituto de la Grasa donde quedaron almacenados a $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 95 % Hr, al objeto de conseguir la homogeneización de sus estadios de madurez. Se ha observado que inmediatamente después de la recolección la producción de etileno era

raramente detectable. Sin embargo, después de 30 días de almacenamiento refrigerado, la tasa respiratoria había remontado muy ligeramente su valor en el momento de la cosecha, y se comprueba que la producción de etileno empieza a activarse (0.12 nmol/g h). En este

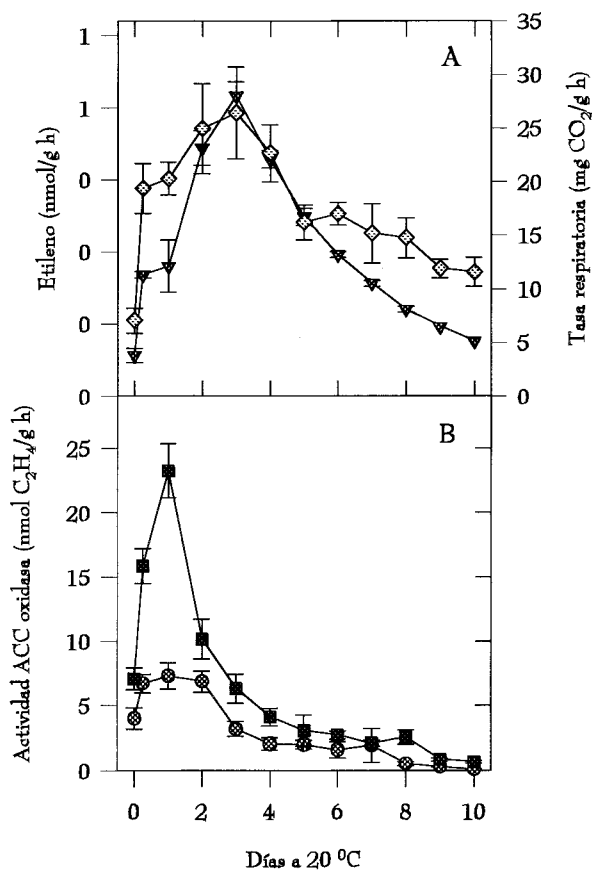


Figura 42. Ripening de pera Blanquilla a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A) evolución de la tasa respiratoria (\diamond) y velocidad de producción de etileno (\blacktriangledown). B) actividad ACC oxidasa in vivo (\circ) e in vitro (\blacksquare). Los resultados se expresan como medias \pm DE.

sentido Knee (1987) ha demostrado que la pera Conferencia está capacitada para producir niveles detectables de etileno a -1°C , si bien, el ripening no tiene lugar hasta que el fruto es transferido a temperaturas más cálidas. Drouet y Hartmann (1982) sugirieron que la conservación de pera a baja temperatura activa un sistema que genera cantidades ínfimas de etileno. Este etileno es el que, después de la transferencia de los frutos a temperaturas superiores induce un segundo sistema que produce la fitohormona en cantidades mucho más importantes e induce los procesos asociados al ripening. Efectivamente, la transferencia de los frutos a 20°C provoca el inicio de la crisis climática en cuestión de horas, de manera que después de 3 días en estas condiciones, se alcanza el máximo climático, tanto desde el punto de vista respiratorio como de la producción de etileno (Figura 42 A). En pera Blanquilla el máximo de producción de etileno coincide en el tiempo con el máximo respiratorio. Nuestros datos confirman los aportados por Biale (1950) quienes establecieron que, en pera, la tasa respiratoria en el máximo climático aumenta entre 2 y 2.5 veces con respecto a la situación pre y postclimática. Igualmente, se atestigua que la pera es un fruto que presenta alta velocidad de producción de etileno ($>1 \text{ nmol/g h}$), tal y como indicaron Burg y Burg (1962). Mansour *et al.* (1982) describieron que la manzana Golden delicious que había sido mantenida 30 días a 0°C alcanzaba el máximo climático después de 3 días de exposición a 25°C . Por su parte, Wang y Mellethin (1972) observaron que en pera Anjou, el etileno interno en fase preclimática se mantenía en niveles próximos a $0.08 \mu\text{l/l}$, pasando a $4 \mu\text{l/l}$ en el máximo climático.

Tras el climaterio se origina la aceleración de los procesos asociados al ripening, entrando los frutos rápidamente en fase de senescencia. La vida comercial de pera Blanquilla después de su almacenamiento es, por ello, relativamente corta (10 - 15 días). Pasado este tiempo resultan visibles distintas fisiopatías (pardeamientos de la epidermis), lo que a su vez incrementa el riesgo de fungopatías. Ha resultado especialmente frecuente el ataque por *Penicillium expansum*, bien a través de heridas superficiales o bien a partir del ennegrecimiento fisiológico del pedúnculo. Herrero (1982) ha mostrado que los frutos afectados por *Penicillium* incrementan su velocidad de producción de etileno, lo que

acelera la senescencia de los frutos circundantes disminuyendo su resistencia al ataque por el microorganismo.

La evolución de la actividad ACC oxidasa *in vivo* e *in vitro* durante el ripening a 20 °C se recoge en la Figura 42 B. Se comprueba que en ambos casos el máximo de actividad se sitúa claramente en torno a las 24 horas desde el comienzo de la exposición a 20 °C, produciéndose un brusco declinar a partir de las 48 horas, para desaparecer totalmente después de 10 días. Según esto, la aceleración de la producción de etileno registrada entre las 48 y 72 horas respondería a una activación previa de ACC oxidasa. De nuevo se pone de manifiesto que la producción de etileno es susceptible de regulación a través de la modulación de la actividad ACC oxidasa. Una vez disparado el ripening, el etileno parece fisiológicamente innecesario, por lo que el fruto desmonta su maquinaria biosintética. Para ello, el vegetal recurre, entre otros mecanismos, a eliminar la actividad o el recambio de ACC oxidasa. Dado que a diferencia de otros frutos el *pool* de ACC se ha mantenido muy bajo durante el ripening, vuelve a evidenciarse que en pera existe un alto grado de coordinación entre ACC sintasa y ACC oxidasa. Así, el incremento del nivel de ACC en frutos senescentes o lesionados sería una manifestación de que estos dos enzimas habrían entrado en un proceso de descoordinación, tal y como apuntaron Hoffman y Yang en 1980.

Conclusiones

CONCLUSIONES

- 1^a A partir de pericarpio de pera Blanquilla se han obtenido extractos enzimáticos que exhiben alta actividad ACC oxidasa. El enzima se encuentra asociado a la fracción corpuscular y puede obtenerse en forma soluble mediante tratamiento con Triton X-100. La máxima recuperación de la actividad se alcanza extrayendo a pH 6.5 y solubilizando con una concentración de Triton X-100 igual o superior a 0.8 %. En presencia de glicerol al 30 % la preparación enzimática obtenida resulta estable a -20 °C durante al menos 11 días.
- 2^a Además de los sustratos ACC y O₂, el enzima muestra absoluto requerimiento de Fe²⁺, ascorbato y CO₂. La máxima actividad se obtiene con una concentración de hierro (II) igual o superior a 0.2 mM, ascorbato 10 mM y una atmósfera con un nivel de CO₂ igual o superior al 14 %. La actividad enzimática tiene un pH óptimo 6.7 y dos máximos relativos a 28 y 38 °C.
- 3^a ACC oxidasa de pera muestra alta afinidad por su sustrato ACC, con una K_m aparente de 57.5 μM para el ACC y de 0.44 % para el oxígeno molecular.
- 4^a Al igual que el enzima *in vivo*, ACC oxidasa extraída de pera se inhibe severamente por iones cobalto y muestra inhibición competitiva por ácido α-aminoisobutírico, análogo estructural del ACC, con una constante de inhibición de 4.28 mM. La presencia simultánea de los grupos amino y carboxilo en el carbono α es esencial para la actividad catalítica.
- 5^a ACC oxidasa no es una hemoproteína, pero requiere invariablemente Fe²⁺ para su actividad. De varios cationes divalentes ensayados ninguno fue capaz de remplazar al

Fe²⁺ en la reacción. Sin embargo, todos ellos se mostraron en mayor o menor extensión inhibidores de la actividad del enzima.

6^a Nuestros resultados apoyan al ascorbato como cosustrato de ACC oxidasa al interaccionar con el segundo átomo de oxígeno que se pone en juego en la reacción. En este sentido, serían explicables el no requerimiento de 2-oxoglutarato para la acción catalítica, así como la inhibición observada a altas concentraciones de este compuesto. Igualmente, el hecho de que la sustitución del ascorbato por otros agentes reductores cause la pérdida total de la actividad refuerza esta idea.

7^a El enzima extraído de pera es fuertemente inhibido por galato de *n*-propilo, EDTA y 1,2-dihidroxinaftaleno, es menos sensible a *m*-clorofenilhidrazona del cianuro de carbonilo, ácido salicílico y reactivos de grupos -SH, y es insensible o poco afectado por benzoato sódico, 2,4-dinitrofenol y cicloheximida.

8^a En todas las etapas cromatográficas, la actividad ACC oxidasa eluye como una única banda, cuyo comportamiento revela que se trata de una proteína hidrófoba de peso molecular 37900 Da.

9^a El ácido α -*p*-clorofenoxiisobutírico (PCIB), una sustancia con propiedades antiauxina, inhibe la actividad ACC oxidasa en secciones de tejido de pera. Sin embargo, las auxinas noparecen regular directamente la acción del enzima, ya que ni el ácido indol-3-acético ni el PCIB afectan su actividad *in vitro*.

10^a El tratamiento de frutos intactos de pera con etileno exógeno causa la inducción y posterior represión de la actividad ACC oxidasa. El curso paralelo seguido por las actividades en los ensayos *in vivo* e *in vitro* proporciona evidencia adicional de la autenticidad del enzima extraído.

11^a ACC oxidasa se inactiva progresivamente en el curso de la reacción, con una vida media de 47 minutos. Esta pérdida de actividad no se debe al etileno producido en la reacción. El enzima se inactiva por preincubación en presencia de ascorbato, siendo esta inactivación máxima cuando el enzima se preincuba en presencia combinada de Fe^{2+} , ascorbato y ACC. Sin embargo, la adición de CO_2 no afectó el nivel de actividad, a pesar del requerimiento absoluto de este cofactor en la reacción. Por ello, la inactivación de ACC oxidasa de pera no está directamente relacionada con la catálisis enzimática.

12^a Actualmente, la actividad ACC oxidasa *in vivo* está siendo subestimada. Aunque la actividad se incrementa en presencia de los cofactores Fe^{2+} , ascorbato y CO_2 , a las concentraciones óptimas del ensayo *in vitro*, ésta se maximiza cuando los tejidos se incuban en presencia de Fe^{2+} y CO_2 , poniéndose de manifiesto un efecto inhibitor del ascorbato *in vivo*.

13^a La producción de etileno durante la ontogenia del fruto está en parte regulada por la actividad ACC oxidasa. La actividad del enzima es alta en los estadios más precoces del desarrollo, y decae progresivamente hasta anularse coincidiendo con el inicio de la maduración fisiológica. El comienzo del ripening viene precedido de un resurgir de la actividad que alcanza su máximo 48 horas antes de la crisis climatérica.

Conclusión final: La observación conjunta de los resultados obtenidos indica claramente que el enzima soluble extraído de frutos de *Pyrus communis* cv. Blanquilla, muestra alta afinidad por ACC y O_2 , requiere Fe^{2+} y resulta inhibido por iones cobalto y ácido α -aminoisobutírico. Por todo ello y por el paralelismo que muestra su evolución respecto del sistema que opera fisiológicamente, podemos concluir que estos extractos exhiben auténtica actividad ACC oxidasa.

Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

Abbott MT, Udenfriends S. 1974. α -ketoglutarate-coupled dioxygenases. *Molecular mechanisms of oxygen activation*. . Hayashi O, editor. Academic Press, New York. p. 167

Abeles FB, Morgan PW, Salveit MEJ. 1992. *Ethylene in Plant Biology*. Academic Press, London..

Acaster MA, Kende H. 1983. Properties and partial purification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Plant Physiol* 72:139

Adams DO, Yang SF. 1977. Methionine metabolism in apple tissue: implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Plant Physiol* 60:982

Adams DO, Yang SF. 1979. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:170

Adlington RM, Aplin RT, Baldwin JE, Rawlings BJ, Osborne D. 1982. On the biosynthesis of ethylene. *J Chem Soc Commun* 1982:1086

Adlington RM, Baldwin JE, Rawlings BJ. 1983. On the stereochemistry of the ethylene biosynthesis. *J Chem Soc Commun* 1983:290

Aharoni N, Anderson JD, Lieberman M. 1979. Production and action of ethylene in senescing leaf discs: effect of indolacetic acid, kinetin, silver ion and carbon dioxide. *Plant Physiol* 64:805

Aharoni N, Philosoph-Hadas S, Meir S. 1984. Control of ethylene biosynthesis in senescing tobacco leaf discs. *Ethylene: Biochemical, Physiological and Applied Aspects*. Fuchs Y, Chalutz E, editors. Martinus Nijhoff/Dr W Junk Publishers, The Hage. p. 129

Al-Bachir M, Sass P. 1989. Effects of ionizing radiation on the respiratory intensity of pears during storage. *Acta Agron. Hung.* 38:49

Amrhein N, Breuing F, Eberle J, et al. 1982. The metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Plant Growth Substances 1982*. . Wareing PF, editors. Academic Press, London: p. 248

Amrhein N, Dorzok U, Kionka C, et al. 1984. The biochemistry and Physiology of 1-aminocyclopropane-carboxylic acid conjugation. *Ethylene: Biochemical, Physiological and Applied Aspects*. Fuchs Y, Chalutz E, editors. Martinus Nijhoff/Dr W junk Publ. The hage: p. 11



- Amrhein N, Schneebeck D, Skorupka H, Tophof S, Stockigt J.** 1981. Identification of a major metabolite of the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in higher plants. *Naturwissenschaften* 68:619
- Apelbaum A, Burgoon AC, Anderson JD, Solomos T, Lieberman M.** 1981a. Some characteristics of the system converting 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. *Plant Physiology* 67:80
- Apelbaum A, Wang SY, Burgoon AC, Baker JE, Lieberman M.** 1981b. Inhibition of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by structural analogs, inhibitors of electron transfer, uncouplers of oxidative phosphorylation and free radical scavengers. *Plant Physiology* 67:74
- Atta-Aly MA, Salveit MEJ, Hobson GE.** 1987. Effect of silver ions on ethylene biosynthesis by tomato fruit tissue. *Plant Physiol* 83:44
- Baker JE, Anderson JD, Hruschka WR.** 1985. Protein synthesis in tomato fruit pericarp tissue during ripening. Characteristics of amino acid incorporation. *J Plant Physiol* 120:167
- Baker JE, Lieberman M, Anderson JD.** 1978. Inhibition of ethylene production in fruit slices by a rhizobitoxine analog and free radical scavengers. *Plant Physiology* 61:886
- Baker JE, Wang CY, Lieberman M, Hardenburg R.** 1977. Delay of senescence in carnations by rhizobitoxine analog and sodium benzoate. *HortScience* 12:38
- Balagué C, Pech JC.** 1985. Relationship between the activity of the ethylene forming enzyme and the level of intracellular 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in pear cell cultures in vitro. *J Plant Growth Regul* 4:81
- Baldwin JE, Jackson DA, Adlington RM, Rawlings BJ.** 1985. The stereochemistry of oxidation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *J Chem Soc Chem Commun* :206
- Barker AV and Corey KA.** Ethylene evolution by tomato plants under nutrient stress. *HortScience* 1988. 23:202
- Biale JB.** 1950. Postharvest physiology and biochemistry of fruits. *Ann Rev Plant Physiol* 1:183
- Biale JB.** 1960. *Handbuch der Pflanzenphysiologie*. Springer Verlag, Berlin: p. 536
- Biale JB, Young RE.** 1947. *Amer J Bot* 34:301
- Biale JB, Young RE.** 1981. respiration and ripening of fruit. *Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables*. Friend J, Rhodes MJC, editors. Academic Press, New York: p. 1

- Bleecker AB, Kenyon WH, Somerville SC, Kende H.** 1986. Use of monoclonal antibodies in the purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, an enzyme in ethylene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7755
- Bleecker AB, Robinson G, Kende H.** 1988. Studies on the regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato using monoclonal antibodies. *Planta* 173:385
- Bleecker AB, Rose-John S, Kende H.** 1987. An evaluation of 2,5-norbornadiene as a reversible inhibitor of ethylene action in deepwater rice. *Plant Physiol* 84:395
- Boller T.** 1984. Superinduction of ACC synthase in tomato pericarp by lithium ions. *Ethylene: Biochemical, Physiological and Applied Aspects*. Fuchs Y, Chalutz E, editors. Nijhoff/Junk, The Hague: p. 87
- Boller T, Herner RC, Kende H.** 1979. Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Planta* 145:293
- Bondoux P.** 1994. *Enfermedades de conservación de frutos de pepita, manzanas y peras*. Editorial Mundi-Prensa, Madrid:
- Bousquet JF, Thimann KC.** 1984. Lipid peroxidation forms ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and may operate in leaf senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1724
- Bouzayen M, Cooper W, Barry C, Zegzouti H, Hamilton AJ, Grierson D.** 1993. Efe multigene family in tomato plants: expression and characterization. *Cellular and Molecular Aspects of Plant Hormone Ethylene*. Pech JC, Latché A, Balagué C, editors. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: p. 76
- Bouzayen M, Felix G, Latché A, Pech JC, Boller T.** 1991. Iron: an essential cofactor for the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. *Planta* 184:244
- Bouzayen M, Latché A, Alibert G, Pech JC.** 1988. Intracellular sites of synthesis and storage of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid in *Acer pseudoplatanus* cells. *Plant Physiol* 88:613
- Bouzayen M, Latché A, Pech JC.** 1990. Subcellular localization of the sites of conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid into ethylene in plant cells. *Planta* 180:175
- Bouzayen M, Latché A, Pech JC, Marigó G.** 1989. Carrier-mediated uptake of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid in vacuoles isolated from *Catharanthus roseus* cells. *Plant Physiol* 91:1317
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72:248
- Brady CJ, O'Connell PBH.** 1976. *Aus J Plant Physiol* 3:301

- Brady CJ, Speirs J.** 1991. Ethylene in fruit ontogeny and abscission. *The plant hormone ethylene*. Mattoo AK, Suttle JC, editors. CRC Press, Boca Raton: p. 235
- Britsch L.** 1990. *Arch Biochem Biophys* 276:348
- Britsch L, Grisebach H.** 1986. Purification and characterization of (2S)-flavanone-3-hydroxylase from *Petunia hybrida*. *Eur J Biochem* 155:322
- Bufler G.** 1986. Ethylene-promoted conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in peel of apple at various stages of fruit development. *Plant Physiology* 80:539
- Bufler G, Bangerth F.** 1983. Effects of propylene and oxygen on the production systems of apples. *Physiol Plant* 58:486
- Burg SA, Burg EA.** 1965. Ethylene action and ripening of fruits. *Science* 148:1190
- Burg SP.** 1962. Physiology of ethylene formation. *Annu Rev Plant Physiol* 13:265
- Burg SP.** 1973. Ethylene in plant growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:591
- Burg SP, Burg EA.** 1962. The role of ethylene in fruit ripening. *Plant Physiol* 37:179
- Burg SP, Clagett CO.** 1967. Conversion of methionine to ethylene in vegetative tissue and fruits. *Biochem Biophys Res Comm* 27:125
- Burg SP, Thimann KV.** 1959. The physiology of ethylene formation in apples. *Proc Natl Acad Sci USA* 45:335
- Burroughs LF.** 1957. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid: A new aminoacid in perry pears and cider apples. *Nature* 179:360
- Cameron AC, Fenton CAL, Yu YB, Adams DO, Yang SF.** 1979. Increased production of ethylene by plant tissues treated with 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *HortScience* 14:178
- Chappel J, Hahlbrock K, Boller T.** 1984. Rapid induction of ethylene biosynthesis in cultured parsley cells by fungal elicitor and its relationship to the induction of phenylalanine ammonia-lyase. *Planta* 161:475
- Chavez-Franco SH, Kader AA.** 1993. Effects of CO₂ on ethylene biosynthesis in Bartlett pears. *Postharvest Biol Technol* 3:183
- Christoffersen RE, Tucker ML, Laties GG.** 1984. Cellulase gene expression in ripening avocado fruit: the accumulation of cellulase mRNA and protein as demonstrated by cDNA hybridation and immunodetection. *Plant Mol Biol* 3:385

- Cohen JD, Bandurski RS.** 1982. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Ann Rev Plant Physiol* 33:403
- Cook D, Rasche M, Eisinger W.** 1985. Regulation of ethylene biosynthesis and action in cut carnation flower senescence by cytokinins. *J Am Soc Hort Sci* 110:24
- Coombe BG.** 1976. The development of fleshy fruit. *Annu Rev Plant Physiol* 27:207
- Cooper WC, Rasmussen GK, Rogers BJ, Preece PC, Henry WH.** 1968. *Plant Physiol* 43:1560
- Corbineau F, Engelmann F, Come D.** 1990. Ethylene production as an indicator of chilling injury in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos. *Plant Science* 71:29
- Cousin HH.** 1910. III. Agricultural experiments. Citrus. *Ann Re Dep Agric of Jamaica* :7
- CSIR.** 1969. Raw Materials. *Wealth of India*. Council Of Scientific and Industrial Research (CSIR), editors. New Delhi: p. 330
- De Carolis E, De Luca V.** 1994. 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase and related enzymes: biochemical characterization. *Phytochemistry* 36:1093
- Deikman J, Fisher RL.** 1988. Interaction of a DNA binding factor with the 5'-flanking region of an ethylene responsive fruit ripening gene from tomato. *EMBO J* 7:3315
- Delhom MJ.** 1986. *La conservación frigorífica de las peras*. Ministerio de Agricultura, Pesca y alimentación. 14/86 HD. Madrid:
- Dong JG, Fernández-Maculet JC, Yang SF.** 1992. Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase from ripe apple fruit. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9789
- Drew MC, He CJ, and Morgan PW.** 1989. Decreased ethylene biosynthesis and induction of aerenchyma, by nitrogen- or phosphate-starvation in adventitious roots of *Zea mays* L. *Plant Physiol* 91:266
- Drouet A, Hartmann C.** 1982. Polyribosomes from pear fruit. II. Changes in pulp tissues during ripening and senescence. *Plant Physiology* 69:885
- Dupille E, Latché A, Roques C, Pech JC.** 1992. In vitro stabilization and purification of the ethylene-forming enzyme from apple fruits. *C R Acad Sci Paris* 315:77
- Dupille E, Rombaldi C, Lelievre JM, Cleyet-Marcel JC, Pech JC, Latché A.** 1993. Purification, properties and partial amino-acid sequence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase from apple fruits. *Planta* 190:65

- Ellis RJ, McDonald IR.** 1970. Specificity of cycloheximide in higher plant systems. *Plant Physiology* 46:227
- Endow SA.** 1991. *Trends Biochem Sci* 16:221
- Erdmann H, Grisebach RJ, Lawson RH, Mattoo AK.** 1989. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-dependent ethylene production during reformation of vacuoles in evacuated protoplasts of *Petunia hybrida*. *Planta* 179:196
- Eun JS, Kuraishi S, Sakurai N.** 1989. Changes in levels of auxin and abscisic acid and the evolution of ethylene in squash hypocotyls after treatment with brassinolide. *Plant Cell Physiol* 30:807
- Even-Chen Z, Mattoo AK, Goren R.** 1982. Inhibition of ethylene biosynthesis by aminoethoxyvinylglycine and by polyamines shunts label from 3,4(14C)Methionine into spermidine in aged orange peel disc. *Plant Physiol* 69:385
- Felix G, Grosskopf DG, Regenass M, Basse CW, Boller T.** 1991. Elicitor-induced ethylene biosynthesis in tomato cells. Characterization and use as a bioassay for elicitor action. *Plant Physiol* 97:19
- Ferguson IB.** 1983. Calcium stimulation of ethylene production induced by 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and indole-3-acetic acid. *J Plant Growth Regul* 67:570
- Fernández-Maculet JC, Dong JG, Yang SF.** 1993. Activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by carbon dioxide. *Biochem Biophys Res Commun* 193:1168
- Fernández-Maculet JC, Yang SF.** 1992. Extraction and partial characterization of the ethylene forming enzyme from apple. *Plant Physiology* 99:751
- Field RJ.** 1981a. The effect of low temperature on ethylene production by leaf tissue of *Phaseolus vulgaris* L. *Ann Botany* 47:215
- Field RJ.** 1981b. A relationship between membrane permeability and ethylene production at high temperature in leaf tissue of *Phaseolus vulgaris*. *Ann Botany* 48:33
- Finlayson SA, Reid DM.** 1994. Influence of CO₂ on ACC oxidase activity from roots of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Phytochemistry* 35:847
- Forsyth FR, Eaves CA, Lightford HJ.** 1969. Storage quality of McIntosh apple as affected by removal of ethylene from the storage atmosphere. *Can J Plant Sci* 49:567
- Frenkel C, Haard NF.** 1973. Initiation of ripening in Bartlett pear with an antiauxin α -(p-chlorophenoxy)isobutyric acid. *Plant Physiology* 52:380

- Frenkel C, Mukai MK.** 1984. Possible role of fruit cell wall oxidative activity in ethylene evolution. *Ethylene: Biochemical, Physiological and Applied Aspects*. Fuchs Y, editors. Martinus Nijhoff/Dr W Junk Publishers, p 303
- Fuchs Y, Mattoo AK, Chalutz E, Rot I.** 1981. Biosynthesis of ethylene in higher plants: the metabolic site of inhibition by phosphate. *Plant Cell Environ* 4:291
- Fuhrer J.** 1982. Ethylene biosynthesis and cadmium toxicity in leaf tissue of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol* 70:162
- Galliard T, Hulme AC, Rhodes MJC, Woollorton LSC.** 1968. Enzymatic conversion of linolenic acid to ethylene by extracts of apple fruits. *FEBS Letters* 1:283
- Gane R.** 1934. Production of ethylene by some ripening fruits. *Nature (London)* 134:1008
- Gazit S, Blumenfeld A.** 1970. Response of mature avocado fruits to ethylene treatments before and after harvest. *J Am Soc Hort Sci* 95:229
- Gepstein S, Thimann KV.** 1980. The effect of light on the production of ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by leaves. *Planta* 149:196
- Goeschl JD, Kays SJ.** 1975. Concentration dependencies of some effects of ethylene on etiolated pea, peanut, bean and cotton seedlings. *Plant Physiol* 55:670
- Goldschmidt EE.** 1974. *Plant Growth Substances 1973*. Hirokawa Publishing Co. Tokyo: p. 1027
- Goldschmidt EE, Aharoni N, Eilati SK, Riov J, Monselius SP.** 1977. *Plant Physiol* 59:193
- Grierson D, Slater A, Speirs J, Tucker GA.** 1985. The appearance of poly-galacturonase mRNA in tomatoes: one of a serie of changes in genes expression during development and ripening. *Planta* 163:263
- Grierson D, Tucker GA.** 1983. Timing of ethylene and polygalacturonase synthesis in relation to the control of tomato fruit ripening. *Planta* 157:174
- Grodzinski B, Boesel I, Horton RF.** 1982. Ethylene release from leaves of *Xanthium strumaricum* L. and *Zea mays* L. *J Exptl Bot* 33:344
- Gross KC.** 1985. Promotion of ethylene evolution and ripening of tomato fruit by galactose. *Plant Physiol* 79:306
- Gross KC, Sams CE.** 1984. Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. *Phytochemistry* 23:2457

- Gupta K, Anderson JD.** 1989. Influence of temperature on potentiation of cellulysin-induced ethylene biosynthesis by ethylene. *Plant Cell Physiol* 30:345
- Guy M.** 1990. Vacuolar ethylene formation does not depend on membrane potential. *Physiol Plant* 79:526
- Guy M, Kende H.** 1984. Ethylene formation in *Pisum sativum* and *Vicia faba* protoplast. *Planta* 160:276
- Guzman P and Ecker JR.** 1990. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 25:13
- Hamilton AJ, Bouzayen M, Grierson D.** 1991. Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7434
- Hamilton AJ, Lycett GW, Grierson D.** 1990. Antisense gene that inhibit synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346:284
- Hamilton GA.** 1971. *Progr Biorg Chem* 1:142
- Hansen E.** 1942. Quantitative study of ethylene production in relation to respiration of pears. *Bot Gaz* 103:543
- Harkett PJ, Hulme AC, Rhodes MJC, Woollorton LSC.** 1971. The threshold value for physiological action of ethylene on apple fruit. *J Food Technol* 6:39
- Hasenstein KH and Evans ML.** 1968. Calcium ion dependency of ethylene production in segments of primary roots of *Zea mays*. *Physiol Plant* 67:570
- Hashimoto T, Yamada Y.** 1986. *Plant Physiology* 81:619
- Hashimoto T, Yamada Y.** 1987. *Eur J Biochem* 164:277
- Herrero A.** 1982. *Enfermedades y fisiopatías de peras y manzanas en conservación frigorífica*. Anonymous Dilagro, S.A. Ediciones, Lérída:
- Hesselman CW, Freebairn HT.** 1969. Rate of ripening of initiated bananas as influenced by oxygen and ethylene. *J Am Soc Hort Sci* 94:635
- Hobson GE, Nichols R, Davies JN, Atkey PT.** 1984. *J Plant Physiol* 116:21
- Hoffman NE, Fu JR, Yang SF.** 1983a. Identification and metabolism of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid in germinating peanut seeds. *Plant Physiol* 71:197

- Hoffman NE, Yang SF.** 1980. Changes of ACC content in ripening fruits in relation to their ethylene production rates. *J.Am.Soc.Hort.Sci.* 105:492
- Hoffman NE, Liu Y, Yang SF.** 1983b. Changes in 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid content in wilted wheat leaves in relation to their ethylene production rates and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content. *Planta* 157:518
- Hoffman NE, Yang SF.** 1982. Enhancement of wound-induced ethylene synthesis by ethylene in preclimacteric cantaloupe. *Plant Physiology* 69:317
- Hoffman NE, Yang SF, McKeon T.** 1982. Identification of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid as a major conjugate of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor in higher plants. *Biochem Biophys Res Comm* 104:765
- Honma M, Shimomura T.** 1978. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agric Biol Chem* 42:1825
- Horton RF, Saville BJ.** 1984. Carbon dioxide enrichment, transpiration and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-dependent ethylene release from oat leaves. *Plant Sci.Lett.* 36:131
- Huang PL, Parks JE, Rottmann WH, Theologis A.** 1991. Two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in zucchini (*Cucurbita pepo*) are clustered and similar but differentially regulated. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7021
- Hulme AC, Rhodes MJC, Woollorton LCS.** 1971. *Phytochemistry* 10:749
- Hyodo H, Hashimoto C, Morozumi S, Hu W, Tanaka K.** 1993. Characterization and induction of the activity of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in the wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. *Plant Cell Physiology* 34:667
- Imaseki H.** 1991. The biochemistry of ethylene biosynthesis. *The Plant Hormone Ethylene*. . Mattoo AK, Suttle JC, editors. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 1
- Imaseki H, Watanabe A.** 1978. Inhibition of ethylene production by osmotic shock. Further evidence for membrane control of ethylene production. *Plant Cell Physiol* 19:345
- Imaseki H, Yoshii H, Todaka I.** 1982. Regulation of auxin-induced ethylene biosynthesis in plants. *Plant Growth Substances 1982*. . Wareing PF, editors. Academic Press, London: p. 259
- Jennings W, Tressl R.** 1974. Production of volatile compounds in the ripening Bartlett pear. *Chem Mikrobiol Technol Lebensm* 3:52

- Jiao XZ, Philosoph-Hadas S, Su LY, Yang SF.** 1986. The conversion of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid to 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in plant tissues. *Plant Physiol* 81:637
- Jiao XZ, Yip WK, Yang SF.** 1987. The effect of light and phytochrome on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid metabolism in etiolated wheat seedling leaves. *Plant Physiol* 85:643
- John P.** 1983. The coupling of ethylene biosynthesis to a transmembrane, electrogenic proton flux. *FEBS lett* 152:141
- John P, Mitchell T, Razdan A, et al.** 1989. Characterization of the ethylene forming enzyme in vivo e in vitro. *Biochemical and physiological aspects of ethylene production in lower and higher plants.* . Clijsters Hea, editors.Kluwer Academic Publishers, p. 23
- John P, Porter ARJ, Miller AJ.** 1985. Activity of the ethylene-forming enzyme measured in vivo at different cell potentials. *J Plant Physiol* 121:397
- Kang BG, Newcomb W, Burg SP.** 1971. Mechanism of auxin-induced ethylene production. *Plant Physiol* 47:504
- Kao CH, Yang SF.** 1982. Light inhibition of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in leaves is mediated through carbon dioxide. *Planta* 155:261
- Kao CH, Yang SF.** 1983. Role of ethylene in senescence of detached rice leaves. *Plant Physiol* 73:881
- Kaperska A, Kubacka-Zebalska M.** 1985. Is lipoxygenase involved in the formation of ethylene from ACC? *Physiol Plant* 64:333
- Kawasaki Y, Ogawa T, Sasaoka K.** 1982. Two pathway for formation of D-amino acids conjugates in pea seedlings. *Agric Biol Chem* 46:1
- Kende H.** 1993. Ethylene biosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol* 44:283
- Kende H, Boller T.** 1981. Wound ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic synthase in ripening tomato fruit. *Planta* 151:476
- Khan AA, Thakur R, Akbar M, HilleRisLambers D, Seshu DV.** 1988. Hormonal regulation of elongation in floating rice during submergence. *Crop Sci* 28:121
- Khani-Oskouee S, Rammalingam K, Kalvin D, Woodard RW.** 1987. Alternate substrates and inhibiots of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase. *Bioorganic Chem* 15:92
- Kidd F, West C.** 1930. Physiology of fruit. *Proc Roy Soc (London)* B106:93

- Kidd F, West C.** 1945. *Plant Physiol* 20:467
- Kim J, Groos KC, Solomos T.** 1987. Characterization of the stimulation of ethylene production by galactose in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *Plant Physiol* 85:804
- Kim WT, Yang SF.** 1992. Turnover of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase in wounded tomato tissues. *Plant Physiol* 100:1126
- Kionka C, Amrhein N.** 1984. The enzymatic malonylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in homogenates of mung bean hypocotyls. *Planta* 162:226
- Klee HJ, Hayford MB, Kretzmer KA, Barry GF, Kishore GM.** 1991. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant Cell* 3:1187
- Knee M.** 1980. Physiological responses of apple fruits to oxygen concentrations. *Ann Appl Biol* 96:243
- Knee M.** 1987. Development of ethylene biosynthesis in pear fruits at -1 0C. *Journal of Experimental Botany* 38:1724
- Knee M, Looney NE, Hatfield SGS, Smith SM.** 1983. Initiation of rapid ethylene synthesis by apple and pear fruits in relation to storage temperature. *J Exptl Bot* 34:1207
- Knecht EW, Kramer SJ, Bruinsma J.** 1974. Facteurs et Régulation de la Maturation des Fruits. *Colloq.Int.C.N.R.S.no.238*. . Ulrich R, editors.p. 355
- Kondo S, Takahashi Y.** 1989. Relationship between early drop of apple fruit and ethylene evolution under high night-temperature conditions. *J Japan Soc Hort Sci* 58:1
- Konze JR, Jones JF, Boller T, Kende H.** 1980. Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid on the production of ethylene in senescing flowers of *Ipomoea tricolor* Cav. *Plant Physiology* 66:566
- Konze JR, Kende H.** 1979. Ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in homogenates of etiolated pea seedlings. *Planta* 146:293
- Konze JR, Kwiatowski GMK.** 1981. Enzymatic ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by manganese, a protein fraction and a cofactor of etiolated pea shoots. *Planta* 151:320
- Kuai J, Dillea DR.** 1992. Extraction, partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase from apple fruit. *Postharvest Biol Technol* 1:203
- Kushad MM, Richardson DG, Ferro AJ.** 1983. Intermediates in the recycling of 5-methylthioribose to methionine in fruits. *Plant Physiol* 73:257

- Laing WA, Ogren WL, Hageman RM.** 1975. *Biochemistry* 14:2269
- Lamoreaux G, Gouot JM, Davis DG, Rusness DG.** 1981. Pentachloronitrobenzene metabolism in peanut. 3. Metabolism in peanut cell suspension cultures. *J Agric Food Chem* 29:996
- Latché A, Dupille E, Rombalidi C, et al.** 1993. Purification, characterization and subcellular localization of ACC oxidase from fruits. *Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene*. . Pech JC, Latché A, Balagué C, editors. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: p. 39
- Lau OL, Yang SF.** 1973. Mechanism of a synergistic effect of kinetin on auxin-induced ethylene production: supression of auxin conjugation. *Plant Physiol* 51:1011
- Lau OL, Yang SF.** 1976. Inhibition of ethylene production by cobaltous ion. *Plant Physiology* 58:114
- Legge RL, Tompson JE.** 1983. Involvement of hydroperoxides dne ACC-derived free radical in the formation of ethylene. *Phytochemistry* 22:2161
- Leslie CA, Romani RJ.** 1986. Salicylic acid: a new inhibitor of ethylene biosynthesis. *Plant Cell Reports* 5:144
- Leslie CA, Romani RJ.** 1988. Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid. *Plant Physiology* 88:833
- Lieberman M.** 1979. Biosynthesis and action of ethylene. *Ann Rev Plant Physiol* 30:533
- Lincoln JE, Cordes S, Read E, Fisher RL.** 1987. Regulation of gene expression by ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit development. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2793
- Lincoln JE, Fisher RL.** 1988. Diverse mechanism for the regulation of ethylene-inducible gene expression. *Mol Gen Genet* 212:71
- Liu Y, Hoffman NE, Yang SF.** 1983. Relationship between the malonylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and D-amino acids in preclimacteric tomato fruit. *Planta* 158:437
- Liu Y, Hoffman NE, Yang SF.** 1985a. Promotion by ethylene of the capability to convert 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in preclimacteric tomato and cantaloupe fruits. *Plant Physiol* 77:407
- Liu Y, Su LY, Yang SF.** 1985b. Ethylene promotes the capability to malonylate 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and D-amino acids in preclimacteric tomato fruits. *Plant Physiol* 77:891
- Lizada MC, Yang SF.** 1979. A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal. Biochem* 100:140

- Looney NE, McGlasson WB, Coombe BG.** 1974. Control of fruit ripening in peach, *Prunus persica*: action of succinic acid-2, dimethyl hydrazide and (2-chloroethyl)phosphonic acid. *Austral J Plant Physiol* 1:77
- Lürssen K, Naumann K, Schröder R.** 1979. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid. An intermediate of the ethylene biosynthesis in higher plants. *Z Pflanzenphysiol* 92:285
- Lynch DU, Sridhara S, Thompson JE.** 1985. Lipoxygenase generated hydroperoxydes account for the nonphysiological features of ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by microsomal membrane of carnations. *Planta* 164:121
- Mandawa NB.** 1988. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annu Rev Plant Physiol* 39:23
- Mansour R, Latché A, Pech JC.** 1982. Extraction et dosage de l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique, précurseur de l'éthylène, dans la pomme Golden Delicious. Mise en évidence de gradients. *Fruits* 37:785
- Mapson LW, March JF, Rhodes MJC, Wooltorton LSC.** 1970. A comparative study of the ability of methionine or linolenic acid to act as precursors of ethylene in plant tissues. *Biochem J* 117:473
- Mapson LW, Robinson JE.** 1966. Relation between oxygen tension, biosynthesis of ethylene, respiration and ripening changes in banana fruit. *J Food Technol* 1:215
- Marei N, Crane JC.** 1971. Growth and respiratory response of fig (*Ficus carica* L. cv. Mission) fruit to ethylene. *Plant Physiol* 48:249
- Marei N, Romani R.** 1971. Ethylene stimulated synthesis of ribosomes, RNA and protein in developing fig fruits. *Plant Physiol* 48:806
- Martell AE.** 1982. *Ascorbic acid: Chemistry, Metabolism and Uses*. . Seib PA, Tolbert BM, editors. American Chemical Society, Washington: p. 153
- Mattoo AK, Achilea O, Rodes Y, Chalutz E.** 1982. Membrane association and some characteristics of the ethylene forming enzyme from etiolated pea seedlings. *Biochem Biophys Res Comm* 105:271
- Mattoo AK, Baker JE, Chalutz E, Lieberman M.** 1977. Effect of temperature on the ethylene-synthesizing systems in apple, tomato and *Penicillium digitatum*. *Plant Cell Physiol* 18:715
- Mattoo AK, White WB.** 1991. Regulation of ethylene biosynthesis. *The Plant Hormone Ethylene* 3. . Mattoo AK, Suttle JC, editors. CRC press, Boca Raton, FL. p. 21
- Maunder MJ, Holdworth MJ, Slater A, Knapp JE, Bird CR, Schuch W, Grierson D.** 1987. Ethylene stimulates the accumulation of ripening-related mRNAs in tomatoes. *Plant Cell Environ* 10:177

- Maxie EC, Catlin PB, Hartmann HT.** 1960. Respiration and ripening of olive fruit. *Proc Am Soc Hort Sci* 75:275
- Maxie EC, Eaks IL, Sommer NF, Rae HL, El-Batal S.** 1965. Effects of gamma radiation rate to ethylene and CO₂ evolution by lemon fruit. *Plant Physiol* 40:407
- Maxie EC, Mitchell FG, Sommer WF, Snyder RG, Rae HL.** 1974. Effect of elevated temperature on ripening of Bartlett pear (*Pyrus communis* L.). *J Am Soc Hort Sci* 99:344
- Mayak S, Borochoy A.** 1984. Nonosmotic inhibition by sugars of the ethylene-forming activity associated with microsomal membranes from carnation petals. *Plant Physiol* 76:191
- Mayak S, Legge RL, Thompson JE.** 1981. Ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by microsomal membranes from senescing carnation flowers. *Planta* 153:49
- Mayne RG, Kende H.** 1986. Ethylene biosynthesis in isolated vacuoles of *Vicia faba* L. requirement for membrane integrity. *Planta* 167:159
- McGarvey D, Christoffersen RE.** 1992. Characterization and kinetic parameters of ethylene-forming enzyme from avocado fruit. *J Biol Chem* 267:5964
- McGlasson WB.** 1985. Ethylene and fruit ripening. *HortScience* 20:51
- McGlasson WB, Wade NL, Adato I.** 1978. I. Phytohormones and fruit ripening. *Phytohormones and related compounds: a comprehensive treatise*. Letham DS, Goodwin PB, Higgin TJV, editors. Elsevier, Amsterdam: p. 447
- McKeon T, Hoffman NE, Yang SF.** 1982. The effect of plant hormone pretreatments on ethylene production and synthesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in water-stressed leaves. *Planta* 155:437
- McKeon TA, Yang SF.** 1984. A comparison of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid stereoisomers to 1-butene by pea epicotyls and by a cell free system. *Planta* 160:84
- McMahon D.** 1985. Cycloheximide is not a specific inhibitor of protein synthesis in vivo. *Plant Physiol* 55:815
- McMurchie EJ, McGlasson WB, Eaks IL.** 1972. Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature (London)* 237:497
- McRae DG, Baker JE, Thompson JE.** 1982. Evidence for involvement of the superoxide radical in the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic to ethylene by pea microsomal membranes. *Plant Cell Physiol* :375

- McRae DG, Cocker JA, Legge R, Thompson JE.** 1983. *Plant Physiology* 73:784
- Mehta AM, Jordan RL, Anderson JD, Mattoo AK.** 1988. Identification of a unique isoform of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8810
- Meigh DF.** 1960. *J Sci Food Agrig* 11:381
- Meigh DF, Jones D, Hulme AC.** 1967. The respiration climacteric in the apple. Production of ethylene and fatty acids in fruit attached and detached from the tree. *Phytochemistry* 6:1507
- Meir S, Philosoph-Hadas S, Aharoni N.** 1984. Role of IAA conjugates in inducing ethylene production by tobacco leaf disc. *J Plant Growth Regul* 3:169
- Meir S, Philosoph-Hadas S, Epstein E, Aharoni N.** 1985. Carbohydrates stimulate ethylene production in tobacco leaf discs. I. Interaction with auxin and the relatio to auxin metabolism. *Plant Physiol* 78:131
- Metlitskii LV, Sal'kova EG, Marcellin P.** 1977. Biochemical and biophysical aspects of controlled atmosphere storage of fruits (survey). *Appl Biochem Microbiol* 13:265
- Miller JM, Conn EE.** 1980. Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants. *Plant Physiol* 65:1199
- Mitchell T, Porter AJR, John P.** 1988. Authentic activity of the ethylene-forming enzyme observed in membranes obtained from kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *New Phytol* 109:313
- Miyazaki JH, Yang SF.** 1987. The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. *Physiol Plant* 69:366
- Morgan PW and Hall WC.** 1962. Effects of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid on the production of ethylene by cotton and grain sorghum. *Physiol Plant* 15:420
- Moya-León MA, John P.** 1994. Activity of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase (ethylene-forming enzyma) in the pulp and peel of ripening bananas. *Journal of Horticultural Science* 69:243
- Muñoz-Rueda, P.** 1995. Estudio de las rutas biosintéticas de etileno y poliaminas durante la germinación de semillas termoinhibidas de *Cicer arietinum* L. Universidad de Granada.
- Muñoz-Rueda P, Gallardo M, Matilla AJ, Sánchez-Calle IM.** 1995. Preliminary characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase properties from embryonic axes of chick-pea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *Journal of Experimental Botany* 46:695
- Murr DP, Yang SF.** 1975. Inhibition of in vivo conversion of methionine to ethylene by L-canaline and 2,4-dinitrophenol. *Plant Physiol* 55:79

- Nakagawa N, Mori H, Yamzaki K, Imaseki H.** 1991. Cloning of a complementary DNA for auxin-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and differential expression of the gene by auxin and wounding. *Plant Cell Physiol* 32:1153
- Nakagawa N, Nakajima N, Imaseki H.** 1988. Immunochemical difference of wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from the auxin-induced enzyme. *Plant Cell Physiol* 29:1255
- Nakajima N, Mori H, Yamazaki K, Imaseki H.** 1990. Molecular cloning and sequence of a complementary DNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase induced by tissue wounding. *Plant Cell Physiol* 31:1021
- Nakayama M, Ota Y.** 1983. Physiological function of ethylene and low pressure storage of apple. *Japan Agr.Res.Quart.* 17:30
- Neljubow D.** 1901. Ueber die horizontale Nutation der Stengel von *Pisum sativum* und einiger anderer. *Pflanzen Beih Bot Zentralbl* 10:128
- Nijenhuis-De vries MA, Woltering EJ, De Vrije T.** 1994. Partial characterization of carnatio petal 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase. *Plant Physiology* 144:549
- Odawara S, Watanabe A, Imaseki H.** 1977. Involvement of cellular membrane in regulation of ethylene production. *Plant Cell Physiology* 18:569
- Oeller PW, Min-Wong L, Taylor LP, Pike DA, Theologis A.** 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254:437
- Olson DC, White JA, Edelman L, harkins RW, Kende H.** 1991. Differential expression of two genes for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato fruits. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5340
- Ortiz de Montellano PR, Reich NO.** 1986. Inhibition of cytochrome P-450 enzymes. *Cytochrome P-450 structure, mechanism and biochemistry*. . Ortiz de Montellano PR, editors. Plenum Press, New York: p. 273
- Park KY, Drory A, Woodson WR.** 1992. Molecular cloning of an 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from senescing carnation petals. *Plant Mol Biol* 18:377
- Peacock BC.** 1972. Role of ethylene in the initiation of fruit ripening. *Queens I J Agric Anim Sci* 29:137
- Peiser G, Wang TT, Hoffman NE, Yang SF.** 1983. Evidence for ¹⁴CN- formation from (1-¹⁴C)-ACC during in vivo conversion of ACC to ethylene. *Plant Physiol Suppl* 72
- Peiser GD, Wang TT, Hoffman NE, Yang SF, Liu HW, Walsh CT.** 1984. Formation of cyanide from carbon 1 of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during its conversion to ethylene. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3059

- Peñarrubia L, Aguilar M, Margossian L, Fisher RL.** 1992. An antisense gene stimulates ethylene hormone production during tomato fruit ripening. *Plant Cell* 4:681
- Perry D, Abraham EP, Baldwin JE.** 1988. *Biochem J* 255:345
- Philosoph-Hadas S, Meir S, Aharoni N.** 1983. Carbohydrates stimulate ethylene biosynthesis in tobacco leaf discs. *Plant Physiol Suppl* 72:121
- Philosoph-Hadas S, Meir S, Aharoni N.** 1985. Autoinhibition of ethylene production in tobacco leaf disc: enhancement of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid conjugation. *Physiol Plant* 63:431
- Philosoph-Hadas S, Meir S, Pasis E, et al.** 1989. Hormone-enhanced ethylene production in leaves. *Biochemical and Physiological Aspects of the ethylene production in lower and Higher Plants*. . Clijsters Hea, editors. Kluwer Academic Publishers, p. 135
- Picton S, barton SL, Bouzayen M, Hamilton AJ, Grierson D.** 1992. Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. *Plant J*
- Pirrung MC, Kaiser LH, Chen J.** 1993. Purification and properties of the apple fruit ethylene-forming enzyme. *Biochemistry* 32:7445
- Pirrung MCC.** 1983. Ethylene biosynthesis. 2. Stereochemistry of ripening, stress and model reaction. *J Am Chem Soc* 105:7207
- Pirrung MCC.** 1986. Mechanism of a lipoxygenase model for ethylene biosynthesis. *Biochemistry* 25:114
- Poneleit LS, Dilley DR.** 1993. Carbon dioxide activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase in ethylene biosynthesis. *Postharvest Biol Technol* 3:191
- Porter AJR, Borlakoglu JT, John P.** 1986. Activity of the ethylene forming enzyme in relation to plant cell structure and organization. *J Plant Physiol* 125:207
- Pratt HK.** 1971. Melons. *The Biochemistry of fruits and their products*. . Hulme AC, editors. Academic Press, London and New York: p. 207
- Pratt HK, Goeschl JD.** 1969. Physiological roles of ethylene in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 20:541
- Privalle LS, Graham JS.** 1987. Radiolabeling of a wound-inducible pyridoxal phosphate-utilizing enzyme: evidence for its identification as ACC synthase. *Arch Biochem Biophys* 253:333
- Quintana EG, Nanthachai P, Hiranpradit H, et al.** 1984. Changes in mango during growth and maturation. *Mango: Fruit Development, Postharvest Physiology and Marketing in ASEAN*. . Mendosa DB, Wills RBH, editors. ASEAN Food Handling Bureau, Kuala Lumpur: p. 25

- Ramalingam K, Lee KM, Woodard RW, Bleecker AB, Kende H.** 1985. Stereochemical course of the reaction catalyzed by the pyridoxal phosphate-dependent enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7820
- Reid MS, Pratt HK.** 1970. *Nature (London)* 226:976
- Reid MS, Rhodes MJC, Hulme AC.** 1973. Changes in ethylene and carbon dioxide during the ripening of apples. *J Sci Food Agric* 24:971
- Rhodes MJC.** 1970. The climacteric and ripening of fruits. *The biochemistry of Fruits and their Products*. Hulme AC, editors. Academic Press, London: p. 521
- Riov J, Dagan E, Goren R, Yang SF.** 1990. Characterization of abscisic acid-induced ethylene production in citrus leaf and tomato fruit tissues. *Plant Physiol* 92:48
- Riov J, Yang SF.** 1982. Autoinhibition of ethylene production in citrus peel discs. Suppression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthesis. *Plant Physiology* 69:687
- Riov J, Yang SF.** 1982. Effects of exogenous ethylene on ethylene production in citrus leaf tissue. *Plant Physiology* 70:136
- Riov J, Yang SF.** 1989. Ethylene and auxin-ethylene interaction in adventitious root formation in mung bean (*Vigna radiata*) cuttings. *J Plant Growth Regul* 8:131
- Romani RJ.** 1975. *Facteurs et Régulation de la Maturation des fruits*. p. 229
- Rombaldi C, Petitprez M, Cleyet-Marel JC, et al.** 1993. Immunocytological characterization of ACC oxidase in transgenic grape cells. *Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene*. Pech JC, Latché A, Balagué C, editors. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: p. 96
- Rottmann WH, Peter GF, Oeller PW, Keller JA, Shen NF.** 1991. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. *J Mol Biol* 222:937
- Sacher JA.** 1973. Senescence and Postharvest Physiology. *Annu Rev Plant Physiol* 24:197
- Sagee O, Goren R, Riov J.** 1980. Abscission of citrus leaf explants: interrelationships of abscisic acid, ethylene and hydrolytic enzymes. *Plant Physiol* 66:750
- Sakai S, Imaseki H.** 1971. Auxin-induced ethylene production by mung bean hypocotyl segments. *Plant Physiol* 12:349
- Salunkhe DK, Desai BB.** 1984. *Postharvest Biotechnology of fruits*. CRC Press. Boca Raton, FL. 123p.

- Salveit MEJ, Bradford KJ, Dilley DR.** 1978. *J Am Soc Hort Sci* 103:472
- Salveit MEJ, Dilley DR.** 1978. Rapidly induced wound ethylene from excised segments of etiolated *Pisum sativum* cv. Alaska II. Oxygen and temperature dependency. *Plant Physiology* 61:675
- Saniewski M, Czapski J.** 1985. Stimulatory effect of methyl jasmonate on the ethylene production in tomato fruit. *Experientia* 41:256
- Sanz LC, Fernández-Maculet JCG, E., Vioque B, Olías JM.** 1993. Effect of methyl jasmonate on ethylene biosynthesis and stomatal closure in olive leaves. *Phytochemistry* 33:285
- Sato T, Oeller PW, Theologis A.** 1991. The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase of *Cucurbita*. Purification, properties, expression in *Escherichia coli*, and primary structure determination by DNA sequence analysis. *J Biol Chem* 266:3752
- Sato T, Theologis A.** 1989. Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6621
- Satoh S, Esashi Y.** 1980. α -Aminoisobutyric acid: a probable competitive inhibitor of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. *Plant Cell Physiology* 21:939
- Satoh S, Esashi Y.** 1982. Effects of α -aminoisobutyric acid and D- and L-amino acids on ethylene production and content of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in cotyledonary segments of cocklebur seeds. *Physiol Plantarum* 54:147
- Satoh S, Esashi Y.** 1983. Alpha-aminoisobutyric acid, propyl gallate and cobalt ion and the mode of inhibition of ethylene production by cotyledonary segments of cocklebur seeds. *Plant Physiology* 57:521
- Satoh S, Esashi Y.** 1986. Inactivation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase of etiolated mung bean hypocotyl segments by its substrate, S-adenosyl-L-methionine. *Plant Cell Physiol* 27:285
- Satoh S, Yang SF.** 1988. S-adenosylmethionine-dependent inactivation and radiolabeling of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase isolated from tomato fruits. *Plant Physiol* 88:109
- Schwarz A.** 1991. A trial of cold storage of pears in controlled atmosphere. V Beurel Bosc. *Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture* 23:157
- Serrano M, Amorós A, Riquelme F, Romojaro F.** 1990. Study of the ethylene forming enzyme in kiwi vesicles. I. Characterization of the enzyme in vitro. *Rev Agroquim Tecnol Alim* 30:59
- Serrano M, Riquelme F, Romojaro F.** 1990. Study of the ethylene forming enzyme in kiwi vesicles. II. Effects of inhibitors and temperature. *Rev Agroquim Tecnol Alim* 30:68

- Shimokawa K.** 1983. An ethylene forming enzyme in citrus unshiu fruits. *Phytochemistry* 22:1903
- Shiota H.** 1990. Changes in the volatiles composition of "La France" pear during maturation. *J Sci Food Agric* 53:421
- Sisler EC, Goren R, Hunberman M.** 1985. Effects of 2,5-norbornadiene on abscission and ethylene production in citrus leaf explants. *Physiol Plant* 63:114
- Sitrit Y, Blumenfeld A, Riov J.** 1987. Ethylene biosynthesis in tissue of young and mature avocado fruits. *Physiol.Plant.* 69:504
- Skorupka H.** 1985. Effect of stress factors on the formation and metabolism of ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Int.Workshop Physiol.Biochem.stressed plants.* AnonymousGSF-Ber, p. 121
- Slater A, Maunders MJ, Edwards K, Schuch W, Grierson D.** 1985. Isolation and characterization of cDNA clones for tomato polygalacturonase and other ripening-related proteins. *Plant Mol Biol* 5:137
- Slocum RD, Kaur-Sawhney R, Galston AW.** 1984. The physiological biochemistry of polyamines in plants. *Arch Biochem Biophys* 235:283
- Smith CJS, Slater D, Grierson D.** 1986. Rapid appearance of an mRNA correlated with ethylene synthesis encoding a protein of molecular weight 35000. *Planta* 168:94
- Smith JJ, John P.** 1993. Maximizing the activity of the ethylene-forming enzyme. *Cellular and Molecular Apects of the Plant Hormone Ethylene.* . Pech JC, Latché A, Balagué C, editors.Kluwer Academic, Dordrecht: p. 33
- Smith JJ, Ververidis P, John P.** 1992. Characterization of the ethylene-forming enzyme partially purified from melon. *Phytochemistry* 31:1485
- Smith JJ, Zhang ZH, Schofield CJ, John P, Baldwin JE.** 1994. Inactivation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase. *Journal of Experimental Botany* 45:521
- Smith VA, Gaskin P, MacMillan J.** 1990. *Plant Physiology* 94:1390
- Sobolewska J and Plich H.** 1986. The effect of inorganic phosphate on the ethylene production in tomato and apple fruits. *Biol Plant (Prague)* 28:95
- Sapnu P, Reinhardt D, Boller T.** 1991. Analysis and cloning of the ethylene forming enzyme from tomato by functional expresion of its mRNA in *Xenopus laevis* oocytes. *EMBO J.* 10:2007

- Strachan CC, Moys AW, Atkinson FE, Britton JE.** 1951. Chemical composition and nutritive value of British Columbia tree fruits. *Publ Can Dep Agr*
- Su LY, Liu Y, Yang SF.** 1985. Relationship between 1-aminocyclopropane-1-carboxylate malonyltransferase and D-amino acids malonyltransferase. *Phytochemistry* 21:1141
- Su LY, McKeon T, Grierson D, Cantwell M, Yang SF.** 1984. *HortScience* 19:576
- Suttle JC.** 1981. Effect of polyamines on ethylene production. *Phytochemistry* 20:1477
- Tan ZY, Thimann KV.** 1989. The roles of carbon dioxide and abscisic acid in the production of ethylene. *Physiol Plant* 75:13
- Tian MS, Hewett EW, Lill RE.** 1994. Effects of carbon dioxide on ethylene-forming enzyme in Japanese pear and apple. *Postharvest Biol Technol* 4:1
- Tophof S, Martinoia E, Kaiser G, Hartung W, Amrhein N.** 1989. Compartmentation and transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and N-malonyl-1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in barley and wheat mesophyll cells and protoplast. *Physiol Plantarum* 75:333
- Trebitsh T, Riov J.** 1987. Inhibition of activity of ethylene forming enzyme by α (para-chlorophenoxy)isobutyric acid. *J Plant Growth Regul* 5:207
- Trewavas AJ.** 1981. How do plant growth work. *Plant Cell Environ* 4:203
- Tsai DS, Arteca RN.** 1984. Inhibition of IAA induced ethylene production in etiolated mung bean hypocotyl segments by 2,3,5-triiodobenzoic acid and 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic acid. *Physiol Plantarum* 62:448
- Tucker GA, Grierson D.** 1987. *The biochemistry of Plants*. . Davies DD, editors. Academic Press, New York: p. 265
- Vahatalo ML, Virtanen AI.** 1957. A new cyclic alpha-aminocarboxylic acid in berries of cowberry. *Acta Chem Scand* 11:741
- Van Der Straeten D, Van Wiemeersch L, Goodman HM, Van Montagu M.** 1989. Purification and partial characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from tomato pericarp. *Eur J Biochem* 182:639
- Van Der Straeten D, Van Wiemeersch L, Goodman HM, Van Montagu M.** 1990. Cloning and sequence of two different cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4859

- Vangonsveld J, Clijsters H, Van Poucke M.** 1988. Phytochrome-controlled ethylene biosynthesis of intact etiolated bean seedlings. *Planta* 174:19
- Vendrell M, McGlasson WB.** 1971. Inhibition of ethylene production in banana fruit tissue by ethylene treatment. *Aust J Biol Sci* 24:855
- Ververidis P, John P.** 1991. Complete recovery in vitro of ethylene forming enzyme activity. *Phytochemistry* 30:725
- Vinkler C, Apelbaum A.** 1984. Conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in submitochondrial particles isolated from plants. Characterization of the system. *FEBS Letters* 167:64
- Vioque A, Albi MA.** 1975. Elementos traza y abscisión de la aceituna. *Grasas y Aceites* 20:73
- Vioque A, Albi MA, Vioque B.** 1981. Role of IAA-oxidase in the formation of ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Phytochemistry* 20:1473
- Vioque B, Castellano JM.** 1994. Extraction and biochemical characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase from pear. *Physiol Plant* 90:334
- Vioque B, Castellano JM.** 1994. Recuperación in vitro de ACC oxidasa de frutos de pera (*Pyrus communis* cv. Blanquilla). *Rev Esp Cienc Tecnol Alim* 34:643
- Vioque B, Fernández-Maculet JC.** 1990. 3-Hydroxypropyl amide formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by a cell-free ethylene-forming system from olive leaves. *Physiol Plantarum* 79:487
- Vioque B, Vioque A.** 1985. Acción del sistema indolacético oxidasa/peroxidasa del olivo sobre el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico. *Grasas y Aceites* 36:35
- Visser T, Sharp AA, De Vries DP.** 1968. Acidity and sweetness in apple and pear. *Euphytica* 17:153
- Walsh CT.** 1979. *Enzymatic Reaction Mechanism*. Freeman, San Francisco: p. 823
- Wang CY, Adams DO.** 1982. Chilling-induced ethylene production in cucumbers (*Cucumis sativus* L.). *Plant Physiol* 69:424
- Wang CY, Mellethin WH.** 1972. *Plant Physiology* 50:311
- Wang CY, Mellethin WH, Hansen E.** 1972. Maturation of 'Anjou' pears in relation to chemical composition and reaction to ethylene. *J Am Soc Hort Sci* 97:9

- Wang SY, Adams DO, Lieberman M.** 1982. Recycling 5'-methylthio-adenosine ribose carbon into methionine in tomato tissue in relation to ethylene production. *Plant Physiol*- 70:117
- Watada AE, Herner RC, Kader AA, Romani RJ, Staby GL.** 1984. Terminology for the description of developmental stages of horticultural crops. *HortScience* 19:20
- Watkins CB, Frenkel C.** 1987. Inhibition of pear fruit ripening by mannose. *Plant Physiol* 85:86
- White JA, Kende H.** 1990. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase: are there charge and size variants in tomato. *J Plant Physiol* 136:646
- Williams AA, Lea AGH, Timberlake CF.** 1977. Measurements of flavor quality in apple, apple juices and fermented ciders. Flavor quality: Objective measurement. *ACS Symp Ser* 51:71
- Wills RBH, McGlasson WB, Graham D, et al.** 1989. *Postharvest: An introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables*. . Wills RBH, editor. BSP Professional Books. Melbourne:
- Woodson WR and Lawton KA.** 1987. Ethylene-induced gene expression in carnation petals: relationship to autocatalytic ethylene production and senescence. *Plant Physiol* 87:498
- Woodson WR, Park KY, Drory A, Larsen PB, Wang H.** 1992. Expression of ethylene biosynthetic pathway transcripts in senescing carnation flowers. *Plant Physiol* 99:526
- Yang SF.** 1981. Biosynthesis of ethylene and its regulation. *Recent Advances in the Biochemistry of Fruit and Vegetables*. . Friend J, Rhodes MJC, editors. Academic Press, London: p. 89
- Yang SF.** 1984. The formation of ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Ethylene. Biochemical, physiological and applied aspects*. . Fuchs Y, Chalutz E, editors. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers,
- Yang SF, Adams DO, Lizada C, et al.** 1980. Mechanism and regulation of ethylene biosynthesis. *Plant Growth Substances*. . Skoog F, editors. Springer verlag, Berlin: p. 219
- Yang SF, Hoffman NE.** 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol* 35:155
- Yip WK, Dong JC, Yang SF.** 1991. Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from apple fruits. *Plant Physiology* 95:251
- Yip WK, Dong JG, Kenny JW, Thompson GA, Yang SF.** 1990. Characterization and sequencing of the active site of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4859

- Yip WK, Jiao X-Z, Yang SF.** 1988. Dependence of in vivo ethylene production on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content and oxygen concentrations. *Plant Physiology* 88:553
- Yip WK, Moore T, Yang SF.** 1992. Differential accumulation of transcripts for four tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase homologs under various conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2475
- Yip WK, Yang SF.** 1986. Effect of thidiazuron, a cytokinin-active urea derivative, in cytokinin-dependent ethylene production systems. *Plant Physiology* 80:515
- Yip WK, Yang SF.** 1988. Cyanide metabolim in relation to ethylene production in plant tissues. *Plant Physiol.* 88:473
- Yoshii H, Imaseki H.** 1981. Biosynthesis of auxin-induced ethylene, effects of indole-3-acetic acid, benzyladenine and abscisic acid on endogenous levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and ACC synthase. *Plant Cell Physiol* 22:369
- Yoshii H, Imaseki H.** 1982. Regulation of auxin-induced ethylene biosynthesis. Repression of inductive formation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase by ethylene. *Plant Cell Physiol* 23:639
- Young RE, Romani RJ, Biale JB.** 1962. *Plant Physiol* 37:416
- Yu Y, Yang SF, Corse J, Kuhnle JA, Hua SS.** 1981. Structures of cytokinins influence synergistic production of ethylene. *Phytochemistry* 20:1191
- Yu YB, Adams DO, Yang SF.** 1979. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 198:280
- Yu YB, Adams DO, Yang SF.** 1980. Inhibition of ethylene production by 2,4-dinitrophenol and high temperature. *Plant Physiology* 66:286
- Yung KH, Yang SF, Schlenk F.** 1982. Methionine synthesis from 5-methylthioribose in apple tissue. *Biochem Biophys Res Comm* 104:771
- Zeroni M, Galil J, Ben Yehoshua S.** 1976. Autoinhibition of ethylene formation in nonripening stages of the fruit of sycamore fig (*Ficus sycomorus* L.). *Plant Physiol* 57:647
- Zhang Z, Schofield CJ, Baldwin JE, Thomas P, John P.** 1995. Expression, purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from tomato in *Escherichia coli*. *Biochem J* 307:77

José María Castellano Orozco
Extracción) conservación del sistema
Acido 1-amino-2-propano 1-carboxílico (ACC)
óxido de zinc (ZnO común) cv. Blaupunkt
Apto con lente

17 Octubre

Alfonso P.

Diego

75
Antonio

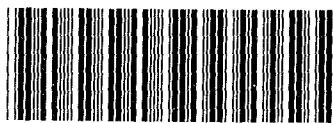
~~Alfonso~~

Catalina

Alfonso



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672120