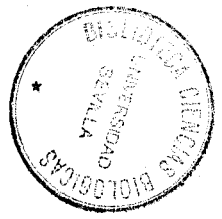


TD  
590

R. 9405



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA

LA CONVERSION DEL ACIDO 1-AMINOCICLOPROPANO-1-CARBOXILICO  
(ACC) EN ETILENO EN HOJAS DE OLIVO (*Olea europaea* L. cv.  
Picual). METABOLISMO DEL ETILENO.

Juan Carlos Fernández Maculet

142

123

*Juan Carlos Fernández Maculet*

Trabajo presentado para optar al  
grado de Doctor por la Facultad de  
Biología de Sevilla

Junio, 1990

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA

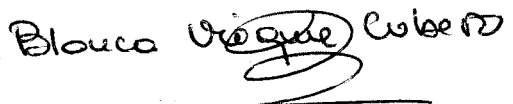
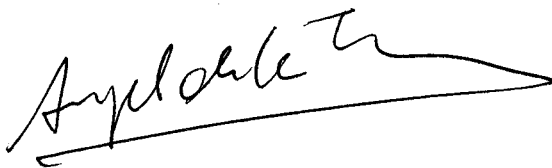
LA CONVERSION DEL ACIDO 1-AMINOCICLOPROPANO-1-CARBOXILICO  
(ACC) EN ETILENO EN HOJAS DE OLIVO (*Olea europaea* L. cv.  
Picual). METABOLISMO DEL ETILENO.

Trabajo presentado para optar al  
grado de Doctor en Ciencias por el  
Lcdo. JUAN CARLOS FERNANDEZ MACULET.

Sevilla, Junio 1990

El Tutor Ponente

El Director de la Tesis



Dr. Angel de la Torre Casas  
Prof. Titular de Biología  
Vegetal de la Facultad de  
Biología

Dra. Blanca Vioque Cubero  
Colaborador Científico  
del Insto. de la Grasa y  
sus Derivados (C.S.I.C.).

A mis padres, hermano y amigos

## AGRADECIMIENTO

- Al Instituto de la Grasa y sus Derivados del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, que ha puesto a mi disposición los instrumentos y materiales necesarios para la realización de este Trabajo.
- A todo su personal, con cuya colaboración conté siempre que fue solicitada, y en especial a los componentes de las Unidades Estructurales de Fisiología y Tecnología Postrecolección y de Caracterización y Calidad de los Alimentos.
- A la Junta de Andalucía por la concesión de la Beca de Formación de Personal Investigador para la realización de esta Tesis.
- A la Dra. Blanca Vioque Cubero, Colaborador Científico del Instituto de la Grasa, por su eficaz dirección y constante preocupación y desvelo.
- Al Dr. Angel de la Torre Casas, Profesor Titular de Biología Vegetal, ponente de esta Tesis.
- Al Prof. Agustín Vioque Pizarro por sus útiles sugerencias y comentarios.
- Así mismo deseo hacer constar mi agradecimiento al Dr. José Fernández-Bolaños Guzmán, Profesor Titular de Química Orgánica por la realización de los análisis de Resonancia Magnética Nuclear.

## INDICE

<u>INTRODUCCION Y OBJETIVOS</u> .....	1
<u>ANTECEDENTES</u> .....	5
1.- EL OLIVO.....	6
2.- IMPORTANCIA DEL ETILENO.....	7
2.1.- Efectos sobre el crecimiento y el desarrollo.....	7
2.2.- Efectos fitogerontológicos.....	8
2.3.- Efectos sobre el metabolismo.....	9
2.4.- Etileno de estrés.....	10
3.- EL ACIDO INDOL-3-ACETICO Y LAS PEROXIDASAS.....	11
3.1.- El ácido indol-3-acético.....	11
3.2.- Las peroxidases.....	12
3.3.- Relación auxina-etileno.....	14
4.- BIOSINTESIS DEL ETILENO.....	17
4.1.- Fuentes primarias de etileno en vegetales superiores.....	17
4.1.1.- Metionina como precursor.....	17
4.1.2.- Acido linolénico como precursor.....	18
4.2.- Ciclo de la metionina.....	18
4.2.1.- Ruta biosintética.....	18
4.2.2.- Reciclado.....	21
4.3.- Conjugación del ACC.....	22
4.4.- Regulación de la biosíntesis de etileno.....	26
4.4.1.- Regulación por poliaminas y hormonas.....	26
4.4.2.- Autorregulación.....	27
4.4.3.- Etileno inducido por estrés.....	28
4.4.4.- Regulación por la luz y el CO <sub>2</sub> .....	28
4.4.5.- Regulación por precursores.....	29

5.- LA CONVERSION DEL ACC EN ETILENO.....	30
5.1.- Características del EFE in vivo.....	30
5.2.- Sistemas libres de células descritos.....	34
5.3.- Mecanismos postulados a nivel molecular.....	37
6.- PEROXIDASAS Y BIOSINTESIS DE ETILENO.....	43
7.- METABOLISMO DEL ETILENO.....	49
7.1.- Características.....	50
7.2.- Significado fisiológico.....	51
<u>MATERIALES Y METODOS.....</u>	<u>54</u>
1.- MATERIAL VEGETAL.....	55
2.- OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO DE HOJAS DE OLIVO.....	56
2.1.- Obtención del extracto crudo.....	56
2.2.- Purificación parcial del extracto enzimático.....	56
2.3.- Hidratación de la PVP.....	57
2.4.- Separación de las fracciones proteicas y de bajo peso molecular de los extractos enzimáticos.....	58
3.- DETERMINACION DE PROTEINAS.....	59
4.- ACTIVIDAD AIA-OXIDASA.....	61
4.1.- Determinación de la actividad.....	61
4.2.- Extracción de los productos de oxidación.....	63
5.- SISTEMA FORMADOR DE ETILENO IN VITRO.....	64
6.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD EFE IN VIVO.....	65
7.- DETERMINACION DE ETILENO.....	66
8.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA.....	68

8.1.- In vitro.....	68
8.2.- In vivo.....	68
9.- DETERMINACION DEL CONTENIDO EN ACC.....	69
9.1.- Fundamento.....	69
9.2.- Extracción de los aminoácidos de los tejidos.....	70
9.3.- Cuantificación del ACC libre.....	72
9.4.- Cuantificación del malonil-ACC.....	72
10.- EXPERIENCIAS CON SULFURO DE CARBONO.....	74
10.1.- Tratamiento de los tejidos.....	74
10.2.- Determinación del sulfuro de carbono.....	74
11.- EXPERIENCIAS CON ACC RADIOACTIVO.....	75
11.1.- Composición de las incubaciones.....	75
11.2.- Determinación de la radiactividad.....	75
11.2.1.- Fase gaseosa.....	75
11.2.2.- Fase líquida.....	76
11.2.3.- Tejidos.....	76
11.3.- Separación de los productos radiactivos.....	78
11.4.- Síntesis de [2,3- <sup>14</sup> C]MACC.....	78
12.- DETECCION DE PEROXIDASAS SOLUBLES POR ISOELECTROENFOQUE	
DIRECTO (IEF) DE TEJIDOS.....	80
12.1.- Condiciones del IEF.....	80
12.2.- Preparación de las muestras.....	80
12.3.- Revelado del gel.....	81
12.3.1.- Tinción de peroxidasas.....	81
12.3.2.- Tinción de proteínas.....	82
12.4.- Cuantificación de las peroxidasas.....	82
13.- PRUEBAS QUIMICAS.....	84
13.1.- Cromatografías de capa fina.....	84
13.1.1.- Revelado con yodo.....	84
13.1.2.- Revelado con ninhidrina.....	84
13.1.3.- Revelado con fluorescamina.....	85

13.1.4.- Revelado con reactivo Sakai.....	85
13.1.5.- Revelado con verde de bromocresol.....	85
13.1.6.- Revelado con hexacianoferrato-nitroprusiato.....	85
13.1.7.- Revelado con 2,4-DNPH.....	86
13.2.- Preparación de derivados.....	86
13.2.1.- Metilación.....	86
13.2.2.- Derivatización con bromuro de <i>p</i> -fenilazofenacilo.....	86
13.2.3.- Derivatización con 2,4-DNPH.....	87
13.3.- Columnas de intercambio iónico.....	87
14.- PRUEBAS ESPECTROSCOPICAS.....	89
14.1.- Espectros de absorción en el ultravioleta.....	89
14.2.- Espectros de absorción en el infrarrojo.....	89
14.3.- Espectros de resonancia magnética nuclear.....	89
14.4.- Espectros de masas.....	90
<u>RESULTADOS Y DISCUSION</u> .....	91
1.- ESTUDIO DEL ENZIMA FORMADOR DE ETILENO DE HOJAS DE OLIVO.....	92
1.1.- Condiciones óptimas de incubación.....	93
1.1.1.- Medio de incubación.....	93
1.1.2.- Número y disposición de los discos.....	93
1.1.3.- El oxígeno como factor limitante.....	96
1.1.4.- Influencia del tipo de tapón.....	99
1.1.5.- El etileno de herida.....	101
1.1.6.- Temperatura óptima.....	105
1.2.- Características del EFE de hojas de olivo.....	107
1.2.1.- Evolución de la actividad enzimática durante el período de incubación.....	107
1.2.2.- Influencia de la concentración de sustrato. Cálculo de la $K_m$ .....	109
1.2.3.- Efecto de análogos estructurales.....	112
1.2.4.- Efecto de la aminoetoxivinilglicina.....	115



1.2.5.- Efecto de secuestradores de radicales libres.....	116
1.2.6.- Integridad de membranas.....	119
1.2.7.- Estudio del bajo rendimiento en la acti- vidad EFE.....	122
2.- RELACION ENTRE LAS ACTIVIDADES PEROXIDASA Y FORMADORA DE ETILENO IN VIVO.....	131
2.1.- Peroxidasas y EFE tras isoelectroenfoque.....	133
2.2.- Peroxidasas y EFE en hojas de distinta edad.....	138
2.3.- Evolución estacional de las actividades peroxidasa y EFE.....	140
3.- INFLUENCIA DEL JASMONATO DE METILO SOBRE LA BIOSINTESIS DE ETILENO IN VIVO.....	142
3.1.- Experiencias con hojas enteras.....	145
3.2.- Experiencias con discos de hojas.....	149
4.- METABOLISMO DEL ETILENO.....	153
5.- SISTEMA FORMADOR DE ETILENO IN VITRO.....	165
5.1.- Actividad enzimática.....	168
5.2.- Efecto de la concentración de sustrato. Cálculo de la $K_m$ .....	172
5.3.- Relación AIA-destruido-etileno formado.....	175
5.4.- Efecto del ACC y PLP sobre la actividad AIA- oxidasa.....	177
5.5.- Influencia del pH.....	179
5.6.- Efecto del ATP.....	181
5.7.- Efecto de análogos estructurales.....	183
5.8.- Efecto de inhibidores de reacciones del PLP.....	185
5.9.- Secuencia de la reacción.....	187
5.10.- Participación de radicales libres.....	191
5.11.- Mecanismo de formación de etileno in vitro.....	195

6.- FORMACION DE 3-HIDROXIPROPANO AMIDA A PARTIR DE ACC.....	198
6.1.- Características de la transformación.....	203
6.2.- Ensayos con [2,3- <sup>14</sup> C]ACC.....	208
6.3.- Caracterización del compuesto de R <sub>f</sub> 0.77 como 3- hidroxipropano amida.....	212
6.3.1.- Pruebas químicas.....	212
6.3.2.- Pruebas espectroscópicas.....	213
6.3.2.1.- Espectros de ultravioleta e in- frarrojo.....	213
6.3.2.2.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protones ( <sup>1</sup> H-RMN) y de carbono-13 ( <sup>13</sup> C-RMN).....	213
6.3.2.3.- Espectros de masas.....	220
6.4.- Mecanismo de formación de 3-hidroxipropano amida a partir de ACC.....	227
 7.- SIGNIFICADO FISIOLÓGICO DEL SISTEMA AIA-OXIDASA/PEROXI- DASA EN LA BIOSÍNTESIS DE ETILENO.....	232
 <u>CONCLUSIONES</u> .....	237
 <u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	242

## ABREVIATURAS

ACC	Acido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
AEC	Acido 1-amino-2-etilciclopropano-1-carboxílico
AIA	Acido indol-3-acético
AIB	Acido $\alpha$ -aminoisobutírico
AVG	Aminoetoxivinilglicina
BTMFA	Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CPA	Ciclopropilamina
CPC	Acido ciclopropanocarboxílico
DCP	Diclorofenol
DMSO	Dimetilsulfóxido-d <sub>6</sub>
DNP	Dinitrofenol
2,4-DNPH	2,4-Dinitrofenilhidracina
EFE	Enzima formador de etileno
GP	Galato de n-propilo
HIBA	Acido 4-hidroxi-2-imino-n-butírico
HPA	3-Hidroxipropano amida
HRP	Peroxidasa de rábano
IEF	Isoelectroenfoque
JA-Me	Jasmonato de metilo
KMB	Acido $\alpha$ -ceto- $\gamma$ -metiltiobutírico
MACC	Acido 1-(malonilamino)ciclopropano-1-carboxílico
MTA	5'-Metiltioadenosina
MTR	5'-Metiltiorribosa
PLP	Fosfato de piridoxal

PVP Polivinilpolipirrolidona

SAM S-Adenosilmetionina

TMS Tetrametilsilano

## INTRODUCCION Y OBJETIVOS

El papel preponderante del etileno como hormona de la maduración y senescencia de los vegetales es sobradamente conocido, regulando muchos aspectos de la fisiología de las plantas superiores tales como germinación, crecimiento, desarrollo y abscisión (Abeles 1973).

Los estudios bioquímicos y fisiológicos sobre su biosíntesis y modo de acción se han incrementado enormemente en los últimos años, quedando establecida su ruta biosintética en 1979 con el descubrimiento del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) como precursor inmediato de la hormona (Adams y Yang 1979, Lürssen et al. 1979); según el siguiente esquema:

Metionina ---> S-adenosilmetionina ---> ACC ---> Etileno

Conociéndose muchos detalles de la ruta biosintética y del mecanismo de formación de la hormona, la atención se ha centrado en resolver las numerosas cuestiones aún pendientes en la bioquímica del etileno, en temas como: regulación de su biosíntesis, inhibición de la misma, modo de acción de la hormona y naturaleza de algunos enzimas implicados.

Aunque se han realizado importantes progresos en el conocimiento del modo de acción del etileno y de su regulación, quedan todavía muchos puntos oscuros. Así, se tiene poca información sobre el enzima que cataliza la transfor-

mación del ACC en etileno. Este enzima, denominado enzima formador de etileno (EFE), no ha podido aún ser aislado y caracterizado in vitro.

En el año 1971 un grupo de investigadores del Instituto de la Grasa y sus Derivados inició el estudio de los procesos bioquímicos y fisiológicos que tienen lugar durante la abscisión de la aceituna. Dicho grupo centró su atención en el sistema enzimático ácido indolacético (AIA) oxidasa/peroxidasa, de amplia distribución en el reino vegetal y cuya implicación en los procesos de maduración, senescencia y abscisión era reconocida.

Tras el descubrimiento del ACC como precursor inmediato del etileno y teniendo en cuenta las propiedades encontradas para el sistema AIA-oxidasa/peroxidasa (Vioque et al. 1978a, b), este grupo de investigación propuso que este sistema enzimático podría actuar in vivo en el paso ACC ---> etileno (Vioque et al. 1981).

A partir de entonces son numerosos los trabajos aparecidos que relacionan las peroxidasas con el EFE (para revisión ver Boyer y De Jaegher 1986). No obstante, los datos aportados no son suficientemente consistentes y faltan evidencias claras para demostrar esta participación in vivo.

El conocimiento del control del crecimiento, maduración y senescencia de los vegetales resultaría trascendental para las prácticas hortofrutícolas y agrícolas. La apli-

cación de retardadores y aceleradores (tanto naturales como sintéticos) de estos procesos no tiene todavía gran difusión, debido sobre todo al desconocimiento de los mecanismos básicos de regulación y de las vías biosintéticas de las hormonas implicadas en dichos fenómenos.

Por todo ello, continuando con la línea de investigación iniciada, y a la vista de los escasos conocimientos existentes sobre la conversión del ACC en etileno, en cuanto a la naturaleza del EFE, las interacciones con otras hormonas y su relación con las peroxidasas, se han planteado en esta Tesis los siguientes objetivos:

- 1.- Estudio de las características del enzima formador de etileno in vivo, para lograr una mejor identificación del mismo.
- 2.- Profundización en el conocimiento de los mecanismos bioquímicos de la acción in vitro del sistema AIA-oxidasa/peroxidasa sobre el ACC liberando etileno. Con ello se pretende dilucidar si la hipótesis establecida por Vioque et al. en 1981 considerando dicho sistema como el activo fisiológicamente, cuestionada por diversos autores, puede recibir un apoyo decisivo o por el contrario debe ser rechazada.



**ANTECEDENTES**

## 1.- EL OLIVO

El material vegetal utilizado en las experiencias es el olivo (*Olea europaea* L.) y en concreto la variedad Picual, la más representativa del olivar andaluz, ya que ocupa un 44% de su superficie.

La gran importancia de este cultivo en la Comunidad Autónoma de Andalucía viene dada no sólo por su extensión (más de un tercio de las tierras cultivadas) y su producción (325.000 T de aceite y 100.000 T de aceituna de mesa en 1988), sino por el valor de las más de 300 millones de jornadas de trabajo que se consumen cada año en la recolección y elaboración de los productos derivados del olivar (López de la Puerta 1985, Junta de Andalucía 1988).

## 2.- IMPORTANCIA DEL ETILENO

El etileno es el compuesto orgánico insaturado más sencillo, gas en condiciones fisiológicas, que influye sobre el crecimiento de las plantas en concentraciones pequeñísimas, siendo sus efectos importantes desde el punto de vista científico y comercial (Yang y Hoffman 1984).

En 1901 Neljubow identificó al etileno como el activo componente del gas del alumbrado que causa la triple respuesta en el guisante etiolado: reducción de la elongación, engrosamiento del tallo y orientación horizontal. No obstante hasta 1934 no se tuvieron pruebas concluyentes de que el etileno era producido por vegetales (Gane 1934). Desde entonces se ha demostrado que casi todos los órganos de los vegetales superiores lo producen y que juega un papel importante en la regulación de múltiples procesos, que alcanzan desde la germinación a la senescencia (Abeles 1973).

### 2.1.- Efectos sobre el crecimiento y el desarrollo

El etileno puede ser considerado como un inhibidor del crecimiento ya que, en general, inhibe la elongación celular. Su acción produce además un engrosamiento de los tejidos puesto que no afecta a la entrada de agua en las células.

Esta acción inhibidora se traduce en fenómenos como la tigmomorfogénesis o disminución de la longitud e incremen-

to radial de internudos (Biro y Jaffe 1984), disminución de la formación de raíces adventicias y del tamaño de las mismas (Mullins 1972), inhibición de la elongación de tallos (Abdel-Rahman y Cline 1989), cierre del gancho terminal de tallos de semillas germinadas, epinastia, inhibición de la expansión foliar, etc. (Abeles 1973).

Otros aspectos del desarrollo están también bajo el control del etileno: dormancia de semillas, diageotropismo, hipertrofia de lenticelas, etc. Incluso el sexo de las flores unisexuales de plantas monoicas parece estar influenciado por esta hormona (Hume y Lovell 1983).

## 2.2.- Efectos fitogerontológicos

El etileno interviene en todos los procesos que conducen a la alteración de la estructura celular que preceden a la senescencia de tejidos vegetales.

Juega un papel crítico en la regulación de la senescencia de flores, y la máxima producción puede asociarse con el inicio de otros síntomas como marchitez, desorganización celular, etc. (Wang y Woodson 1989). Así mismo la senescencia de las hojas y la abscisión de órganos (frutos, flores, hojas) están estrechamente relacionadas con la evolución de los niveles endógenos de etileno y una aplicación exógena de la hormona acelera dichos procesos (Roberts et al. 1984).

La evidencia de la implicación del etileno en la maduración de frutos es irrefutable. En frutos climatéricos la maduración se caracteriza por una producción autocatalítica de etileno que provoca el "disparo" de las reacciones asociadas a dicho proceso, característica que no presentan los frutos no climatéricos. No obstante, un tratamiento con etileno de frutos no climatéricos inmaduros provoca la aparición de síntomas de maduración (Brady 1987).

### 2.3.- Efectos sobre el metabolismo

La exposición de tejidos vegetales a atmósfera de etileno promueve un aumento de la síntesis y actividad de un gran número de sistemas enzimáticos: fosfatasas, catalasa, celulasas, lipasas, polifenol oxidasas,  $\beta$ -1,3-glucanasa (Felix y Meins 1987), peroxidasas (Smith et al. 1983), etc.

La respiración es promovida o incrementada en muchos tejidos vegetales tras un tratamiento con etileno, siendo acompañada en frutos de desvertización, es decir degradación de clorofilas y aumento del contenido en carotenos y antocianinas (Abeles 1973).

A pesar de todo lo ya dicho, una de las más destacadas funciones del etileno reside en el control de los niveles endógenos de otras hormonas. Puede reducir los niveles de AIA o aumentarlos según el tipo de tejido y su estado fisiológico. La interacción entre estas dos hormonas

es un tema de gran interés para el estudio de los fenómenos de maduración y abscisión. También se ha demostrado que el etileno inhibe fuertemente el transporte basipétalo de auxinas (Suttle 1988).

#### 2.4.- Etileno de estrés

La tendencia de cualquier situación de estrés a promover la producción de etileno ha provocado la aceptación del término "etileno de estrés". Aunque el significado fisiológico de esta estimulación no está claro, se sabe que está asociado a tejido vivo ya que un daño severo provoca el cese de su síntesis. Entre las causas que inducen el etileno de estrés se encuentran: radiación, herida, infección, alta y baja temperatura, sequía, inundación y agentes contaminantes como metales, ozono, herbicidas, etc. (Yang y Hoffman 1984). Se ha propuesto que el etileno de estrés sería una respuesta adaptativa que capacitaría a las plantas a resistir situaciones adversas estimulando la inactivación de sustancias tóxicas (Liu et al. 1985). Esta hipótesis está apoyada por la conocida implicación del etileno en la resistencia de los tejidos heridos a celulasas (Geballe y Galston 1982) y en la activación de la quitinasa frente a invasiones fúngicas (Boller et al. 1983).

### 3.- EL ACIDO INDOL-3-ACETICO Y LAS PEROXIDASAS

#### 3.1.- El ácido indol-3-acético (AIA)

La idea de la existencia de sustancias promotoras del crecimiento (auxinas) en vegetales es muy antigua y ya en el siglo XVIII Sachs propuso que "sustancias formadoras de raíces son producidas en las hojas y desplazadas hacia los tallos". La identificación del ácido indol-3-acético (AIA) como auxina fue realizada en 1934 por Thimann y Skoog.

El AIA participa en la regulación de importantes fases de la vida de los vegetales superiores, no quedando su acción limitada a aquellos procesos que implican crecimiento o división celular. En general, se sintetiza en órganos jóvenes (hojas, brotes, yemas) y sufre un transporte basipétalo hacia otros órganos (Barceló et al. 1987). A nivel celular provoca un crecimiento en longitud (Cookson y Osborne 1979) a través de un mecanismo de inducción de síntesis de proteínas (Grierson et al. 1982). Muchos procesos de organogénesis como el desarrollo de nuevas raíces (Mato y Vieitez 1986), partenocarpia, etc. están también bajo control auxínico.

De alguna manera el AIA está asimismo implicado en los fenómenos de maduración y senescencia. Altos niveles de auxina provocan un aumento de la síntesis de etileno que a su vez reduce los contenidos de AIA por un mecanismo de retroalimentación negativa, promoviendo el disparo de la madura-

ción de frutos (Balagué et al. 1983) o de los procesos celulares que llevan a la senescencia de tejidos (Cook y Van Staden 1988).

Dada la importancia del AIA como fitohormona, la regulación de sus niveles endógenos tiene una indudable importancia fisiológica. En vegetales superiores existen dos mecanismos básicos, además del control de su biosíntesis, para regular el contenido en auxina: su conjugación con azúcares o aminoácidos y su oxidación por peroxidasas a través de la actividad AIA-oxidasa (Schneider y Wightman 1974), existiendo evidencias que muestran que este último sistema controla los niveles de AIA libre en los tejidos (Aharoni y Yang 1983, Sabater et al. 1983).

### 3.2.- Las peroxidasas

La importancia de las peroxidasas estriba en su capacidad de catalizar un amplio número de reacciones bioquímicas. Pocos enzimas han atraído tanta atención como ellas debido a su amplia distribución, versatilidad, gran número de isoformas, su aparente localización en cualquier parte de la célula, la increíble cantidad de sustratos y donantes de hidrógeno con los que pueden actuar y su variación en número y actividad durante los procesos fisiológicos (Gaspar 1986).

Kenten demostró en 1955 que el AIA puede ser degradado por peroxidasa purificada en ausencia de peróxido de



hidrógeno. Desde entonces muchos investigadores han profundizado en esta cuestión, quedando establecido que la oxidación de auxina por peroxidasas sirve para controlar la concentración de fitohormona in vivo, estando además ligada a la oxidación de otros sustratos adecuados tales como fenoles (Grambow 1986). Esta dualidad de funciones (peroxidasa/AIA-oxidasa) ha sido explicada en base a la presencia de dos centros activos en la misma proteína o a la existencia de diversos isoenzimas (unos con actividad peroxidasa y otros con actividad AIA-oxidasa). Hoy se piensa que distintos isoenzimas tienen diferente capacidad de destruir el AIA según su potencial de óxido-reducción y que en condiciones favorables todos pueden exhibir actividad AIA-oxidasa dependiendo de la presencia o ausencia de modificadores alostéricos (Rama Rao et al. 1982, Acosta et al. 1989).

Las auxinas pueden promover la secreción o liberación de enzimas específicos, entre ellos las peroxidasas. Esta secreción, localizada principalmente en la pared celular, puede influir profundamente en los procesos de crecimiento y desarrollo de los vegetales (Jones 1986).

El papel del sistema AIA-oxidasa/peroxidasa en los procesos de abscisión, maduración y senescencia parece ampliamente probado. Así en 1966 Schwertner y Morgan confirman que dicho sistema regula in vivo la abscisión del algodón, concluyendo que el mecanismo de control implica la destrucción del AIA vía AIA-oxidasa. Frenkel (1972) encuentra

asímismo un acusado aumento de la actividad AIA-oxidasa durante la maduración de peras y tomates. Por su parte Vioque y Albi (1975) demuestran que durante la maduración de las aceitunas se produce una acumulación de peroxidasas en la zona de abscisión de las mismas, correlacionándose dicha acumulación con la disminución de las fuerzas necesarias para desprender los frutos del árbol. A pesar de todo, la función precisa del sistema AIA-oxidasa/peroxidasa en estos procesos es controvertida debido a la ya comentada dualidad de actividades, que se presenta incluso a nivel de isoenzimas.

### 3.3.- Relación auxina-etileno

El hecho de que el AIA promueve la producción de etileno en tejidos vegetales fue descubierto inicialmente por Zimmerman y Wilcoxon (1935). En tejidos vegetativos, la síntesis de etileno parece estar regulada por los niveles de auxina libre. De acuerdo con esta hipótesis, los elevados niveles de etileno se asocian con tejidos ricos en AIA (Abeles 1973). Se ha observado también que en frutos en maduración el contenido en auxina crece 3-4 veces antes de iniciarse una elevada producción de etileno, decayendo luego a su nivel inicial (Mousdale y Knee 1981). No obstante en frutos no se encuentra la relación entre AIA libre y etileno que se da en tejidos vegetativos; se cree que la auxina actúa como disparador de la producción de etileno y más tarde se regularía su síntesis con independencia del contenido en AIA

(Roberts y Osborne 1981).

Kang et al. (1971) estudiaron la influencia de niveles supraóptimos de auxina ( $10^{-5}$ - $10^{-3}$  M) sobre la producción de etileno, encontrando que niveles altos de AIA son necesarios para estimular el "sistema formador de etileno", incrementándose su producción con el aumento de concentración de auxina. Asimismo se ha estudiado la regulación del etileno inducido por AIA en haba mung [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] y en guisante, donde la auxina estimula varios cientos de veces la liberación de etileno (Jones y Kende 1979).

Aunque Franklin y Morgan (1978) observaron un rápido incremento en la producción de etileno tras un tratamiento con AIA en segmentos de sorgo, la mayor parte de los investigadores (Lau et al. 1978, Konze et al. 1978, Yu y Yang 1979, Arteca et al. 1988) encuentran un período de inducción de horas o incluso de días entre el tratamiento con auxina y la estimulación de la producción de etileno. Estas diferencias en la respuesta de los tejidos a un tratamiento con auxina puede deberse a la utilización de distintas concentraciones de la hormona. Así Steen y Chadwick (1973) encuentran que la cicloheximida inhibe la producción de etileno inducida por auxina cuando se usan altos niveles ( $10^{-5}$  -  $10^{-4}$  M) de AIA, pero no si la concentración de AIA es de  $10^{-6}$  M. Esto significaría que a bajos niveles el AIA puede incrementar la producción de etileno *per se*, mientras que a concentraciones mayores la producción de etileno inducida por auxinas estaría

asociada con la síntesis de RNA y proteínas (Lieberman 1979).

La proteína sintetizada por inducción auxinica, el enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa, permite la formación del precursor inmediato del etileno (Yoshii e Imaseki 1982). Ahora bien, el hecho de que la producción de etileno decaiga rápidamente si se elimina el AIA del tejido pretratado o si se añade cicloheximida para inhibir una posterior síntesis de proteínas, lleva a la conclusión de que el producto inducido por auxina es bastante lábil (Imaseki et al. 1982), siendo necesaria una presencia continua de AIA para mantener los niveles de etileno.

A su vez el etileno provoca alteraciones sobre la normal distribución del AIA endógeno y de la actividad peroxidasa (Smith et al. 1983). La separación de las funciones del AIA y del etileno en varios fenómenos es complicada, debido a la íntima relación entre los efectos de la auxina sobre la síntesis de etileno y los efectos del etileno sobre el metabolismo del AIA (Ursin y Bradford 1989).

De todo lo anteriormente expuesto se concluye que AIA y etileno son dos importantes fitohormonas que están implicadas en el control de los procesos de desarrollo, maduración y senescencia. Los efectos a veces contrapuestos, de estos dos reguladores pueden ser consecuencia de la interferencia sobre una reacción o serie de reacciones comunes (Fukuyama y Moyed 1964).

#### 4.- BIOSINTESIS DEL ETILENO

Es evidente el importante papel que juega el etileno en la fisiología de las plantas. La atención que está recibiendo en las dos últimas décadas el estudio de su biosíntesis es enorme. No obstante, la tarea de identificar los precursores no fue fácil, puesto que, tejidos que desprenden altas cantidades de etileno no lo producen tras un proceso de homogeneización. Por este motivo los avances en este campo se hicieron administrando metabolitos marcados (Yang 1974) o utilizando sistemas modelo.

##### 4.1.- Fuentes primarias de etileno en vegetales superiores

Debido a la sencillez de la estructura química del etileno son muchos los compuestos que pueden originarlo y que por tanto han sido propuestos como precursores: ácido linoléico, propanal,  $\beta$ -alanina, ácido acrílico, ácido  $\beta$ -hidroxipropiónico, etionina, etanol, ácido acético, ácido fumárico, y metionina.

##### 4.1.1.- Metionina como precursor

En 1964 se puso de manifiesto que en sistemas químicos in vitro se producía etileno a partir de la metionina (Lieberman y Mapson 1964). Posteriormente se encontró que la metionina marcada producía eficientemente etileno en tejidos de manzana y que al igual que en el sistema modelo,

provenía de los carbonos 3 y 4 de la metionina (Lieberman et al. 1966). Aunque se comprobó más tarde que las reacciones que sufría la metionina en el sistema químico no eran fisiológicas, las observaciones de que la capacidad de producir etileno se relacionaba en tejidos vegetales con la capacidad de convertir metionina en etileno (Lieberman 1979), apoyaban la idea de que sólo la metionina era el precursor del etileno en plantas superiores (Yang y Hoffman 1984).

#### 4.1.2.- Acido linolénico como precursor

Aunque no se duda hoy del papel de la metionina como fuente primaria del etileno, se ha observado que algunos tejidos iluminados en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  pueden producir etileno a partir de la peroxidación de lípidos (Sandmann y Boger 1980). Se piensa que al avanzar la maduración de los frutos hay un cambio en el precursor, de metionina a lípidos (ácido linolénico) provenientes de la ruptura de membranas celulares tras la fase climatérica (Lieberman 1979). No obstante, las últimas investigaciones de Wise y Naylor (1988) ponen en duda estas hipótesis.

#### 4.2.- Ciclo de la metionina

##### 4.2.1.- Ruta biosintética

La ruta biosintética del etileno quedó completada tras el descubrimiento de dos intermediarios entre metionina

y etileno: la S-adenosilmetionina (SAM) (Adams y Yang 1977) y el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Adams y Yang 1979, Lürssen et al. 1979).

El hecho de que la conversión metionina ---> etileno requiera  $O_2$  y sea inhibida por dinitrofenol, un desacoplante de la fosforilación oxidativa, llevó a Murr y Yang (1975a, b) a la conclusión de que la SAM, que es sintetizada a partir de metionina y ATP, era un intermediario en la biosíntesis del etileno. Poco más tarde fue confirmada la idea al encontrar que la metionina marcada era transformada en 5'-metiltiorribosa (MTR) y 5'-metiltioadenosina (MTA), compuestos que sólo pueden derivar de la metionina, en tejidos vegetales, vía SAM (Adams y Yang 1977).

Aunque el ACC fue aislado en 1957 a partir de manzanas (Burroughs) y de arándanos rojos (Vähätalo y Virtanen), no se conoció su significado fisiológico hasta que comparando el metabolismo de la metionina en aire y en atmósfera de nitrógeno, Adams y Yang (1979) encontraron que el ACC se acumulaba en los tejidos durante las experiencias en condiciones anaerobias. Al exponer otra vez los tejidos al aire, desaparecía el ACC y se formaba de nuevo etileno. Estas observaciones se interpretaron en el sentido de que el ACC era un intermediario entre SAM y etileno. Por su parte, Lürssen et al. (1979) llegan a la misma conclusión basándose en que la SAM es análoga a la S-metilmetionina, precursor del ACC en síntesis orgánica, y en la estimulación que ejerce el

ACC exógeno sobre la producción de etileno in vivo.

Con la demostración de la intervención de la SAM y del ACC, la ruta biosintética del etileno quedó como sigue:

Metionina ---> SAM ---> ACC ---> Etileno

El enzima responsable del primer paso, ATP: metionina adenosiltransferasa (EC 2.5.1.6), fue primeramente purificado a partir de levaduras por Chiang y Cantoni en 1977 y, dos años más tarde, se demostró su presencia en tejidos vegetales y su relación con la biosíntesis del etileno (Konze y Kende 1979a). El enzima necesita activar la metionina con ATP para permitir la unión del núcleo de adenina.

El paso SAM ---> ACC está catalizado por la ACC-sintasa, enzima aislado de frutos de tomate por Boller et al. (1979), los cuales calcularon una  $K_m$  de 13  $\mu M$  para la SAM, su sustrato específico. Los progresos en la purificación del enzima han sido lentos debido a su inestabilidad y a los bajos contenidos presentes en cualquier tejido vegetal. Se sabe que, es dependiente de fosfato de piridoxal ya que se inhibe por aminoetoxivinilglicina (Adams y Yang 1979), siendo también inhibido por su propio sustrato SAM (Satoh y Yang 1989), tiene un peso molecular de 55.000-58.000 daltons estimado por filtración en gel (Acaster y Kende 1982) y su pH óptimo es básico (Yu et al. 1979). La transformación de la SAM en ACC parece ser el paso limitante en la biosíntesis de



etileno, por lo que el enzima necesita formarse o activarse para que la producción de la hormona se mantenga de forma continuada (Yang y Hoffman 1984).

El último paso de la ruta biosintética del etileno, la oxidación del ACC, es el menos conocido a pesar de ser el más investigado. El enzima formador de etileno (EFE) no ha sido todavía aislado y caracterizado in vitro. Más adelante se desarrollará con mayor amplitud este tema, objeto principal de nuestros estudios (Apartado 5).

#### 4.2.2.- Reciclado

Como los niveles de metionina en los tejidos vegetales son demasiado bajos para mantener una producción continuada de etileno, Baur y Yang concluyeron en 1972 que ésta debe ser reciclada. Esta hipótesis estaba de acuerdo con la observación de que no se liberaban compuestos de azufre volátiles en tejidos de manzana tratados con [<sup>35</sup>S]metionina (Burg y Clagett 1967). Los estudios de Adams y Yang (1977) que demostraron que el grupo CH<sub>3</sub>S- de la metionina se recuperaba como MTA, y de Murr y Yang (1975a) que probaron que la MTA marcada era reciclada a metionina, permitieron arrojar luz sobre el ciclo de la metionina. Así en 1982 Yung et al. establecieron que el grupo metil-tio de la metionina es regenerado continuamente, mientras que la porción de 4 carbonos deriva de la porción ribosa del ATP.

El primer paso de la ruta de reciclado es la degradación de la MTA por el enzima MTA nucleosidasa para formar MTR y adenina. El enzima es tan activo que la MTA se hidroliza tan pronto como se forma a partir de la SAM. La adenina se recupera como ADP y ATP (Giovanelli et al. 1983) mientras que la MTR debe fosforilarse (MTR-kinasa) a MTR-1-P antes de transformarse en ácido  $\alpha$ -ceto- $\gamma$ -metiltiobutírico (KMB). En esta última conversión intervienen al menos tres enzimas, aunque no están claros los detalles de las reacciones. Finalmente el paso de KMB a metionina está regulado por una transaminasa con L-glutamina como principal donante de grupos amino (Miyazaki y Yang 1987a).

A continuación se representa el ciclo de la metionina con sus dos vías: producción de etileno y biosíntesis de poliaminas (Fig. 1), adaptado de Yang y Hoffman (1984).

#### 4.3.- Conjugación del ACC

En 1981 Apelbaum y Yang observaron que la cantidad de ACC que desaparecía durante un período de incubación de tejidos vegetales con ACC exógeno era mayor que la cantidad de etileno liberada, sugiriendo la existencia de un metabolismo del ACC. Aunque el ACC puede ser desaminado a ácido  $\alpha$ -cetobutírico por algunos microorganismos (Honma y Shimomura 1978), esta reacción no se da en vegetales superiores.

Amrhein et al. (1981) encontraron que el ACC exó-

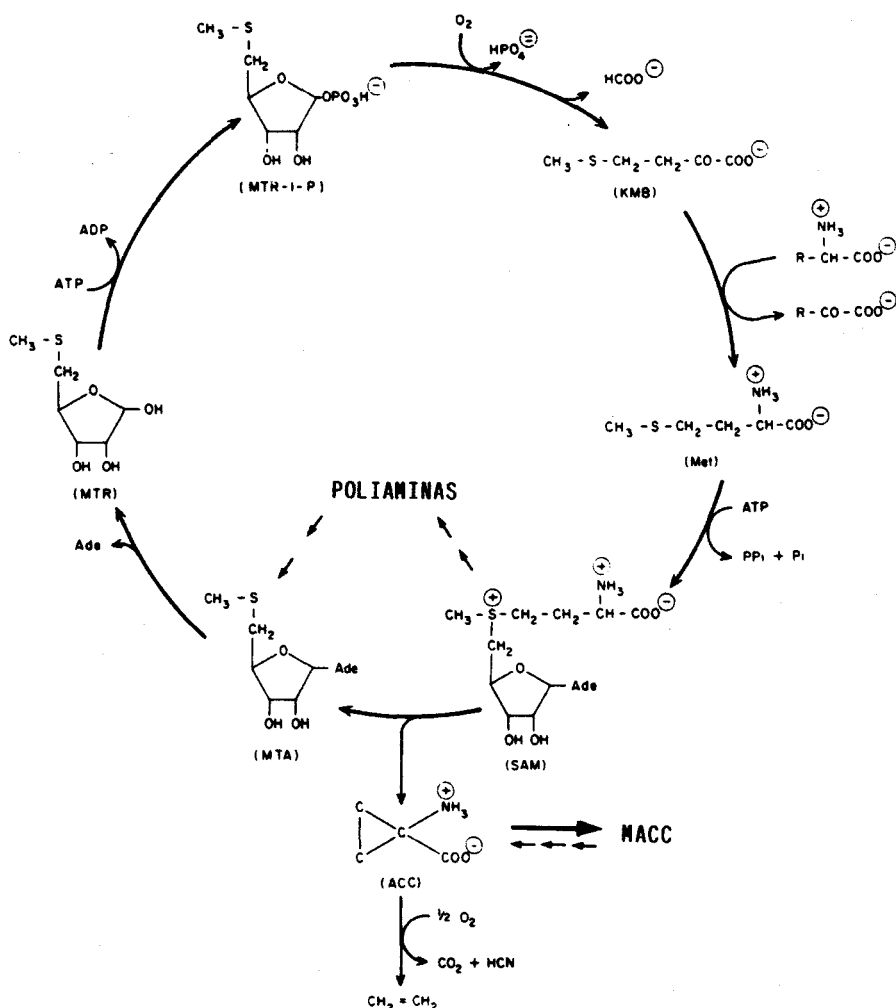


Fig. 1.- Ciclo de la metionina en relación con la biosíntesis de poliaminas y etileno. Abreviaturas: ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; Ade, Adenina; KMB, ácido 2-ceto-4-metil-tiobutírico; MACC, ácido N-(malonilamino)ciclopropano-1-carboxílico; Met, Metionina; MTA, 5'-metiltioadenosina; MTR, 5'-metiltiorribosa; MTR-1-P, 5'-metiltiorribosa-1-fosfato; SAM, S-adenosilmetionina. Adaptado de Yang y Hoffman (1984).

geno suministrado a semillas de trigo sarraceno era conjugado a ácido N-malonilaminociclopropano-1-carboxílico (MACC). La existencia natural del MACC fue confirmada poco más tarde en hojas de trigo (Hoffman et al. 1982b). Como la mayor parte de los tejidos vegetales son capaces de metabolizar el ACC a MACC, el enzima responsable parece ser constitutivo (Amrhein et al. 1982). El enzima, N-maloniltransferasa, ha sido aislado y caracterizado de semillas de haba mung (*Vigna radiata*) por Kionka y Amrhein (1984).

A nivel celular, el MACC es sintetizado en el citosol y acumulado posteriormente en la vacuola. El transporte del MACC estaría regulado no sólo por su concentración en el citosol sino también por el contenido extracelular (Bouzayen et al. 1988). El sistema responsable de la introducción del MACC en la vacuola parece ser el transportador de aminoácidos dicarboxílicos y necesita ATP (Tophof et al. 1989).

La N-malonización de D-aminoácidos es un proceso de desintoxicación común en plantas superiores. Puesto que el ACC no tiene carbonos asimétricos, puede ser reconocido como D o como L-aminoácido; por tanto la malonización del ACC podría estar catalizada por el mismo enzima o por enzimas que exhiban especificidad cruzada respecto a los D-aminoácidos (Yang y Hoffman 1984). La mayor parte de los trabajos sobre este tema apoyan la hipótesis de que se trata del mismo enzima: el enzima es estereoespecífico (Sato y Esashi

1984a), reconoce al ACC como un D-aminoácido (Liu et al. 1984a), y el ACC y algunos D-aminoácidos exhiben una mutua inhibición competitiva (Su et al. 1985).

El significado biológico del MACC, al tratarse de un producto metabólicamente inactivo obtenido por una reacción irreversible, sería el de regular los niveles endógenos de ACC y por tanto la producción de etileno. Cuando se inhibe la formación de MACC, queda más ACC disponible para la biosíntesis de etileno, la cual se ve estimulada en todos los tejidos vegetales estudiados con la excepción de las manzanas (Romojaro et al. 1986).

Se ha encontrado que tratamientos con altas concentraciones de MACC durante períodos prolongados de incubación inducen una reversión del MACC a ACC estimulando la producción de etileno (Jiao et al. 1986). Aunque se cree que el MACC no es una forma de almacenamiento de ACC, se han descrito reducciones fisiológicas de los niveles de MACC que promueven la senescencia (Hanley et al. 1989).

El hecho de que el etileno promueva la capacidad de conjugación del ACC y de los D-aminoácidos hace pensar que el MACC es además una vía de salida en la autorregulación de la producción de etileno. Un exceso de etileno llevaría a una malonización del ACC que sería apartado de la ruta de síntesis del etileno, el cual vería frenada su producción (Liu et al. 1985).

#### 4.4.- Regulación de la biosíntesis de etileno

La producción de etileno está regulada por un gran número de factores ambientales y de desarrollo. Su síntesis se induce durante ciertos estados de crecimiento tales como germinación, maduración de frutos y abscisión y senescencia de órganos. Entre los factores externos que influyen en su liberación destacan: lesiones mecánicas, estrés ambiental y ciertos productos químicos como hormonas y poliaminas.

Por otra parte, el etileno juega un papel importante en el inicio de la maduración de frutos climatéricos, funcionando como disparador de la misma. Tanto en el proceso de maduración como en los de abscisión y senescencia, se produce una regulación autocatalítica del etileno.

##### 4.4.1.- Regulación por poliaminas y hormonas

La ruta biosintética de las poliaminas está estrechamente conectada con la del etileno a nivel de la SAM (Fig. 1). Aunque la aplicación exógena de poliaminas inhibe la síntesis de etileno vía ACC-sintasa (Hyodo y Tanaka 1986), las vías no parecen ser activamente competitivas in vivo dado que los niveles endógenos de poliaminas son siempre suficientemente bajos como para no ejercer ningún efecto (Kushad et al. 1988).

Ya se comentó (capítulo 3) que en tejidos vegetativos la producción de etileno está regulada por los niveles

de auxina libre a través de un proceso de inducción enzimática (Yang y Hoffman 1984). El ácido abscísico, una hormona promotora de la abscisión de órganos, inhibe la biosíntesis de etileno endógeno a nivel del enzima ACC-sintasa, estimulando por el contrario la conversión de ACC exógeno en etileno (Tan y Thimann 1989).

Las citoquininas estimulan la biosíntesis de etileno, teniendo un efecto sinérgico sobre la utilización del ACC en tejidos estresados (Khan y Prusinski 1989). La combinación de auxinas y citoquininas promueve la producción de etileno durante la formación de yemas axilares, siendo difícil establecer una relación causa-efecto (Gaspar et al. 1989).

#### 4.4.2.- Autorregulación

El etileno es capaz de regular su propia síntesis bien autoestimulándola bien autoinhibiéndola, según el tipo de tejido y su estado fisiológico.

En frutos en maduración y flores senescentes el etileno promueve su propia producción mediante un proceso fisiológico complejo y probablemente indirecto, que afectaría de alguna forma a la sensibilidad de los tejidos a su acción y también a los niveles de ACC y a la actividad del EFE (Yang y Hoffman 1984).

Por el contrario, la autoinhibición de la síntesis

de etileno es rápida y se da en numerosos tejidos vegetativos, habiéndose sugerido que actuaría disminuyendo la cantidad de ACC disponible más que inhibiendo actividades enzimáticas (Riov y Yang 1982).

#### 4.4.3.- Etileno inducido por estrés

Sea cual sea el origen (mecánico, hídrico, de temperatura, etc.) en todos los casos los niveles de ACC y la actividad ACC-sintasa, que son bajos antes del estímulo, aumentan rápidamente. Estudios con inhibidores de la transcripción (Acaster y Kende 1982) y de la síntesis de proteínas (Wang y Adams 1982) sugieren un proceso de inducción enzimática de la ACC-sintasa semejante al producido por el AIA.

#### 4.4.4.- Regulación por la luz y el CO<sub>2</sub>.

Luz y CO<sub>2</sub> son dos importantes reguladores de la biosíntesis del etileno cuyos efectos, a veces dispares, son de difícil separación debido a la influencia de la luz sobre los niveles tisulares de CO<sub>2</sub> durante la fotosíntesis (Preger y Gepstein 1984).

En presencia de altas concentraciones de CO<sub>2</sub>, la luz promueve la producción de etileno estimulando el EFE e inhibiendo la conjugación del ACC en MACC (Weckx et al. 1989). Otros efectos de la luz, como el control del etileno



durante la floración, parecen ser regulados a través del fotoperíodo y el fitocromo (Machácková et al. 1989b).

Por su parte el  $\text{CO}_2$  estimula la producción de etileno a bajas concentraciones (Jiao et al. 1987), mientras que, por el contrario, altos niveles de  $\text{CO}_2$  inhiben la síntesis de etileno en frutos (Cheverry et al. 1988). Estos hechos llevan a la sugerencia de que el efecto del  $\text{CO}_2$  se ajusta a una curva que estimula a bajas concentraciones e inhibe a altas concentraciones (Tan y Thimann 1989).

#### 4.4.5.- Regulación por precursores

El ciclo de la metionina tiene una cierta capacidad de autorregulación ya que la ACC-sintasa puede ser inhibida débilmente por MTA (inhibición por producto) y la MTA nucleosidasa es inhibida competitivamente por la adenina, uno de sus productos. No obstante la capacidad de funcionamiento del ciclo es amplia y la recuperación de la metionina no parece ser un factor limitante para la producción de etileno (Miyazaki y Yang 1987b).

Como comentario final cabe señalar que la conversión de SAM en ACC es el factor más importante en el control de la biosíntesis del etileno, aunque ésta puede ser regulada también a través de los niveles de ACC disponible (malonización) y de la actividad del enzima formador de etileno.

## 5.- LA CONVERSION DEL ACC EN ETILENO

Como ya se comentó al hablar de la ruta de biosíntesis del etileno, éste es el paso menos conocido a pesar de ser el más investigado. La conversión de ACC en etileno es catalizada por un enzima o sistema enzimático oxidativo denominado enzima formador de etileno (EFE).

Dado que el EFE no ha sido aún aislado independiente de material celular intacto (tejidos, protoplastos o vacuolas), todas las características han sido determinadas in vivo. Esta situación dificulta la interpretación de muchas experiencias, ya que los efectos observados sobre el EFE pueden ser atribuidos a acciones directas o indirectas (McKeon y Yang 1987). A pesar de este problema se conocen varias propiedades del EFE.

### 5.1.- Características del EFE in vivo

Cuando se aplica ACC exógeno a órganos vegetales, se produce un marcado incremento en la producción de etileno (Cameron et al. 1979, Lürssen et al. 1979), indicando que el enzima es constitutivo y que la formación de ACC es la etapa limitante de la síntesis de etileno en dichos tejidos.

Es un enzima bisustrato que utiliza oxígeno y ACC (Adams y Yang 1979). La concentración de ACC influye sobre la  $K_m$  aparente para el  $O_2$ , habiéndose estimado que la concen-

tración de  $O_2$  que da una actividad mitad de la máxima es del 1% (Konze et al. 1980). Por el contrario, la alta afinidad hacia el ACC parece ser independiente de la concentración de oxígeno in vivo (Yip et al. 1988), oscilando la  $K_m$  aparente entre 8 y 66  $\mu M$  según el tipo de tejido (McKeon y Yang 1987).

Se han descrito varios inhibidores de la actividad EFE. Uno de los más potentes y específico es el ion cobalto, efectivo a concentraciones tan bajas como 10  $\mu M$  (Yu y Yang 1979). El ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico, un análogo del ACC, inhibe competitivamente la conversión del ACC en etileno, aunque son necesarios niveles relativamente altos de dicho ácido (Sato y Esashi 1983). Seguramente su semejanza estructural con el ACC es la responsable de sus propiedades inhibitoras, habiéndose sugerido que puede ser oxidado por el EFE (Liu et al. 1984b). La ciclopropilamina y el ácido ciclopropanocarboxílico no son inhibidores del EFE ni actúan como precursores del etileno, aunque la amina pueda ser oxidada a etileno químicamente (Lizada y Yang 1979). Otros inhibidores son cianuro, azida, EDTA y altas temperaturas, pero carecen de la especificidad suficiente como inhibidores enzimáticos.

Atrapadores de radicales libres como el galato de propilo o el benzoato sódico inhiben la conversión del ACC en etileno, sugiriendo la participación de radicales libres en dicho paso (Apelbaum et al. 1981b). Trabajos posteriores de Legge y Thompson (1983), Parups (1984), Lynch et al. (1985) y Vioque y Vioque (1985) apoyan esta hipótesis.

La sustitución de uno de los hidrógenos del anillo del ACC por un grupo etilo genera cuatro estereoisómeros del ácido 1-amino-2-etilciclopropano-1-carboxílico (AEC). Por oxidación química con NaClO, los 4 isómeros se transforman en 1-buteno en igual extensión. Sin embargo, los tejidos vegetales utilizan preferentemente el isómero (1R,2S)-AEC (Hoffman et al. 1982a), indicando que esta reacción está catalizada por un enzima estereoespecífico (Fig. 2). ACC y AEC parecen ser degradados por el mismo enzima, ya que ambas reacciones se inhiben en igual extensión por iones  $\text{Co}^{++}$  y anaerobiosis; y porque, cuando están presentes simultáneamente ambos sustratos, cada uno actúa como inhibidor respecto al otro (McKeon y Yang 1987).

Compuestos lipofílicos y tratamientos de choque osmótico reducen la tasa de producción de etileno en tejidos vegetales (Apelbaum et al. 1981a), que pierden totalmente la actividad tras homogeneización (Vioque et al. 1981). Estos hechos, unidos a la sensibilidad del EFE a detergentes y bajas temperaturas sugieren que el enzima está altamente estructurado y requiere integridad de membrana. La inhibición causada por protonóforos y desacoplantes de la fosforilación oxidativa podría ser debida al daño que producen en la estructura de la membrana (Yang y Hoffman 1984).

La evidentemente compleja naturaleza del EFE, la imposibilidad de aislarlo y caracterizarlo in vitro y las

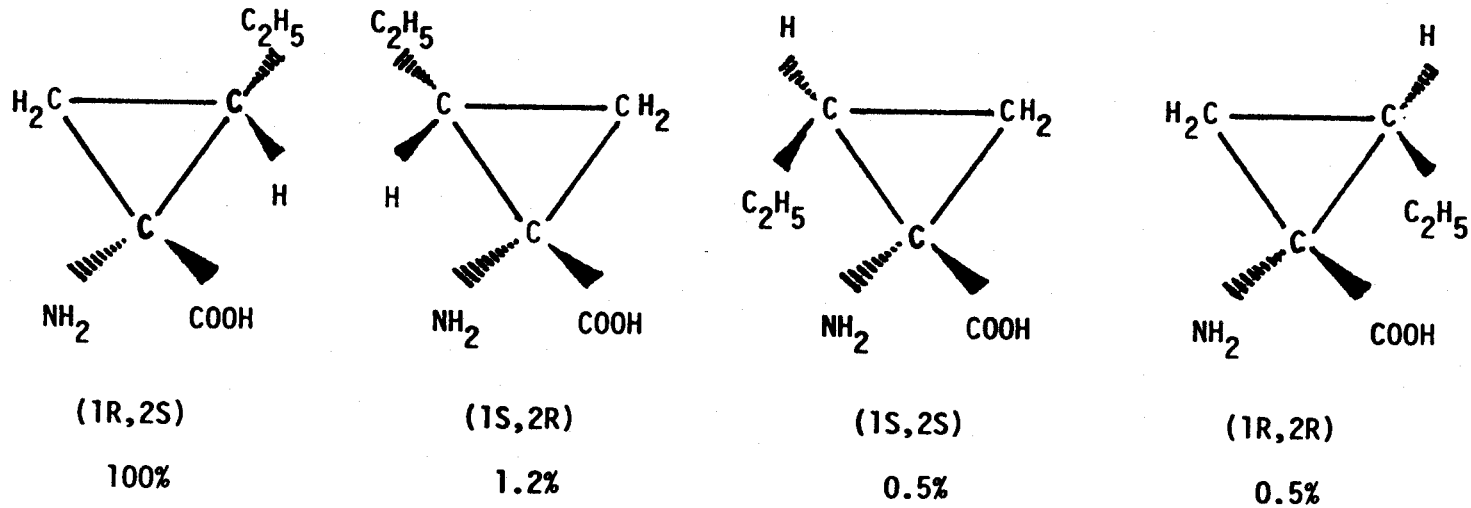


Fig. 2.- Conversi3n relativa de los is3meros del AEC en 1-buteno por segmentos de jud3a mung.

muchas interacciones del sistema oxidante del ACC in vivo, sugieren que la reacción puede no ser simple, pudiendo estar catalizada por varios enzimas, posiblemente relacionados entre sí (Bousquet y Thimann 1984).

#### 5.2.- Sistemas libres de células descritos

Aunque, como ya se ha comentado anteriormente, el EFE no ha sido aún aislado y caracterizado in vitro, se han descrito varios sistemas enzimáticos capaces de transformar el ACC en etileno.

- Konze y Kende (1979b) obtuvieron un extracto de plántulas de guisante capaz de producir etileno a partir de ACC. La fracción de alto peso molecular apenas conserva actividad, que se restablece si se añade la fracción de bajo peso molecular. El sistema enzimático precisa un factor termoestable de bajo Pm, se satura a altas concentraciones de ACC y se activa por iones  $Mn^{2+}$ . Los autores concluyen que, la formación de etileno por el extracto puede ser el resultado de la acción de un enzima que tiene baja afinidad por su sustrato, el ACC, o puede ser el resultado de una reacción química entre el ACC y el producto de una reacción enzimática.

- En 1981 Mayak et al. encuentran que la fracción microsómica aislada de pétalos de clavel es capaz de catalizar la transformación del ACC en etileno. Otros autores (Mattoo et

al. 1982) observan asimismo formación de etileno en incubaciones de microsomas de plántulas de guisante. Este sistema es considerado un modelo por los propios autores, habiéndose demostrado posteriormente la participación, por una parte del anión superóxido (McRae et al. 1982) y por otra de un hidroperóxido y de un radical libre del ACC (Legge y Thompson 1983). Trabajando con un sistema de membranas de guisante, Adam y Mayak (1984) solubilizaron un enzima con propiedades semejantes a las de la fracción microsómica.

- El sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo cataliza la conversión de ACC en etileno in vitro (Vioque et al. 1981). En este sistema intervienen AIA,  $Mn^{2+}$ , PLP y un monofenol. Semejantes a dicho sistema son los posteriormente descritos por Shimokawa (1983), que aisla un extracto de frutos de *Citrus unshiu* con actividad AIA-oxidasa y por Osswald et al. (1989), que consta de peroxidasa,  $Mn^{2+}$  y un monofenol que puede ser sustituido por productos de la oxidación del AIA.
- En 1983 Vinkler y Apelbaum encuentran que mitocondrias aisladas de plántulas de guisante convierten el ACC en etileno. Sugieren que la actividad EFE se encuentra asociada a la membrana interna de las mitocondrias y que el paso limitante de la reacción es el transporte de ACC al interior de la membrana mitocondrial. El sistema de partículas mitocondriales descrito posteriormente por los mismos autores (Vinkler y Apelbaum 1984) es similar al sistema soluble de

Konze y Kende (1979b) en cuanto a su pH óptimo y a la dependencia de manganeso.

- El enzima lipoxigenasa en presencia de  $Mn^{2+}$ , PLP y ácido linoleico es capaz de oxidar al ACC liberando etileno (Bousquet y Thimann 1984). Basándose en la idea de que el EFE está asociado a membranas y debido al relativamente alto rendimiento del sistema (16%), los autores concluyen que puede actuar in vivo en tejidos senescentes. El mecanismo de la reacción ha sido estudiado por Lynch et al. (1985), encontrando que la lipoxigenasa forma hidroperóxidos del ácido linoleico, que a su vez actúan sobre el ACC. Aunque Kacperska y Kubacka-Zebalska (1985) sugieren también que la formación de etileno puede estar conectada con la actividad lipoxigenasa in vivo, el estudio de los productos de la reacción llevó a la conclusión de que el sistema no era el EFE fisiológico (Pirrung 1986). Nilsen et al. (1988) obtienen un extracto crudo de raíces de cebada que produce etileno a partir de ACC, producción que se ve acelerada en presencia de  $Mn^{2+}$  y ácido linoleico. Los autores sugieren que puede darse una cooperación entre lipoxigenasa y EFE en la generación de etileno.

- Protoplastos y vacuolas aisladas de hojas de guisante convierten el ACC en etileno (Guy y Kende 1984a, b). La fracción vacuolar forma más del 80% del etileno producido por los protoplastos, discrimina entre los estereoisómeros del AEC y tiene una alta afinidad por el ACC ( $K_m$  aparente



61  $\mu\text{M}$ ). Este sistema mantiene sólo alrededor del 5% de la actividad formadora de etileno del tejido intacto, por lo que las conclusiones obtenidas con dicho sistema son limitadas (Porter et al. 1986).

Todos los sistemas libres de células aquí recogidos son enzimáticos, requieren oxígeno y son inhibidos por iones cobalto y atrapadores de radicales libres, características del EFE fisiológico (Yang y Hoffman 1984). Estos sistemas tienen sin embargo una baja producción de etileno (1-16%), y, a excepción del sistema de vacuolas, exhiben una baja afinidad hacia el ACC ( $K_m$  entre 2.8 y 389 mM) y no discriminan entre los estereoisómeros del AEC (Venis 1984, McKeon y Yang 1984, Manning 1985, Wang y Yang 1987).

### 5.3.- Mecanismos postulados a nivel molecular

A pesar de las limitaciones de trabajar con tejidos intactos, el estudio de los productos de la reacción utilizando precursores radiactivos, ha arrojado cierta luz sobre el mecanismo de la reacción.

Basándose en que la oxidación química de la 1-fenilciclopropilamina transcurre a través de un ion nitrenium, Yang propone en 1981 que la conversión del ACC en etileno sucedería de forma análoga. El ACC sería oxidado por una hidrolasa a N-hidroxi-ACC, que se fragmentaría en etileno y ácido cianofórmico vía ion nitrenium (Fig. 3). El ácido

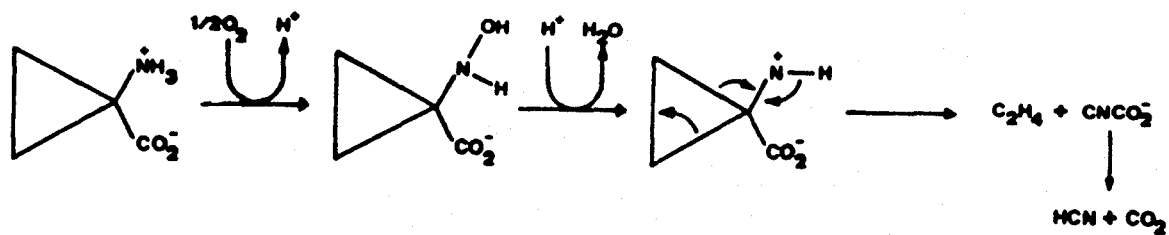


Fig. 3.- Modelo para la formación de etileno propuesto por Yang (1981).

cianofórmico se degradaría espontáneamente a  $\text{CO}_2$  y HCN.

Los trabajos de Peiser et al. (1984) con precursores marcados suponen un apoyo a esta teoría. Los autores encuentran que el grupo carboxilo del ACC se libera como  $\text{CO}_2$  mientras que el C-1 del ACC origina HCN, que se metaboliza rápidamente a  $\beta$ -cianoalanina y asparagina.

Cuando se oxidan con hipoclorito sódico los isómeros *cis*- y *trans*-2,3-dideuterio ACC, se obtienen *cis*- y *trans*-dideuterio etileno respectivamente, transcurriendo pues la reacción a través de un mecanismo concertado, probablemente vía ion nitrenium (Adlington et al. 1983). Este mecanismo, que confirmaría el modelo de Yang, no sucede en tejidos vegetales. Cuando se incuban cada uno de estos dideuterio-ACC con material biológico, se obtienen cantidades iguales de *cis*- y *trans*-dideuterio etileno (Fig. 4) (Adlington et al. 1983).

Estas observaciones indican que la reacción fisiológica no transcurre a través de un mecanismo concertado que retenga la configuración, sino por uno que permita la libre rotación del enlace C-C implicado en el etileno. Como la oxidación electrolítica del *cis*-2,3-dideuterio ACC origina HCN y una mezcla equimolecular de *cis*- y *trans*-dideuterio etileno, Pirrung (1983) sugiere que dicha oxidación y la formación de etileno in vivo son análogas. El modelo incluye dos oxidaciones de un electrón cada una a través de un radical

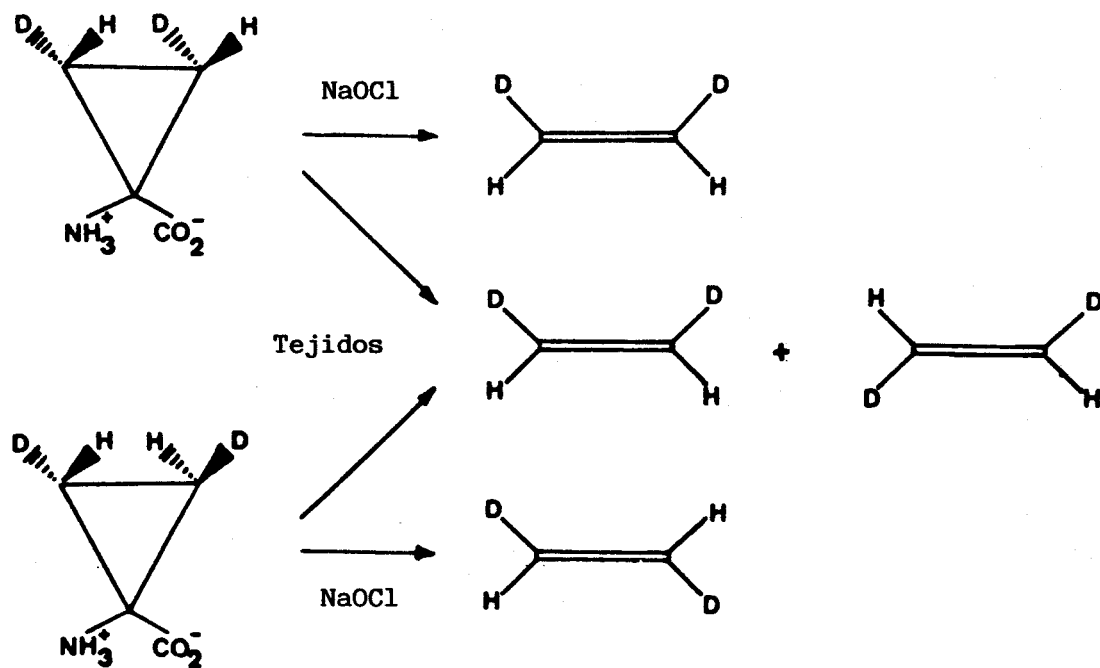


Fig. 4.- Mecanismo no concertado para la formación de etileno in vivo, adaptado de Adlington et al. (1983).

catiónico del ACC y no del ion nitrenium (Fig. 5).

Un problema para aceptar el mecanismo propuesto por Pirrung es explicar cómo intermediarios tan reactivos pueden ser estabilizados in vivo. Baldwin et al. (1985) encuentran que varios oxidantes con metales de transición ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{MnO}_4^-$ ,  $\text{FeO}_4^{2-}$ ) producen etileno a partir de 2,3-dideuterio ACC con pérdida de estereoisomería, postulando que un ion metálico está implicado en la generación y estabilización del radical catiónico del ACC, apoyando por tanto el modelo de Pirrung.

Con estos trabajos parece haber quedado claro el mecanismo del último paso de la ruta biosintética del etileno. Quedan todavía, no obstante, cuestiones pendientes referentes a la naturaleza del EFE, la regulación de su actividad y al modo de acción de la hormona (Dagani 1984).

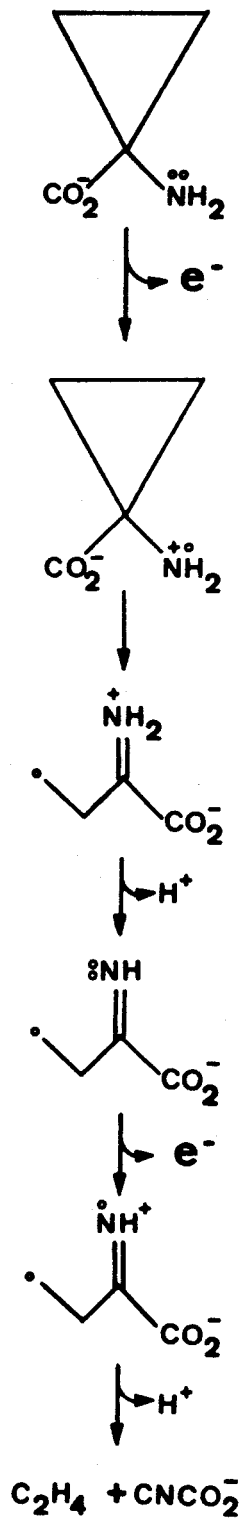


Fig. 5.- Modelo de Pirrung (1983) para la formación de etileno.

## 6.- PEROXIDASAS Y BIOSÍNTESIS DE ETILENO

Durante mucho tiempo se han relacionado las peroxidasas con la biosíntesis de etileno debido a una serie de hechos típicos de la producción de etileno in vivo, como son la necesidad de oxígeno (Burg 1962), la participación de radicales libres (Baker et al. 1977) e incluso la sugerencia de la participación de peróxidos (Brennan y Frenkel 1977).

El incremento paralelo en la producción de etileno y actividad peroxidasa durante la maduración de frutos de tomate (Ku et al. 1970), la relación entre peroxidasas y etileno de estrés (Abeles 1973), así como la sugerencia de que el sistema sintetizador de etileno podría estar localizado en un complejo pared celular-membrana plasmática (Mattoo y Lieberman 1977) parecen estar en línea con este punto de vista.

Antes de que se conociera que el ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC) era el precursor inmediato del etileno en tejidos vegetales, se habían descrito sistemas modelo in vitro en los cuales las peroxidasas catalizaban la formación de etileno a partir de metional (Yang 1967) y de ácido  $\alpha$ -ceto- $\gamma$ -metiltiobutírico (KMB) (Ku et al. 1969, Mapson y Wardale 1972).

Posteriormente, la ruta de biosíntesis del etileno quedó establecida en 1979 con el descubrimiento del ACC como

su inmediato precursor, simultáneamente por Adams y Yang (1979) y Lürssen et al. (1979).

La conversión del ACC en etileno requiere oxígeno, habiéndose sugerido que éste sería transformado en  $H_2O_2$  por acción de una oxidasa y que posteriormente el  $H_2O_2$  rompería el anillo de ciclopropano, paso previo a la liberación de etileno (Adams y Yang 1979).

Los trabajos ya citados de Ku et al. (1969) y de Mapson y Wardale (1972) sobre formación de etileno a partir de KMB, los de Konze y Kende (1979b) realizados con ACC, así como las ideas de Adams y Yang (1979) sobre la posible participación del  $H_2O_2$  y una oxidasa, llevaron a la sugerencia de que el sistema AIA-oxidasa/peroxidasa podría actuar in vivo en el paso ACC ---> etileno (Vioque et al. 1981).

Las características de este sistema enzimático, estudiadas por Vioque et al. (1978a, b) en el olivo, coincidían con las atribuidas hasta entonces al EFE (Adams y Yang 1979, Lürssen et al. 1979, Konze y Kende 1979b).

Extractos enzimáticos de hojas de olivo, con actividades AIA-oxidasa y peroxidasa, transforman el ACC en etileno in vitro en presencia de AIA, diclorofenol,  $Mn^{2+}$  y fosfato de piridoxal (Vioque et al. 1981).

La participación del sistema AIA-oxidasa/peroxidasa y su sustrato, AIA, en este paso de la biosíntesis del



etileno explicaría la bien conocida estimulación de la producción de etileno en tejidos pretratados con AIA. Esta producción de etileno inducida por auxina responde positivamente a concentraciones crecientes de AIA y posteriormente disminuye al seguir aumentando la concentración (Lieberman 1979). Este comportamiento se corresponde con la inhibición de la actividad AIA-oxidasa por exceso de sustrato y con la inhibición de la producción de etileno a partir de ACC, en el sistema in vitro, a concentraciones de AIA superiores a 0.40 mM (Vioque 1980).

Después de que Vioque et al. (1981) sugirieran la participación del sistema AIA-oxidasa de hojas de olivo en el paso ACC ---> etileno in vivo, el papel de las peroxidases en dicha conversión ha sido un tema ampliamente investigado por su gran interés y, aunque los datos aportados no son concluyentes, las pruebas en apoyo de esta hipótesis son cada vez mayores.

Macháckova y Zmrhal (1981) y Rohwer y Mäder (1981), intentaron separadamente aclarar el problema usando peroxidasa purificada de trigo y guisante, respectivamente, bajo una amplia variedad de condiciones de reacción. Concluyen que si bien el ACC no se convierte en etileno por acción directa de una peroxidasa, no se puede excluir que estén de alguna manera implicadas en el proceso, suministrando radicales, peróxido de hidrógeno o alguna forma activada de oxígeno. Shimokawa (1983) purificó de frutos de *Citrus unshiu* un

extracto enzimático con actividad AIA-oxidasa que transforma ACC en etileno, con propiedades semejantes al sistema de hojas de olivo. Los trabajos de Frenkel y Mukai (1984) han constituido un fuerte apoyo a la participación del sistema AIA-oxidasa en el último paso de la biosíntesis del etileno. Estos autores estudian el efecto del AIA y de un inhibidor de la AIA-oxidasa, el carbofurano HDDB, sobre la producción de etileno a partir de ACC en ensayos in vivo e in vitro. Los resultados muestran que la formación de etileno se estimula por el AIA y, por el contrario, se restringe cuando se inhibe la actividad AIA-oxidasa por el carbofurano. Ellos estiman que la regulación de la auxina en frutos por la actividad AIA-oxidasa, puede conducir a la liberación de etileno a partir de ACC, como ya se había sugerido (Vioque et al. 1981).

En esta misma línea se encuentran los trabajos de Billot (1983), Parups (1984) y Mussell (1985). El primero de ellos estudia la evolución de los mono- y difenoles durante la maduración de la pera Passe-crassane, concluyendo que podrían regular la biosíntesis de etileno gracias a sus acciones contrapuestas sobre la actividad AIA-oxidasa (Billot 1983). Parups (1984) apunta también a una interdependencia entre los sistemas degradador de AIA y formador de etileno basándose en los efectos de radicales libres y atrapadores de los mismos. Por su parte, Mussell (1985) relaciona igualmente ambas fitohormonas al encontrar una interacción entre ACC y

AIA-oxidasa en hojas de tomate, indicando que esta interacción puede ser un importante factor regulador en el desarrollo vegetal.

Un efecto regulador por auxina de la actividad EFE ha sido también encontrado en ensayos in vivo por Balagué y Pech (1985) y Trebitsh y Riov (1987).

Además de los trabajos anteriores que apoyan una interrelación entre peroxidasas y actividad EFE, otros resultados se centran en la participación de estas enzimas en la formación del etileno de estrés.

El frotamiento de los internudos de *Bryonia dioica* reduce la producción de etileno, pero sin embargo incrementa la capacidad de los tejidos de convertir ACC exógeno en etileno. Este hecho parece deberse a la acción de las peroxidasas asociadas a membranas sobre el ACC (Boyer et al. 1983). Kevers et al. (1984) sugieren que el proceso de vitrificación de tejidos vegetales resulta de la producción de etileno de estrés mediada por el sistema AIA-oxidasa/peroxidasa.

En una revisión del tema, Gaspar et al. (1985) proponen un control generalizado de las respuestas de los vegetales a situaciones de estrés. Presentan una secuencia de reacciones que relacionan auxina y etileno, con las peroxidasas como responsables de la regulación de los niveles de AIA y de la conversión ACC ---> etileno, participando el manganeso como ión activante. Según este mecanismo, que apoya

plenamente la hipótesis de Vioque et al. (1981), los cambios producidos in vivo dependerían de la disponibilidad de peróxidos y dadores de electrones, por lo que no se correlacionarían necesariamente con variaciones en la actividad peroxidasa in vitro. Finalmente, Boyer y De Jaegher (1986) proponen igualmente la intervención de las peroxidases y el  $Mn^{2+}$  en el paso ACC ---> etileno para explicar la tigmomorfogénesis en *Bryonia dioica* Jacq.

Muy recientemente se ha propuesto que la rápida inducción de la producción de etileno por el AIA podría deberse a reacciones del AIA con cofactores endógenos de la producción de etileno y ACC en la pared celular o en membranas que contengan peroxidases, mediante un mecanismo mediado por radicales libres (Osswald et al. 1989). Según los autores, su sistema es semejante al descrito por Vioque et al. (1981) y Shimokawa (1983).



No todos los tejidos vegetales estudiados llevan a cabo una oxidación completa; así los cotiledones de *Vicia faba* convierten el etileno en óxido de etileno pero no en CO<sub>2</sub>, mientras que en otras especies el metabolito mayoritario es CO<sub>2</sub> o una mezcla de ambos y del conjugado del etilenglicol con glucosa.

### 7.1.- Características

La velocidad del proceso varía enormemente de unas especies a otras, siendo los cotiledones de *Vicia faba* los de mayor tasa metabólica. A pesar de ello, el sistema responsable parece ser el mismo en todos los tejidos estudiados, ya que los metabolitos primarios son los productos de la oxidación del etileno: CO<sub>2</sub> y óxido de etileno (Beyer et al. 1984). La cantidad y velocidad de formación de cada metabolito depende del tipo de tejido y del tiempo de incubación, sufriendo además bruscas variaciones durante los distintos estadios del desarrollo de la planta (Sanders et al. 1986).

Se trata de un proceso enzimático inhibido por desnaturalización, inhibidores metabólicos y homogeneización, el enzima requiere oxígeno y estudios con <sup>18</sup>O indican que se trata de una monooxigenasa (Beyer et al. 1984).

El etileno puede inducir una síntesis proteica del enzima, ya que tratamientos con etileno estimulan su metabo-

lización, proceso inhibido por bloqueantes de la síntesis de proteínas (Abeles y Dunn 1985).

### 7.2.- Significado fisiológico

Como el etileno es un gas en condiciones fisiológicas y puede por tanto difundir con relativa facilidad fuera de los tejidos y las tasas de oxidación del mismo son pequeñas (Beyer y Blomstrom 1979), su papel no puede ser el de eliminar el exceso de etileno no deseable.

Se han propuesto varias alternativas para justificar la existencia de este metabolismo : que sea un medio de sintetizar óxido de etileno; que el etileno sea un análogo de otro compuesto, sustrato habitual del enzima; que se trate de un proceso íntimamente ligado a la acción del etileno e incluso que se trate de una herencia vestigial (Abeles 1984a).

La necesidad de una producción de óxido de etileno se basa en el efecto sinérgico observado sobre las respuestas de los vegetales al etileno (Beyer 1981). Sin embargo esta hipótesis implicaría que una disminución de la producción de óxido de etileno reduciría la eficiencia del etileno como hormona, hecho que no ha sido comprobado experimentalmente. Además el óxido de etileno por sí solo no produce ningún efecto propio de la acción hormonal (Beyer 1984).

La teoría más ampliamente investigada es la que relaciona el metabolismo del etileno con su mecanismo de acción. Varios datos llevaron a Beyer (1979a) a proponer una participación de la oxidación del etileno en su acción hormonal. No obstante otros resultados contradicen esta hipótesis ya que los efectos del etileno se saturan a concentraciones 150 veces menores que su metabolismo y algunos compuestos ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{S}_2\text{C}$ ,  $\text{AgNO}_3$ ) inhiben de manera muy distinta ambos procesos (Sanders et al. 1989). Trabajos recientes de Raskin y Beyer (1989) con olefinas cíclicas, que son potentes y específicos inhibidores de la acción del etileno, indican que no existe una correlación directa entre la acción del etileno y un metabolismo total del mismo.

Recientemente se ha demostrado la presencia en semillas de guisante de epoxidasas que utilizan un amplio rango de sustratos (alcanos, alquenos, ...) de manera similar a la observada para el enzima que metaboliza el etileno, existiendo además una inhibición competitiva entre los diferentes sustratos y el etileno. Esto significaría que el metabolismo del etileno sería accidental, ya que el enzima utilizaría normalmente otros sustratos (Sanders et al. 1989).

Aunque no existe una clara relación entre metabolismo del etileno y modo de acción de la hormona, y el sistema oxidante tiene mayor afinidad hacia otros hidrocarburos (Sanders et al. 1989), el etileno es el compuesto más efectivo en la inducción del enzima y es el



volátil más asequible para las plantas (Abeles y Dunn 1985). Por tanto es difícil evaluar la importancia de la oxidación del etileno hasta que se disponga de más información sobre el mecanismo primario de la acción de la fitohormona (Sanders et al. 1986).

## **MATERIALES Y METODOS**

1.- MATERIAL VEGETAL

Se han utilizado hojas de olivo (*Olea europaea* L. cv. Picual) de árboles de unos 14 años de edad. En algunas experiencias se han utilizado hojas de naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.), arce negundo (*Acer negundo* L.) y epicótilos de guisante (*Pisum sativum* L.) de 7 días de edad, crecidos en la oscuridad.

## 2.- OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO DE HOJAS DE OLIVO

### 2.1.- Obtención del extracto enzimático crudo

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

Se lavan hojas de olivo con agua destilada, se secan con papel de filtro y se cortan en trocitos. Tras la adición de tampón fosfato 20 mM pH 6.1, en la proporción de 5 ml por gramo de tejido, se trituran y homogenizan en un Omnimixer durante 20 min a 4°C. El homogenado se centrifuga a 23300 g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante de dicha centrifugación se filtra a través de gasa, constituyendo el extracto crudo, que muestra actividad peroxidasa pero no AIA-oxidasa y cuya concentración referida a material vegetal es de 0.2 g/ml.

### 2.2.- Purificación parcial del extracto enzimático

El extracto crudo así obtenido se purifica parcialmente por precipitación con acetona fría y posterior tratamiento con polivinilpirrolidona (PVP) hidratada.

En un vaso de precipitados se añade acetona fría a -10°C al extracto crudo en la proporción de 5 ml de acetona por ml de extracto crudo, dejándose estar 1 h a dicha temperatura. Se decanta el sobrenadante, y el precipitado se pasa a una botella de centrífuga con ayuda de 20 ml de

acetona-agua (5:1) fría, centrifugándose a 164 g durante 15 min a  $-10^{\circ}\text{C}$ . Se realizan a continuación dos lavados del precipitado con 20 ml de la misma acetona-agua, centrifugándose a 356 y 1465 g, respectivamente, durante 15 min y 3 lavados más con 20 ml de acetona fría, centrifugándose a 4080, 16000 y 16000 g respectivamente durante 15 min. Se retira la acetona del último lavado con ayuda de una jeringa, evaporándose el resto con corriente de  $\text{N}_2$ .

El residuo se disuelve en tampón fosfato 20 mM pH 6.1 (2 ml/g de material vegetal) mediante agitación discontinua durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Finalmente se añade PVP hidratada (0.5 g/ml), se agita durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se filtra a través de Buchner aplicando vacío. El filtrado se centrifuga a 39100 g durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante, extracto parcialmente purificado, es incoloro, presenta actividades AIA-oxidasa y peroxidasa, tiene una concentración referida a material vegetal original de 0.5 g/ml y puede mantenerse congelado durante 5-6 meses conservando dichas actividades.

### 2.3.- Hidratación de la PVP

Se utiliza el segundo de los procedimientos recomendados por Knypl y Chylinska (1974). A 100 g de PVP se añade 1 L de tampón fosfato 0.1 M, pH 6.1 y se deja estar durante 1 h con agitación ocasional. Durante el reposo se decanta el exceso de tampón, reemplazándolo con tampón nuevo tres veces. La PVP hidratada se lava con tampón en un embudo

Buchner, bajo succión, y se conserva en refrigerador en frasco herméticamente cerrado.

2.4.- Separación de las fracciones proteicas y de bajo peso molecular de los extractos enzimáticos

La separación de dichas fracciones se ha realizado utilizando columnas PD-10 preempaquetadas con Sephadex G-25. Se introducen 2.5 ml de extracto en la columna previamente equilibrada con tampón fosfato 20 mM pH 6.1 y se eluyen con 3.5 ml de dicho tampón (fracción proteica). Los compuestos de bajo peso molecular se obtienen eluyendo con 25 ml de agua destilada. Estos 25 ml se liofilizan a  $-70^{\circ}\text{C}$  y 30 mtorr, en un liofilizador Virtis 10-324, resuspendiéndose posteriormente en 3.5 ml de agua destilada.

### 3.- DETERMINACION DE PROTEINAS

El contenido proteínico de los extractos enzimáticos se determina por el método de Lowry et al. (1951). Este método no es aplicable a extractos crudos, ya que la presencia de fenoles interfiere en los resultados. Para extractos crudos se utiliza el método de Bradford (1976). En ambos casos se ha utilizado albúmina de suero bovino como patrón para construir las rectas de calibrado (Fig. 6A y B).

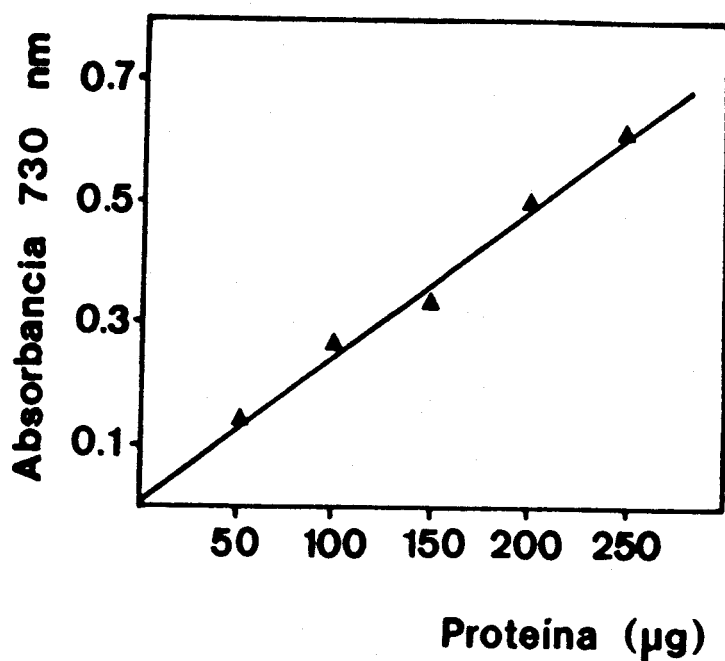


Fig. 6A.- Recta de calibrado con albúmina de suero bovino para la determinación de proteínas por el método de Lowry et al. (1951).

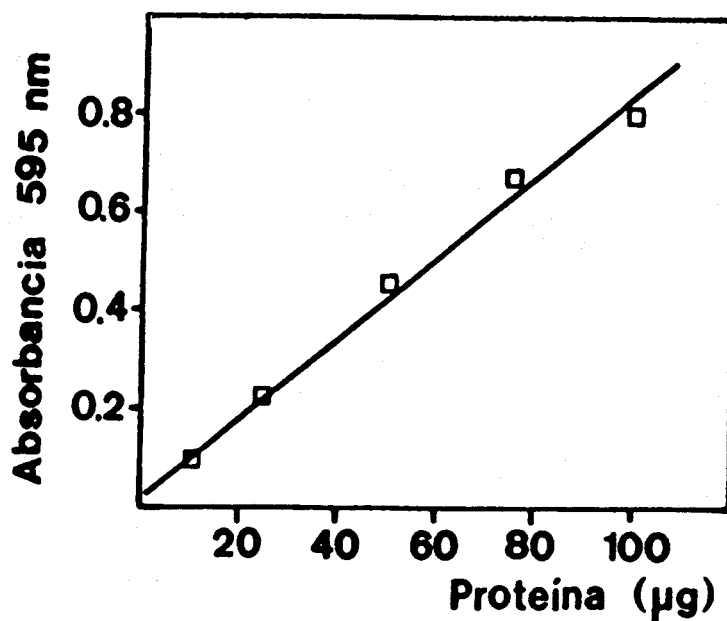


Fig. 6B.- Recta de calibrado con albúmina de suero bovino para la determinación de proteínas por el método de Bradford (1976).



#### 4.- ACTIVIDAD AIA-OXIDASA

##### 4.1.- Determinación de la actividad

Como medida de la actividad se utiliza la velocidad inicial de destrucción del AIA durante la incubación de una cantidad conocida del mismo y una alícuota de extracto enzimático.

La mezcla de reacción estándar contiene diclorofenol (DCP) 0.3 mM,  $MnCl_2$  0.3 mM, AIA 0.2 mM, 0.25 ml de extracto enzimático y tampón fosfato 20 mM pH 5.7 en un volumen total de 10 ml. La incubación se realiza por triplicado en matraces erlenmeyer de 50 ml, a 30°C, con agitación.

El AIA se determina por el método de Salkowski, modificado por Gordon y Weber (1951).

Al tiempo cero y a intervalos de 15 min, se toman muestras de 0.5 ml del medio de incubación que se mezclan con 2.5 ml de reactivo de Gordon-Weber. Tras 30 min en la oscuridad, se leen las absorbancias a 530 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8450A. La actividad se expresa como nmol AIA destruidos/min.mg proteína. Previamente se construye una recta de calibrado con AIA patrón (Fig. 7).

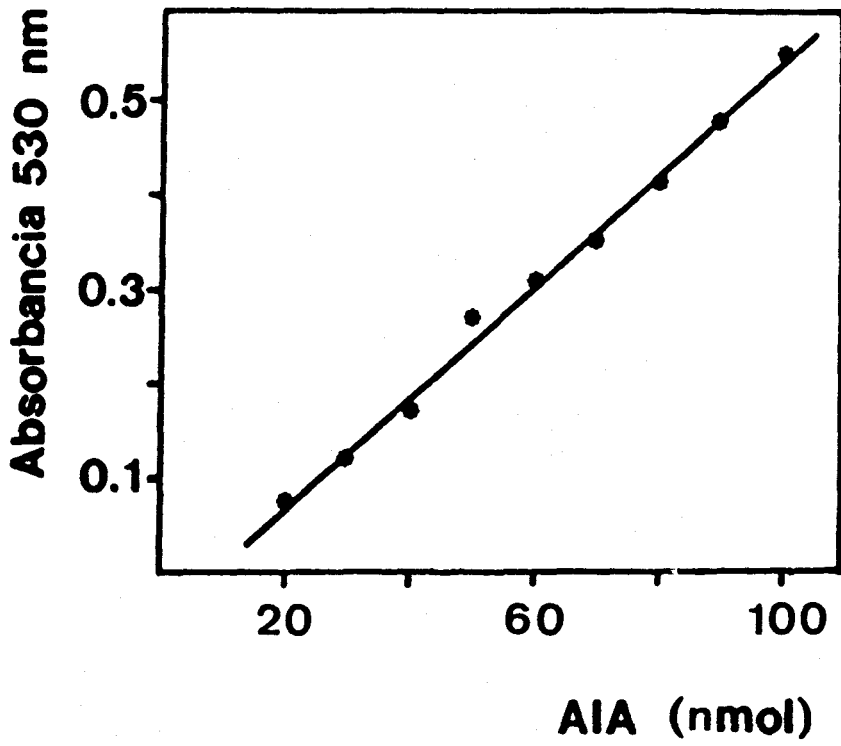


Fig. 7.- Recta de calibrado para la determinación de la actividad AIA-oxidasa.

#### 4.2.- Extracción de los productos de oxidación

Los productos de la oxidación enzimática del AIA absorben fuertemente en el ultravioleta con máximos a 247 y 254 nm (Ray 1956). Estos productos se extraen del medio de incubación estándar con diclorometano (3 x 20 ml). Las fracciones orgánicas de las tres extracciones se reúnen, se secan con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se llevan a sequedad en rotavapor a 30°C. El residuo se disuelve en 1 ml de tampón fosfato 20 mM pH 5.7.

##### 5.- SISTEMA FORMADOR DE ETILENO IN VITRO

La mezcla de reacción estándar contiene ACC 1 mM, fosfato de piridoxal (PLP) 0.3 mM, DCP 0.3 mM,  $MnCl_2$  0.3 mM, AIA 0.4 mM, tampón fosfato 20 mM pH 5.7 y extracto enzimático (100  $\mu$ l) en un volumen total de 1 ml. La incubación se lleva a cabo por triplicado en viales de 11 ml cerrados con tapones de goma, en la oscuridad a 30°C con agitación.

A los tiempos indicados en cada caso se toman muestras de 1 ml del espacio de cabeza para determinar el etileno liberado. El AIA se determina con 250  $\mu$ l del medio de incubación por el método de Gordon y Weber (1951).

## 6.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD EFE IN VIVO

Las hojas se lavan con agua corriente y se tratan con hipoclorito sódico al 0.5% durante 30 segundos (Aharoni et al. 1979). A continuación se lavan abundantemente con agua destilada esterilizada en autoclave (120°C, 20 min) y se cortan en discos de 4 mm de diámetro.

Cinco discos (aprox. 40 mg) se incuban con 1 ml de agua o ACC 1 mM en viales de 11 ml cerrados con tapones de goma, en la oscuridad a 30°C, con agitación. A los tiempos indicados en cada caso se toman muestras de 1 ml del espacio de cabeza para determinar el etileno liberado. La actividad EFE se mide restando el etileno liberado en las incubaciones con agua (etileno endógeno) del liberado en las incubaciones con ACC exógeno.

Cuando se utilizan hojas enteras, se incuba una hoja de unos 3 cm de longitud (70-90 mg), con 5 ml de agua o ACC 1 mM en viales de 60 ml.

En los ensayos con epicótilos de guisante, se utilizan 12 segmentos de 1 cm de longitud (aprox. 180 mg), que se incuban con 1 ml de agua o ACC 1 mM.

Todas las determinaciones se han realizado con 5 viales replicados.

## 7.- DETERMINACION DE ETILENO

Se lleva a cabo por cromatografía gaseosa en un cromatógrafo Hewlett Packard 5890, con detector de ionización de llama y columna de acero inoxidable de 2 m x 3 mm d.i. rellena de alúmina activada (80-100 mallas). Las condiciones empleadas han sido las siguientes:

- Flujo del gas portador ( $N_2$ ) 25 ml/min
- Temperatura de la columna 100°C
- Temperatura del detector e inyector 150°C

En estas condiciones el etileno tiene un tiempo de retención de 1.10 min. Se construye previamente una recta de calibrado partiendo de la mezcla comercial azethyl (5.2% de etileno en  $N_2$ ) de la Sociedad Española del Oxígeno (Fig. 8).

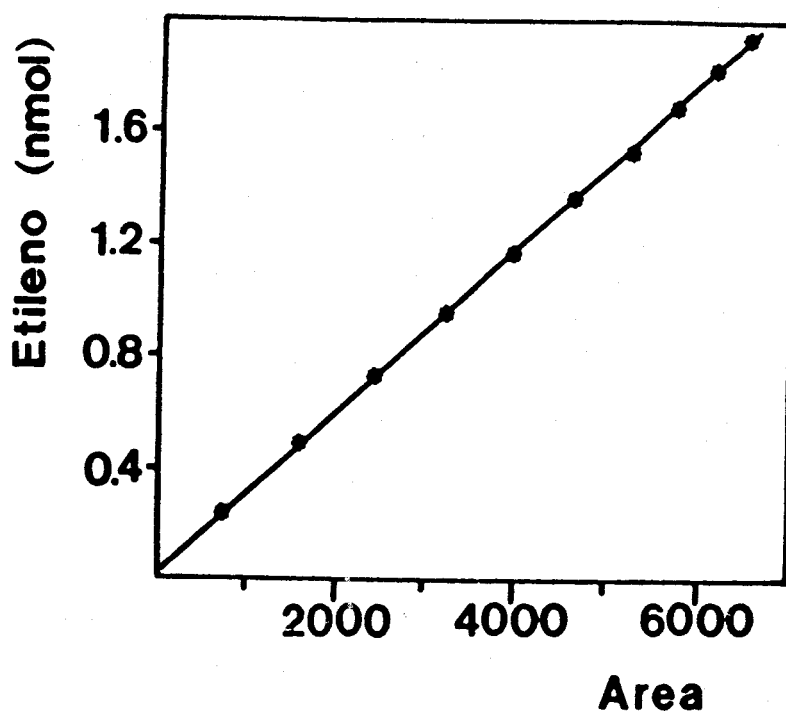


Fig. 8.- Recta de calibrado para la determinación de etileno.

## 8.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA

### 8.1.- In vitro

Se sigue el método de Pilet y Lavanchy (1969), que utiliza guayacol como sustrato. Se mide a 25°C el incremento de absorbancia a 420 nm de una mezcla formada por 2 ml de tampón fosfato 2 mM pH 6.1, 0.2 ml de guayacol al 1%, 0.2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM y 0.1 ml de extracto enzimático. La actividad peroxidasa se expresa como  $\Delta A_{420\text{nm}}/\text{min.mg proteína}$ . Las determinaciones se hacen por triplicado.

### 8.2.- In vivo

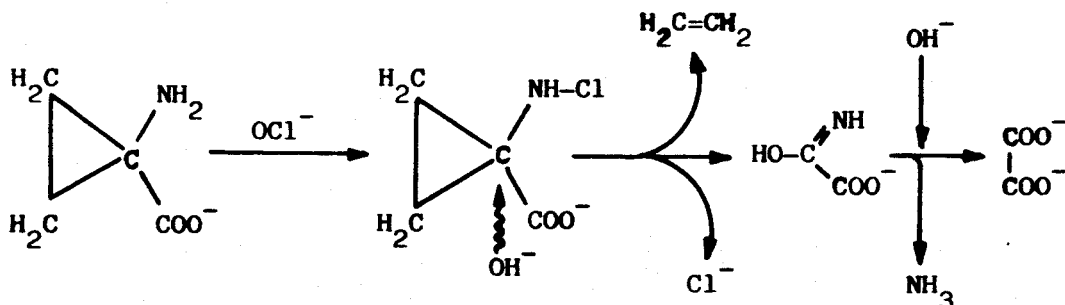
En un tubo de ensayo se incuba 1 disco de hoja de 4 mm de diámetro con 2.1 ml de tampón fosfato 2 mM pH 6.1, 0.2 ml de guayacol al 1% y 0.2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM. Se agita durante 15 min a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 420 nm del medio de incubación. La actividad se expresa como  $\Delta A_{420\text{nm}}/\text{min.g peso fresco}$ .



## 9.- DETERMINACION DEL CONTENIDO EN ACC

### 9.1.- Fundamento

El ACC se cuantifica por el método de Lizada y Yang (1979), que se basa en su conversión química en etileno con hipoclorito sódico como oxidante y  $Hg^{2+}$  como catalizador. El  $NaClO$  reacciona con  $\alpha$ -aminoácidos formando N-Cloramina como intermediario, que se degrada posteriormente a aldehído, amoníaco y  $CO_2$ . En el caso concreto del ACC se desprende etileno como uno de los compuesto intermediarios, según el siguiente mecanismo de reacción:



El  $NaClO$  se mezcla previamente con  $NaOH$  saturado en proporción 2:1 (v/v) ya que la máxima producción de etileno es a pH 10 o superior (Lizada y Yang 1979). Los autores han demostrado que este método es altamente específico para el ACC y que no existen interferencias con otros compuestos presentes en las incubaciones.

En este método la eficiencia de la reacción varía con la naturaleza del material a analizar, por lo que es

necesario calcular el porcentaje de conversión de ACC en etileno para cada caso. Este factor se calcula restando el etileno liberado en soluciones problema del etileno liberado por dichas soluciones a las que se han añadido cantidades conocidas de ACC patrón. Previamente se construye una recta de calibrado que permite hallar el factor de conversión del ACC patrón a etileno (Fig. 9).

Se ha utilizado este método para cuantificar el ACC en las incubaciones in vitro e in vivo. En las incubaciones in vivo el ACC se determina en el líquido y en los tejidos, para lo cual es necesaria la extracción previa de los aminoácidos de los mismos.

#### 9.2.- Extracción de los aminoácidos de los tejidos

El método de extracción está inspirado en el de Apelbaum y Yang (1981). El tejido a extraer se tritura en mortero con arena de mar lavada y descalcificada. El tejido triturado se trasvasa a un recipiente de extracción con ayuda de etanol al 70% (30 ml/g tejido), calentándose a reflujo durante 20 min en baño de arena. El extracto etanólico, una vez frío, se centrifuga a 18000 g durante 15 min y se filtra a través de papel, evaporándose a sequedad en rotavapor a 38°C. El residuo se disuelve en 1 ml de agua destilada y se filtra con equipo Millipore, usando prefiltro y filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro. Se obtiene así un extracto acuoso donde se determina el ACC.

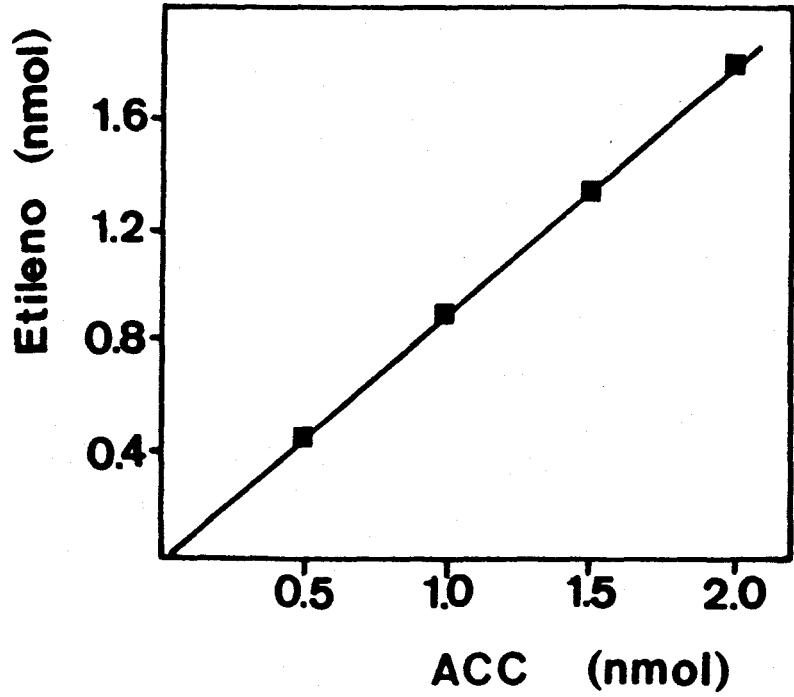


Fig. 9.- Conversión de ACC patrón en etileno. El factor de conversión obtenido para las concentraciones de ACC utilizadas es de 0.86.

### 9.3.- Cuantificación del ACC libre

En un vial de 11 ml, previamente enfriado, se introduce una parte alícuota del líquido a analizar y 50  $\mu$ l de  $\text{HgCl}_2$  20 mM, completando con agua destilada hasta un volumen de 0.9 ml. Se sella el vial, se coloca en baño de nieve con agitación, y se inyectan 100  $\mu$ l de una mezcla fría de NaClO al 5% y NaOH saturado (2:1, v/v). Tras diez minutos de agitación, el vial se agita vigorosamente durante 5 segundos para liberar el etileno de la mezcla de reacción y se determina el etileno desprendido en 1 ml del espacio de cabeza. Todas las determinaciones se realizan por duplicado.

### 9.4.- Cuantificación del malonil-ACC

En las incubaciones in vivo, el contenido en MACC del medio de incubación y del extracto acuoso de los tejidos se determina previa hidrólisis alcalina del mismo a ACC libre y ácido malónico (Kionka y Amrhein 1984).

En un tubo de ensayo de vidrio con tapón de rosca, se introduce una alícuota del líquido a analizar y un volumen equivalente de NaOH 10 N, haciendo pasar una corriente de  $\text{N}_2$  antes de cerrar el tubo. Se calienta en estufa a 110°C durante 5 h, obteniéndose el hidrolizado donde se cuantifica el ACC libre según se describe en el apartado anterior. Este valor corresponde al ACC total (ACC libre inicial + MACC). La

cantidad de MACC viene dada por la diferencia entre el ACC total obtenido tras la hidrólisis y el ACC libre presente antes de la misma.

## 10.- EXPERIENCIAS CON SULFURO DE CARBONO

### 10.1.- Tratamiento de los tejidos

Los discos de hojas a tratar se someten a una atmósfera de sulfuro de carbono de 180  $\mu\text{l/L}$  durante 15 min a temperatura ambiente (Peiser et al. 1984).

### 10.2.- Determinación del sulfuro de carbono

Se ha realizado en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 equipado con detector fotométrico de llama con filtro para azufre y columna capilar de fenilmetilsilicona al 5% (25 m x 0.31 mm d.i., espesor de fase 0.17  $\mu\text{m}$ ). Las condiciones de trabajo han sido las siguientes:

- Inyección a split-less
- Flujo del gas portador ( $\text{N}_2$ ) 25 ml/min
- Temperatura de la columna 50°C
- Temperatura del inyector 150°C
- Temperatura del detector 230°C

En estas condiciones el  $\text{S}_2\text{C}$  tiene un tiempo de retención de 0.84 min.

## 11.- EXPERIENCIAS CON ACC RADIATIVO

### 11.1.- Composición de las incubaciones

A las incubaciones estándar in vivo e in vitro se añaden 4 nmol de [2,3-<sup>14</sup>C]ACC (80 nCi/nmol).

Las incubaciones preparativas in vitro se realizan con 25 mg de ACC, 135 nmol de [2,3-<sup>14</sup>C]ACC (10.8  $\mu$ Ci), 50 ml de extracto enzimático o 25  $\mu$ g de peroxidasa comercial de rábano (HRP, 152 U/mg), 25 ml de MnCl<sub>2</sub> 3 mM y tampón fosfato 20 mM pH 5.7 en un volumen total de 250 ml.

### 11.2.- Determinación de la radiactividad

#### 11.2.1.- Fase gaseosa

Se utiliza un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890, provisto de detector de conductividad térmica y columna de acero inoxidable (2 m x 3 mm d.i.) con relleno de alúmina activada (80-100 mallas). Las condiciones utilizadas son:

Flujo del gas portador (He) 15 ml/min

Temperatura de la columna 100°C

Temperatura del detector e inyector 150°C

A la salida de gases del detector se acopla un flujo de metano (18 ml/min) y se lleva la mezcla a un contador de radiactividad Berthold modelo LB 2503 por medio

de un conducto de acero inoxidable.

El contador se calibra con etileno radiactivo procedente de la oxidación química de [2,3-<sup>14</sup>C]ACC (método de Lizada y Yang 1979), estableciéndose una relación lineal entre la radiactividad correspondiente al etileno (desintegraciones por minuto, DPM) y las cuentas por minuto (CPM) registradas por el contador (Fig. 10).

#### 11.2.2.- Fase líquida

Alícuotas de los medios de incubación in vivo o in vitro (5-100  $\mu$ l) se tratan con una mezcla Scintran-xilano (2:1, v/v) y se agitan hasta homogeneización en viales de centelleo de 20 ml. La radiactividad se mide en un contador de centelleo líquido LKB modelo Rackbeta II, con radio como patrón interno.

#### 11.2.3.- Tejidos

El tejido vegetal se lava cuidadosamente en agua destilada, se seca con papel de filtro y se tritura en mortero con arena de mar lavada y descalcificada. Al homogenado se añaden 3 ml de etanol, se filtra a través de papel y se lleva a sequedad en rotavapor a 38°C. El residuo se resuspende en 1 ml de agua destilada y se filtra. En el extracto así obtenido se determina la radiactividad de la forma descrita en el apartado anterior.



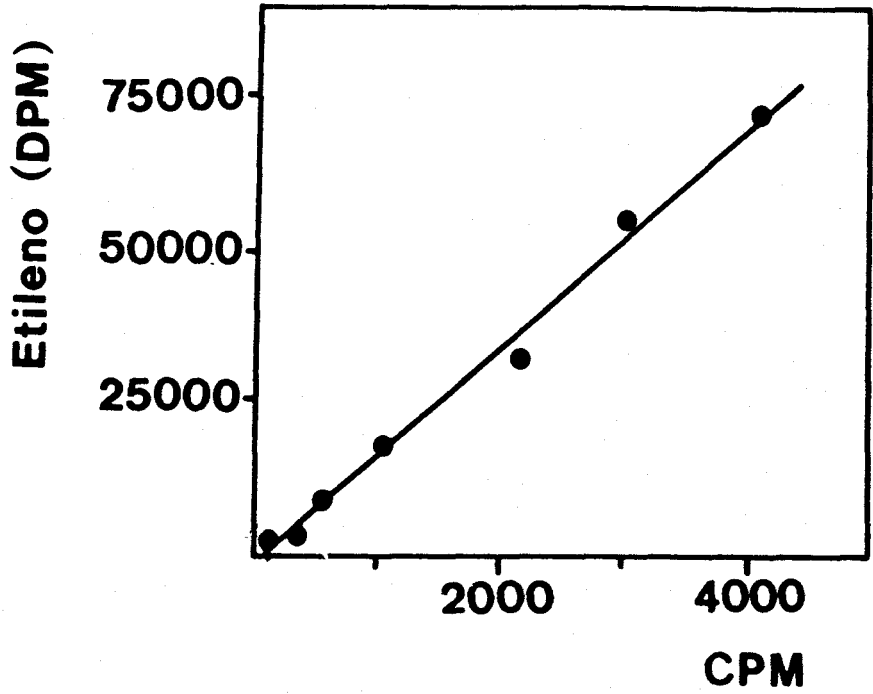


Fig. 10.- Relación entre las desintegraciones por minuto correspondientes al etileno marcado y las cuentas por minuto registradas por el contador de radiactividad en gases.

### 11.3.- Separación de los productos radiactivos

Los compuestos radiactivos presentes en los medios de incubación in vivo e in vitro se separan por CCF en silicagel 60-F con acetona : n-butanol : ácido acético : agua (7:7:2:4, v/v) como líquido de desarrollo. Las bandas radiactivas se detectan y cuantifican con un analizador lineal de radiactividad Berthold, modelo LB 2820-1, siendo el flujo de gas PR (metano al 10% en argón) de 20 ml/min.

En el caso de las incubaciones preparativas in vitro, se liofilizan éstas. El liofilizado se resuspende en 25 ml de metanol, se filtra y se concentra en rotavapor a 38°C hasta un volumen de 1-2 ml. Los productos radiactivos se separan por CCF preparativa en gel de sílice con metanol : cloroformo (3:1, v/v) como fase móvil. Las bandas radiactivas se detectan y cuantifican como se indica más arriba.

### 11.4.- Síntesis de [2,3-<sup>14</sup>C]MACC

Se sigue el método de Satoh y Esashi (1984b).

Se disuelven 1.01 g de ACC y 100 µl de [2,3-<sup>14</sup>C]ACC (135 nmol, 10.8 µCi) en 6 ml de NaOH 2 N, enfriándose la mezcla en baño de hielo. A esta mezcla fría se añaden 1.4 ml de cloruro de etilmalonilo (1.67 g) y 5 ml de NaOH 4 N, gota a gota durante unos 30 min, bajo agitación continua en baño de nieve. Al finalizar el proceso, se añade 1 ml de NaOH 4 N

y se lleva la reacción a temperatura ambiente durante 4 h.

A continuación se extrae la mezcla con éter etílico (2 x 10 ml) en ampolla de decantación, separándose la fase acuosa que se pasa por una columna de Amberlita IR-120 (forma H<sup>+</sup>) de 75 ml de lecho. La resina se lava hasta que el efluente resulta neutro y se evaporan las aguas de lavado en rotavapor, a 40°C, hasta la obtención de un residuo oleoso. El residuo se deja reposar en refrigerador toda la noche hasta la formación de cristales blanquecinos. Los cristales obtenidos, que corresponden a MACC y ACC residual, se filtran en frío, se disuelven en metanol y se separan por CCF en placa de celulosa, con n-propanol : NH<sub>4</sub>OH concentrado (7:3, v/v) como líquido de desarrollo. La banda de radiactividad de R<sub>f</sub> 0.22, correspondiente a MACC, se extrae con metanol y se lleva a sequedad con rotavapor a 38°C. Se obtienen unos cristales de color blanco cuya naturaleza se comprueba por cromatografía de gases y espectrometría de masas del derivado metilado (dimetil-MACC).

## 12.- DETECCION DE PEROXIDASAS SOLUBLES POR ISOELECTROENFOQUE (IEF) DIRECTO DE TEJIDOS

### 12.1.- Condiciones del IEF

El IEF se ha realizado a 10°C usando un equipo de electroforesis horizontal FBE 3000 de Pharmacia. Los geles de poliacrilamida, de 1 mm de espesor y composición T6C3 se preparan según se recomienda en "Isoelectric focusing. Principles and methods" de Pharmacia (1982). Se emplea una solución comercial de anfolito con rango de pH de 3 a 10 y  $H_3PO_4$  1 M y NaOH 1 M como soluciones electrolíticas en el ánodo y cátodo respectivamente.

Las condiciones eléctricas, obtenidas con una fuente ECPS 3000/150 de Pharmacia son: potencia constante 30 W y voltaje e intensidad máximos 2000 V y 150 mA respectivamente. La duración del IEF es de aproximadamente 1.5 h para un total de 3000 V.h.

### 12.2.- Preparación de las muestras

Las hojas se lavan con agua corriente y agua destilada y se cortan en piezas rectangulares de 5 x 10 mm. Inmediatamente después del corte las secciones se infiltran bajo vacío a 66 cm de Hg durante 1 min (Vendrell 1985), con agua destilada o KCl 100 mM. El vacío, obtenido con una bomba Millipore XX 5522050, se aplica a un matraz de 6 L conectado

al recipiente de infiltración a través de una llave de 3 pasos. Cuando se alcanza el vacío deseado en el matraz, se conecta éste al recipiente de infiltración durante 1 min. Las secciones de tejidos se mantienen inmersas en el líquido de infiltración con ayuda de un disco perforado de acero inoxidable.

Tras la infiltración, las secciones se secan cuidadosamente con papel de filtro y se cortan longitudinalmente en dos mitades de 2.5 x 10 mm cada una. Las dos mitades se colocan en su posición original sobre el gel, con el envés en contacto con la superficie del mismo.

Después de 30 min de IEF se retiran las secciones del gel, continuando el IEF durante 1 h más aproximadamente.

### 12.3.- Revelado del gel

#### 12.3.1.- Tinción de peroxidasas

Se utiliza el método de Hoyle (1977). El gel se sumerge en una solución conteniendo 75 mg de 3-amino-9-etilcarbazol, 7.5 ml de dimetilformamida, 150 ml de tampón acético-acetato 2 M (1:2.4, v/v) y 75  $\mu$ l de  $H_2O_2$  al 30%. Las bandas con actividad peroxidasa se tiñen de color rojo. A continuación el gel se lava con agua y se conserva en ácido acético al 2% en la oscuridad.

### 12.3.2.- Tinción de proteínas

Para calcular los pI se utiliza un patrón de 11 proteínas de pI conocido, revelándose los geles con nitrato de plata según el método de Henkeshoven y Dernick (1985) (Fig. 11).

### 12.4.- Cuantificación de las peroxidasas

Para cuantificar las peroxidasas extraídas de las secciones de tejidos en el IEF, se cortan los geles en tiras de 115 x 15 mm, determinándose los perfiles de densidad óptica mediante un densitómetro/absorciómetro Joyce Loebel modelo Chromoscan, provisto de una rejilla vertical (10 x 0.5 mm) en el emisor y un filtro 3 O.D. en el receptor.

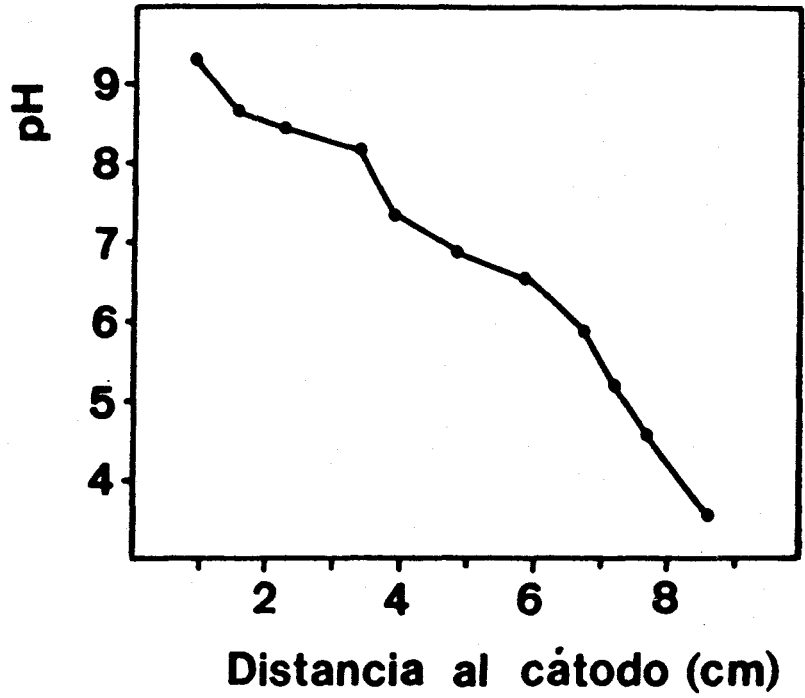


Fig. 11.- Gradiente de pH obtenido en isoelectroenfoque utilizando kits de proteínas de pI conocido. El gel se revela por el método de Henkeshoven y Dernick (1985).

### 13.- PRUEBAS QUIMICAS

Los compuestos formados a partir del ACC en las incubaciones in vivo e in vitro se han sometido a diferentes pruebas químicas.

#### 13.1.- Cromatografías de capa fina

Para los ensayos de tinción en placa, se cromatografían 25  $\mu$ l del medio de incubación en placas de silicagel 60-F con acetona : n-butanol : ácido acético : agua (7:7:2:4, v/v) como líquido de desarrollo. Para el revelado de las placas se utilizan los reactivos que se indican a continuación.

##### 13.1.1.- Revelado con yodo

Las placas se introducen en un recipiente con cristales de yodo resublimado hasta que el fondo adquiere un tono amarillento. Las sustancias que dan reacción positiva (insaturadas principalmente) presentan una coloración marrón (Barret 1962).

##### 13.1.2.- Revelado con ninhidrina

Permite detectar la presencia de grupos amino libres. Las placas se rocían con una disolución de ninhidrina al 0.2% en etanol (Barrollier 1955), calentándose en estufa a 70°C durante unos 15 min, hasta la aparición de bandas de



color rosa-violeta.

#### 13.1.3.- Revelado con fluorescamina

Las muestras, cromatografiadas en silicagel 60F-254, son rociadas con una solución de fluorescamina en acetona (10 mg/20 ml) y observadas a la luz ultravioleta a 365 nm. La presencia de fluorescencia indica reacción positiva con aminas.

#### 13.1.4.- Revelado con reactivo Sakai

Se rocían las placas con una mezcla de *p*-dimetilaminocinamaldehído (1 g), HCl al 5% (5 ml) y etanol al 95% (95 ml). La aparición de bandas rosadas indica la presencia de grupos amino libres.

#### 13.1.5.- Revelado con verde de bromocresol

Las placas se rocían con una disolución de verde de bromocresol al 0.04% en etanol, que se equilibra con NaOH 0.1 N hasta que el color vira del verde-azulado al naranja (Bryant y Overell 1953). Las sustancias ácidas se tiñen de color amarillo, mientras que las básicas aparecen de color azul.

#### 13.1.6.- Revelado con hexacianoferrato-nitroprusiato

Se utiliza una mezcla compuesta por 5 ml de

NaOH al 10%, 5 ml de nitroprusiato sódico al 10%, 5 ml de hexacianoferrato (III) de potasio al 10% y 15 ml de agua (Fishbein y Cavanaugh 1965). En el momento de su uso se añade un volumen equivalente de acetona. La presencia de nitrógeno alifático se detecta por la aparición de bandas rosadas.

#### 13.1.7.- Revelado con 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNPH)

Se rocían las placas con una disolución de 2,4-DNPH al 0.3% en HCl 4 N. La aparición de bandas amarillas indica la presencia de grupos carbonilo libres.

#### 13.2.- Preparación de derivados

##### 13.2.1.- Metilación

Se usa el método de Schlenk y Gellerman (1960) para ensayos a pequeña escala. Se hace pasar una corriente de  $N_2$  con vapores de éter etílico sobre una mezcla formada por 1 ml de carbitol, 1 ml de KOH al 60% y 100 mg de N-nitroso-N-metil-*p*-toluensulfonamida, lo que provoca una liberación de diazometano gaseoso que metila las muestras (25-100 mg) disueltas en 3 ml de metanol al 10% en éter etílico.

##### 13.2.2.- Derivatización con bromuro de *p*-fenilazofenacilo

Este reactivo reacciona con los grupos carboxilo en medio básico, originando compuestos coloreados de

fácil separación por CCF (Vioque et al. 1985).

En un tubo de ensayo roscado se colocan 50 mg de muestra, 2 ml de trietilamina al 5% en acetona y 100 mg de bromuro de *p*-fenilazofenacilo, manteniéndose bajo agitación constante durante 30 min. Los productos obtenidos se separan por CCF en silicagel 60-F con benceno como fase móvil.

### 13.2.3.- Derivatización con 2,4-DNPH

Se tratan 500  $\mu$ l del medio de incubación in vivo o in vitro con 4 ml de agua y 6 ml de 2,4-DNPH al 0.4% en HCl 4 N durante 15 min bajo agitación (Mehlitz et al. 1963). Una vez formadas las hidrazonas correspondientes, se procede a una doble extracción con 2.5 ml de éter etílico en embudo de decantación. La fracción orgánica se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se filtra, concentrándose hasta 0.5 ml de volumen en rotavapor a 30°C. Los diferentes derivados se separan por CCF en silicagel 60-F con tetracloruro de carbono : hexano : acetato de etilo (10:2:3, v/v) como líquido de desarrollo.

### 13.3.- Columnas de intercambio iónico

Se utilizan para comprobar la presencia de grupos cargados. Se pasa 1 ml del medio de incubación estándar in vitro, conteniendo [2,3-<sup>14</sup>C]ACC, a través de columnas de vidrio con un lecho de 15 ml de resina Dowex-2

(forma  $\text{OH}^-$ ) o Amberlita CG-120 (forma  $\text{H}^+$ ). Tras un lavado con 30 ml de agua destilada, se eluyen las fracciones retenidas con 30 ml de  $\text{HCOOH}$  6 N (Dowex-2) o 30 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  2 N (Amberlita CG-120). Las fracciones radiactivas obtenidas se analizan con un contador de centelleo líquido.

## 14.- PRUEBAS ESPECTROSCOPICAS

### 14.1.- Espectros de absorción en el ultravioleta

Se realizan en cubeta de 1 cm en espectrofotómetro Hewlett Packard 8450A. Se ha usado metanol especial para espectrofotometría como disolvente.

### 14.2.- Espectros de absorción en el infrarrojo

Se ha utilizado un espectrofotómetro Perkin Elmer 299, realizándose los espectros en pastilla de KBr seco.

### 14.3.- Espectros de resonancia magnética nuclear

Se han registrado en un espectrómetro Varian XL-200.

Los espectros de protones ( $^1\text{H}$ -RMN) se han realizado a 200 MHz, con técnica de pulso-transformada de Fourier. Como disolventes se utilizan dimetilsulfóxido- $\text{d}_6$  y agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ), con tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

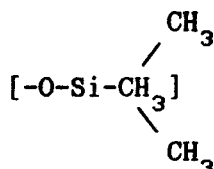
Los espectros de carbonos ( $^{13}\text{C}$ -RMN) se han realizado a 50.3 MHz, usando como disolvente agua deuterada y TMS como referencia interna.

#### 14.4.- Espectros de masas

Se han registrado en un espectrómetro MS 30/70 VG con sistema de datos DS 11/250, introduciendo los sólidos directamente en la fuente de ionización.

Los productos metilados y sililados se introducen a través de un cromatógrafo de gases Konik KNK 200C equipado con columna capilar (30 m x 0.25 mm d.i.) de OV1/101 BP.

Para comprobar la presencia de grupos hidroxilo se ha derivatizado con bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BTMFA), que sustituye el grupo OH por



dando fragmentaciones características (Blau y King 1978). La muestra a tratar se disuelve en piridina, añadiéndose un volumen equivalente de BTMFA; se calienta a 80°C durante 15 min y se analiza seguidamente por cromatografía gaseosa y espectrometría de masas.

## RESULTADOS Y DISCUSION

**1.- ESTUDIO DEL ENZIMA FORMADOR DE ETILENO DE HOJAS DE OLIVO**



## 1.1.- CONDICIONES OPTIMAS DE INCUBACION

Se ha realizado una serie de ensayos para establecer las condiciones que permitan el mayor rendimiento en la reacción de transformación del ACC en etileno in vivo.

### 1.1.1.- Medio de incubación

La actividad EFE se determina incubando tejidos vegetales en una disolución de ACC y midiendo el etileno liberado. Se ha ensayado la actividad EFE de discos de hojas de olivo en distintos medios: agua, sorbitol 600 mM (Apelbaum et al. 1981b) y sacarosa al 2% (Lau et al. 1978). En la tabla 1 se recogen los resultados obtenidos al incubar 5 discos de hojas de olivo de 4 mm de diámetro con ACC 1 mM en los tres medios indicados.

La máxima producción de etileno se obtiene cuando los discos se incuban con ACC y agua, que es el medio más utilizado para la determinación de la actividad EFE. Satoh y Esashi (1983) encuentran también un ligero efecto inhibitor del sorbitol sobre la producción de etileno.

### 1.1.2.- Número y disposición de los discos

Como puede observarse en la fig. 12, el número de discos utilizado en las incubaciones no influye en la

Tabla 1.- Etileno liberado en incubaciones de discos de hojas de olivo con ACC 1 mM en distintos medios.

Medio de incubación	Etileno (nmol/24h)
Agua	3.06±0.22 <sup>a</sup>
Sorbitol 600 mM	2.85±0.25
Sacarosa 2% (p/v)	2.32±0.28

<sup>a</sup> Media±σ de seis replicados.

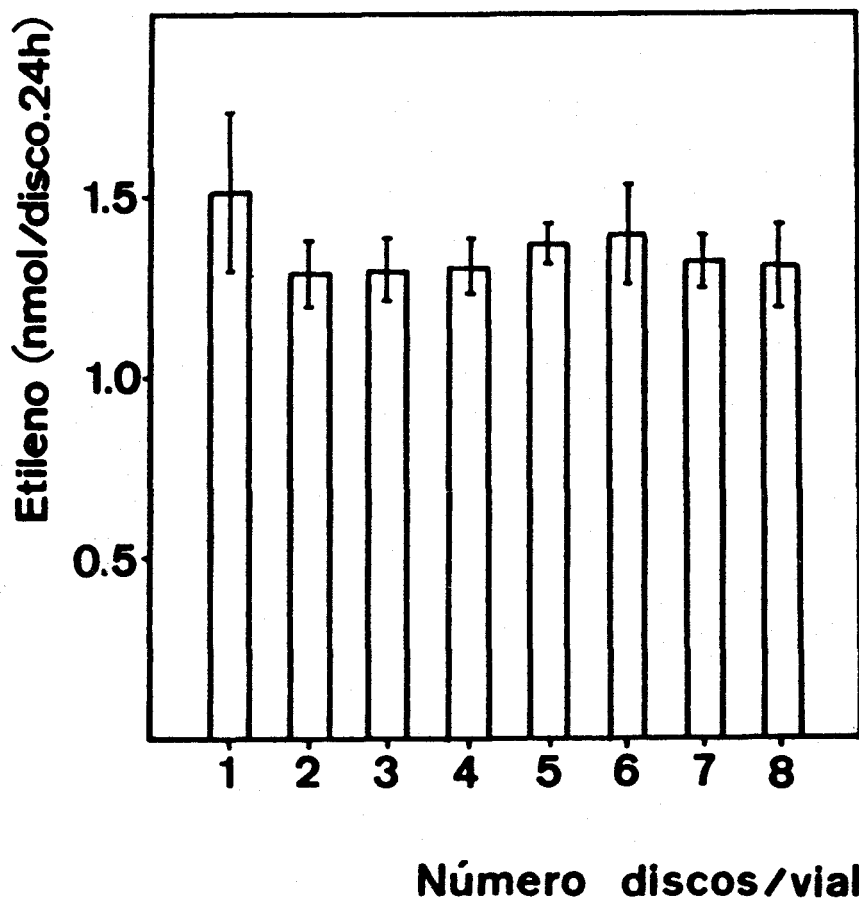


Fig. 12.- Etileno liberado en incubaciones de distinto número de discos con ACC 1 mM.

cantidad total de etileno liberada por cada disco. Cuando se incubaba un solo disco, la dispersión obtenida es mucho mayor, disminuyendo la reproducibilidad. Para las determinaciones de la actividad EFE se utilizarán 5 discos, valor que da la menor desviación típica.

En general, en las experiencias que se realizan con tejidos, la dispersión de los resultados obtenidos es alta, por lo que se ha estudiado el efecto que la disposición de los discos (ordenados o al azar) ejerce en las determinaciones de la actividad EFE.

Se incuban 15 viales con 5 discos cada uno dispuestos todos ellos con el haz hacia arriba (ordenados) y otros 15 viales con los discos al azar, con ACC 1 mM. Como puede verse en la tabla 2, la disposición de los discos en el vial no influye en el etileno liberado, pero sí en la dispersión de los valores obtenidos, que es significativamente menor cuando los discos se disponen de manera ordenada.

### 1.1.3.- El oxígeno como factor limitante

La biosíntesis de etileno a partir de su precursor ACC es una reacción dependiente de oxígeno (Adams y Yang 1979), por lo que en determinadas circunstancias puede llegar a ser un factor limitante.

Se realizan incubaciones en viales de 6.8, 11, 60 y

Tabla 2.- Etileno desprendido en incubaciones de ACC 1 mM con 5 discos de hojas de olivo dispuestos al azar y ordenados con el haz hacia arriba. Los datos expresan nmol etileno/24h.

Discos al azar	Discos ordenados
5.71	6.76
6.18	7.05
6.85	7.59
4.71	6.84
7.18	6.14
7.44	7.32
6.15	6.92
8.14	8.13
7.14	7.73
6.03	8.06
8.13	5.95
8.73	8.98
8.65	8.67
9.04	8.40
12.26	7.75
$x_1 = 7.5 \pm 1.8$	$x_2 = 7.5 \pm 0.9$
$s_1^2 = 3.24$	$s_2^2 = 0.81$
$F_{(14, 14, 1\%)} = 3.7$	$F = 4^{**}$

Tabla 3.- Producción de etileno en incubaciones realizadas en viales de distinto tamaño. Los datos expresan  $\bar{x} \pm \sigma$  de cinco replicados.

Volumen del vial (ml)	Etileno <sup>x</sup> (nmol/24h)
6.8	2.18±0.30 <sup>a</sup>
11	3.80±0.65 <sup>b</sup>
60	4.20±0.67 <sup>b</sup>
120	3.79±0.51 <sup>b</sup>

<sup>x</sup> Letras distintas indican diferencias significativas al nivel del 5% según el test de Duncan (Ruiz-Maya 1983).

Tabla 4.- Etileno (nmol) liberado en incubaciones aireadas y no aireadas. Los datos expresan  $\bar{x} \pm \sigma$  de diez replicados para cada tiempo.

Incubación	4 h	8 h	24 h	30 h	48 h
Estándar	0.20±0.05	1.05±0.35	3.65±1.02	3.95±0.92	4.60±0.83
Aireada	0.23±0.05	1.03±0.50	3.60±1.10	4.00±0.85	4.70±0.75



120 ml, determinándose el etileno liberado. Como puede verse en la tabla 3, la producción de etileno en viales de 6.8 ml es sensiblemente menor que en los otros tamaños de vial, entre los cuales no hay diferencias significativas.

Para comprobar que el oxígeno no es limitante en los viales de 11 ml, se han llevado a cabo incubaciones en dichos viales sometiéndolos a 2 min de aireación tras cada determinación de etileno. Los resultados se comparan con los obtenidos en viales de 11 ml sin airear (Tabla 4).

Se demuestra que en los viales de 11 ml el oxígeno no es limitante para la conversión ACC ---> etileno, resultando por tanto adecuados para nuestros estudios sobre el EFE.

#### 1.1.4.- Influencia del tipo de tapón

Se ha estudiado el efecto que, en la determinación de la actividad EFE, ejerce el tipo de tapón utilizado para cerrar los viales de incubación. La tabla 5 recoge la evolución del etileno liberado por incubaciones de discos de hojas de olivo con ACC 1 mM en viales cerrados con tapones de goma y de teflón. Puede observarse que cuando se utilizan tapones de goma el etileno presente en dichas incubaciones es mucho mayor que cuando se usan tapones de teflón.

Estas diferencias observadas no son debidas a

Tabla 5.- Etileno producido por tejidos de olivo incubados en viales cerrados con diferente tipo de tapón.

Tiempo (h)	Tapón de goma (nmol)	Tapón de teflón (nmol)
3	0.11±0.03	0.04±0.01
6	0.25±0.04	0.11±0.02
24	0.60±0.10	0.29±0.08
48	1.30±0.10	0.27±0.06



difusión del etileno en el caso de los tapones de teflón, sino a la existencia de un metabolismo oxidativo del etileno en los tejidos de olivo, que se ve inhibido al utilizar tapones de goma (Ver apartado 4: Metabolismo del etileno). Por tanto, los tapones de teflón no son adecuados para los estudios sobre el EFE, ya que el etileno producido (medida de la actividad) va siendo metabolizado durante las incubaciones.

#### 1.1.5.- El etileno de herida

Cuando se dañan los tejidos vegetales (por herida, lesión mecánica, etc.) hay un incremento en la producción basal de etileno. Esta estimulación puede ser debida a un incremento en el contenido de ACC por inducción del enzima ACC-sintasa (Kende y Boller 1981), o a reacciones mediadas por radicales libres y peróxidos provenientes de las membranas dañadas, explicando así su rápida aparición (Boyer y De Jaegher 1986).

En nuestras experiencias hemos utilizado discos de hojas de olivo, causando un daño al tejido. Se ha determinado el etileno liberado a partir del ACC endógeno y la actividad EFE en discos que han sido sometidos a distinto número de cortes. Los discos se cortan diametralmente 1, 2 ó 3 veces, siendo posteriormente incubados con agua o con ACC 1 mM.

Cuando se incuban los discos con agua, el etileno

liberado es función de la intensidad de la lesión (Fig. 13), observándose que la producción de etileno es directamente proporcional a la superficie herida. Este parámetro se determinó en base al siguiente esquema:

Número de cortes	Long. cortada	Long. Herida Relativa
0	$2\pi r$	1.00
1	$2\pi r+4r$	1.64
2	$2\pi r+8r$	2.27
3	$2\pi r+12r$	2.91

Cuando se incuban discos sometidos a distinto número de cortes con ACC 1 mM se comprueba que el etileno producido es independiente de la intensidad de la lesión (Tabla 6). Estos resultados se explican por la estimulación del enzima ACC-sintasa en los tejidos heridos (Wang y Adams 1982), efecto que no se observa en las incubaciones con ACC exógeno, ya que en este caso los niveles de ACC en los tejidos son suficientemente altos para saturar la actividad EFE.

Para evitar una posible interferencia del etileno de heridas en la medida de la actividad EFE, algunos autores preincubaban los tejidos durante 1 hora en agua antes de la incubación con ACC (Aharoni y Yang 1983). La tabla 7 recoge los resultados de incubaciones estándar y de incubaciones con discos sometidos a una preincubación de 1 hora en agua. Puede

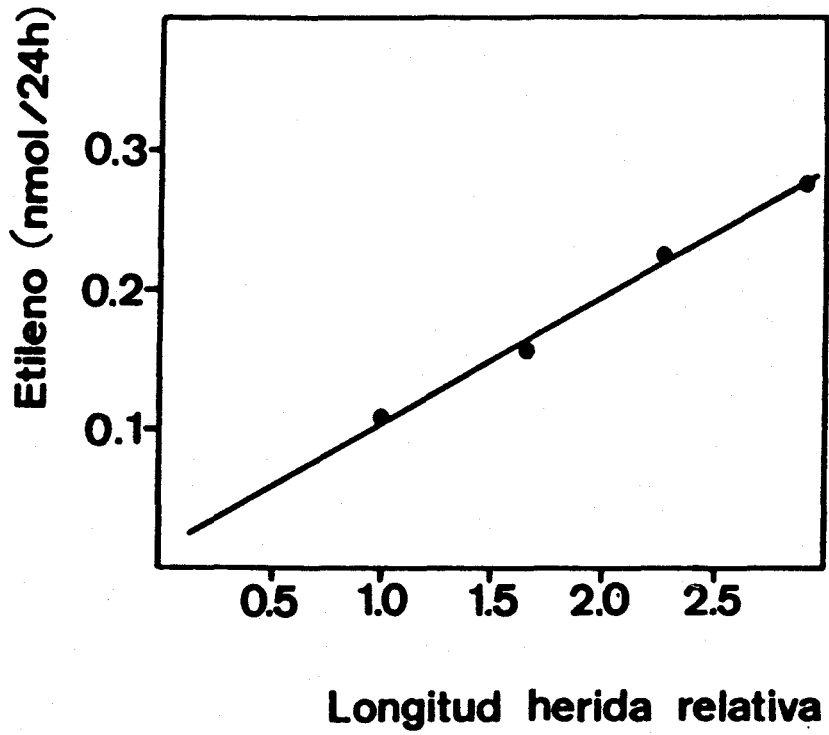


Fig. 13.- Etileno de herida liberado por tejidos de hojas de olivo incubados en agua.

Tabla 6.- Etileno producido en incubaciones de discos sometidos a distinto número de cortes con ACC 1 mM. Los datos indican  $\bar{x} \pm \sigma$  de seis replicados.

N° de cortes	L.H.R. <sup>a</sup>	Etileno (nmol/24h)
0	1.00	2.45±0.44
1	1.64	2.52±0.38
2	2.27	2.21±0.35
3	2.91	2.30±0.39

<sup>a</sup> Longitud de herida relativa.

Tabla 7.- Etileno liberado por incubaciones estándar y sometidas a preincubación. Los datos expresan  $\bar{x} \pm \sigma$  de 15 replicados.

Incubación	Etileno (nmol/24h)	t <sup>a</sup>	F <sup>b</sup>
Estándar	3.35±0.36	1.80NS	1.43NS
Preincubación	3.61±0.43		

<sup>a</sup> Valor de la t de Student.  $t_{(28, 5\%)} = 2.06$

<sup>b</sup> Valor de la F de Fisher-Snedecor.  $F_{(14, 14, 5\%)} = 2.48$

observarse que la preincubación no influye en la cantidad de etileno producido. Estos datos y los recogidos en la tabla anterior indican que el etileno de herida no influye en la determinación de la actividad EFE.

#### 1.1.6.- Temperatura óptima

La fig. 14 resume los resultados obtenidos cuando se determina la actividad EFE a temperaturas comprendidas entre 17 y 40°C. La temperatura óptima de actuación del enzima es de 30°C, tanto a 10 como a 24 horas de incubación.

Esta temperatura de 30°C coincide con la utilizada en la bibliografía para la medida de la actividad EFE de otros tejidos vegetales (Machácková y Zmrhal 1981, Aharoni y Yang 1983).

A la vista de los resultados obtenidos, se han establecido las siguientes condiciones óptimas de incubación para la determinación de la actividad EFE: cinco discos de hojas de olivo con el haz hacia arriba, sin preincubación en agua, se incuban a 30°C con ACC 1 mM en viales de 11 ml cerrados con tapón de goma.

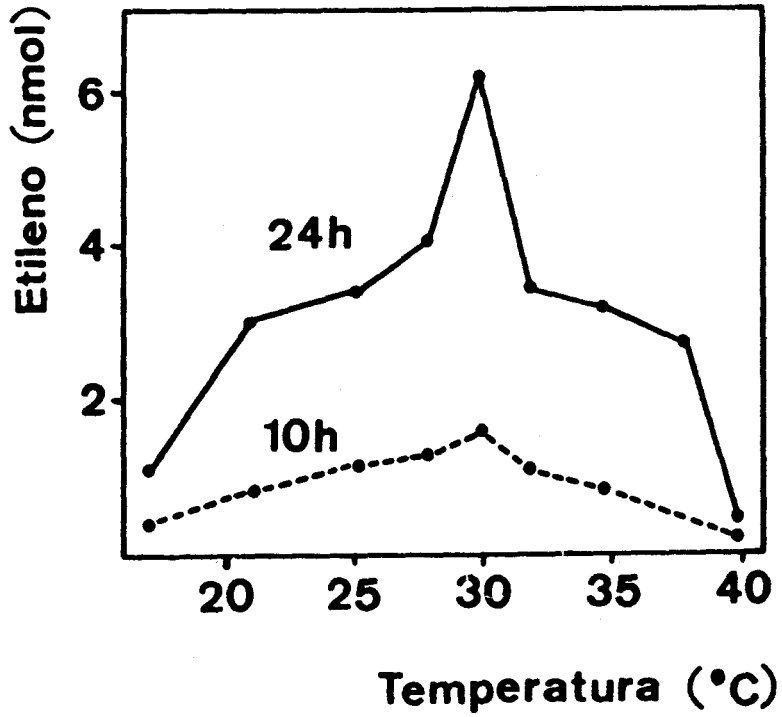


Fig. 14.- Efecto de la temperatura sobre el enzima formador de etileno de hojas de olivo.

## 1.2.- CARACTERISTICAS DEL EFE DE HOJAS DE OLIVO

El EFE de hojas de olivo presenta las siguientes propiedades : es termolábil, requiere oxígeno, se inactiva al homogeneizar el tejido y se inhibe por cianuro, azida, EDTA, iones cobalto, dinitrofenol y galato de propilo (Vioque et al. 1981, Vioque y Vioque 1985). Como continuación de estos trabajos, se estudian algunas características de esta actividad.

### 1.2.1.- Evolución de la actividad enzimática durante el período de incubación

En la fig. 15 se representa la evolución del desprendimiento de etileno a lo largo del tiempo en viales que contienen 5 discos de hojas de olivo (40 mg aprox.) incubados en agua y en ACC 1 mM.

Como se puede observar, los discos de hojas de olivo tienen una tasa basal de desprendimiento de etileno muy baja, del orden de 0.4 nmol/30h. Al añadir ACC al medio de incubación se aprecia que el desprendimiento de etileno aumenta de forma muy acusada durante las 30 primeras horas de incubación y a partir de este momento el incremento es menos pronunciado, estabilizándose a partir de las 48 horas.

El cese en la producción de etileno indica que el EFE ha perdido su actividad, a pesar de la gran cantidad de

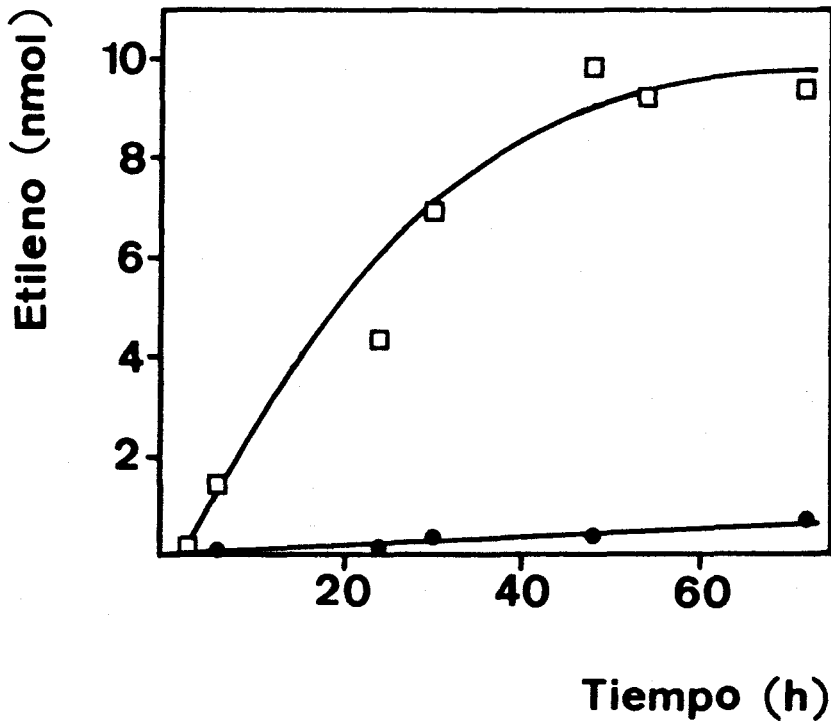


Fig. 15.- Actividad del EFE de discos de hojas de olivo expresada como nmol de etileno acumulado en el tiempo. (●) Incubaciones con agua, (□) incubaciones con ACC 1 mM.



sustrato presente en el medio y de que el oxígeno no es un factor limitante (tablas 3 y 4). La disminución en la producción de etileno podría deberse a una autoinhibición provocada por el propio etileno, como ha sido descrita en plátanos (Domínguez y Vendrell 1988); o también a que el ACC no sea asequible a la acción del EFE a causa de su situación en distintos compartimentos celulares (Guy y Kende 1984b), pudiendo estar la síntesis de etileno regulada por el transporte de ACC desde el citosol a la vacuola (Saftner y Baker 1987).

El rendimiento en la conversión del ACC exógeno en etileno por los discos de hojas de olivo es bajo, del orden del 1-2% a las 48 horas de incubación, aunque similar al de otros tejidos vegetales (Apelbaum et al. 1981a, Guy y Kende 1984b, Manning 1985, Porter et al. 1986).

#### 1.2.2. Influencia de la concentración de sustrato. Cálculo de $K_m$

Se incuban discos de hojas de olivo con concentraciones crecientes de ACC, determinándose las velocidades iniciales de formación de etileno. Tras las incubaciones se determinan las concentraciones de ACC en los tejidos (ver Materiales y Métodos). La tabla 8 y la fig. 16 recogen los resultados obtenidos. Se observa que el EFE de hojas de olivo es saturable por ACC a concentraciones superiores a 40  $\mu\text{M}$ .

Tabla 8.- Influencia de la concentración de ACC en la actividad EFE.

SE <sup>a</sup> ( $\mu$ M)	SI ( $\mu$ M)	Velocidad (pmol/h.g PF)
1.0	0.93	3.52
1.5	1.42	5.15
2.0	1.85	6.40
3.0	2.86	9.01
5.0	4.5	12.4
10	9.2	18.5
20	17.2	23.8
40	35.7	28.6
60	45.5	28.6

<sup>a</sup> SE y SI corresponden a la concentración de ACC del medio de incubación y a la concentración de ACC en los tejidos respectivamente.

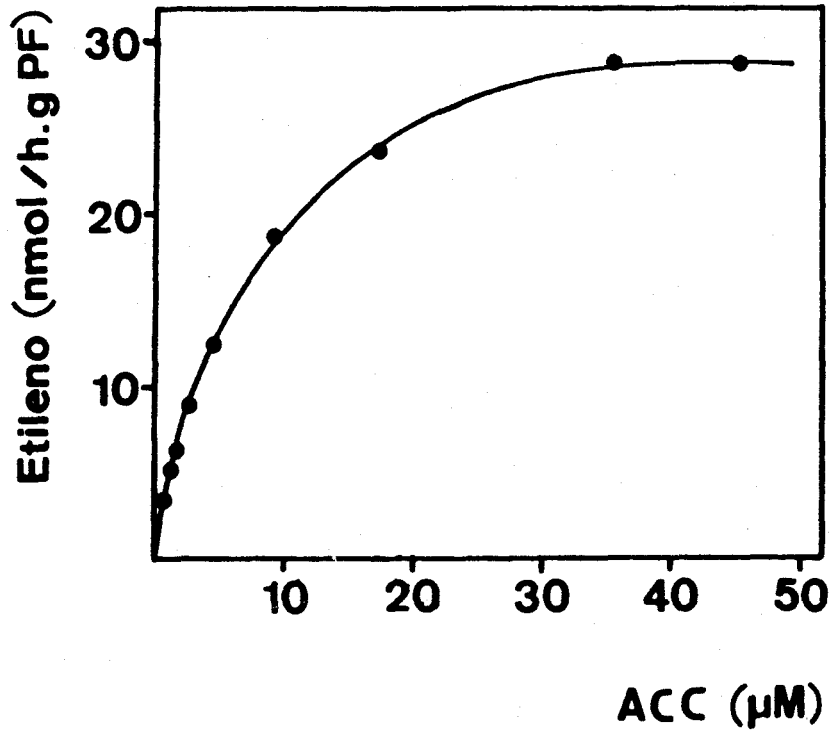


Fig. 16.- Influencia de la concentración interna de sustrato sobre la actividad EFE.

La fig. 17 muestra una representación de Line-weaver-Burk de las velocidades iniciales de liberación de etileno a diferentes concentraciones internas de ACC, obteniéndose una velocidad máxima de 35.3 nmol de etileno/h.g PF y una  $K_m$  aparente para el ACC de 8.4  $\mu\text{M}$ . Este valor de  $K_m$  es del mismo orden que el encontrado para otros tejidos vegetales: 8.1  $\mu\text{M}$  en manzanas y 20  $\mu\text{M}$  en hojas verdes de trigo (Yip et al. 1988), 16  $\mu\text{M}$  para hojas verdes de cebada (Wang y Yang 1987) y 25  $\mu\text{M}$  en hipocótilos de haba mung (Yoshii e Imaseki 1981).

Estos valores de  $K_m$  aparente representan una estimación de su valor real ya que las concentraciones internas de ACC sólo son calculables en nmol/g PF y se asume además que el ACC está homogéneamente distribuido en el tejido, pudiendo estar compartimentado (Jiao et al. 1987, Yip et al. 1988).

### 1.2.3.- Efecto de análogos estructurales

Análogos químicos estructurales son a menudo inhibidores competitivos de reacciones enzimáticas. La ciclopropilamina (CPA), el ácido ciclopropanocarboxílico (CPC) y el ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico (AIB) son análogos estructurales del ACC y por tanto posibles inhibidores del EFE. Para probar la naturaleza de la reacción  $\text{ACC} \rightarrow \text{C}_2\text{H}_4$  se ensaya si CPA, CPC y AIB inhiben dicho paso. La tabla 9 resume los

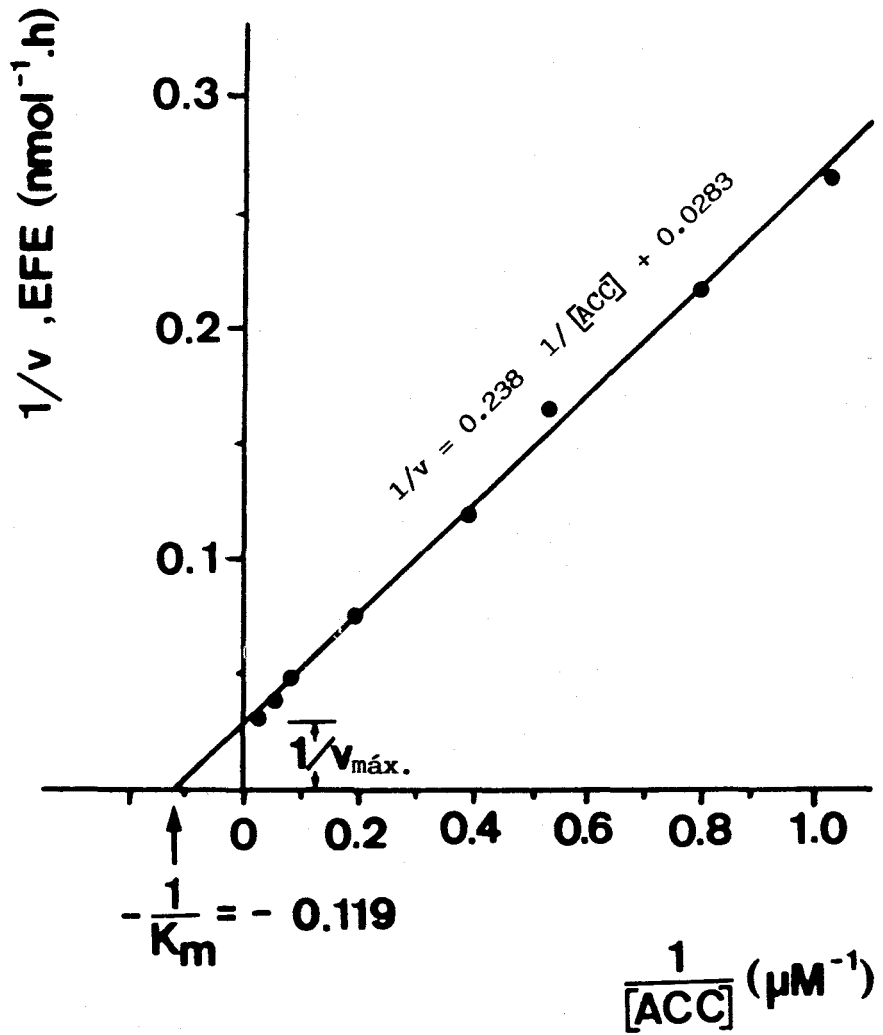


Fig. 17.- Representación de Lineweaver-Burk de las velocidades iniciales de producción de etileno a diferentes concentraciones internas de ACC.

Tabla 9.- Producción de etileno en incubaciones de discos de hojas de olivo con análogos estructurales del ACC a concentración 1 mM. Los resultados expresan  $\bar{x} \pm \sigma$  de 5 replicados.

Medio de incubación	Etileno/24 h (%) <sup>a</sup>
ACC	100± 7
CPA	5± 2
CPC	3± 2
AIB	ND
ACC + CPA	105± 9
ACC + CPC	100±13
AIB + ACC	62± 5 *

<sup>a</sup> Porcentaje de la incubación estándar con ACC. ND: No detectado

\* Diferencia significativa al nivel del 5% respecto a la incubación estándar, según el test de Duncan (Ruiz-Maya 1983).

resultados obtenidos al incubar estos análogos a concentración 1 mM con discos de hojas de olivo y su efecto sobre la actividad EFE.

Como puede verse en la tabla 9, ninguno de los análogos actúa como precursor del etileno in vivo, aunque la CPA pueda ser transformada químicamente en etileno (Lizada y Yang 1979). Por otra parte CPA y CPC no inhiben la conversión del ACC exógeno en etileno, mientras que el AIB inhibe la actividad EFE en un 38%. Estos resultados indican que es necesaria la presencia simultánea de los grupos  $\alpha$ -amino y  $\alpha$ -carboxílico para la acción inhibidora. El AIB inhibe competitivamente la conversión del ACC exógeno en etileno en otros tejidos vegetales, aunque se necesitan concentraciones relativamente altas (10 mM) del inhibidor (Sato y Esashi 1983). Probablemente el parecido estructural con el ACC es la causa de la acción inhibidora, habiéndose sugerido que la descarboxilación del AIB y la oxidación del ACC están catalizadas por el mismo sistema enzimático (Liu et al. 1984b).

#### 1.2.4.- Efecto de la aminoetoxivinilglicina (AVG)

Los análogos estructurales de la vinilglicina (ácido L-2-amino-4-alcoxi-trans-3-butenoico) son inhibidores de reacciones enzimáticas dependientes de fosfato de piridoxal (Rando 1974). Estos compuestos inhiben la conversión de metionina en etileno (Yang y Hoffman 1984). De entre ellos el

más efectivo y comúnmente utilizado es la AVG. La AVG inhibe la conversión de SAM en ACC tanto in vivo (Adams y Yang 1979) como in vitro (Boller et al. 1979), pero no parece tener efecto sobre la conversión ACC ---> etileno (Apelbaum et al. 1981b, Yang y Hoffman 1984).

Se ensaya el efecto de la AVG sobre la actividad formadora de etileno de tejidos de olivo (Tabla 10). Puede observarse que AVG 5  $\mu$ M inhibe ligeramente la conversión del ACC exógeno en etileno. Estos resultados coinciden con las últimas observaciones de Machácková et al. (1989a) quienes encuentran también una ligera inhibición de la actividad EFE por AVG en explantes de *Prunus* y *Dianthus*. Estos datos sugieren una cierta acción de la AVG sobre el EFE que implicaría, directa o indirectamente, la existencia de algún factor regulador del EFE todavía no conocido (Machácková et al. 1989a).

#### 1.2.5.- Efecto de secuestradores de radicales libres

Atrapadores de radicales libres tales como galato de propilo (GP) y benzoato sódico inhiben la producción de etileno en frutos, flores y tejidos vegetativos (Konze et al. 1980, Apelbaum et al. 1981a). Trabajos posteriores implican a los radicales libres en la conversión del ACC en etileno, ya que éste es el paso sensible a estos inhibidores (Yang y Hoffman 1984).



Tabla 10.- Efecto de la AVG sobre la actividad EFE

Incubación	Etileno <sup>a</sup> /24 h
ACC 1 mM	100±11
+ AVG 5 μM	81± 9 *

<sup>a</sup> Porcentajes de la incubación estándar

\* Diferencias significativas al nivel del 5% según el test de la t de Student.

Tabla 11.- Efecto de atrapadores de radicales libres (1 mM) sobre la actividad EFE de discos de hojas de olivo.

Tratamiento	Etileno (%)
-	100
Galato propilo	34
Ascórbico	121
Fórmico	128
Manitol	101

Para comprobar la naturaleza de estos radicales, se ensaya el efecto de algunos atrapadores de radicales libres (galato de propilo, ácido ascórbico, ácido fórmico y manitol) a concentración 1 mM sobre la actividad del EFE de hojas de olivo (Tabla 11). De los secuestradores de radicales libres no específicos (galato de propilo y ascórbico), sólo el GP inhibe la reacción (en un 66%). Los atrapadores de radicales OH<sup>•</sup> (fórmico y manitol) no inhiben la actividad EFE, descartando la intervención de dichos radicales. La ligera estimulación de la conversión ACC ---> etileno por los ácidos ascórbico y fórmico (121 y 128% respectivamente) puede ser debida a que el medio ácido facilita la penetración del ACC en los tejidos vegetales (Sato y Esashi 1983) e incluso puede estimular la actividad EFE (Chen y Wellburn 1989). Además el ácido ascórbico puede actuar in vivo como agente reductor para preservar al EFE en estado reducido o como sustrato para la formación de radicales libres (Shimokawa 1983). El ácido ascórbico estimula ligeramente la formación de etileno a partir de ACC en manzanas (120%), tomates (110%) y plátanos (105%) (Shimokawa 1983).

El hecho de que el galato de propilo inhiba pero no el ascórbico (ambos atrapadores no específicos) y el que se requieran concentraciones relativamente altas del inhibidor (Yang y Hoffman 1984), indican que el efecto inhibidor puede no ser debido a su acción como secuestrador de radicales libres.

### 1.2.6.- Integridad de membranas

El aislamiento del EFE sigue siendo uno de los retos en la investigación sobre la biosíntesis del etileno. Protoplastos y vacuolas intactas poseen las propiedades funcionales del EFE, pero esta actividad se pierde tras la rotura de la membrana plasmática o vacuolar (Guy y Kende 1984b). Estos hechos y la sensibilidad del EFE a compuestos lipofílicos, ionóforos como el 2,4-dinitrofenol (Yu et al. 1980), tratamientos de choque osmótico (Apelbaum et al. 1981a) y en general a sustancias que de alguna forma alteran la estructura de la membrana, han sido interpretados en el sentido de que el EFE puede estar asociado a estructuras membranosas (Yang y Hoffman 1984). Estas conclusiones son, sin embargo, limitadas debido a la poca especificidad de los inhibidores y a las altas concentraciones necesarias para ejercer su efecto (Smith y Hall 1984). El secreto de aislar el EFE está en conocer por qué pierde totalmente su actividad tras la rotura celular. Hay varias posibles funciones para esta membrana: la actividad EFE puede estar acoplada a un flujo de protones transmembrana (John 1983), puede requerir un sistema de transporte de electrones unido a membrana; o puede ser necesaria para, mantener una alta concentración de un cofactor necesario aún desconocido, o para proteger al EFE de inactivación (McKeon y Yang 1987).

La actividad EFE de hojas de olivo se inhibe por

dinitrofenol (Vioque y Vioque 1985) y cesa totalmente cuando el tejido se homogeneiza (Vioque et al. 1981). Esta pérdida de actividad puede ser debida a la liberación de inhibidores durante la homogeneización del tejido. La tabla 12 recoge los resultados obtenidos cuando se añade extracto crudo (tejido homogeneizado) al medio de incubación de discos de hojas con ACC. La adición de cantidades crecientes de extracto crudo (0.5 y 0.9 ml) inhibe la formación de etileno en un 68 y 94% del control, respectivamente. El extracto crudo se pasa por una columna de Sephadex G-25 y se separan la fracción de alto P<sub>m</sub> (excluída) y la de bajo P<sub>m</sub> (retenida). Se añaden ambas fracciones por separado (equivalentes a 0.9 ml de extracto crudo) a la incubación de discos con ACC. Cuando se añade la fracción de bajo P<sub>m</sub>, la actividad se reduce al 4%, del mismo orden que la obtenida con 0.9 ml de extracto crudo (Tabla 12). Estos resultados ponen de manifiesto la existencia en el extracto crudo de factores de bajo P<sub>m</sub> que inhiben la actividad EFE. La liberación de inhibidores que estaban anteriormente compartimentados podría explicar el que tratamientos que supongan destrucción de membranas inhiban la actividad EFE. Sin embargo, esta inhibición no es la única causa de la pérdida de actividad en los tejidos homogeneizados, ya que la incubación de la fracción de alto P<sub>m</sub> (equivalente a 5 discos) con ACC no libera etileno (Tabla 12). Estos resultados ponen claramente de manifiesto la existencia en los extractos crudos de hojas de olivo de inhibidores de bajo P<sub>m</sub> del EFE, aunque no descartan una

Tabla 12.- Formación de etileno por incubaciones de ACC 1 mM bajo diferentes condiciones.

Incubación	Etileno/24h	
	nmol	%
Ext. crudo	-	-
Discos	2.76±0.21	100
+ 0.5 ml ext. crudo	0.87±0.17	32
+ 0.9 ml ext. crudo	0.17±0.03	6
+ 0.9 ml FE	2.97±0.21	108
+ 0.9 ml FR	0.11±0.02	4
FE	0.03±0.01	1

asociación del EFE con estructuras membranosas.

1.2.7.- Estudio del bajo rendimiento en la actividad EFE

Se ha realizado el seguimiento a lo largo del tiempo de la conversión ACC ---> etileno y de su conjugación a MACC en tejidos de olivo. Como puede observarse en la tabla 13, tras 48 horas de incubación el 1.2% del ACC inicial se ha transformado en etileno, el 20% se conjuga a MACC, el 13% permanece como ACC libre y el resto (65%) no puede ser detectado. En las mismas condiciones un control de ACC no sufre ninguna alteración.

El incremento en los niveles de MACC durante las primeras horas de incubación se explica por su rápida cinética de formación (Bouzayen et al. 1988). La disminución en la concentración de MACC al final del período de incubación puede explicarse por su reversión hacia ACC que, aunque no ocurre en condiciones fisiológicas, puede darse a altas concentraciones de MACC (Jiao et al. 1986, Hanley et al. 1989).

Esta "desaparición" del ACC no es debida a la destrucción del etileno formado durante las incubaciones ya que si se añade etileno patrón a viales con discos de hojas, su concentración permanece constante.

La tabla 14 recoge la distribución de la radiacti-

Tabla 13.- Producción de etileno y contenido en ACC libre y MACC en incubaciones de discos de hojas de olivo con ACC 1 mM. ACC y MACC se determinan en el líquido de incubación y en el tejido, expresando los resultados la suma de ambas determinaciones.

Tiempo (h)	Etileno <sup>a</sup>	ACC	MACC	No detectado
3	0.1	78.7	19.2	2.0
6	0.2	70.3	24.1	5.4
24	0.5	48.3	28.9	23.3
30	0.7	40.9	25.7	33.7
48	1.2	13.1	20.6	65.1

<sup>a</sup> Los datos representan % del ACC inicial (1  $\mu$ mol).

Tabla 14.- Distribución de la radiactividad tras 48 h de incubación de 5 discos de hojas de olivo con ACC 1 mM conteniendo [2,3-<sup>14</sup>C]ACC (4 nmol, 320 nCi).

	Radiactividad total <sup>a</sup>	Conocida	Desconocida
GAS	1.4	1.2 (etileno)	0.2
TEJIDO	20.1	5.0 (ACC+MACC)	15.1
LIQUIDO	78.5	25.9 (ACC+MACC)	52.6

<sup>a</sup> Los datos indican % de la radiactividad inicial.



vidad en el gas, tejido y líquido de incubación cuando se añade [2,3-<sup>14</sup>C]ACC a las incubaciones. Etileno, ACC y MACC explican solamente una parte de la radiactividad detectada, que aparece mayoritariamente en la fase líquida.

CCF del líquido de incubación con acetona : n-butanol : acético : agua (7:7:2:4; v/v) como líquido de desarrollo muestra la presencia de 5 bandas radiactivas con valores de  $R_f$  de 0.03, 0.30, 0.40, 0.53 y 0.75 (Fig. 18). Las bandas de  $R_f$  0.40 y 0.53 corresponden respectivamente a ACC y MACC patrón (sintetizado como se describe en Materiales y Métodos).

Los datos aquí presentados demuestran que el ACC, al ser incubado con discos de hojas de olivo, se transforma en gran parte en compuestos diferentes de sus metabolitos hoy conocidos (etileno y MACC). Dichos compuestos no dan reacción con ninhidrina ni con 2,4-dinitrofenilhidracina, no poseyendo por tanto grupos amino o carbonilo libres. Estos resultados descartan la posibilidad de que el ACC se transforme en ácido  $\alpha$ -aminobutírico o  $\alpha$ -cetobutírico, como ocurre en bacterias (Honma y Shimomura 1978).

Inhibidores de la conversión ACC ---> etileno no ejercen ningún efecto sobre esta transformación del ACC (Tabla 15), indicando que es independiente de la ruta de formación de etileno. Los extractos crudos de hojas de olivo, que no poseen actividad formadora de etileno, son también

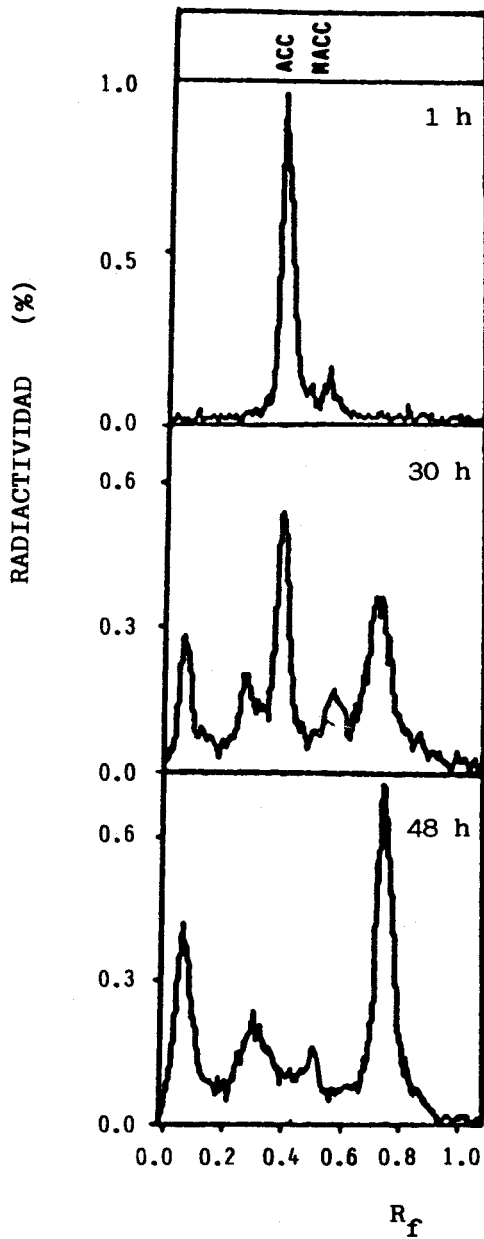


Fig. 18.- Distribución de los productos radiactivos no volátiles de incubaciones de discos de hojas de olivo con ACC 1 mM conteniendo [2,3-<sup>14</sup>C]ACC (4 nmol, 320 nCi). Las muestras se separan por CCF y se cuantifican según se describe en Materiales y Métodos.

Tabla 15.- Efecto de inhibidores de la producción de etileno sobre la transformación del ACC en productos desconocidos en incubaciones de discos de hojas de olivo y extracto crudo.

Incubación	ACC transformado <sup>a</sup>
Estándar	65.1
+ atm. N <sub>2</sub>	61.5
+ Co <sup>++</sup> (0.5 mM)	63.2
Discos triturados	55.4
Extracto crudo	70.2
Discos hervidos	3.0

<sup>a</sup> Porcentaje del ACC inicial (1  $\mu$ mol) transformado en productos desconocidos tras 48 h de incubación.

capaces de transformar al ACC. El hecho de que los discos hervidos no produzcan dichos compuestos sugiere la implicación de reacciones enzimáticas.

Para comprobar la naturaleza enzimática de esta transformación, se incuban con ACC 1 mM las fracciones de alto (FE) y bajo (FR) peso molecular del extracto crudo obtenidas por filtración en Sephadex G-25. También se incubaba con ACC el líquido resultante de preincubar los discos en agua durante 48 horas a 30°C (Tabla 16). Los resultados presentados en la tabla 16 muestran que la transformación del ACC se debe a reacciones no enzimáticas con compuestos de bajo peso molecular presentes en los tejidos de olivo, como lo demuestra también el hecho de que el líquido de preincubación sea capaz de llevar a cabo dicha transformación.

Esta conversión no enzimática del ACC ha sido también observada, en menor medida, en incubaciones con discos de hojas de arce (*Acer negundo* L.), pero no con epicótilos de guisante (*Pisum sativum* L.) o discos de hojas de naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.). Estas reacciones dependen por tanto de la especie en cuestión y podrían no ser representativas de otros tejidos vegetales.

Como estas transformaciones del ACC disminuyen los niveles de ACC libre en las incubaciones in vivo, se ha estudiado la posible influencia que puedan tener sobre la determinación de la actividad EFE en tejidos de olivo. Como puede

Tabla 16.- Incubación de ACC con: extracto crudo, fracciones de alto (FE) y bajo (FR) peso molecular del mismo y líquido de preincubación de discos con agua durante 48 h.

Incubaciones	ACC transformado
Extracto crudo	74.0
FE	5.8
FR	66.4
Líquido preinc.	70.5

<sup>a</sup> Porcentaje del ACC inicial (1  $\mu$ mol).

comprobarse en la fig. 19, aunque el ACC sea transformado en otros productos en el líquido de incubación, la cantidad de ACC libre presente en los tejidos durante las incubaciones es muy superior a la concentración saturante para el EFE (40 nmol/g, Fig. 16). Por tanto las reacciones del ACC con factores de bajo peso molecular presentes en los tejidos del olivo no afectan a las medidas de la actividad EFE en dichos tejidos.

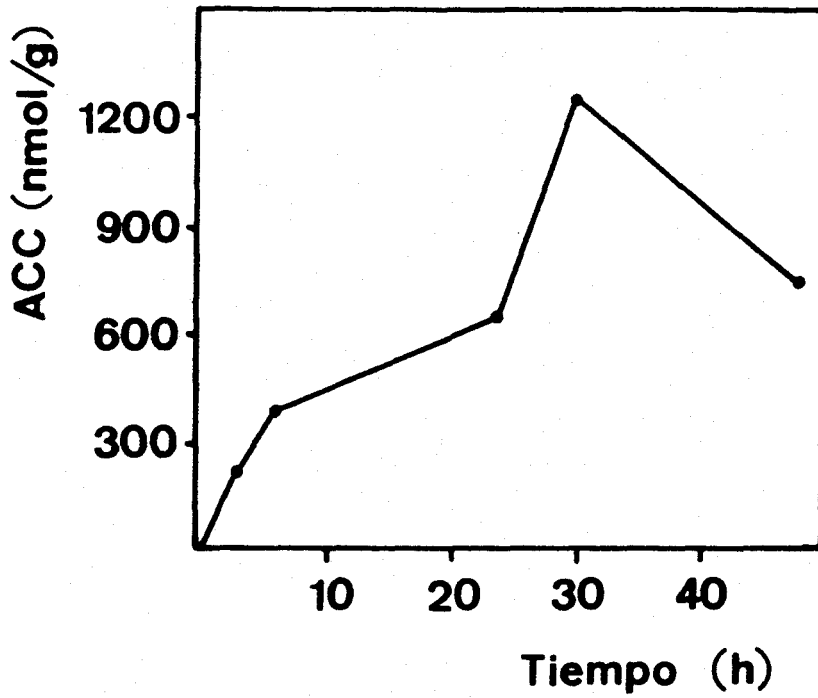


Fig. 19.- Evolución de la concentración de ACC libre en el tejido, en incubaciones de discos de hojas de olivo con ACC 1 mM.

**2.- RELACION ENTRE LAS ACTIVIDADES PEROXIDASA Y FORMADORA DE  
ETILENO IN VIVO**

Durante muchos años el papel de las peroxidasas en la biosíntesis del etileno ha atraído considerable atención, en especial desde que se propuso la posible implicación de las mismas en la conversión ACC ---> etileno (Vioque et al. 1981). Los resultados a favor y en contra de dicha hipótesis son hasta ahora controvertidos. Se ha realizado una serie de ensayos que relacionan ambas actividades in vivo.

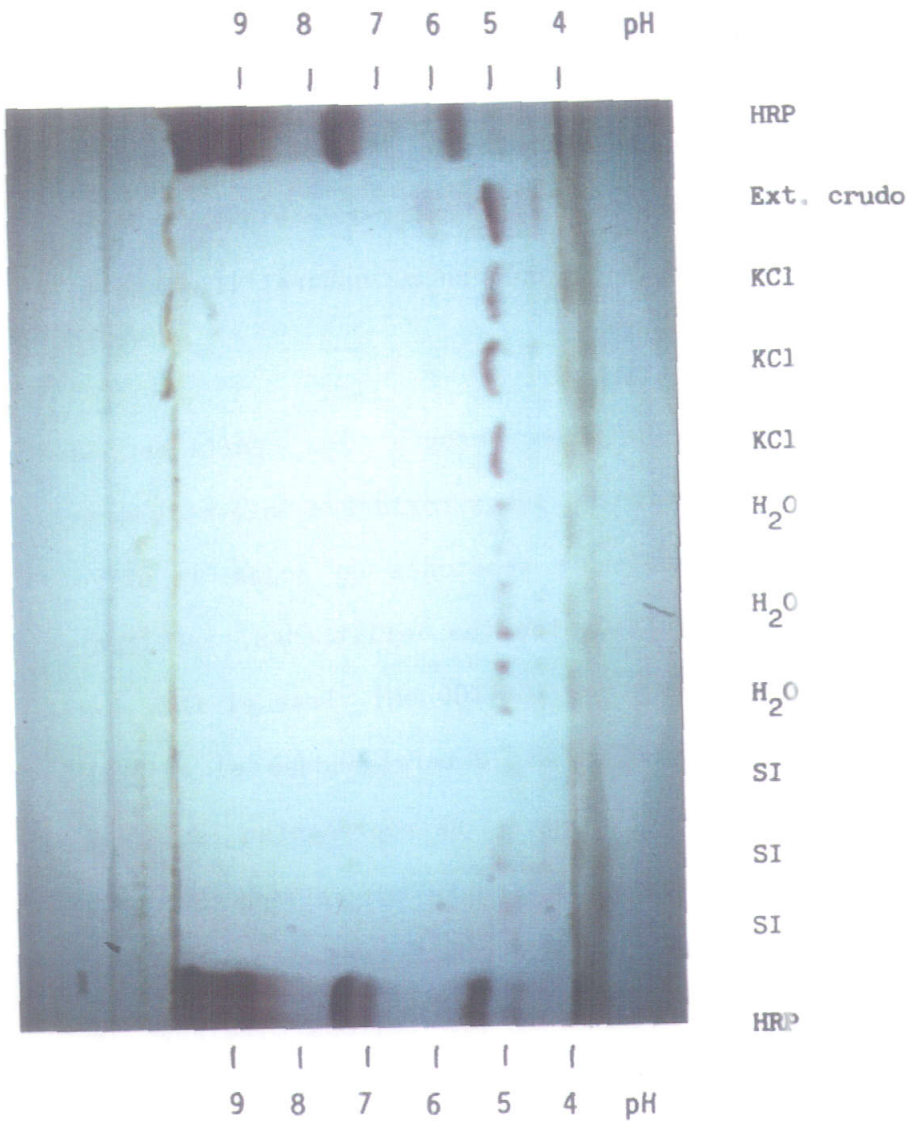


## 2.1.- PEROXIDASAS Y EFE TRAS ISOELECTROENFOQUE

La aplicación a tejidos vegetales de técnicas de infiltración con vacío seguida de centrifugación (Klement 1965) ha permitido la determinación de peroxidasas intercelulares (Rathmell y Sequeira 1974, Castillo et al. 1984). Basándose en estas técnicas, Vioque et al. (1986) han desarrollado un método electroforético para la determinación de peroxidasas solubles (libres e iónicamente ligadas) presentes en los espacios intercelulares de tejidos vegetales por isoelectroenfoque (IEF) directo de tejidos sobre geles de poliacrilamida.

Cuando se someten a IEF secciones de hojas de olivo sin infiltrar, infiltradas bajo vacío con agua e infiltradas bajo vacío con KCl 100 mM, se observa que los tejidos no infiltrados apenas liberan peroxidasas en comparación con los tejidos infiltrados (Fotografía 1). La infiltración con KCl libera mayores cantidades de peroxidasas que la infiltración con agua, indicando que en presencia de KCl se extraen las peroxidasas libres y las ligadas iónicamente, mientras que con agua son liberadas únicamente las peroxidasas libres.

El gradiente de pH obtenido durante el IEF (ver Materiales y Métodos), nos permite estimar que las bandas de peroxidasa aparecen en la zona de pH entre 5.2 y 6.2 (Fotografía 1). Estos valores de pI obtenidos han de considerarse orientativos, ya que el número y la naturaleza de las isoform-



Fotografía 1.- IEF directo de secciones de hojas de olivo sometidas a distintos tratamientos, (SI) sin infiltrar, (H<sub>2</sub>O) infiltradas bajo vacío con agua, (KCl) infiltradas bajo vacío con KCl 100 mM. Sobre el gel se llevaron también peroxidasa patrón (HRP) y extracto enzimático crudo de hojas de olivo.

mas de peroxidasa dependen en gran manera de las técnicas y condiciones de separación utilizadas (Gaspar et al. 1982). Efectores no proteicos, principalmente de naturaleza fenólica, pueden unirse a peroxidasas y emigrar conjuntamente en ensayos electroforéticos, variando su pI natural (Legrand et al. 1976).

En la fig. 20 se recogen los perfiles de absorbancia por transmisión de las peroxidasas intercelulares extraídas tras IEF directo de secciones de hojas de olivo sometidas a los tres tratamientos (no infiltradas, infiltradas con agua e infiltradas con KCl 100 mM). Tras el IEF, los tejidos se incuban con ACC 1 mM, determinándose el etileno liberado tras 24 h de incubación. Si se representan las áreas de los perfiles de absorbancia frente al etileno liberado (Fig. 21), se pone de manifiesto que la salida de peroxidasas de los espacios intercelulares de los tejidos disminuye la capacidad de convertir ACC en etileno de dichos tejidos, existiendo una buena correlación ( $r=-0.9958$ ). Estos resultados sugieren una posible implicación de las peroxidasas en la conversión de ACC en etileno in vivo. Los valores son media de dos ensayos con tres replicados para cada tratamiento.

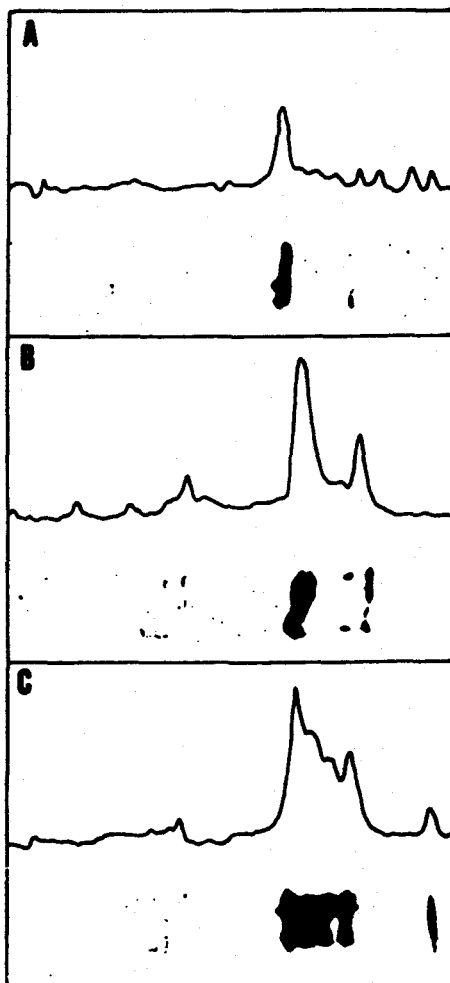


Fig. 20.- Perfiles de absorbancia por transmisión de las peroxidasas intercelulares extraídas por IEF directo de secciones de hojas de olivo sometidas a diferentes tratamientos: (A) no infiltradas, (B) infiltradas bajo vacío con agua, (C) infiltradas bajo vacío con KCl 100 mM.

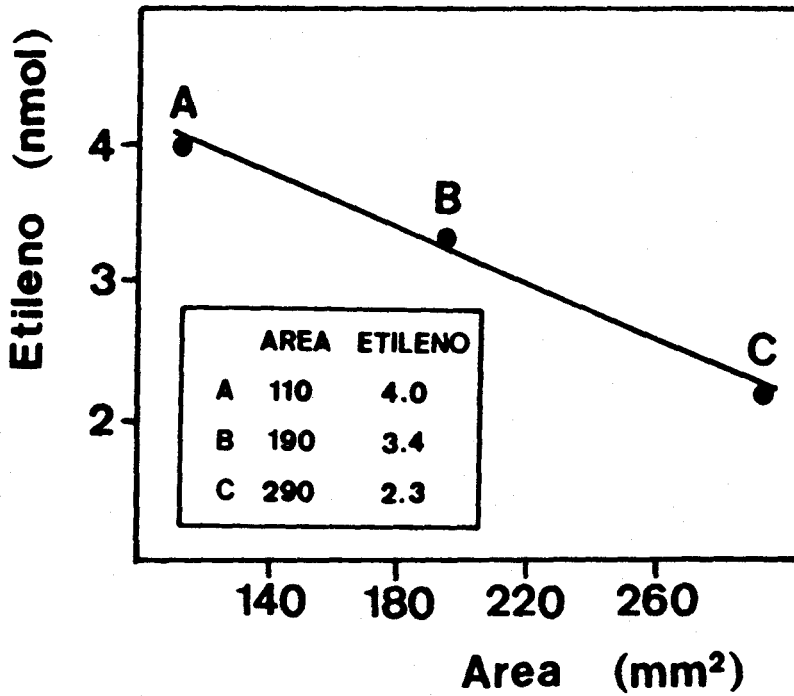


Fig. 21.- Relación entre las peroxididasas intercelulares y el etileno liberado por secciones de hojas de olivo sometidas a IEF tras distintos tratamientos. (A) no infiltradas, (B) infiltradas bajo vacío con agua, (C) infiltradas bajo vacío con KCl 100 mM.

## 2.2.- PEROXIDASAS Y EFE EN HOJAS DE DISTINTA EDAD

Hojas de olivo de distinta edad tienen diferente capacidad para transformar ACC en etileno. Se han determinado las actividades peroxidasa y EFE in vivo en discos de hojas de olivo de distinta edad según su posición en la rama. Para cada tipo de hoja se mide la actividad formadora de etileno con 6 viales replicados con 5 discos/vial y la actividad peroxidasa con 15 viales replicados con 1 disco/vial.

En la fig. 22A se representan los valores medios obtenidos para cada actividad frente a la posición de la hoja en la rama. El experimento se ha repetido cuatro veces con similares resultados. Puede observarse que ambas actividades siguen un curso paralelo, de forma que las hojas jóvenes (posición 1, extremo de la rama) presentan menor actividad que las hojas de mayor edad (posiciones 9 y 11). Si se representa la actividad formadora de etileno frente a la actividad peroxidasa se obtiene una relación lineal (Fig. 22B), indicando que ambas actividades aumentan de forma paralela con la edad del tejido.

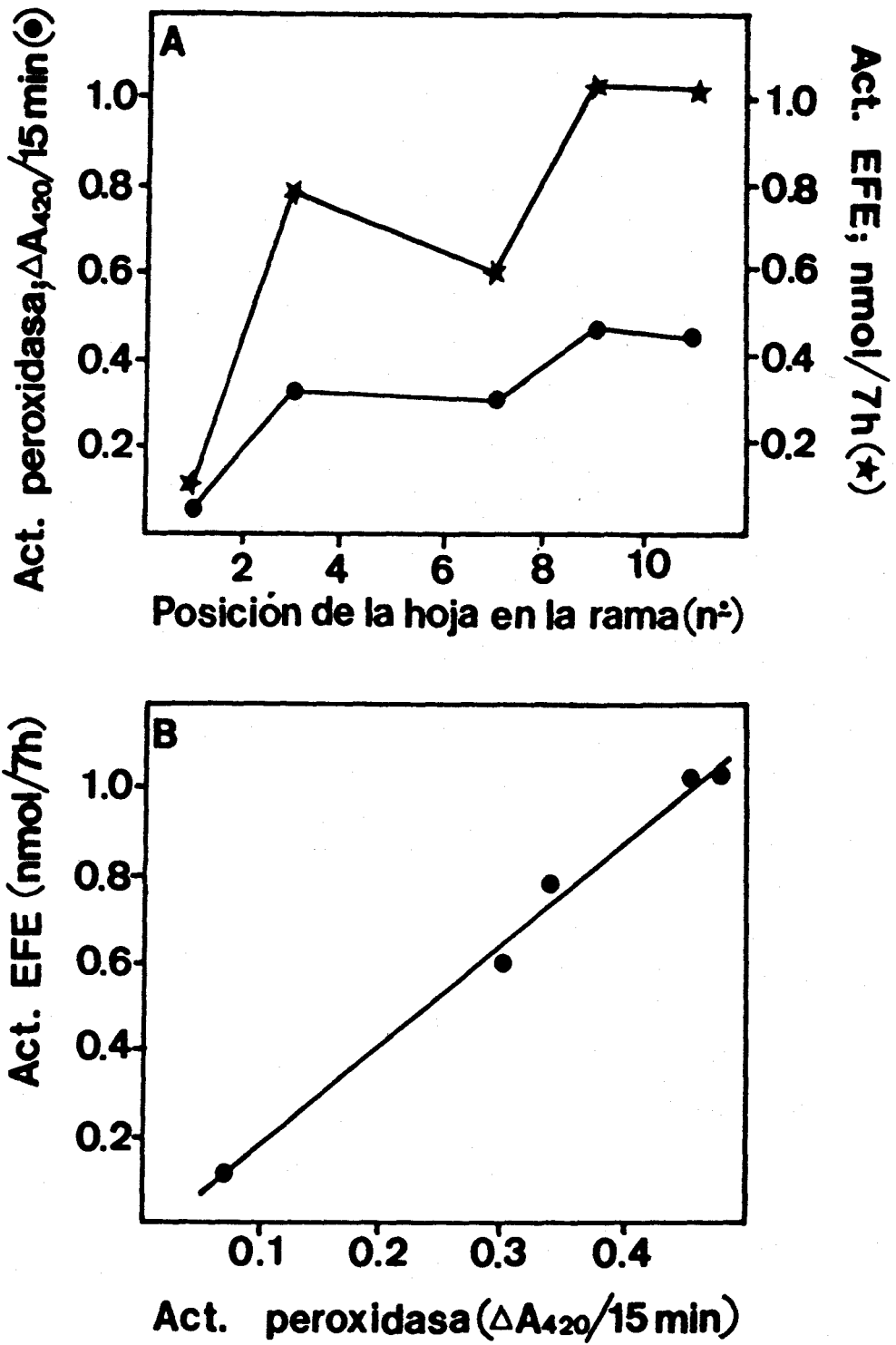


Fig. 22.- Actividades peroxidasa y formadora de etileno (EFE) de hojas situadas en diferentes posiciones en la rama.

### 2.3.-EVOLUCION ESTACIONAL DE LAS ACTIVIDADES PEROXIDASA Y EFE

Se ha seguido a lo largo de un año la evolución de ambas actividades en hojas de olivo, desde Septiembre de 1988 a Octubre de 1989 (Fig. 23). Las determinaciones se han realizado mensualmente con 6 replicados para la actividad EFE y 15 replicados para la actividad peroxidasa. Puede observarse que ambas actividades siguen un curso paralelo, con incrementos y decrementos en las mismas épocas del año, correspondiendo los máximos a los meses de Enero y Febrero. Estos resultados deben ser confirmados con el seguimiento de las actividades durante más ciclos anuales.

La relación entre etileno liberado y peroxidasas extraídas por IEF directo de tejidos sometidos a distintos tratamientos, la correlación entre actividad peroxidasa y EFE en hojas de diferente edad y la evolución paralela de dichas actividades a lo largo del tiempo, apoyan la hipótesis de Vioque et al. (1981) sobre una posible implicación de las peroxidasas en la conversión del ACC en etileno in vivo.

Los resultados aquí presentados concuerdan con las observaciones de Boyer et al. (1983), Kevers et al. (1984), Parups (1984), Mussell (1985), Boyer y De Jaegher (1986) y Osswald et al. (1989). Dichos autores sugieren también una intervención de las peroxidasas en la conversión del ACC en etileno in vivo.



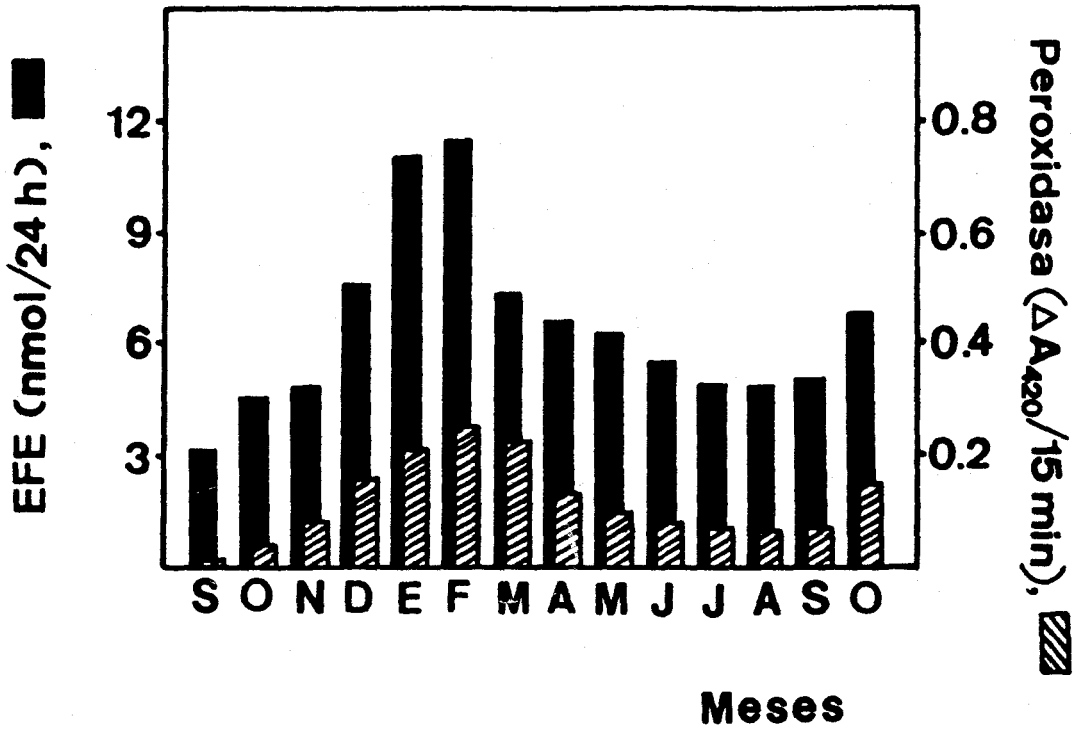
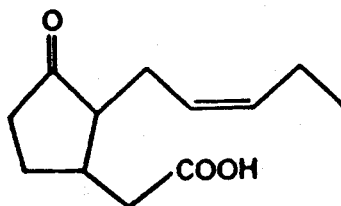


Fig. 23.- Evolución mensual de las actividades peroxidasa y formadora de etileno in vivo de hojas de olivo.



3.- INFLUENCIA DEL JASMONATO DE METILO SOBRE LA BIOSINTESIS  
DE ETILENO IN VIVO

El ácido jasmónico es un ácido graso cíclico formado por un núcleo de ciclopentanona y grupos 2'-*cis*-pentenil y acético, de estructura similar a las prostaglandinas animales:



Su éster metílico es un compuesto odorífero abundante en el aceite esencial de jazmín, de donde fue aislado e identificado por vez primera (Demole et al. 1962). Los efectos que el jasmonato de metilo (JA-Me) ejerce sobre la senescencia de las plantas unidos a su amplia distribución en el reino vegetal han hecho que sea objeto de especial atención en los últimos años, llegando a ser considerado como una nueva hormona vegetal (Meyer et al. 1984).

La aplicación de JA-Me exógeno a tejidos vegetales provoca inhibición del crecimiento (Yamane et al. 1981), síndrome de senescencia (Ueda y Kato 1981), y alteración cualitativa y cuantitativa del contenido en pigmentos (Saniewski y Czapski 1983).

El JA-Me provoca también una estimulación en la

producción de etileno y el contenido endógeno de ACC que sólo ha sido demostrada hasta ahora en frutos de tomate (Saniewski y Czapski 1985, Saniewski et al. 1987). Se ha estudiado el efecto del JA-Me sobre la biosíntesis de etileno en tejidos vegetativos de olivo. Para ello se utilizan hojas enteras y discos de hojas tratados con JA-Me 45  $\mu\text{M}$ , que es la concentración habitualmente utilizada (Ueda y Kato 1981, Weidhase et al. 1987, Anderson 1988).

### 3.1.- EXPERIENCIAS CON HOJAS ENTERAS

Como puede verse en la tabla 17, un tratamiento con JA-Me 45  $\mu\text{M}$  provoca una disminución de la producción endógena de etileno en hojas enteras, incrementando por el contrario los niveles de ACC libre y total (ACC + MACC). El aumento de la concentración de ACC total puede deberse a la síntesis *de novo* de ACC y/o a la inhibición de la actividad EFE, lo que permitiría una acumulación del ACC no metabolizado a etileno. En este caso, la diferencia en los contenidos de ACC total en hojas tratadas y sin tratar no se explica solamente por la inhibición del EFE (Tabla 17). Se deduce por tanto que el JA-Me estimula la actividad ACC-sintasa, aumentando los niveles de ACC total en los tejidos. La menor producción de etileno en las incubaciones con hojas tratadas, que contienen más ACC libre, parece indicar que la actividad EFE se encuentra inhibida.

Para comprobar el efecto del JA-Me sobre el EFE, se incuban hojas enteras tratadas (JA-Me 45  $\mu\text{M}$ ) y sin tratar con ACC 1 mM. En la tabla 18 se recoge la evolución a lo largo del tiempo del etileno liberado y de los contenidos internos de ACC libre y total de dichas hojas. Puede observarse que tanto la producción de etileno como los niveles de ACC son sensiblemente menores en hojas tratadas. Esto indica que el JA-Me dificulta de alguna manera la entrada del ACC exógeno en los tejidos, seguramente por su efecto inductor sobre el

Tabla 17.- Producción de etileno y contenido endógeno de ACC libre y total (ACC + MACC) de hojas de olivo tratadas con JA-Me 45  $\mu$ M y sin tratar. Los datos expresan  $\bar{x} \pm \sigma$  de 6 replicados.

Tiempo (h)	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (nmol/g)		ACC libre (nmol/g)		ACC total (nmol/g)	
	H <sub>2</sub> O	JA-Me	H <sub>2</sub> O	JA-Me	H <sub>2</sub> O	JA-Me
0	-	-	4.8 $\pm$ 0.2	4.7 $\pm$ 0.3	18.9 $\pm$ 1.6	18.7 $\pm$ 1.5
				NS		NS
24	1.7 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.0	11.3 $\pm$ 0.1	12.6 $\pm$ 0.3	35.5 $\pm$ 1.9	50.1 $\pm$ 3.4
		***		**		**
48	2.5 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2	7.8 $\pm$ 0.4	8.8 $\pm$ 0.1	37.7 $\pm$ 2.2	55.6 $\pm$ 3.7
		*		*		**
72	3.0 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.2	2.9 $\pm$ 0.4	33.1 $\pm$ 2.5	52.1 $\pm$ 4.5
		*		*		**

Los símbolos indican la existencia de diferencias significativas al 5% (\*), 1% (\*\*) ó 1% (\*\*\*) o la no existencia (NS) según el test de la t de Student (Ruiz-Maya 1983).

Tabla 18.- Etileno liberado y niveles de ACC libre y total de hojas de olivo tratadas con JA-Me 45  $\mu$ M y sin tratar, incubadas con ACC 1 mM. Los datos expresan  $\bar{x} \pm \sigma$  de 6 replicados.

Tiempo (h)	$C_2H_4$ (nmol/g)		ACC libre (nmol/g)		ACC total (nmol/g)	
	-JA-Me	+JA-Me	-JA-Me	+JA-Me	-JA-Me	+JA-Me
0	-	-	4.8 $\pm$ 0.2	4.7 $\pm$ 0.3	18.9 $\pm$ 1.6	18.7 $\pm$ 1.5
		**		NS		NS
24	9.5 $\pm$ 1.1	7.0 $\pm$ 1.1	17.4 $\pm$ 0.1	12.9 $\pm$ 0.5	89.6 $\pm$ 4.9	69.2 $\pm$ 4.5
		**		**		*
48	18.2 $\pm$ 3.0	9.8 $\pm$ 0.6	4.1 $\pm$ 0.2	2.6 $\pm$ 0.1	202.7 $\pm$ 0.6	138.4 $\pm$ 18.6
		**		**		*
72	16.7 $\pm$ 3.2	9.3 $\pm$ 1.7	5.8 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.3	248.4 $\pm$ 13.4	183.0 $\pm$ 17.2
		**		**		*

Los símbolos indican la existencia de diferencias significativas al 5% (\*), 1% (\*\*) ó 1%. (\*\*\*) o la no existencia (NS) según el test de la t de Student (Ruiz-Maya 1983).

cierre estomático (Satler y Thimann 1981, Raghavendra y Reddy 1987). La aparente menor actividad EFE observada en las hojas tratadas (Tabla 18) puede ser debida a la presencia de menores cantidades de sustrato en los tejidos, ya que las concentraciones internas de ACC no son saturantes para el EFE de hojas de olivo (ver Fig. 16).

Los resultados obtenidos con hojas enteras ponen de manifiesto que el JA-Me estimula la actividad ACC-sintasa (Tabla 17). El efecto del JA-Me sobre el EFE no está claro debido a las interferencias en la entrada de ACC a los tejidos. Este hecho hace que las concentraciones de ACC sean diferentes en hojas tratadas y sin tratar (Tabla 18).



### 3.2.- EXPERIENCIAS CON DISCOS DE HOJAS

Para evitar los efectos causados por el JA-Me por su posible acción sobre el cierre estomático, se utilizan discos de hojas de olivo.

Cuando se tratan discos de hojas con JA-Me 45  $\mu\text{M}$ , se produce un fuerte aumento en los contenidos endógenos de ACC libre y total, resultando asimismo incrementada la producción de etileno (Tabla 19). Estos datos confirman el efecto estimulador del JA-Me sobre la ACC-sintasa, que se traduce en concentraciones mayores de ACC libre y una mayor liberación de etileno. Saniewski et al. (1987) obtuvieron resultados semejantes utilizando discos de pericarpio de tomate.

El efecto del JA-Me sobre la actividad EFE se estudia incubando discos de hojas de olivo con ACC 1  $\mu\text{M}$  y diferentes concentraciones de JA-Me. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 20. Puede observarse que una concentración baja de JA-Me (4.5  $\mu\text{M}$ ) no ejerce efecto alguno sobre la actividad EFE, apreciándose un efecto estimulador a concentraciones iguales o superiores a 45  $\mu\text{M}$ . Este efecto es mayor al aumentar la concentración del tratamiento, disminuyendo al aumentar el tiempo de incubación, lo que indica una posible inactivación del JA-Me en el tejido (Weidhase et al. 1987).

Tabla 19.- Contenido en ACC libre y total y producción de etileno en discos de hojas de olivo tratados con JA-Me 45  $\mu$ M y sin tratar. Los datos expresan  $\bar{x} \pm \sigma$  de 6 replicados.

Tiempo (h)	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (nmol/g)		ACC libre (nmol/g)		ACC total (nmol/g)	
	H <sub>2</sub> O	JA-Me	H <sub>2</sub> O	JA-Me	H <sub>2</sub> O	JA-Me
0	-	-	5.0 $\pm$ 0.5	5.1 $\pm$ 0.5	20.2 $\pm$ 0.9	20.1 $\pm$ 0.8
				NS		NS
24	8.7 $\pm$ 1.0	21.5 $\pm$ 3.7	11.7 $\pm$ 1.2	52.0 $\pm$ 0.4	34.5 $\pm$ 1.3	137.9 $\pm$ 1.1
		***		***		***
48	12.6 $\pm$ 2.2	41.1 $\pm$ 11.4	5.4 $\pm$ 0.9	10.8 $\pm$ 0.3	13.7 $\pm$ 1.6	30.0 $\pm$ 1.7
		***		**		***
72	17.2 $\pm$ 2.4	63.2 $\pm$ 16.7	2.4 $\pm$ 0.2	6.9 $\pm$ 0.2	26.0 $\pm$ 3.7	42.0 $\pm$ 3.1
		***		**		***

Los símbolos indican la existencia de diferencias significativas al 5% (\*), 1% (\*\*) ó 1% (\*\*\*) o la no existencia (NS) según el test de la t de Student (Ruiz-Maya 1983).

Tabla 20.- Efecto del JA-Me sobre la actividad EFE en incubaciones de discos de hojas de olivo con ACC 1 mM. Los datos son  $\bar{x} \pm \sigma$  de 6 replicados y están expresados en nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/g.

Tiempo (h)	Control <sup>x</sup>	JA-Me			
		4.5 $\mu$ M	45 $\mu$ M	90 $\mu$ M	180 $\mu$ M
24	51.2 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	51.4 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	65.8 $\pm$ 5.6 <sup>b</sup>	70.1 $\pm$ 5.2 <sup>bc</sup>	74.3 $\pm$ 1.5 <sup>c</sup>
48	83.8 $\pm$ 6.7 <sup>a</sup>	81.3 $\pm$ 6.4 <sup>a</sup>	90.5 $\pm$ 8.3 <sup>a</sup>	100.8 $\pm$ 6.3 <sup>b</sup>	108.7 $\pm$ 8.9 <sup>b</sup>
72	81.0 $\pm$ 6.3 <sup>a</sup>	79.6 $\pm$ 8.9 <sup>a</sup>	88.6 $\pm$ 9.7 <sup>a</sup>	111.4 $\pm$ 9.8 <sup>b</sup>	121.0 $\pm$ 9.4 <sup>b</sup>

<sup>x</sup> Letras distintas indican diferencias significativas al 5% según el test de Duncan (Ruiz-Maya 1983).

En las experiencias con discos no existe interferencia del cierre estomático, ya que las concentraciones internas de ACC son iguales en discos tratados y sin tratar (220-250 nmol/g), saturantes para el EFE de hojas de olivo (Fig. 16).

De los resultados obtenidos con discos y hojas enteras se concluye que el JA-Me estimula la producción de etileno en tejidos vegetativos, ejerciendo su efecto tanto a nivel de la ACC-sintasa como del EFE. Este último efecto no queda claro en el caso de hojas enteras debido a que el tratamiento con JA-Me dificulta la entrada de ACC exógeno en los tejidos. El cierre de los estomas provocado por el JA-Me podría asimismo dificultar la salida del etileno de los tejidos al espacio de cabeza en las incubaciones, explicando así la menor cantidad de etileno medida al incubar en agua hojas enteras tratadas con JA-Me (Tabla 17).

#### **4.- METABOLISMO DEL ETILENO**

Como se ha comentado en los Antecedentes, la oxidación enzimática del etileno es un fenómeno común en gran número de microorganismos (Abeles 1984b) y de plantas superiores (Beyer 1984). Se ha realizado una serie de ensayos para comprobar la existencia de un metabolismo del etileno en los tejidos del olivo.

El disulfuro de carbono es un compuesto volátil que inhibe el metabolismo del etileno (Beyer 1977) y de otros alquenos, probablemente actuando como inactivador suicida del sistema enzimático etileno monooxigenasa (Abeles 1984a). El tratamiento de tejidos vegetales con una atmósfera de sulfuro de carbono puede ser utilizado como test para comprobar la existencia del metabolismo del etileno.

La exposición de discos de hojas de olivo a una concentración de  $S_2C$  de  $180 \mu l/L$  no modifica los valores de etileno obtenidos en incubaciones con ACC  $1 mM$  (Tabla 21). La falta de respuesta de los tejidos del olivo al tratamiento con  $S_2C$  puede ser debida a: 1) dichos tejidos no son capaces de metabolizar el etileno; 2) el  $S_2C$  no ejerce ningún efecto sobre este metabolismo ó 3) los tapones de goma utilizados para cerrar los viales desprenden algún compuesto que interfiere en los resultados obtenidos.

Tabla 21.- Etileno liberado por tejidos de olivo tratados con  $S_2C$  y sin tratar, incubados con ACC 1 mM. Los datos expresan  $\bar{x} \pm \sigma$  de 6 replicados.

Tiempo (h)	Etileno (nmol)	
	Tratados con $S_2C$	Sin tratar
3	0.03±0.01	0.03±0.01
6	0.12±0.04	0.12±0.03
24	0.98±0.09	1.00±0.10
48	1.70±0.10	1.70±0.20

Para comprobar esto se han aislado los tapones de goma del medio de incubación con papel de aluminio. En la fig. 24 puede comprobarse que la concentración de etileno es mucho menor cuando se aíslan totalmente los tapones del espacio de cabeza. Esta disminución no es debida a la inhibición de la conversión ACC  $\rightarrow$  etileno por el papel de aluminio, ya que si se coloca éste de manera que no aisle completamente el tapón de goma, se produce un ligero retraso en la producción de etileno, pero no una variación en la cantidad total liberada (Fig. 24).

Estos resultados sugieren que los tapones de goma usados para cerrar los viales liberan un compuesto volátil, presumiblemente  $S_2C$  (Beyer 1977), que no pasa a la atmósfera de incubación cuando se aíslan los tapones con papel de aluminio. La disminución del etileno en el espacio de cabeza de las incubaciones con tapones aislados con papel de aluminio podría deberse a un metabolismo oxidativo del etileno.

La liberación de compuestos azufrados por los tapones de goma ha sido comprobada por cromatografía gaseosa (Fig. 25). Tras 24 horas de incubación a  $30^\circ C$  aparece en el espacio de cabeza de viales cerrados con tapón de goma un pico (Fig. 25B) a igual tiempo de retención (0.84 min) que el  $S_2C$  patrón (Fig. 25D). Si los viales se calientan en estufa a  $105^\circ C$  durante una hora, el pico de sulfuro de carbono es mucho mayor y va acompañado de un pequeño pico de otro compuesto azufrado (Fig. 25C), seguramente SOC (Beyer 1977).



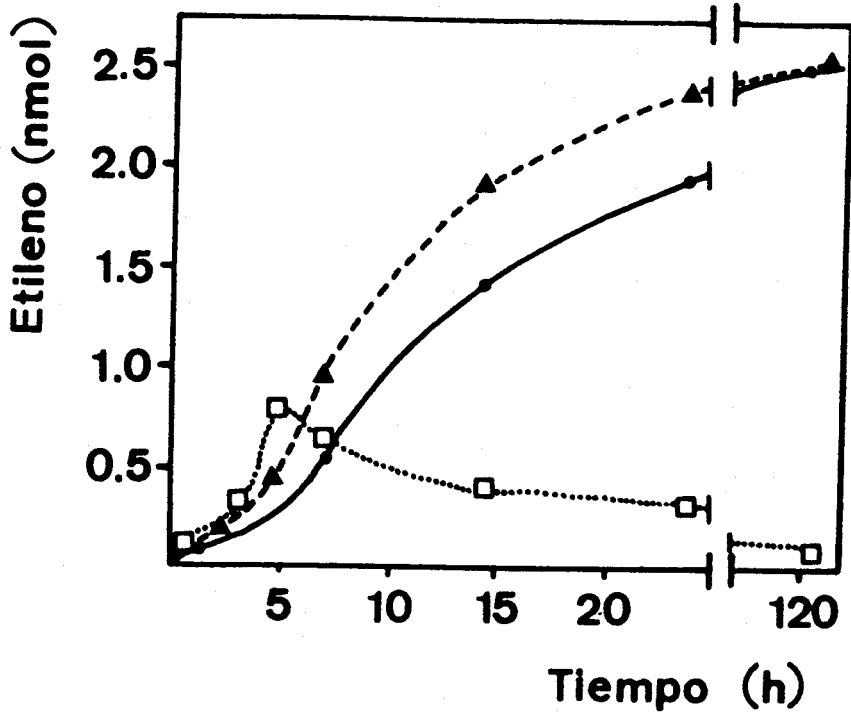


Fig. 24.- Etileno liberado por tejidos de olivo incubados con ACC 1 mM en viales cerrados con:

- ▲ Tapón de goma
- Papel de aluminio aislando la goma
- Papel de aluminio sin aislar la goma

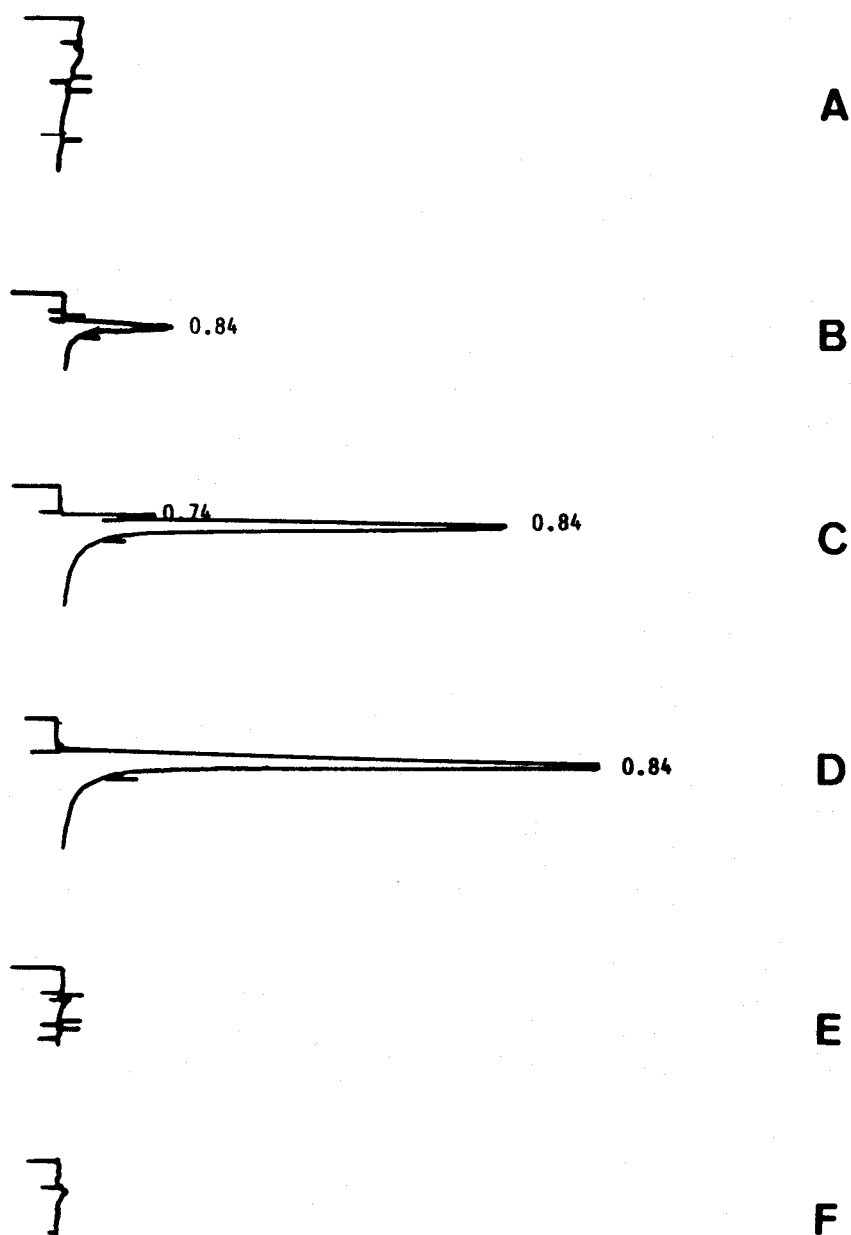


Fig. 25.-Productos azufrados presentes en el espacio de cabeza de viales cerrados con tapón de goma y de teflón, sometidos a distintos tratamientos. A) Aire; B) Tapón de goma, 24 h, 30°C; C) Tapón de goma, 1 h, 105°C; D) S<sub>2</sub>C patrón; E) Tapón de teflón, 24 h, 30°C; F) Tapón de teflón, 1 h, 105°C.

Estos compuestos no aparecieron en el espacio de cabeza de viales cerrados con tapones de teflón sometidos a idénticos tratamientos (Fig. 25E y 25F)

La liberación de  $S_2C$  por los tapones de goma los convierte en un material poco adecuado para los estudios sobre el metabolismo del etileno. Por ello se repite el ensayo del tratamiento con sulfuro de carbono de los discos de hojas de olivo, que se incuban posteriormente con ACC 1 mM en viales sellados con tapones de teflón. Como puede verse en la tabla 22, tras 24 horas de incubación puede medirse un 70% más de etileno en viales con discos tratados con  $S_2C$  (180  $\mu$ l/L) que en viales de discos sin tratar. Resultados similares fueron obtenidos por Peiser et al. (1984) con tejidos de *Vicia faba*. Los autores sugieren que el etileno producido a partir del ACC exógeno va siendo metabolizado por los discos sin tratar. En los discos tratados el  $S_2C$  inhibe la oxidación del etileno, que continúa acumulándose en el espacio de cabeza.

Para comprobar que los tejidos del olivo son capaces de metabolizar el etileno, se incuban en agua discos de hojas con etileno exógeno (10  $\mu$ l/L) en viales cerrados con tapón de teflón. Esta concentración de etileno es saturante para la etileno monooxigenasa (Abeles 1984a). Las incubaciones se llevan a cabo bajo diferentes condiciones: discos hervidos, atmósfera de nitrógeno y tratamiento con una concentración de sulfuro de carbono equivalente a la liberada

Tabla 22.- Etileno liberado por tejidos de olivo tratados con  $S_2C$  y sin tratar, incubados con ACC 1 mM en viales cerrados con tapón de teflón. Los datos expresan  $\bar{x} \pm \sigma$  de 6 replicados.

Tiempo (h)	Etileno (nmol)	
	Tratados con $S_2C$	Sin tratar
6	$0.19 \pm 0.04$	$0.11 \pm 0.03$
24	$0.90 \pm 0.10$	$0.53 \pm 0.09$
48	$1.40 \pm 0.20$	$0.49 \pm 0.07$

por los tapones de goma. A distintos tiempos se determina la concentración de etileno presente en las incubaciones, obteniéndose los resultados que se recogen en la tabla 23. Puede observarse que cuando se incuban discos de hojas de olivo con etileno exógeno desaparece el 60% aproximadamente del etileno inicial tras 24 horas de incubación. Si se utilizan discos hervidos, tratados con  $S_2C$  o se incuban en atmósfera de  $N_2$ , sólo desaparece alrededor del 10% del etileno exógeno. Este porcentaje puede deberse a difusión del gas, ya que se sitúa dentro de los valores observados por otros autores (Abeles y Dunn 1985).

Los resultados ponen claramente de manifiesto la existencia en los tejidos del olivo de un metabolismo oxidativo del etileno. Este metabolismo posee las características descritas para otros materiales vegetales: requiere oxígeno (Beyer et al. 1984), es dependiente de tejido vivo (Beyer y Blomstrom 1979) y resulta inhibido por sulfuro de carbono (Beyer 1977). El hecho de que una concentración de  $S_2C$  equivalente a la desprendida por los tapones inhiba totalmente el metabolismo del etileno (Tabla 23) explica la falta de respuesta de las incubaciones selladas con tapón de goma al tratamiento con sulfuro de carbono (Tabla 21).

Estos hechos también explican fácilmente las diferencias observadas en la determinación de la actividad EFE entre incubaciones cerradas con tapones de goma y cerradas con tapones de teflón (Tabla 5, Apartado 1.1). Cuando se

Tabla 23.- Etileno presente en viales de incubación, cerrados con tapones de teflón, de tejidos sometidos a distintos tratamientos, con etileno exógeno. Los datos son  $\bar{x} \pm \sigma$  de 6 replicados y expresan % del etileno inicial (10  $\mu\text{l/L}$ ).

Tiempo (h)	Tratamiento			
	Control	Discos hervidos	Atm. N <sub>2</sub>	S <sub>2</sub> C
0	97±1	98±1	98±3	100±4
6	72±9	96±1	93±5	98±5
24	39±9	90±2	89±3	94±5

utilizan tapones de teflón el etileno formado a partir del ACC exógeno va siendo metabolizado, disminuyendo su concentración en el espacio de cabeza. Esto no ocurre con los tapones de goma debido a la inhibición del metabolismo del etileno por el  $S_2C$  desprendido por los mismos.

Para comprobar que el  $S_2C$  liberado por los tapones de goma inhibe completamente el metabolismo del etileno, resultando un material adecuado para los estudios sobre el EFE, se realizan incubaciones de discos de hojas de olivo con agua y etileno exógeno ( $10 \mu\text{l/L}$ ) en viales cerrados con tapones de goma. Como puede comprobarse en la tabla 24, el etileno presente a distintos tiempos en dichas incubaciones no difiere del etileno presente en incubaciones control sin tejido. Estos resultados ponen de manifiesto que cuando se utilizan tapones de goma, el metabolismo del etileno se encuentra inhibido y que por tanto las medidas de la actividad EFE realizadas con este material son correctas.

La tasa de consumo de etileno ha sido calculada en  $9 \text{ nl}$  por hora y gramo de peso fresco, en base a la disminución de la concentración del etileno exógeno en las incubaciones cerradas con tapón de teflón. Esta tasa metabólica sitúa al olivo en una posición intermedia entre las especies de alta (alfalfa, haba) y baja (tomate, judía) capacidad de metabolizar el etileno (Beyer 1984).

Tabla 24.- Etileno presente en viales de incubación, cerrados con tapones de goma, de tejidos de olivo con agua y etileno exógeno. Las incubaciones control se realizan sin tejidos. Los datos son  $\bar{x} \pm \sigma$  de 5 replicados y expresan % del etileno inicial (10  $\mu\text{l/L}$ ).

Tiempo (h)	Incubación		
	Tejidos	Control	
0	98 $\pm$ 1	99 $\pm$ 2	ND
6	93 $\pm$ 2	95 $\pm$ 3	ND
24	91 $\pm$ 4	92 $\pm$ 2	ND

ND. Diferencias no significativas al nivel del 5% según el test de la t de Student.



## **5.- SISTEMA FORMADOR DE ETILENO IN VITRO**



Varios sistemas libres de células capaces de catalizar la conversión del ACC en etileno han sido descritos (Konze y Kende 1979b, Mayak et al. 1981, Vioque et al. 1981, Vinkler y Apelbaum 1983, Bousquet y Thimann 1984, Guy y Kende 1984b). Aunque todos ellos tienen semejanzas con el sistema formador de etileno nativo, poseen también otras propiedades que los diferencian del EFE fisiológico.

El sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa parcialmente purificado de hojas de olivo libera etileno a partir de ACC en presencia de su sustrato, AIA, y los cofactores diclorofenol (DCP), fosfato de piridoxal (PLP) y  $Mn^{2+}$ , habiéndose sugerido que podría intervenir in vivo en la conversión ACC  $\rightarrow$  etileno (Vioque et al. 1981).

La producción de etileno por este sistema es termolábil, requiere oxígeno y se inhibe por cianuro, azida y EDTA (Vioque et al. 1981), inhibidores de la AIA-oxidasa. Asimismo es sensible a iones  $Co^{2+}$  (Vioque et al. 1981), a desacoplantes de la fosforilación oxidativa como el dinitrofenol, y a secuestradores de radicales libres como el galato de n-propilo (Vioque y Vioque 1985). Extractos crudos de hojas de olivo, que no exhiben actividad AIA-oxidasa pero sí peroxidasa (Vioque et al. 1978a), no son capaces de liberar etileno (Vioque 1980). Los resultados aportados evidencian una relación entre actividad AIA-oxidasa y formación de etileno in vitro.

Continuando con esta línea de investigación, se programó como un objetivo de este trabajo el estudio de algunas características de la reacción in vitro así como del posible mecanismo de la formación de etileno en este sistema.

### 5.1.- ACTIVIDAD ENZIMATICA

La fig. 26 recoge la evolución con el tiempo de la producción de etileno por el sistema AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo. Puede observarse que sin extracto enzimático la tasa de formación de etileno es muy baja (0.11 nmol/24 h). En presencia del extracto enzimático se produce un acusado aumento en la producción de etileno durante las primeras 24 h de incubación, cesando dicha producción a partir de las 48 h.

Aunque la tasa de liberación de etileno (8.65 nmol/24 h) es comparable a la de los otros sistemas libres de células descritos, el rendimiento de la reacción es bajo (aprox. del 1% tras 24 h de incubación).

La fig. 27 muestra el efecto de cantidades crecientes de extracto enzimático sobre la liberación de etileno. La velocidad de liberación de etileno es proporcional a la concentración de extracto enzimático.

El extracto enzimático puede sustituirse en el medio de incubación por peroxidasa de rábano comercial (HRP, E.C. 1.11.1.7), enzima con actividades AIA-oxidasa y peroxidasa, con análogos resultados (Tabla 25). Esto indica que el sistema AIA-oxidasa/peroxidasa es responsable de la formación de etileno in vitro.

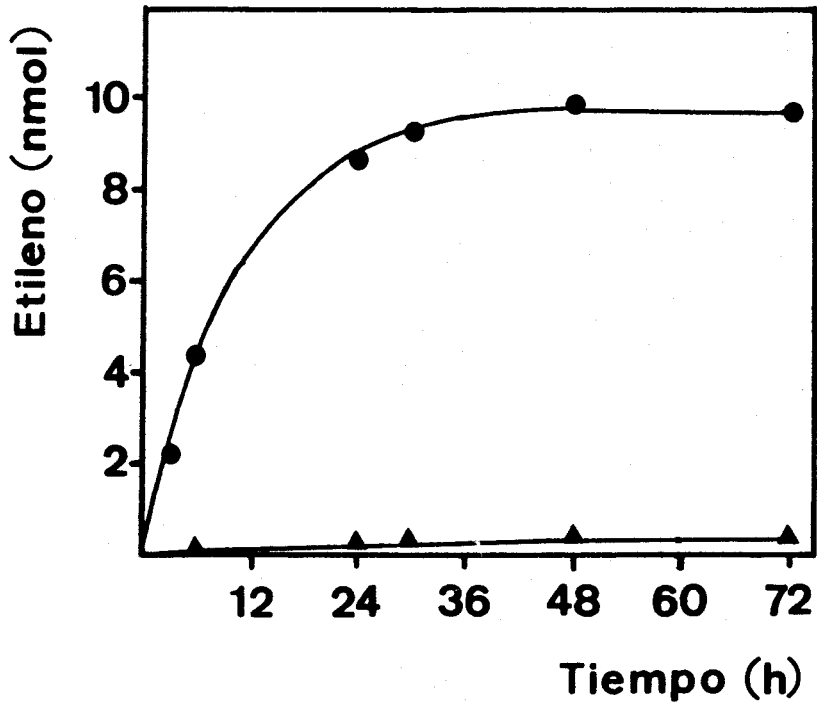


Fig. 26.- Evolución de la actividad formadora de etileno del sistema AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo. (●) Incubación completa, (▲) control sin extracto enzimático.

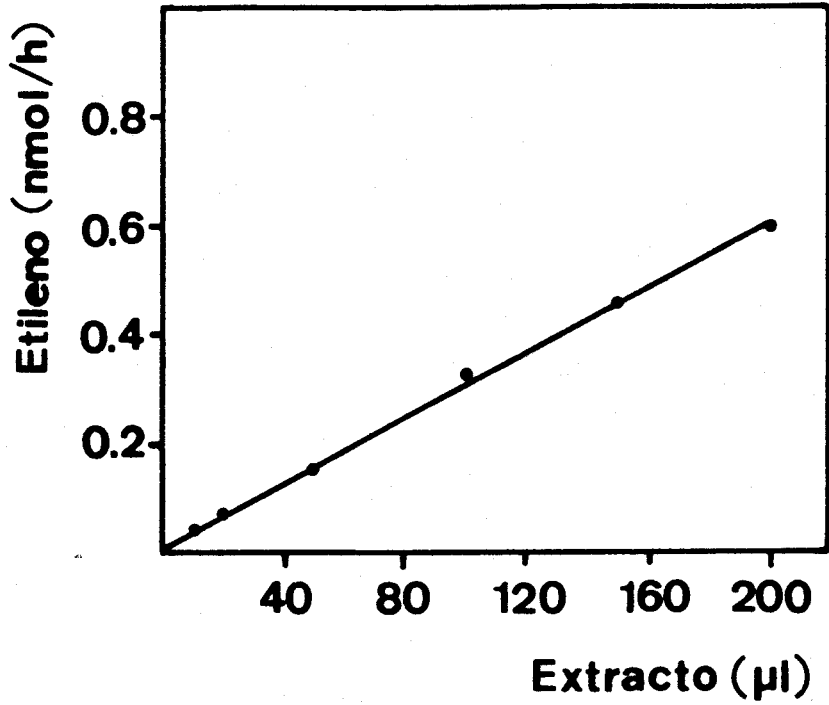


Fig. 27.- Efecto de la concentración de extracto enzimático ( 1 µl = 8.4 ng prot.) sobre la formación de etileno in vitro.

Tabla 25.- Formación de etileno in vitro con HRP (0.2  $\mu$ g).

Incubación	Etileno <sup>a</sup>
Completa	100
Sin HRP	2
HRP hervida	4
Atm. N <sub>2</sub>	1

<sup>a</sup> Porcentaje de la incubación completa (11.06 nmol/24 h).

## 5.2.-EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO. CALCULO DE LA $K_m$

Se ha estudiado la respuesta del sistema formador de etileno in vitro a distintas concentraciones de ACC (Fig. 28). La velocidad de liberación de etileno sigue un comportamiento lineal hasta una concentración de ACC 60 mM, permaneciendo prácticamente constante a partir de ACC 80 mM. El sistema resulta pues saturable por el ACC, aunque a concentraciones no fisiológicas. Por ello hemos decidido utilizar en nuestros ensayos ACC 1 mM, que es la concentración usada en la mayoría de los sistemas in vitro.

Aplicando la representación de Lineweaver-Burk se obtiene un valor de  $K_m$  para el ACC de 35.8 mM (Fig. 29). Este alto valor de  $K_m$  contrasta con el obtenido in vivo (8.4  $\mu$ M), aunque es del mismo orden que el de los otros sistemas libres de células: 389 mM para el homogenado de plántulas de guisante (Konze y Kende 1979b), 20 mM para el mismo material vegetal (Satoh y Esashi 1980), 15 mM para la fracción microsómica de pétalos de clavel (Mayak et al. 1981) y 2.8 mM para el sistema enzimático de *Citrus unshiu* (Shimokawa 1983).



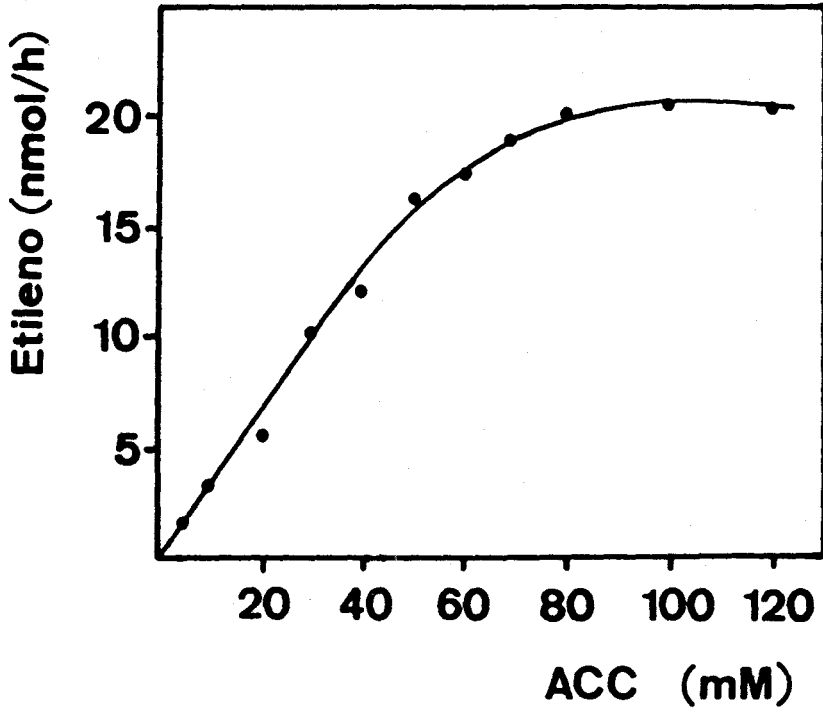


Fig. 28.- Influencia de la concentración de ACC en la actividad formadora de etileno in vitro.

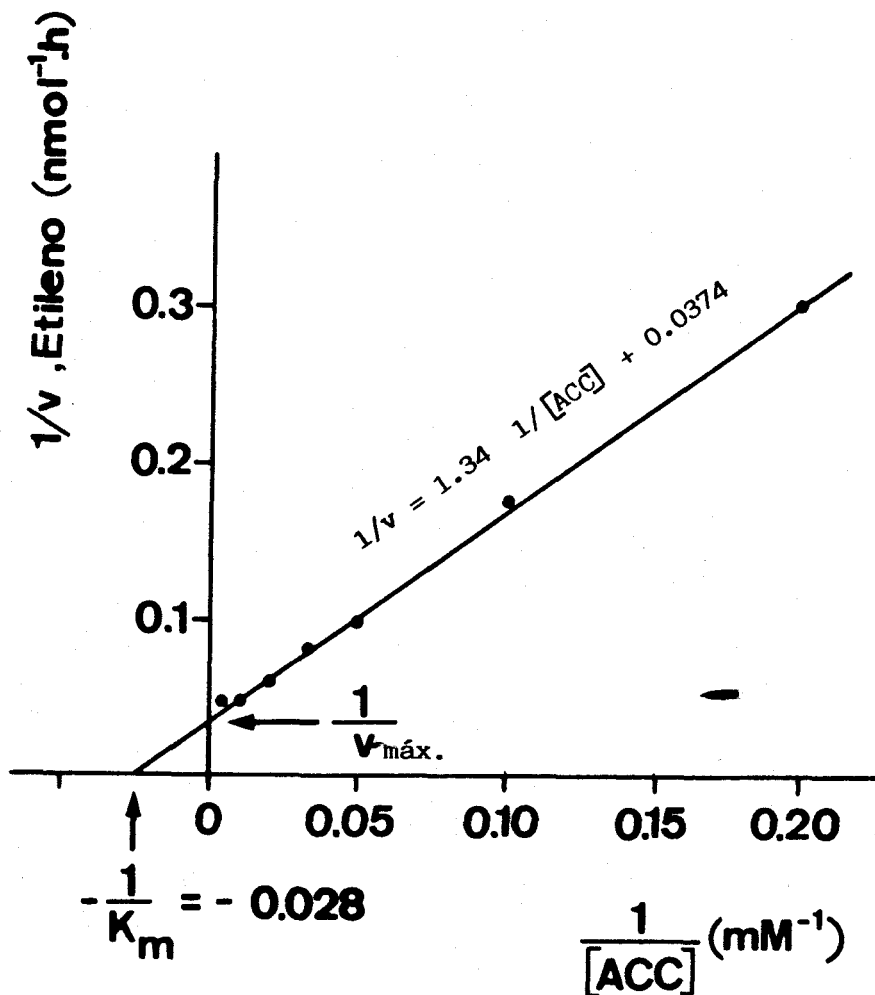


Fig. 29.- Representación de Lineweaver-Burk de las velocidades iniciales de formación de etileno a diferentes concentraciones de ACC. Cálculo de la  $K_m$ .

### 5.3.- RELACION AIA DESTRUIDO-ETILENO LIBERADO

Se han determinado a distintos tiempos (2, 6, 19, 20, 28 y 30 h) la concentración de AIA y el etileno desprendido en el medio de incubación in vitro (Fig. 30). Puede observarse que existe una relación lineal entre ambas magnitudes:  $\text{nmol AIA destruido} = 4.2 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 - 0.05$ ;  $r = 0.9968$ , de manera que es necesaria la oxidación de 4 moles de AIA para que se libere un mol de etileno. Esta relación indica que algún o algunos productos formados en la oxidación del AIA son necesarios para la liberación de etileno a partir del ACC.

El valor obtenido (4 nmol AIA/nmol etileno) relaciona este sistema con el sistema lipoxigenasa de Bousquet y Thimann (1984), donde se necesitan al menos 4 moles de hidróperóxido del ácido linoleico para generar 1 mol de etileno (Gardner y Newton 1987).



Fig. 30.- Relación entre AIA destruido y etileno liberado en el medio de incubación in vitro.

#### 5.4.- EFFECTO DEL ACC Y PLP SOBRE LA ACTIVIDAD AIA-OXIDASA

En una mezcla de reacción conteniendo AIA, DCP,  $Mn^{2+}$ , tampón fosfato pH 5.7 y extracto enzimático, el AIA se oxida completamente según la reacción de Salkowski en 2-3 horas. Como en la incubación completa in vitro (con ACC y PLP) existe una relación lineal entre AIA destruido y etileno formado durante 30 horas (Fig. 30), se deduce que la presencia de ACC y/o PLP debe alterar la velocidad de oxidación del AIA.

En la tabla 26 se muestra el efecto del ACC y PLP sobre la actividad AIA-oxidasa. Se comprueba que ACC y PLP por separado no interfieren en la actividad del enzima. Sin embargo, cuando se libera etileno (incubación completa con ACC y PLP), la velocidad inicial de oxidación del AIA se reduce en un 65%. La posibilidad de que el etileno liberado sea responsable de la inhibición de la actividad AIA-oxidasa observada ha sido investigada añadiendo etileno exógeno a la mezcla de reacción (Tabla 26). Se deduce que la presencia de etileno *per se* no inhibe la actividad AIA-oxidasa, ya que ésta no es significativamente menor con etileno exógeno.

La inhibición de la actividad en presencia de ACC y PLP sugiere una interacción entre ACC y AIA por el enzima. En hojas de olivo no se reproduce el efecto estimulador del ACC sobre la actividad AIA-oxidasa observado por Mussell (1985) en hojas de tomate.

Tabla 26.- Efecto del ACC (1mM), PLP (0.3 mM) y etileno (1.2 nmol/ml) sobre la velocidad de destrucción del AIA. La mezcla de reacción contiene: AIA 0.2 mM,  $Cl_2Mn$  0.3 mM, DCP 0.3 mM, 0.25 ml de extracto enzimático y tampón fosfato 20 mM pH 5.7.

Incubación	Actividad AIA-oxidasa <sup>x</sup>	(%) <sup>y</sup>
Mezcla de reacción	60.2±10.2	100 <sup>a</sup>
+ ACC	57.8±11.7	96 <sup>a</sup>
+ PLP	61.7±10.0	102 <sup>a</sup>
+ ACC + PLP	21.0± 2.4	35 <sup>b</sup>
+ etileno	53.4±10.3	89 <sup>a</sup>

<sup>x</sup>  $\mu\text{mol AIA destruidos} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg prot})^{-1}$

<sup>y</sup> Letras distintas indican diferencias significativas al nivel del 5% según el test de Duncan.

### 5.5.- INFLUENCIA DEL pH

En la fig. 31 se muestran los resultados obtenidos al determinar la actividad formadora de etileno a diferentes valores de pH (entre 5.0 y 8.5). El etileno se determina a varios tiempos (2, 6, 15, 20 y 24 h), obteniéndose la máxima producción en todos ellos a pH 6.0. Este valor coincide con el óptimo de la actividad peroxidasa y está muy cercano al pH de máxima actividad AIA-oxidasa (pH 5.7).

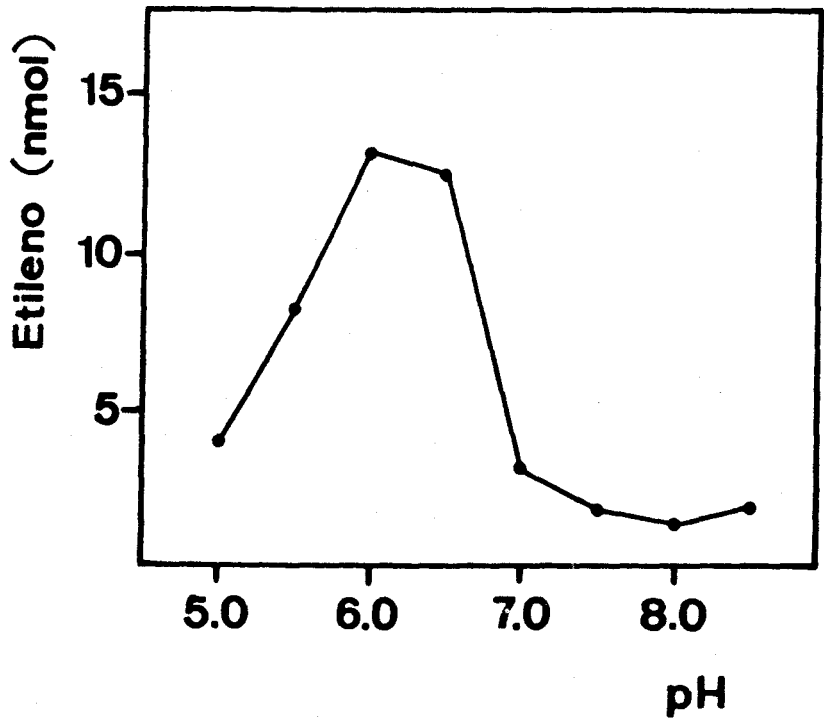


Fig. 31.- Efecto del pH del medio de incubación sobre la producción de etileno in vitro (20 h incubación).



### 5.6.- EFEECTO DEL ATP

El dinitrofenol (DNP) inhibe la producción de etileno en vegetales superiores (Burg y Thimann 1960, Lau et al. 1974). Este efecto se atribuyó a su acción sobre la conversión de metionina en SAM (Burg 1973, Murr y Yang 1975b), si bien posteriormente se ha demostrado que la etapa afectada por este inhibidor es el paso ACC  $\rightarrow$  etileno (Yu et al. 1980, Apelbaum et al. 1981b, Vioque y Vioque 1985). El DNP es un compuesto protonóforo que ejerce su acción in vivo modificando la estructura de la membrana y reduciendo los niveles celulares de ATP. Estos hechos sugieren que el ATP puede ser necesario para la conversión de ACC en etileno, como sustrato o como cofactor (Yu et al. 1980) o bien que este paso es sensible a algún efecto secundario asociado con la transferencia de electrones o la fosforilación oxidativa (Apelbaum et al. 1981b).

Estas hipótesis y la baja producción de etileno en el sistema AIA-oxidasa/peroxidasa nos indujeron a estudiar el posible efecto estimulador del ATP en la reacción in vitro. Los resultados presentados en la tabla 27 muestran que el ATP es un potente inhibidor de la conversión ACC  $\rightarrow$  etileno en el sistema in vitro. El efecto inhibidor del ATP no es debido a la variación del pH del medio de reacción, ya que la disminución de pH producida (0.3 unidades con ATP 1 mM) no es suficiente para anular la actividad (Fig. 31).

Tabla 27.- Efecto inhibitor del ATP sobre la formación de etileno en el sistema in vitro.

ATP (mM)	Etileno/2h		pH
	(nmol)	(%)	
-	1.83	100	5.90
0.1	1.27	69	5.85
0.5	0.20	11	5.80
1.0	-	0	5.60

Borochoy y Adam (1984) encuentran igualmente una fuerte inhibición por el ATP de la actividad formadora de etileno de una fracción membranosa de vesículas de pétalos de clavel. Estos resultados y el efecto inhibitor del DNP sobre el enzima solubilizado llevan a dichos autores a concluir que el DNP ejerce su efecto por interacción directa con el enzima más que por su acción sobre las membranas. El efecto del DNP in vivo lo explican por un mecanismo de transporte del ACC acoplado a membranas.

### 5.7.- EFFECTO DE ANALOGOS ESTRUCTURALES

Se ha ensayado el efecto de tres análogos del ACC, ciclopropilamina (CPA), ácido ciclopropanocarboxílico (CPC) y ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico (AIB) sobre la producción de etileno in vitro. Ni CPA ni CPC actúan como precursores del etileno en el sistema in vitro, por lo que parece necesaria la presencia simultánea de los grupos  $\alpha$ -amino y  $\alpha$ -carboxílico en el anillo de ciclopropano para la liberación de etileno.

Análogos químicos de sustratos son posibles inhibidores de reacciones enzimáticas. En la tabla 28 se muestra el efecto de dichos análogos a concentración 1 mM sobre la producción de etileno en incubaciones con ACC 1 mM. Puede observarse que ninguno de ellos inhibe la reacción. A igual concentración el AIB es un inhibidor de la actividad EFE de discos de hojas de olivo (Tabla 9).

Tabla 28.- Efecto de análogos estructurales (1 mM) sobre la producción de etileno a partir de ACC in vitro.

Incubación	Etileno (nmol/24h) <sup>x</sup>
Estándar	9.17±0.69 <sup>a</sup>
+ CPA	9.80±0.94 <sup>a</sup>
+ CPC	9.60±0.35 <sup>a</sup>
+ AIB	9.17±0.56 <sup>a</sup>

<sup>x</sup> Letras distintas indican diferencias significativas al nivel del 5% según el test de Duncan.

#### 5.8.- EFFECTO DE INHIBIDORES DE REACCIONES DEL PLP

El fosfato de piridoxal (PLP), molécula multifuncional que interviene como grupo prostético de gran número de reacciones enzimáticas, capaz de formar bases de Schiff y de actuar como quelante, es uno de los cofactores necesarios para la producción de etileno en el sistema AIA-oxidasa/peroxidasa del olivo (Vioque et al. 1981).

Existen dos tipos principales de inhibidores de las reacciones mediadas por el PLP, los análogos de la vinilglicina (ácido L-2-amino-4-alcoxi-trans-3 butenoico) y los de la hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH). Los más utilizados por su potencia y especificidad son la aminoetoxivinilglicina (AVG) y el ácido aminooxiacético (AOA) (Amrhein y Wenkler 1979, Yang y Hoffman 1984).

En la tabla 29 se recogen los resultados de los ensayos con AVG y AOA. Puede comprobarse que la AVG no ejerce ningún efecto sobre la producción de etileno, mientras que concentraciones relativamente altas de AOA (100 µM) inhiben la reacción. La AVG actúa sobre el centro activo del enzima (Rando 1974) mientras que el AOA puede reaccionar también no enzimáticamente con el PLP (John et al. 1978). Los resultados obtenidos sugieren que el PLP no actúa como cofactor unido al enzima. El hecho de que bajas concentraciones de AOA (10 µM) no tengan efecto sobre la producción de etileno (Tabla 29) apoya esta hipótesis.

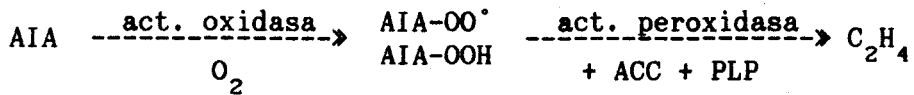
Tabla 29.- Producción de etileno por el sistema enzimático de hojas de olivo, en presencia de AVG y AOA.

Incubación	Etileno (nmol/24h)	Actividad <sup>x</sup> (%)
Estándar	25.5±0.9	100 <sup>a</sup>
+ AVG 10 µM	25.4±0.6	99 <sup>a</sup>
+ AVG 100 µM	25.5±1.0	100 <sup>a</sup>
+ AOA 10 µM	26.5±0.6	104 <sup>a</sup>
+ AOA 100 µM	9.7±0.1	38 <sup>b</sup>

<sup>x</sup> Letras distintas indican diferencias significativas al nivel del 5% según el test de Duncan.

### 5.9.- SECUENCIA DE LA REACCION

En sus estudios sobre la formación de etileno a partir del ACC por el sistema AIA-oxidasa/peroxidasa, Vioque y Vioque (1985) encuentran que la reacción tiene lugar en dos pasos, sugiriendo el siguiente esquema:



El AIA se oxida enzimáticamente formando radicales peróxido y/o hidroperóxidos (Nakajima y Yamazaki 1979) que interaccionan con ACC y PLP en una reacción mediada por la actividad peroxidasa del enzima.

Para comprobar la naturaleza enzimática del segundo paso de la reacción se extraen con diclorometano los productos de oxidación del AIA de un medio de reacción conteniendo AIA, DCP,  $\text{Mn}^{2+}$ , tampón fosfato pH 5.7 y extracto enzimático. Se comprueba la extracción por el espectro característico de los productos de oxidación del AIA en el UV, con máximos a 247 y 254 nm (Fig. 32) (Ray 1956). Estos productos se incuban con ACC y PLP bajo diferentes condiciones según se recoge en la tabla 30. Los resultados ponen claramente de manifiesto la necesidad de una fracción enzimática en la segunda parte de la reacción, siendo también necesarios  $\text{Mn}^{2+}$  y oxígeno. El manganeso es necesario en este sistema in vitro no sólo como

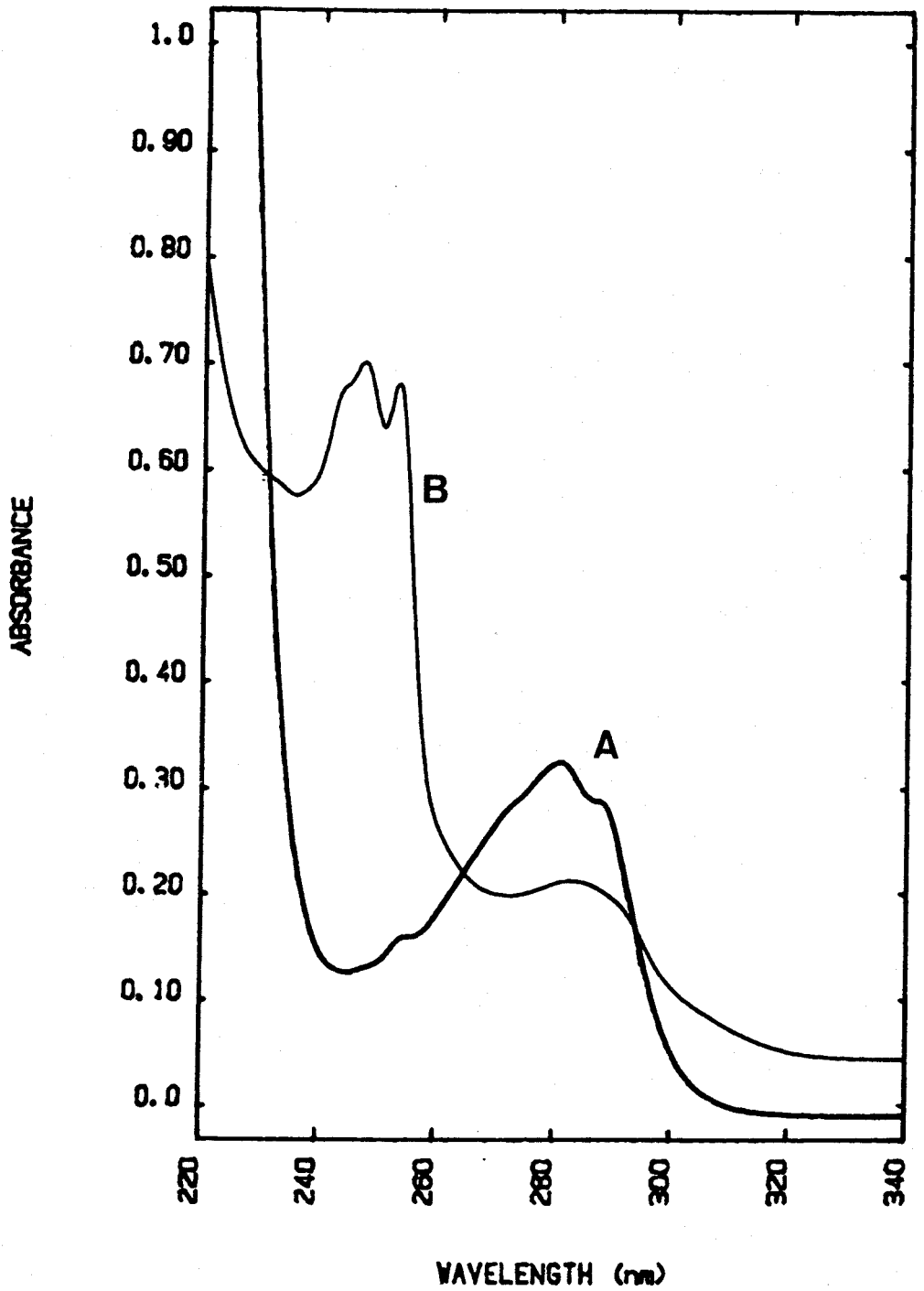


Fig. 32.- Espectro de absorción en el UV de la mezcla de incubación inicial (A) y tras 2 h (B).



Tabla 30.- Etileno liberado por incubación de los productos de la oxidación enzimática del AIA con ACC y PLP bajo diferentes condiciones.

Productos de oxidación del AIA +	Etileno (nmol/24 h)
ACC + PLP	-
ACC + PLP + Mn <sup>2+</sup>	-
ACC + PLP + ext. enz.	0.12
ACC + PLP + Mn <sup>2+</sup> + ext. enz.	19.10
ACC + PLP + Mn <sup>2+</sup> + ext. enz. + atm. N <sub>2</sub>	1.15

Tabla 31.- Necesidad de una fracción enzimática para la liberación de etileno por los productos de oxidación del AIA. FR y FE corresponden a las fracciones retenida (bajo P<sub>m</sub>) y excluida (alto P<sub>m</sub>) del medio de incubación (sin ACC ni PLP) oxidado.

ACC + PLP +	Etileno (nmol/24 h)
Medio incub. oxidado	17.17
FR	0.14
FR + FE	7.15
FR + ext. enz.	9.98

cofactor de la oxidación del AIA sino también para la conversión del ACC en etileno. La necesidad de  $Mn^{2+}$  para la rotura del anillo de ciclopropano ha sido también observada por Nilsen et al. (1988) con un extracto enzimático de raíces de cebada capaz de liberar etileno a partir de ACC.

La necesidad de actividad enzimática en el segundo paso de la reacción ha sido confirmada al pasar el medio de incubación conteniendo AIA, DCP,  $Mn^{2+}$ , tampón fosfato pH 5.7 y extracto enzimático, tras 2 h de incubación, por una columna de Sephadex G-25. La fracción retenida (FR), que contiene los productos de oxidación del AIA, comprobado por el espectro de absorción en el ultravioleta (Ray 1956), no libera etileno en presencia de ACC y PLP (Tabla 31). La capacidad para liberar etileno se recupera al añadirle la fracción de alto peso molecular (FE) o extracto enzimático, habiéndose comprobado previamente que la FE conserva la actividad peroxidasa. Estos resultados confirman que el segundo paso de la reacción es también de naturaleza enzimática.

#### 5.10.- PARTICIPACION DE RADICALES LIBRES

Los radicales libres han sido implicados en la biosíntesis del etileno debido a la capacidad de los atrapadores de radicales libres para inhibir su producción (Baker et al. 1977). Posteriormente se ha demostrado que es el último paso, la conversión de ACC en etileno, el bloqueado por los secuestradores de radicales libres (Konze et al. 1980, Apelbaum et al. 1981b).

Para estudiar la participación de radicales libres en el sistema formador de etileno in vitro, se han utilizado enzimas específicos (catalasa y superóxido dismutasa) y atrapadores de radicales libres (ácido ascórbico, galato de n-propilo, ácido fórmico y D-manitol). La catalasa (EC 1.11.1.6) participa en reacciones de eliminación del peróxido de hidrógeno mediante un proceso de oxidación molecular:  $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$ , siendo utilizada para detectar la intervención del agua oxigenada en reacciones enzimáticas. La superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1.) reacciona con radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), transformándolos en  $O_2$  y  $H_2O_2$ . Su función fisiológica parece ser la de evitar la toxicidad del anión superóxido (Scrimgeour 1977), usándose como test para comprobar la presencia de radicales  $O_2^{\cdot-}$  en reacciones enzimáticas. Los secuestradores de radicales libres reaccionan con los mismos debido a su alta afinidad, retirándolos de otras reacciones.

En la tabla 32 se recogen los resultados obtenidos, siendo la formación de etileno inhibida por galato de n-propilo (GP), ácido ascórbico, catalasa y superóxido dismutasa. La inhibición por GP y ácido ascórbico (inhibidores no específicos) indica la intervención de radicales libres en la reacción. Ni el ácido fórmico ni el D-manitol (inhibidores de radicales  $\text{OH}^{\cdot}$ ) ejercen efecto alguno, por lo que puede descartarse la participación de radicales hidroxilo. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Osswald et al. (1989) con un sistema generador de etileno mediado por peroxidasa, y por McRae et al. (1982) en un sistema lipoxigenasa capaz de liberar etileno a partir de ACC.

La inhibición por SOD y catalasa sugiere la intervención de radicales superóxido y de  $\text{H}_2\text{O}_2$  respectivamente. Sin embargo el  $\text{H}_2\text{O}_2$  no estimula la reacción (Tabla 32), sino que la inhibe ligeramente (de forma no significativa). Esta aparente contradicción puede explicarse en base a una inhibición del enzima por peróxido de hidrógeno durante la oxidación del AIA a través de hidroperóxidos (Acosta et al. 1989). El efecto inhibitor de la catalasa puede ser debido a su acción sobre los hidroperóxidos del AIA, ya que también puede utilizar hidroperóxidos de bajo peso molecular como sustrato (White et al. 1973), no siendo necesaria la intervención del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la reacción.

Los resultados obtenidos apoyan la participación de radicales superóxido, peróxido ( $\text{AIA-OO}^{\cdot}$ ) y/o hidroperóxidos

Tabla 32.- Efecto de inhibidores de radicales libres sobre la actividad formadora de etileno in vitro.

Incubación	Etileno (nmol/24h)	Inhibición (%)
Estándar	2.10±0.25	- <sup>a</sup>
+ catalasa (500 U)	0.99±0.07	53 <sup>b</sup>
+ SOD (5000 U)	0.17±0.05	92 <sup>c</sup>
+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 mM)	1.83±0.34	13 <sup>a</sup>
+ fórmico (0.5 mM)	2.03±0.21	3 <sup>a</sup>
+ D-manitol (0.5 mM)	2.12±0.27	0 <sup>a</sup>
+ ascórbico (50 μM)	1.03±0.12	51 <sup>b</sup>
+ GP (50 μM)	0.02±0.02	99 <sup>d</sup>

Letras distintas indican diferencias significativas al nivel del 5% según el test de Duncan.

(AIA-OOH) en la reacción. La formación de peróxidos e hidroperóxidos durante la oxidación aeróbica del AIA, catalizada por peroxidasa en ausencia de  $H_2O_2$ , ha sido confirmada por Nakajima y Yamazaki (1979) y Acosta et al. (1988). Por otra parte, los hidroperóxidos pueden participar en la formación de radicales superóxido, seguramente facilitando la activación del oxígeno molecular (Legge y Thompson 1983). La inhibición causada por SOD podría ser debida a su acción sobre los aniones superóxido así generados. Parups (1984) en sus trabajos sobre formación de etileno en presencia de AIA y peroxidasa propone también la intervención de hidroperóxidos del AIA y radicales superóxido en la reacción. Dicho autor concluye además que se forman uno o más radicales del ACC durante su conversión a etileno. Sin embargo, la inhibición causada por SOD no implica necesariamente al radical superóxido en la generación de etileno, ya que se han descrito reacciones de sensibilidad del enzima frente a radicales peróxido (Gardner y Newton 1987).

### 5.11.- MECANISMO DE FORMACION DE ETILENO IN VITRO

Basándonos en la similitud del sistema AIA-oxidasa/ peroxidasa de hojas de olivo con el sistema lipoxigenasa de Bousquet y Thimann (1984), en las reacciones descritas para la oxidación enzimática del AIA (Acosta et al. 1988, 1989) y en el modelo de Pirrung (1983) para la conversión del ACC en etileno, proponemos como posible mecanismo de reacción el representado en la fig. 33. Dicho mecanismo explicaría muchas de las características del sistema: dependencia de oxígeno, sensibilidad a catalasa y SOD, no intervención del  $H_2O_2$ , sensibilidad a atrapadores de radicales libres y baja afinidad hacia el ACC al transcurrir la reacción en dos etapas.

El papel del AIA en el sistema enzimático de producción de etileno sería el de actuar, en una primera etapa, como sustrato del enzima dando lugar a radicales del AIA. Estos radicales reaccionan con oxígeno generando radicales peróxido de AIA ( $AIA-OO^{\cdot}$ ), que son estabilizados a hidroperóxidos en presencia de iones manganeso (Nakajima y Yamazaki 1979, Acosta et al. 1988, 1989). El DCP es un monofenol que acelera la oxidación del AIA proporcionando electrones desapareados y permitiendo la formación de radicales (Osswald et al. 1988). El DCP no es necesario para la oxidación del ACC (Tabla 30).

Los peróxidos e hidroperóxidos del AIA son capaces de activar el enzima nativo hasta Compuesto I (Co-I), abrien-

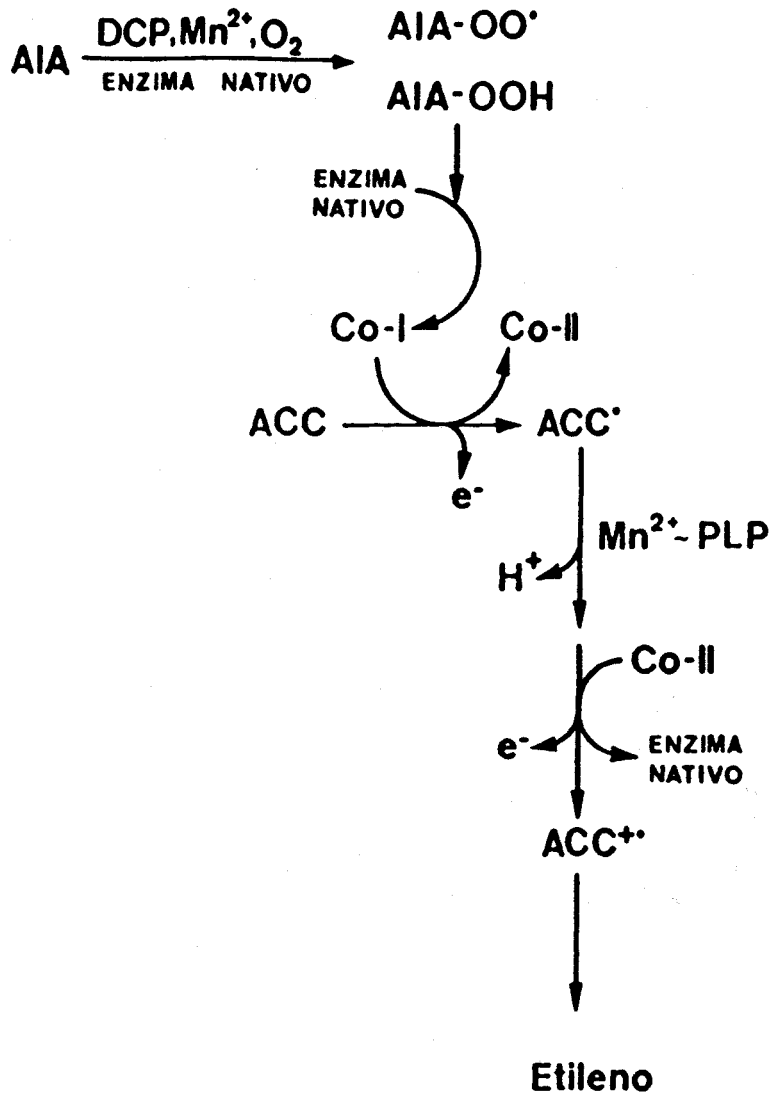


Fig. 33.-Mecanismo propuesto para la formación de etileno por el sistema AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo.



do así la ruta peroxidativa del enzima. Esta forma activa del enzima podría oxidar al ACC con pérdida de un electrón y apertura del anillo de ciclopropano, originando el radical ACC<sup>•</sup>. Siguiendo a continuación el esquema propuesto por Pirrung (1983) para la formación de etileno a partir de ACC, el radical ACC<sup>•</sup> perdería un protón y otro electrón, formándose etileno a través del intermediario ACC<sup>+•</sup>. La presencia de peróxidos e hidroperóxidos (AIA-OO<sup>•</sup>, AIA-OOH) aseguraría el turnover catalítico del enzima y por tanto la producción de etileno. De acuerdo con el esquema propuesto el ACC competiría con el AIA por las formas activas del enzima, lo que podría explicar la baja afinidad del sistema hacia el ACC.

Por su parte el Mn<sup>2+</sup> es un cofactor necesario en casi todos los sistemas in vitro descritos (Konze y Kende 1979b, Shimokawa 1983, Adam y Mayak 1984, Borochoy y Adam 1984, Bousquet y Thimann 1984, Vinkler y Apelbaum 1984, Nilsen et al. 1988, Osswald et al. 1989), participando además en gran número de reacciones de óxido-reducción y como activante de las peroxidasas (Gaspar et al. 1985). En el sistema enzimático de hojas de olivo el manganeso es un cofactor para la actividad AIA-oxidasa (Vioque et al. 1978b), resultando necesario también para la conversión de ACC en etileno (Tabla 30). El Mn<sup>2+</sup> podría actuar unido al PLP como transportador de protones tras la primera oxidación del ACC, de forma análoga a la propuesta por Bousquet y Thimann (1984) para el sistema lipoxigenasa.

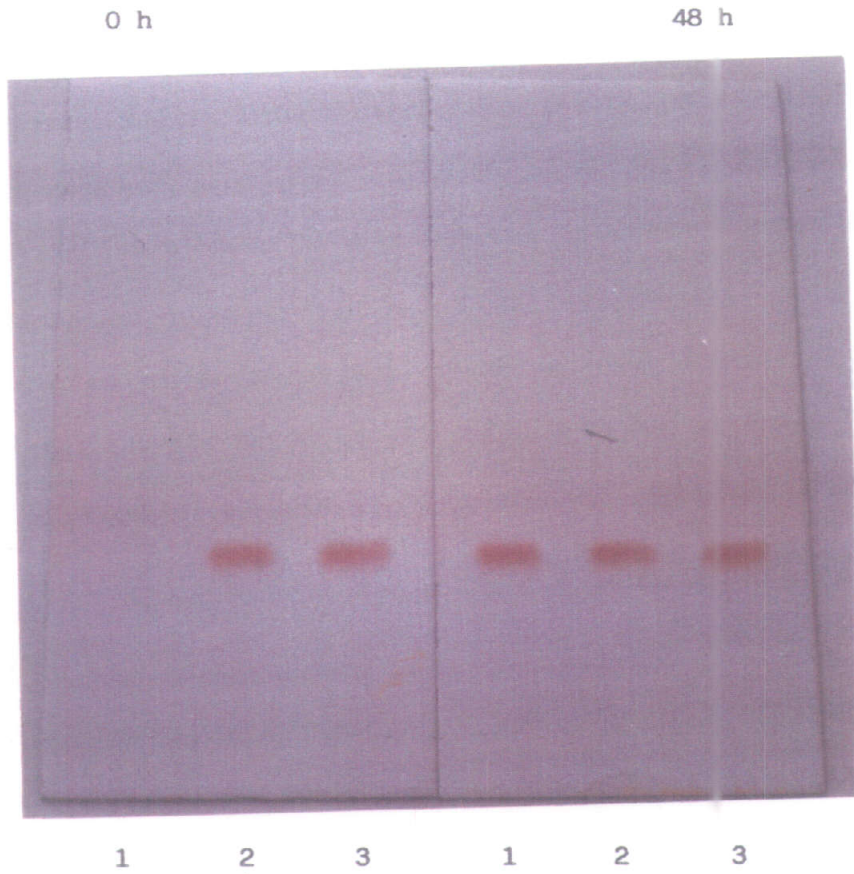
**6.- FORMACION DE 3-HIDROXIPROPANO AMIDA A PARTIR DE ACC**

El rendimiento en la conversión ACC ---> etileno en el sistema AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo es bajo. Esta es una característica común a todos los sistemas in vitro hasta ahora descritos, cuyos rendimientos oscilan entre el 1 y el 16%. Este hecho ha sido objeto de constante preocupación por quienes se han dedicado al estudio del EFE, habiendo sido utilizado por algunos autores como prueba para negar la naturaleza fisiológica de los sistemas in vitro, aunque sin llegar a una conclusión clara. Se han investigado las causas de este bajo rendimiento en el sistema formador de etileno in vitro de hojas de olivo.

Cuando se incuba ACC con el extracto enzimático en presencia de PLP, AIA, DCP y  $Mn^{2+}$ , se transforma en etileno alrededor del 1-2% del ACC inicial tras 24-48 horas de incubación. Si no tienen lugar otras reacciones, el resto del ACC debería permanecer como tal en el medio de incubación.

La fotografía 2 muestra un análisis cromatográfico en silicagel, revelado con ninhidrina, de la mezcla de reacción inicial y tras 48 h de incubación. Se observa que a las 48 h, el ACC no aparece en la incubación completa, mientras que en el control (incubación sin extracto enzimático) el ACC permanece en el medio.

Se han determinado a distintos tiempos el etileno liberado y el ACC presente en el medio, por el método de



Fotografía 2.- CCF revelada con ninhidrina de la mezcla completa de incubación (3), del control sin extracto enzimático (2) y de ACC patrón (1).

Lizada y Yang (1979), en la mezcla de incubación completa (Tabla 33). Como se muestra en dicha tabla, tras 48 h de incubación sólo se encontró un 15.9% del ACC añadido a la mezcla de reacción. Bajo las mismas condiciones un control de ACC no sufre ninguna alteración. Esta "desaparición" de ACC no es el resultado de la destrucción de etileno o de su difusión al exterior durante la incubación, ya que cuando se añade una cantidad conocida de etileno a la mezcla de reacción completa sin ACC, la concentración de etileno permanece invariable.

Estos resultados indican que durante la reacción catalizada por el sistema AIA-oxidasa/peroxidasa, tras 48 h de incubación un 1.5% del ACC inicial se transforma en etileno, un 15% aproximadamente permanece como ACC libre y el resto (aprox. 85%) no se recupera ni tras hidrólisis alcalina (Kionka y Amrhein 1984). Esta falta de ACC tampoco se debe a interferencias químicas del método de Lizada y Yang (1979) con los componentes de la mezcla de reacción, puesto que la eficiencia de la conversión es alta (88-95%). Estos hechos indican que el ACC debe transformarse en el medio de reacción en algún o algunos productos desconocidos.

Tabla 33.- Producción de etileno y contenido en ACC de la mezcla de reacción estándar. Los datos expresan % del ACC añadido (1  $\mu\text{mol}$ ) y representan la  $\bar{x} \pm \sigma$  de 6 replicados.

Tiempo (h)	$\text{C}_2\text{H}_4$ (%)	ACC (%)
3	0.2 $\pm$ 0.1	92.4 $\pm$ 1.7
15	0.4 $\pm$ 0.1	71.8 $\pm$ 5.0
24	0.8 $\pm$ 0.1	61.4 $\pm$ 2.5
30	1.0 $\pm$ 0.2	38.1 $\pm$ 1.8
48	1.5 $\pm$ 0.2	15.9 $\pm$ 1.2

### 6.1.- CARACTERISTICAS DE LA TRANSFORMACION

Los resultados de la tabla 34 muestran la naturaleza enzimática de esta reacción, ya que si se omite el extracto enzimático o se desnaturaliza por calor, el ACC permanece sin alterar en el medio de incubación. Sin embargo el ACC no sufre alteración alguna cuando se incuba únicamente con el extracto enzimático (tabla 34), por lo que debe ser necesario también algún cofactor de la incubación completa.

Para determinar qué cofactor o cofactores de la incubación completa son necesarios para transformar el ACC, se incuba éste con diferentes medios de reacción (Tabla 35). Como puede apreciarse, la transformación es dependiente de oxígeno y requiere manganeso, pero no AIA, DCP o PLP. El extracto enzimático,  $Mn^{2+}$  y oxígeno son pues los componentes de la incubación completa responsables de esta transformación del ACC, que parece independiente de la formación de etileno, ya que éste se forma únicamente en la incubación completa. Resultados semejantes se obtienen cuando se sustituye el extracto enzimático por su fracción de alto peso molecular. La fig. 34 muestra que la desaparición del ACC en la incubación completa es proporcional a la concentración de extracto enzimático o su fracción proteica.

Por otra parte, el extracto enzimático puede también ser sustituido en la incubación completa por peroxidasa comercial de rábano (HRP, 0.04 unidades) aumen-

Tabla 34.- Naturaleza enzimática de la transformación del ACC. Los datos representan la  $\bar{x} \pm \sigma$  de dos experimentos independientes realizados con viales triplicados, y expresan el contenido de ACC en el medio tras 48 h de incubación.

Incubación	ACC (%) <sup>a</sup>
Completa	15.9±1.2
Sin ext. enz.	99.8±4.1
Con ext. enz. hervido	96.5±2.5
Con ext. crudo	20.6±2.4
ACC + ext. enz.	92.6±4.9

<sup>a</sup> Porcentaje del ACC inicial (1  $\mu$ mol).



Tabla 35.- Contenido en ACC de diversas mezclas de reacción tras 48 h de incubación. Los datos indican la  $\bar{x} \pm \sigma$  de dos experiencias independientes realizadas con viales triplicados, y expresan % del ACC inicial.

Incubación	ACC (%)
Completa	15.9±1.2
Atm. N <sub>2</sub>	90.8±5.6
Sin Mn <sup>2+</sup>	98.8±3.2
Sin AIA	12.8±3.4
Sin DCP	1.0±0.2
Sin PLP	0.9±0.2
ACC + ext. enz. + Mn <sup>2+</sup>	6.0±1.9

Tabla 36.- Contenido en ACC, tras 3 h de incubación, de mezclas de reacción con HRP (0.04 unidades) sustituyendo al extracto enzimático. Los datos son  $\bar{x} \pm \sigma$  de 6 replicados y expresan % del ACC inicial (1 μmol).

Incubación	ACC (%)
Completa con HRP	8.7±1.3
ACC + HRP + Mn <sup>2+</sup>	2.2±0.4
ACC + HRP + Mn <sup>2+</sup> + N <sub>2</sub>	90.1±2.3
ACC + HRP hervida + Mn <sup>2+</sup>	93.7±5.3

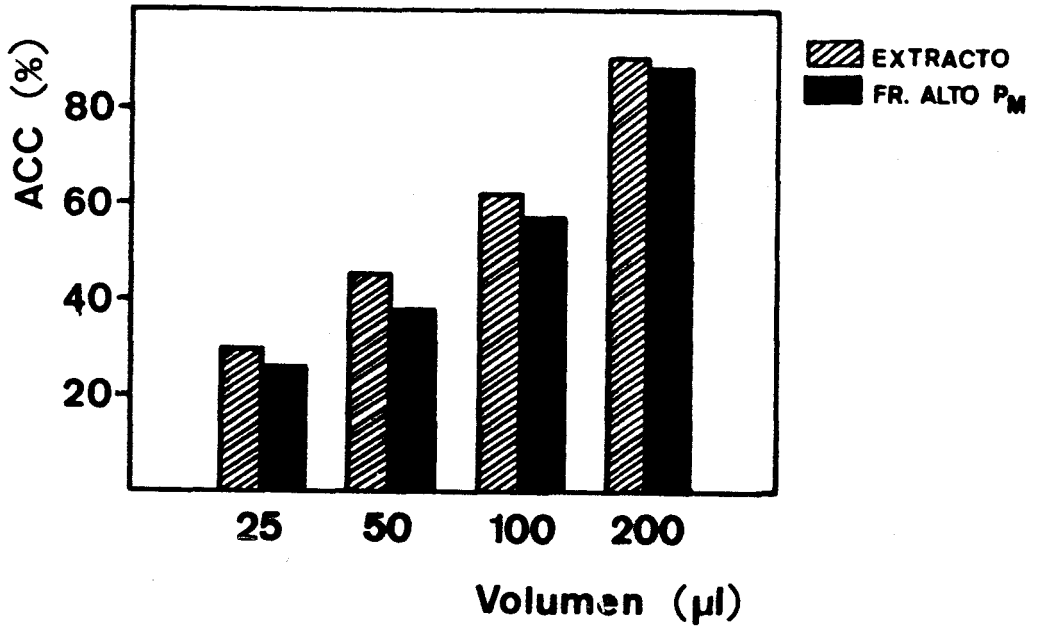


Fig. 34.- ACC transformado en incubaciones completas con extracto enzimático y su fracción de alto peso molecular. Los resultados expresan % del ACC inicial (1 µmol).

tando la velocidad de transformación del ACC (Tabla 36), por lo que puede concluirse que las peroxidasas son los enzimas implicados en esta transformación. El hecho de que extractos crudos de hojas de olivo, que exhiben actividad peroxidasa pero no AIA-oxidasa, sean capaces de transformar al ACC (Tabla 34), indica que la actividad peroxidasa es la responsable de la transformación.

## 6.2.- ENSAYOS CON [2,3-<sup>14</sup>C]ACC

Para examinar el destino del ACC en el sistema AIA-oxidasa/peroxidasa, se añade ACC marcado en los carbonos 2 y 3 a distintas mezclas de reacción, analizándose la distribución de los productos radiactivos tras 48 h de incubación (Tabla 37). Sólo se detecta radiactividad en la fase gaseosa en el caso de la incubación completa, y se corresponde con el etileno liberado. La radiactividad en la fase líquida de la incubación completa corresponde a más de un compuesto, ya que el ACC explica solamente alrededor del 20% de dicha radiactividad.

El análisis por CCF en silicagel del medio de reacción completo tras 10 y 48 h de incubación, muestra la presencia de dos picos radiactivos, uno con  $R_f$  0.40 que corresponde al ACC y un pico desconocido con  $R_f$  0.66 (Fig. 35). Las incubaciones de ACC, extracto enzimático y  $Mn^{2+}$  o ACC, HRP (0.04 unidades) y  $Mn^{2+}$  originan el mismo pico radiactivo desconocido ( $R_f$  0.66) que la incubación completa.

Estos resultados indican que en el sistema in vitro el ACC se transforma mayoritariamente en un compuesto desconocido.

Este compuesto desconocido de  $R_f$  0.66 se aísla del medio de reacción de incubaciones preparativas mediante CCF en placa de gel de sílice, utilizando cloroformo : metanol

Tabla 37.- Distribución de la radiactividad, etileno formado y contenido en ACC en distintas mezclas de reacción tras 48 h de incubación. Los datos expresan % del ACC (1  $\mu$ mol) o de la radiactividad (320 nCi) iniciales.

Incubación	GAS		LIQUIDO	
	Etileno	Radiact.	ACC	Radiact.
Completa	2.8	2.9	20.3	97.1
Sin extracto	0.3	0.3	98.6	99.4
ACC + ext. enz. + Mn <sup>2+</sup>	0.0	-	0.5	99.9

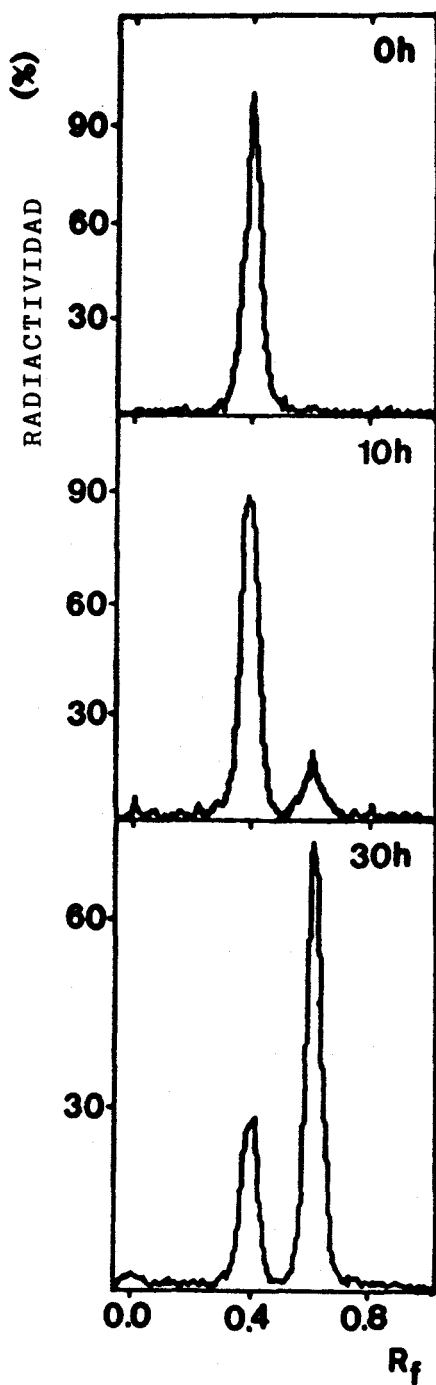


Fig. 35.- Distribución de los productos radiactivos no volátiles en la incubación estándar con  $[2,3-^{14}\text{C}]$  ACC. Las muestras se separan por CCF y se cuantifican según se describe en Materiales y Métodos. Los datos expresan % de la radiactividad inicial (320 nCi).

(3:1; v/v) como líquido de desarrollo. Dicho compuesto, que en estas condiciones tiene un  $R_f$  de 0.77, se extrae con metanol y se somete a diferentes pruebas químicas y espectroscópicas para su caracterización.

6.3.- CARACTERIZACION DEL COMPUESTO DE R<sub>f</sub> 0.77 COMO 3-HIDRO-  
XIPROPANO AMIDA

6.3.1.- Pruebas químicas

El compuesto de R<sub>f</sub> 0.77 es un sólido blanco, soluble en agua y metanol, que funde a la llama.

En CCF da reacción negativa con vapores de yodo y con ninhidrina, fluorescamina o reactivo Sakai. También es negativa la reacción con verde de bromocresol. Se tiñe con hexacianoferrato (III) de potasio-nitroprusiato sódico, reactivo para sustancias nitrogenadas alifáticas (Fishbein y Cavanaugh 1965).

Las reacciones llevadas a cabo con diazometano, con bromuro de *p*-fenilazofenacilo y con 2,4-dinitrofenilhidracina son igualmente negativas. Así mismo, el compuesto no queda retenido cuando se pasa a través de columnas de intercambio iónico (Dowex-2, forma OH<sup>-</sup>, aniónica o amberlita CG-120, forma H<sup>+</sup>, catiónica).

De los resultados obtenidos en estas experiencias se puede concluir que el compuesto no posee grupos amino o carboxilo libres y tampoco grupos aldehído o cetona, o grupos funcionales cargados, pero sí contiene nitrógeno en su molécula.



### 6.3.2.- Pruebas espectroscópicas

#### 6.3.2.1.- Espectros de ultravioleta e infrarrojo

El compuesto de  $R_f$  0.77 no presenta absorbancia en el espectro de ultravioleta.

En el espectro de infrarrojo (Fig. 36), aparecen bandas con los siguientes valores de frecuencia:  $\nu_{\text{máx}}^{\text{KBr}}$ , 3400 - 3200 (OH, NH), 3000 (CH, alifático), 1675 (C=O), 1425 (C-N) y 600 - 700  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_2$ ).

#### 6.3.2.2.- Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protones ( $^1\text{H}$ -RMN) y de carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN).

En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, realizado en dimetilsulfóxido- $\text{d}_6$  (DMSO) (Fig. 37), aparecen señales con los siguientes valores de desplazamiento químico:  $\delta$  (ppm) 7.35 (sa), 6.79 (sa), 4.64 (t), 3.59 (td) y 2.21 (t). La señal que aparece a  $\delta$  3.59 ppm presenta dos acoplamientos, uno con la señal a  $\delta$  2.21 ppm con una constante de acoplamiento (J) de 6.5 Hz y otro (J= 4.9 Hz) con la señal a  $\delta$  4.64 ppm.

Cuando el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN se realiza en agua deuterada (Fig. 38), sólo se observa la aparición de dos tripletas a  $\delta$  3.77 ppm y  $\delta$  2.43 ppm, que están acoplados (J= 6.5 Hz) y que son asignables a los cuatro protones de dos grupos metileno vecinales ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ). La desaparición de las otras señales observadas en el espectro realizado en DMSO indica

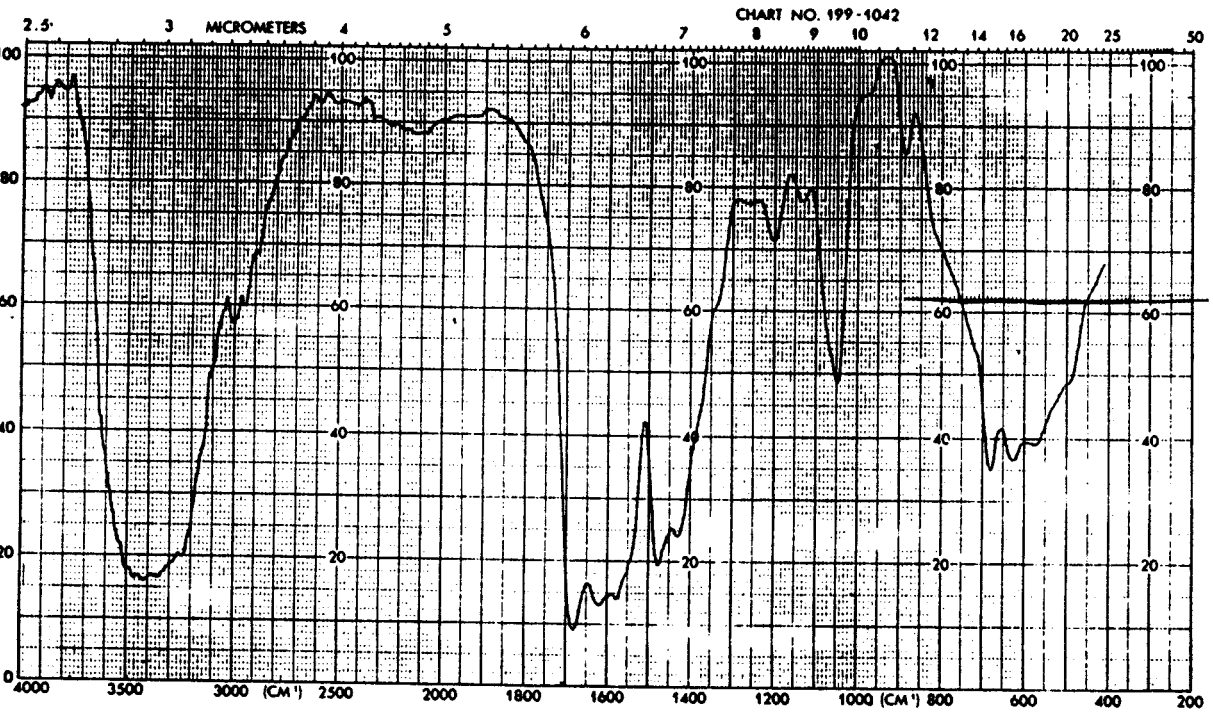


Fig. 36.- Espectro de infrarrojos del compuesto en BrK.

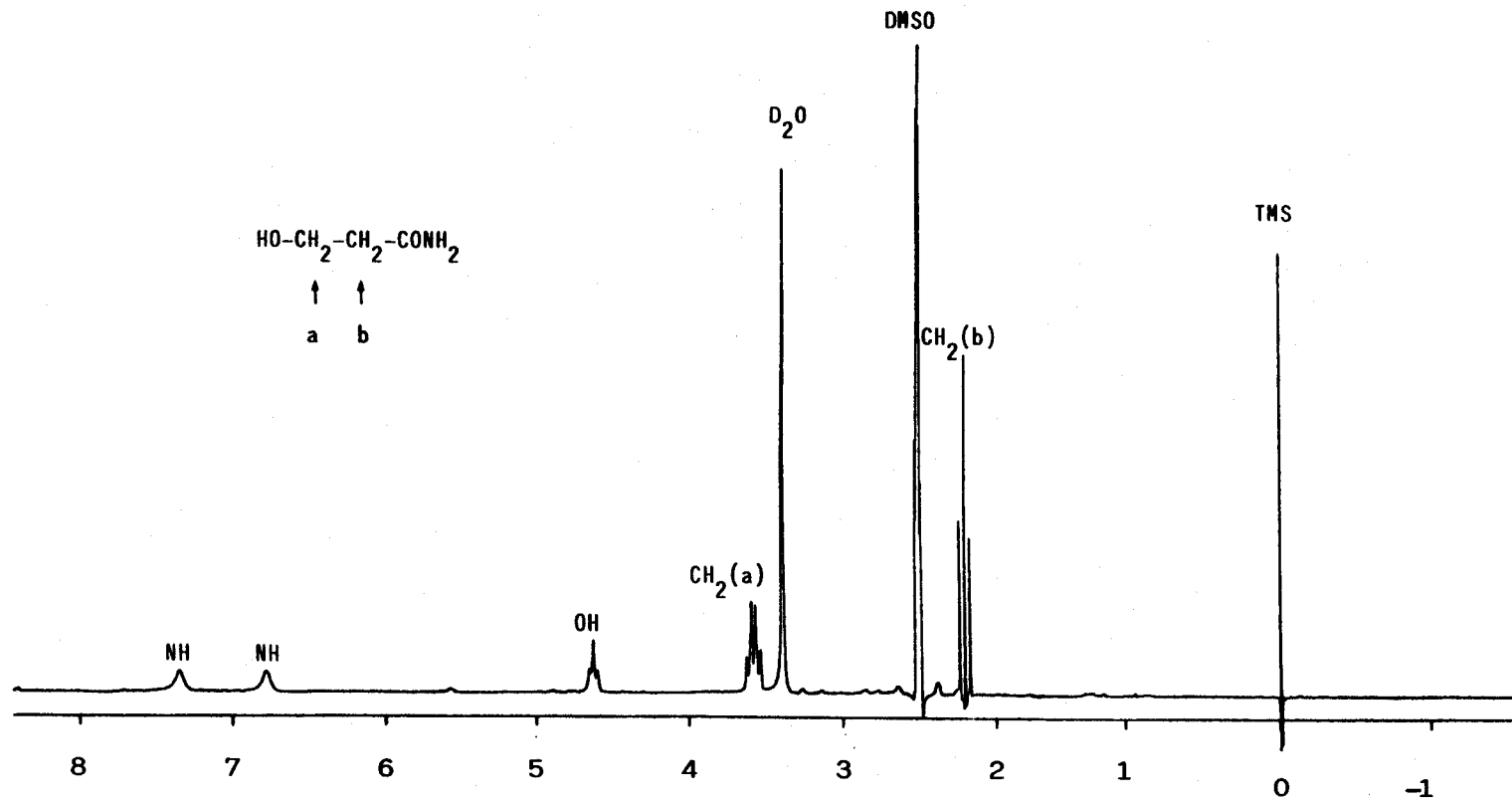


Fig. 37.- Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto en dimetilsulfóxido- $\text{d}_6$ .

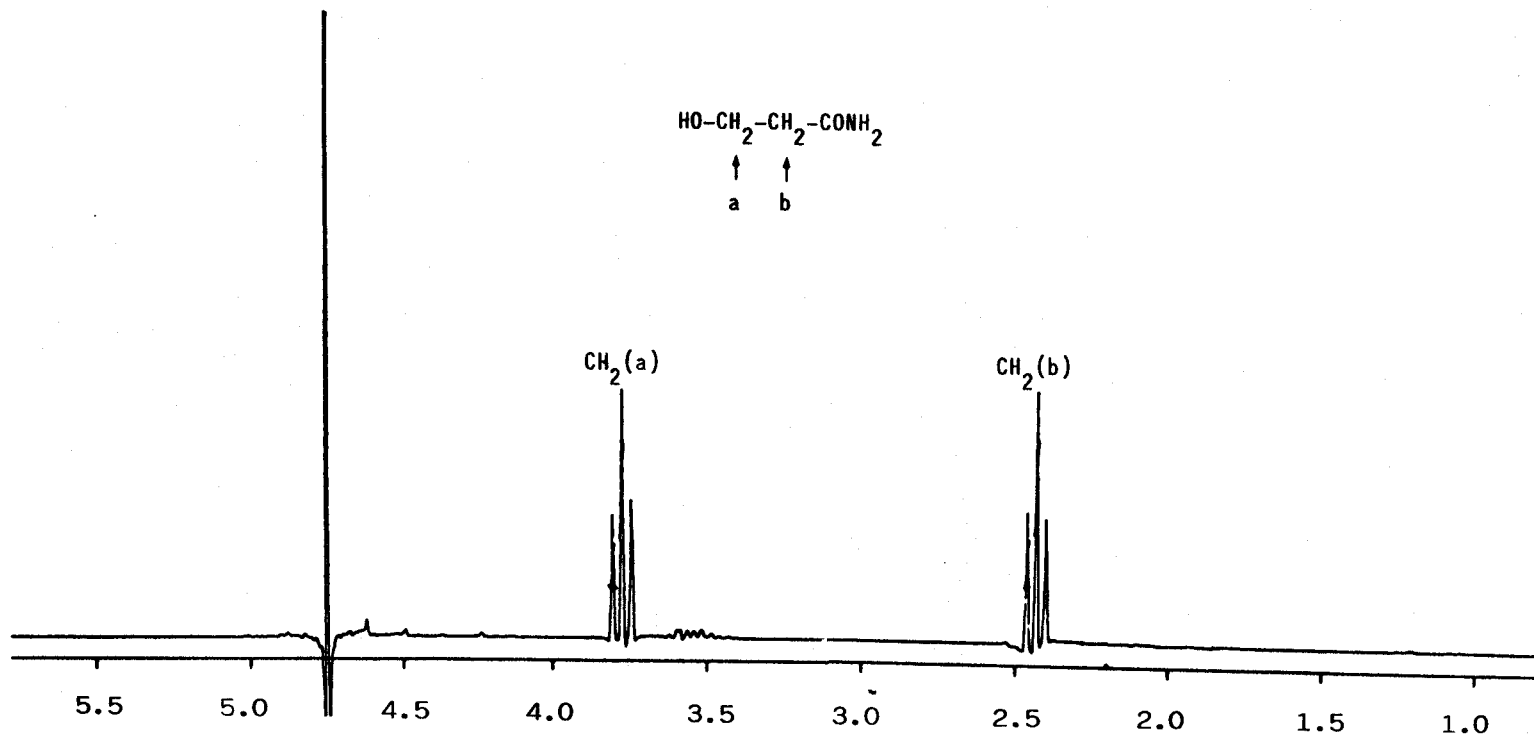
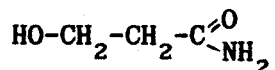


Fig. 38.- Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del compuesto en D<sub>2</sub>O.

que estas señales se deben a protones del tipo OH y NH, que son intercambiables con el agua deuterada.

En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (Fig. 39) aparecen tres señales a  $\delta$  (ppm) 178.2, 58.6 y 38.6. Según estos valores de desplazamiento químico el carbono que origina la señal a  $\delta$  178.2 ppm puede ser asignable a un carbono del tipo éster o amida, el carbono a  $\delta$  58.6 ppm porta un hidroxilo y el carbono a  $\delta$  38.6 ppm es del tipo alifático.

Una estructura compatible con los datos obtenidos de los espectros de  $^1\text{H}$ - y  $^{13}\text{C}$ -RMN es la siguiente:



3-hidroxiopropano amida

En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, realizado con DMSO, aparecía el protón del hidroxilo como un triplete acoplado con los dos protones del grupo metileno que lo porta (señal a  $\delta$  4.64 ppm). Las señales a  $\delta$  6.79 ppm y  $\delta$  7.35 ppm, que aparecen como singuletes anchos, se asignan a los dos protones del grupo  $\text{NH}_2$  de amida. Estos dos protones no son equivalentes debido a la existencia, en solución, de las siguientes formas resonantes en equilibrio:

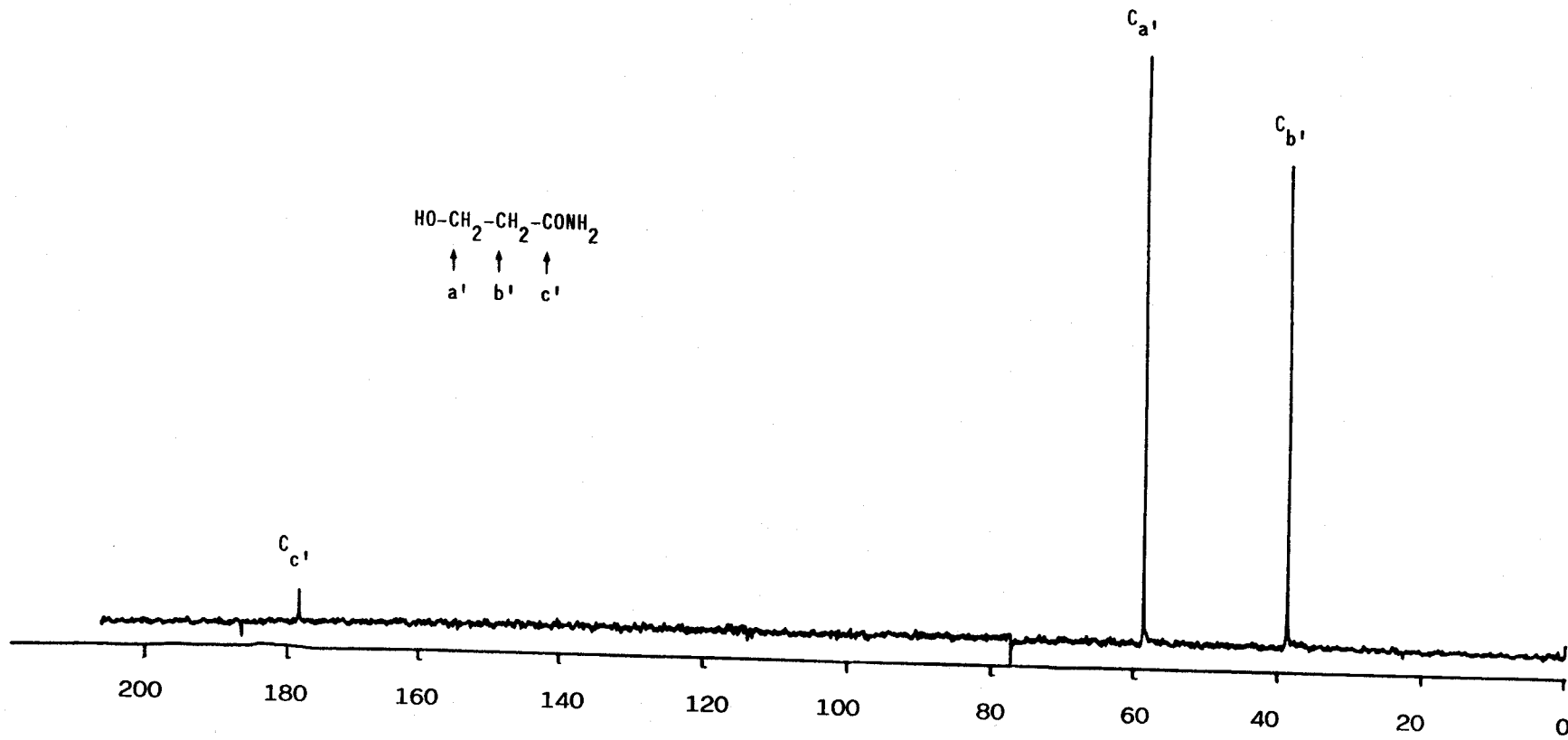
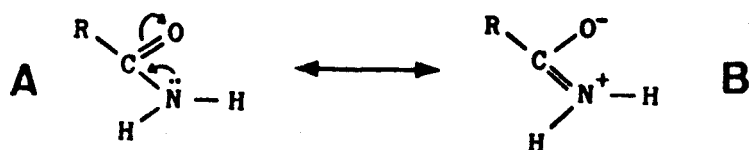
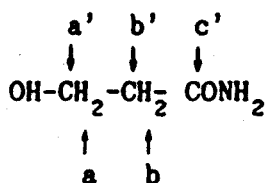


Fig. 39.- Espectro de <sup>13</sup>C-RMN del compuesto en D<sub>2</sub>O.



Como consecuencia del carácter parcial de doble enlace que tiene el enlace C-N en la forma resonante B, el giro en torno a dicho enlace C-N se encuentra restringido.

Un cálculo teórico de los valores de desplazamiento químico de los protones y carbonos de la 3-hidroxiopropano amida (HPA) confirma la estructura propuesta ya que dichos valores de  $\delta$  teórico coinciden con los encontrados en los espectros ( $\delta$  experimental).



Espectro	$\delta$ teórico	$\delta$ experimental
$^1\text{H-RMN (D}_2\text{O)}$	$\delta_a = 3.76$	$\delta_a = 3.77$
$^1\text{H-RMN (D}_2\text{O)}$	$\delta_b = 2.40$	$\delta_b = 2.43$
$^{13}\text{C-RMN (DMSO)}$	$\delta_{a'} = 58.4$	$\delta_{a'} = 58.6$
$^{13}\text{C-RMN (DMSO)}$	$\delta_{b'} = 38.9$	$\delta_{b'} = 38.6$
$^{13}\text{C-RMN (DMSO)}$	$\delta_{c'} = 177.2$	$\delta_{c'} = 178.2$

### 6.3.2.3.- Espectros de masas

El análisis directo del sólido originó el espectro que puede verse en la Fig. 40:  $m/e$  89 ( $M^+$ , 15); 71 (34); 59 (73); 45 (27); 44 (100); 31 (55). Los fragmentos 44 y 45 son característicos del grupo amida.

Dado que el fragmento 31 suele ser indicativo de grupo OH, se procede a sililar una muestra del compuesto con bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BTMFA) (Fig. 41). El análisis del compuesto sililado se realiza por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas, confirmando la presencia de un grupo hidroxilo, ya que el ion molecular pasó a ser 161 al ser sustituido el grupo -OH por -O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>:  $m/e$  161 ( $M^+$ , 2); 146 (83); 129 (8); 104 (29); 74 (100); 59 (6); 45 (15).

Para confirmar el peso molecular del compuesto, se realiza una fragmentación en atmósfera de isobutano, que potencia la aparición del fragmento  $M^{+1}$ . El espectro obtenido (Fig. 42) ratifica 89 como peso molecular:  $m/e$  179 ( $2M+1$ , 10); 90 ( $M^{+1}$ , 100); 57 (10); 43 (9); 39 (7). La aparición del fragmento 179 demuestra la existencia de un grupo OH primario (Field 1970).

De acuerdo con los datos aquí expuestos, la fórmula empírica asignable al compuesto es C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>, compatible con la estructura de la 3-hidroxiopropano amida deducida de los espectros de RMN.





MACU1210109 xl Bgd=45 6-JUL-89 00:40:32:24 MS30 EI\*  
DpM=0 I=47mv Ra=0 TIC=1829000 Acnt:1. GRASA Sys:GLCCI  
PT= 0° Cal:CI

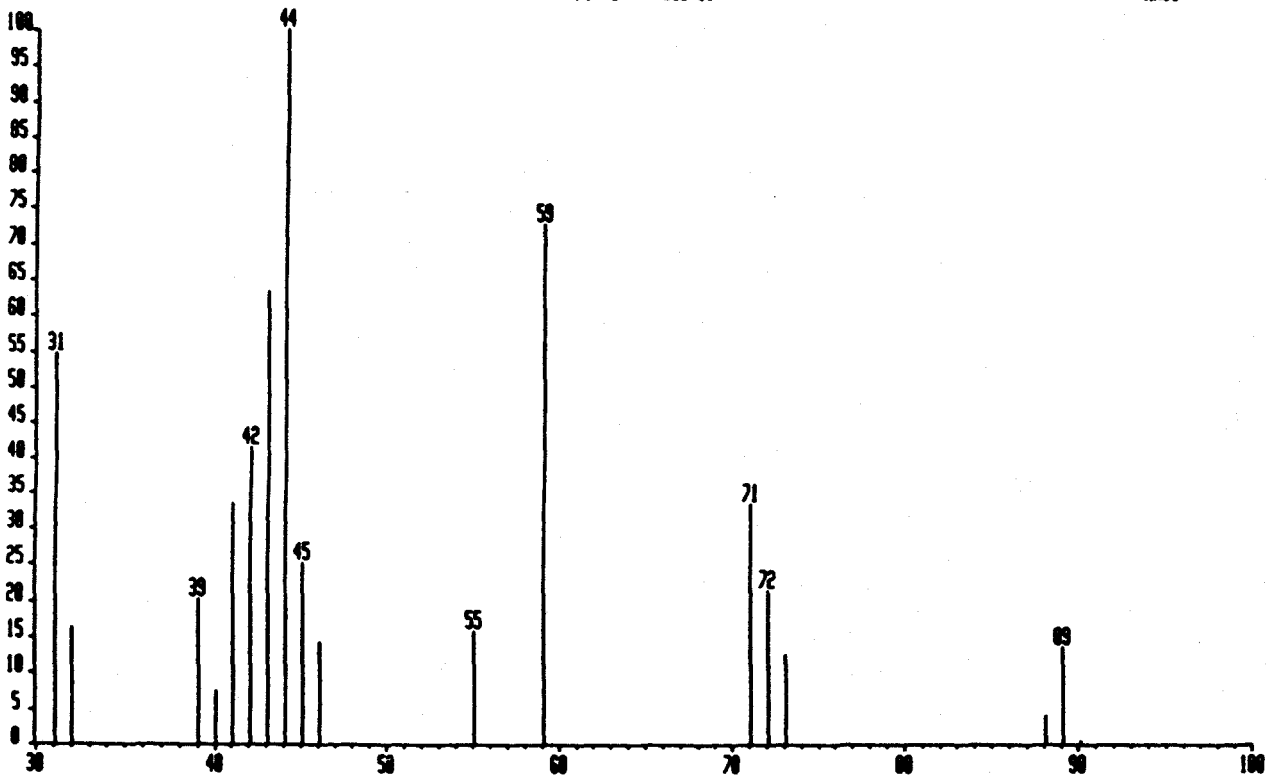


Fig. 40.- Espectro de masas del compuesto por aplicación directa del sólido.

NAU12S1435 x1 8yd=25 7-JUL-89 11:14:05:22 NS30 EI+  
DpA=0 I=7.0v Na=0 TIC=289680000 Rcnt:16-CSIC Sys:SYSTEMDEF  
NUESTRA NAU12 SILANIZADA CON BSTFA PT= 0° Cal:PFK

NIR: 4561  
NRS:

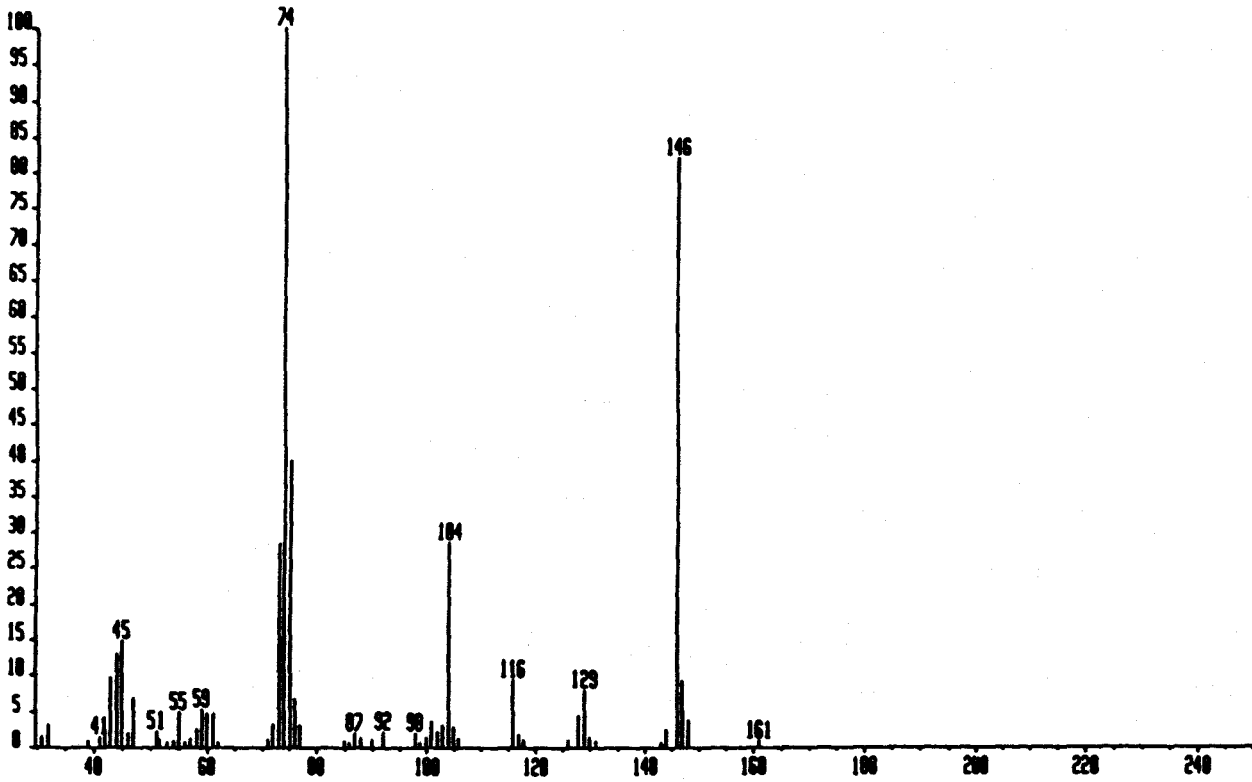


Fig. 41.- Espectro de masas del compuesto sililado con BTMFA, obtenido a través de cromatografía de gases.

MACU12/058 xl Bgd=46 6-JUL-89 00:40:27:41 MS30 C1-  
BpH=0 I=3.2v Mw=0 TIC=34946800 Acnt=1. GRASH Sys:GLCCI  
PT= 0° Cal:CI

NBR: 2112  
NRSS:

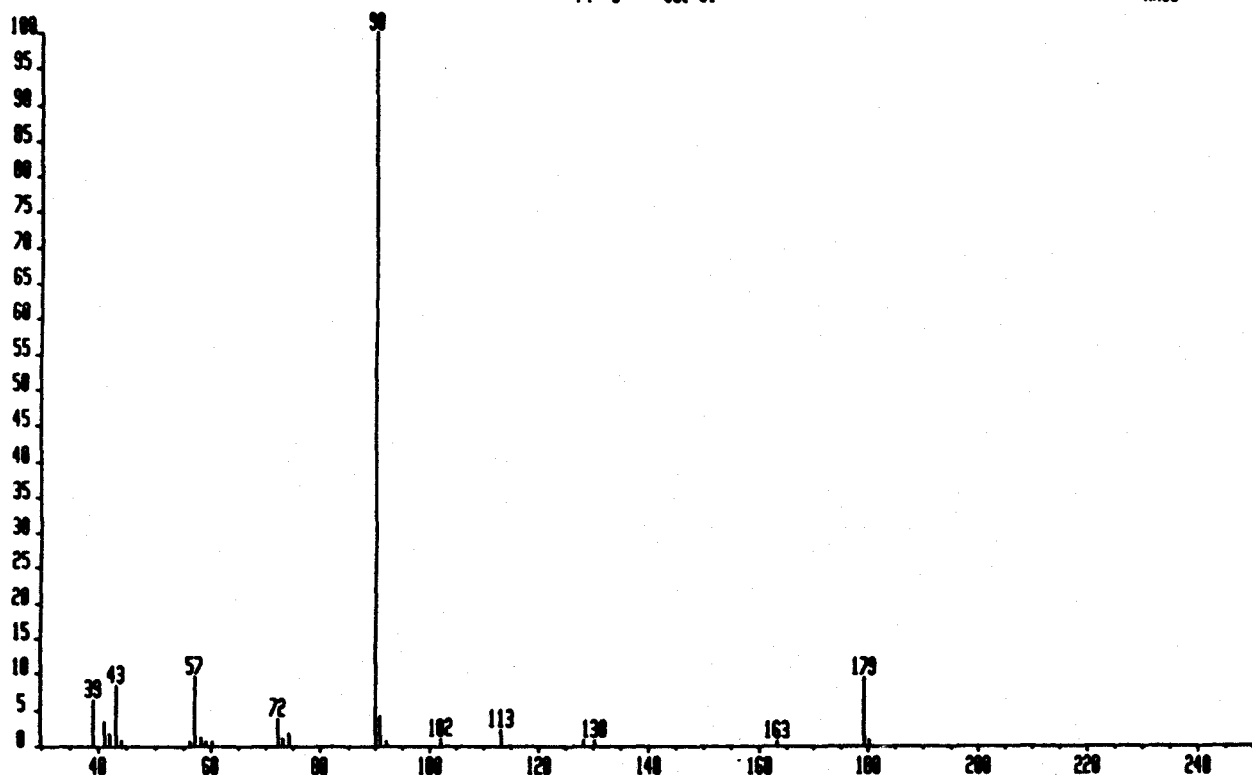


Fig. 42.- Espectro de masas del sólido en atmósfera de isobutano.

Esta estructura explicaría los espectros de masas obtenidos, tanto por análisis directo como el del producto sililado. Las tablas 38 y 39 recogen la asignación de estructuras a los distintos fragmentos obtenidos.

Los resultados que aquí se presentan, indican que en el sistema formador de etileno mediado por el sistema enzimático AIA-oxidasa/peroxidasa, el ACC se transforma mayoritariamente en un compuesto identificado como 3-hidroxi-propano amida (HPA).

Todos los sistemas libres de células descritos hasta ahora tienen una baja producción de etileno, siendo el  $Mn^{2+}$  cofactor necesario en muchos de ellos (Konze y Kende 1981, Shimokawa 1983, Adam y Mayak 1984, Bousquet y Thimann 1984, Nilsen et al. 1988, Osswald et al. 1989). Por otra parte, las peroxidasas están ampliamente distribuidas en los tejidos vegetales (Gaspar et al. 1982). Así, los experimentos que incluyan preparaciones libres de células en un intento de aislar el enzima responsable de la conversión ACC  $\rightarrow$  etileno, deben tener en cuenta la posible formación de HPA a partir del ACC añadido. Wang y Yang (1987) en sus estudios sobre el sistema formador de etileno mediado por lipoxigenasa descrito por Bousquet y Thimann (1984) encuentran la formación de un compuesto desconocido a partir del ACC. Dadas las similitudes entre ambos sistemas (la lipoxigenasa es también

Tabla 38.- Estructura de los fragmentos obtenidos por espectrometría de masas directa del sólido.

m/e	Fuente del fragmento	Estructura
89	$M^+$	$HO-CH_2-CH_2-CONH_2$
71	$M^+-H_2O$	$CH_2=CH_2-CONH_2$
59	$M^+-CHOH$	$CH_3-CONH_2$
45	$M^+-CONH_2$	$HO-CH_2=CH_2$
44	$M^+-(CH_2)_2OH$	$O^+=C-NH_2 \leftrightarrow O=C=N^+H_2$
31	$M^+-CH_2CONH_2$	$HO^+=CH_2$

Tabla 39.- Estructura de los fragmentos obtenidos por espectrometría de masas del producto sililado.

m/e	Fuente del fragmento	Estructura
161	$M^+$	$Si(CH_3)_3-O-CH_2-CH_2-CONH_2$
146	$M^+-CH_3$	$Si(CH_3)_2^+-O-CH_2-CH_2-CONH_2$
129	$M^+-CH_3, -NH_3$	$Si(CH_3)_2^+-O-CH_2-CH=C=O$
104	$M^+-CH_2-CONH_2$	$Si(CH_3)_3-O-CH_3$
74	BTMFA	$Si(CH_3)_3H$
59	$M^+-Si(CH_3)_3-OCH$	$CH_3-CONH_2$
45	$M^+-Si(CH_3)_3-O-CH_2-CH_2$	$HOC-NH_2$

un enzima oxidante y el medio contiene manganeso) este compuesto desconocido bien podría ser HPA.

El hecho de que no se libere etileno cuando se sustituye el ACC por HPA en la incubación completa y en incubaciones con discos de hojas de olivo (Tabla 40) confirma la hipótesis ya sugerida de que la HPA no es un intermediario en la ruta de formación de etileno.

Tabla 40.- Etileno liberado a partir de ACC y de HPA 1 mM en incubaciones completas in vitro y con discos de hojas de olivo.

Incubación	Etileno <sup>a</sup> (nmol/24h)
Discos + ACC	9.42±0.41
Discos + HPA	0.06±0.03
Completa con ACC	12.35±0.22
Completa con HPA	0.04±0.02

<sup>a</sup> Los datos son  $\bar{x} \pm \sigma$  de 6 replicados.

6.4.- MECANISMO DE FORMACION DE 3-HIDROXIPROPANO AMIDA A  
PARTIR DE ACC

La HPA podría derivar del ACC mediante una doble oxidación con pérdida de dos electrones. La fig. 43 recoge el esquema del posible mecanismo de formación de HPA a partir del ACC mediante dos ciclos peroxidativos del enzima.

El primer paso es la oxidación del ACC a ACC radical ( $ACC^{\bullet}$ ) con pérdida de un electrón y apertura del anillo de ciclopropano. Este  $ACC^{\bullet}$  es análogo al radical descrito por Pirrung (1983) para la formación de etileno. Este paso estaría catalizado por la peroxidasa actuando a través de su ruta peroxidativa, siendo necesaria la activación previa por peróxidos del enzima nativo (HRP) a Compuesto-I (Co-I) de peroxidasa (Acosta et al. 1988). La activación del enzima ocurre de forma espontánea por pequeñas cantidades de peróxidos presentes en las disoluciones de ACC (Arnao et al. 1990), no precisándose la adición de peróxidos exógenos.

La estabilización del radical  $ACC^{\bullet}$  se produciría por medio de una reacción de propagación de radicales libres, que originaría el radical peróxido ( $ACC-OO^{\bullet}$ ), que resulta estabilizado a hidroperóxido ( $ACC-OOH$ ) por la presencia de manganeso.

Este hidroperóxido del ACC sería sustrato oxidativo del enzima nativo (HRP) activándolo hasta Co-I, dando lugar

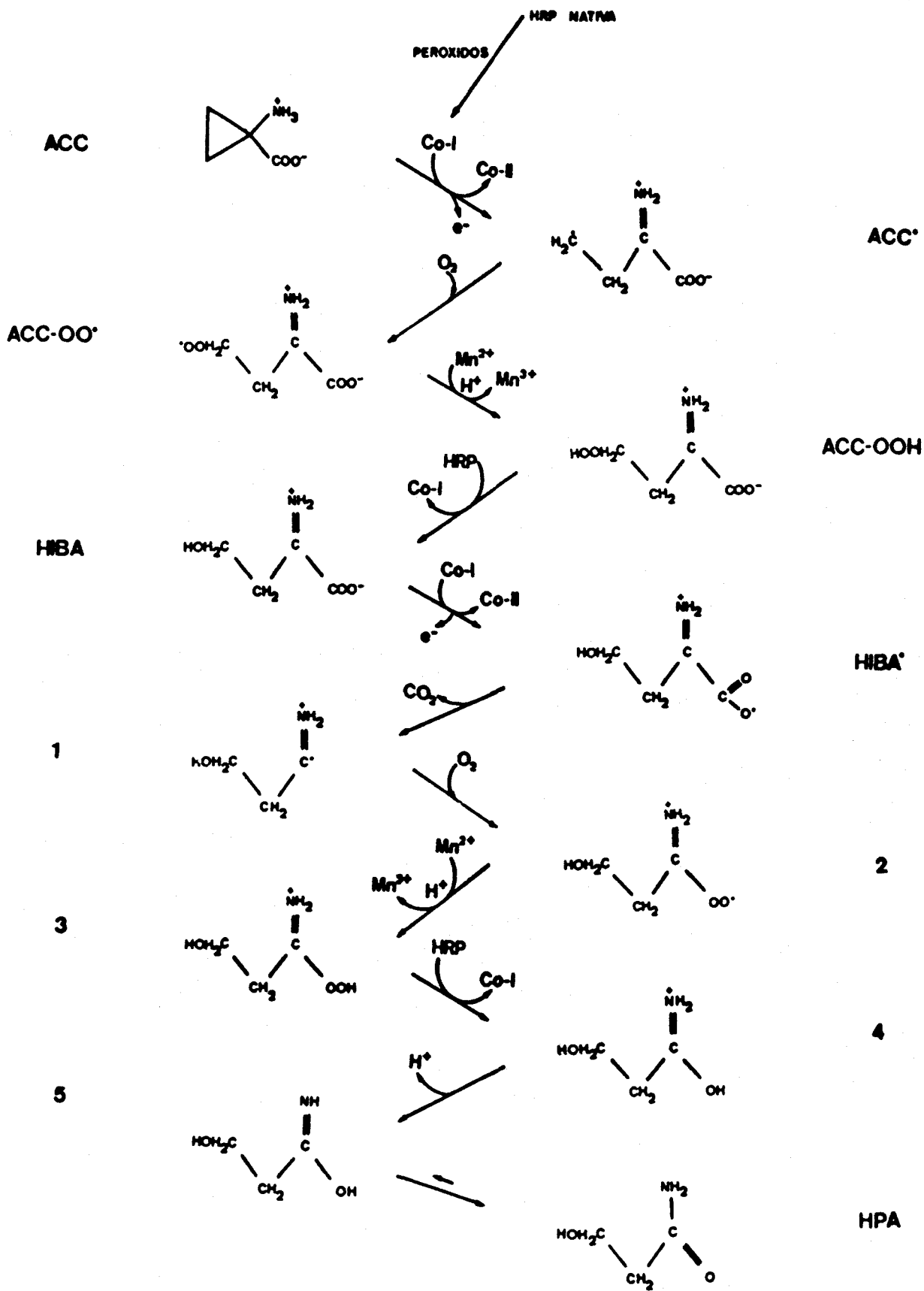


Fig. 43.- Posible mecanismo de formación de HPA.



al correspondiente alcohol, ácido 4-hidroxi-2-imino-n-butírico (HIBA) y cerrando así el ciclo catalítico del enzima.

A su vez el HIBA sería sustrato de la forma activada del enzima (Co-I) perdiendo un electrón y originando un radical (HIBA°) que sufriría descarboxilación al compuesto [1] antes de ser oxidado al correspondiente peróxido [2] y ser estabilizado al hidroperóxido [3]. Finalmente este hidroperóxido activaría de nuevo al enzima nativo a Co-I transformándose en 3-hidroxipropano amida (HPA) a través de su forma enólica protonada [5].

Según este mecanismo, la pequeña concentración de peróxidos presente en las disoluciones de ACC, abriría la ruta peroxidativa del enzima. Una vez iniciada la reacción, la presencia de hidroperóxidos, (ACC-OOH y [3]) aseguraría el turnover catalítico del enzima y por tanto la producción de HPA. Asimismo en el mecanismo propuesto, el HIBA aparece como un producto intermedio en la reacción. Si bien no se ha encontrado HIBA en el medio de reacción, el producto final identificado (HPA), sólo difiere de aquél en haber sufrido una descarboxilación oxidativa, la cual es muy probable que ocurra en presencia de los iones  $Mn^{2+}/Mn^{3+}$  presentes en el medio de reacción (Smith y Marshall 1988).

Los resultados de la tabla 41 confirman la participación de radicales libres en la reacción, ya que el ascorbato inhibe completamente la formación de HPA.

Tabla 41.- Efecto del  $H_2O_2$  y de secuestradores de radicales libres sobre la formación de HPA a partir de ACC in vitro.

Incubación	HPA <sup>a</sup>		Inhibición (%)	
	1 h	3 h	1 h	3 h
ACC + HRP + Mn <sup>2+</sup>	56.4±1.4	95.5±2.0	-	-
+ ascórbico (100 μM)	0	2.8±0.2	100	97
+ SOD (100 U)	18.6±1.1	83.8±1.7	67	12
+ Catalasa (100 U)	28.8±3.3	86.1±6.5	49	10
ACC + HRP + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.5 mM)	22.5±2.1	27.1±2.6	60	72

<sup>a</sup> Los datos expresan % del ACC inicial (1 μmol) y son  $\bar{x} \pm \sigma$  de seis replicados.

Tanto la superóxido dismutasa (SOD) como la catalasa inhiben la formación de HPA a tiempos cortos (Tabla 41). La inhibición causada por la SOD durante la primera hora de incubación puede explicarse por la formación de  $H_2O_2$  a partir del anión superóxido, que podría inactivar al enzima (Acosta et al. 1988) o bien por su acción sobre los peróxidos del ACC generados en la reacción (Gardner y Newton 1987). La inhibición inicial por catalasa, puede igualmente explicarse por una ligera actuación de la misma sobre los hidroperóxidos del ACC, ya que puede reaccionar con peróxidos de bajo peso molecular (White et al. 1973).

El hecho de que el  $H_2O_2$  no pueda sustituir al ion manganeso en la formación de HPA (Tabla 41), confirma el papel del  $Mn^{2+}$  como estabilizador de radicales peróxido (Pirrung 1986) y no como generador de  $H_2O_2$  (Yamazaki y Piette 1963).

**7.- SIGNIFICADO FISIOLÓGICO DEL SISTEMA AIA-OXIDASA/  
PEROXIDASA EN LA BIOSÍNTESIS DE ETILENO**

El sistema AIA-oxidasa/peroxidasa, en presencia de su sustrato, AIA, y de los cofactores DCP,  $Mn^{2+}$  y PLP, es capaz de catalizar la conversión de ACC en etileno in vitro, habiéndose sugerido que podría actuar in vivo (Vioque et al. 1981). Desde entonces, la implicación de las peroxidasas en este paso ha sido objeto de atención preferente, aunque no ha recibido un apoyo definitivo (ver Apartado 6 de Antecedentes). Los resultados aquí presentados (Apartado 2) que relacionan las actividades peroxidasa y EFE in vivo en hojas de olivo apoyan esta hipótesis.

Como ya se ha comentado anteriormente este sistema in vitro presenta semejanzas con el EFE fisiológico como son: necesidad de oxígeno, termolabilidad e inhibición por iones cobalto, dinitrofenol y atrapadores de radicales libres (Vioque et al. 1981, Vioque y Vioque 1985). Sin embargo tiene algunas características que no recuerdan al sistema natural in vivo: baja afinidad hacia el ACC con una  $K_m$  de 35.8 mM frente a 8.4  $\mu M$  para el enzima in vivo, no posee estereoespecificidad (Venis 1984), tiene un bajo rendimiento (1-2%) y no resulta inhibido por el ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico.

La baja afinidad exhibida hacia el ACC puede explicarse por varias razones. La  $K_m$  de las reacciones secuenciales se ve incrementada si no existe una conexión entre ambas. En los tejidos, las dos partes de la reacción podrían estar acopladas, seguramente en una estructura membranosa, mientras

que ésto no puede suceder in vitro. Por otra parte, en los enzimas bisustrato un incremento en la concentración de un sustrato supone el aumento del valor de la  $K_m$  aparente para el segundo sustrato. Este hecho incrementaría la  $K_m$  aparente para el ACC si la concentración de oxígeno es alta. En este sistema la concentración de oxígeno es la atmosférica (21%), siendo la concentración óptima para el EFE del 1% (Konze et al. 1980). Finalmente, las peroxidasas no son enzimas Michaelianos (Bardsley et al. 1980), siendo poco correcto hablar de  $K_m$  para el ACC en este caso.

Recientemente se ha propuesto que el precursor del etileno es una forma "activada" del ACC (Tan y Thimann 1989). De ser esto cierto, los valores de  $K_m$  obtenidos in vivo carecerían del valor que se les atribuye y la dificultad para aislar al EFE no dependería tanto de la naturaleza del enzima como de la forma especial de su sustrato.

El criterio de estereoespecificidad del EFE (Hoffman et al. 1982a) ha sido utilizado para juzgar la validez de algunos sistemas in vitro descritos (McKeon y Yang 1984, Venis 1984, Manning 1985, Wang y Yang 1987). Sólo el sistema de las vacuolas de Guy y Kende (1984b) es capaz de discriminar entre los cuatro estereoisómeros del AEC, aunque el aislamiento de las vacuolas supone la pérdida de más del 95% de la actividad EFE del tejido (Porter et al. 1986). Existen, sin embargo, ciertas reservas sobre la autenticidad del criterio establecido de estereoespecificidad por varias

razones: 1) Parece poco probable que un enzima que se supone altamente específico (Lieberman 1979) actúe sobre el ACC formando etileno y sobre uno de los estereoisómeros del AEC formando 1-buteno; 2) Los resultados de Amrhein et al. (1984) con el ácido 1-amino-2-metilciclopropano-1-carboxílico ponen en duda la estereoespecificidad del EFE o al menos ésta no parece ser tan estricta como se había supuesto previamente; 3) Otra cuestión es si puede esperarse que el carácter estereoespecífico del enzima se mantenga después del aislamiento del mismo (Nilsen et al. 1988) y 4) Se han descrito variaciones en la capacidad de estereodiscriminación del EFE con la edad del tejido, restando validez a dicho criterio (Adam y Mayak 1986).

El efecto inhibitor del AIB in vivo podría situarse a nivel del transportador de aminoácidos neutros, que es utilizado tanto por el ACC como por el AIB (Saftner y Baker 1987). Este efecto no sería observable in vitro.

El bajo rendimiento en la producción de etileno de este sistema se explica por la transformación mayoritaria del ACC en 3-hidroxiopropano amida (HPA). La competencia entre AIA y ACC por las formas activas del enzima y la alta afinidad del radical ACC<sup>•</sup> por el oxígeno para formar el peróxido (ACC-OO<sup>•</sup>) y el hidroperóxido (ACC-OOH) son las causas de la baja tasa de producción de etileno. El hecho de que en el sistema in vitro la formación de etileno (minoritario) vaya asociada a la formación de hidroperóxidos del ACC (mayori-

tario) introduce nuevos elementos a tener en cuenta cuando se estudia el mecanismo de biosíntesis del etileno en los tejidos vegetales. Aunque los resultados obtenidos no confirman la participación de este sistema en el paso ACC ---> etileno, sí demuestran que el ACC es sustrato de las peroxidases, siendo el  $Mn^{2+}$  estrictamente necesario como cofactor de la reacción.

Como las vacuolas aisladas son capaces de producir etileno a partir de ACC conservando las características del EFE nativo (Guy y Kende 1984b) y es bien conocido que contienen fenoles, AIA (Driess-Ecole y Perbal 1987) y peroxidases (Grob y Matile 1980, Schloss et al. 1987), puede asumirse que la formación de etileno a partir de ACC podría tener lugar en las vacuolas catalizada por este mismo sistema enzimático.

Hasta ahora no se han encontrado, en plantas superiores, metabolitos naturales del ACC distintos de MACC y etileno. Sin embargo, la amplia distribución de las peroxidases en el reino vegetal y la ubicuidad del ion manganeso, hacen probable que la formación de HPA pueda tener lugar in vivo. La posibilidad de que HIBA o HPA se encuentren como productos endógenos en las plantas mantiene abierta una puerta para que la reacción entre peroxidases y ACC tenga un significado fisiológico, quizás próximo a la definitiva caracterización del enzima formador de etileno (EFE).



## CONCLUSIONES

1.- Se han establecido las condiciones óptimas de incubación para la determinación de la actividad del enzima formador de etileno (EFE) en discos de hojas de olivo. Asimismo se han estudiado algunas características de dicha actividad.

Merecen destacarse:

- a) El EFE exhibe una alta afinidad hacia el ACC, con una  $K_m$  aparente de  $8.4 \mu\text{M}$  y una velocidad máxima de producción de etileno de  $35.3 \text{ nmol/h.g PF}$ , siendo saturable por ACC a concentraciones superiores a  $40 \mu\text{M}$ .
- b) Se inhibe por galato de n-propilo, aminoetoxivinilglicina y ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico, pero no por atrapadores de radicales hidroxilo, ciclopropilamina o ácido ciclopropanocarboxílico.
- c) La actividad EFE se inhibe por compuestos de bajo peso molecular presentes en el extracto crudo. No obstante, ésta no es la única causa de la pérdida de actividad en tejidos homogeneizados, ya que la separación de dichos compuestos no restablece la actividad enzimática, por lo que no puede descartarse una asociación del EFE a estructuras membranosas.

2.- El jasmonato de metilo, un potente regulador del desarrollo vegetal, estimula la producción de etileno in vivo, ejerciendo su efecto tanto a nivel de la ACC-sintasa como del EFE.

3.- Se ha comprobado la existencia de un metabolismo del etileno en los tejidos del olivo. Este metabolismo es termolábil, requiere oxígeno y resulta inhibido por sulfuro de carbono. Los tapones de goma, generalmente utilizados en las incubaciones, liberan sulfuro de carbono, inhibiendo dicho metabolismo.

4.- Las actividades peroxidasa y formadora de etileno siguen una evolución estacional paralela y se correlacionan en tejidos de distinta edad, comprobándose que las hojas jóvenes presentan menores valores de actividad que las de mayor edad. Se demuestra asimismo que la salida de peroxidasas intercelulares durante el isoelectroenfoque directo de tejidos disminuye la capacidad de convertir ACC en etileno en dichos tejidos, encontrándose una relación lineal. Estos resultados apoyan la participación de las peroxidasas en la conversión ACC ---> etileno in vivo.

5.- Se han estudiado algunas características de la formación de etileno a partir de ACC in vitro por el sistema AIA-oxidasa/peroxidasa de hojas de olivo, destacan:

- a) Es saturable por ACC a concentraciones no fisiológicas (80 mM), siendo la  $K_m$  aparente para el ACC de 35.8 mM.
- b) Existe en dicho sistema una relación entre AIA destruido y etileno liberado, de forma que algún producto de la

oxidación enzimática del AIA parece ser necesario para la liberación de etileno.

c) El pH de máxima producción de etileno coincide con el óptimo de la actividad peroxidasa.

d) La formación de etileno es inhibida por ATP, ácido amino-oxiacético y galato de n-propilo, pero no por ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico, ciclopropilamina o ácido ciclopropanocarboxílico.

6.- Se propone un mecanismo en dos pasos enzimáticos para la formación de etileno in vitro que transcurriría a través de la formación de peróxidos e hidroperóxidos del ácido indol-3-acético (AIA) y de un radical catiónico del ACC, descartándose la intervención de radicales hidroxilo y del peróxido de hidrógeno.

7.- En el sistema in vitro estudiado, el ACC es sustrato de las peroxidases en una reacción mediada por radicales libres, que requiere oxígeno y manganeso y cuyo producto final identificado es 3-hidroxiopropano amida (HPA). Se propone un mecanismo para la formación de HPA a través de peróxidos e hidroperóxidos del ACC. La baja producción de etileno en el sistema in vitro se explica por la competencia entre AIA y ACC por las formas activas del enzima y por la alta afinidad del radical del ACC por el oxígeno para formar peróxidos e hidroperóxidos del ACC.

8.- Se discute el posible significado fisiológico del sistema AIA-oxidasa/peroxidasa en la conversión ACC ---> etileno in vivo. Aunque los resultados no demuestran la participación de este sistema en dicho paso in vivo, el hecho de que la producción de etileno vaya asociada a la formación de HPA introduce nuevos elementos a tener en cuenta en el estudio del EFE. La posibilidad de que la HPA se encuentre como producto endógeno en las plantas mantiene abierta una puerta para que la reacción entre peroxidasas y ACC tenga un significado fisiológico, quizás próximo a la definitiva caracterización del enzima formador de etileno.

## **BIBLIOGRAFIA**

Abdel-Rahman A.M., Cline M.G. 1989. Timing of growth inhibition following shoot inversion in *Pharbitis nil*. *Plant Physiol.* 91, 464-465.

Abeles F.B. 1973. *Ethylene in plant biology*. Academic Press, Nueva York, 327 pp.

Abeles F.B. 1984a. Role of ethylene oxidation in the mechanism of ethylene action. In: "Ethylene. Biological, physiological and applied aspects". Fuchs Y., Chalutz E. (ed). Nijhoff M., Junk W. Publishers, La Haya, pp. 75-85.

Abeles F.B. 1984b. A comparative study of ethylene oxidation in *Vicia faba* and *Mycobacterium paraffinicum*. *J. Plant Growth Regul.* 3, 85-95.

Abeles F.B., Dunn L.J. 1985. Ethylene-enhanced ethylene oxidation in *Vicia faba*. *J. Plant Growth Regul.* 4, 123-128.

Acaster M.A., Kende H. 1982. Properties and partial purification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Plant Physiol.* 72, 139-145.

Acosta M., Arnao M.B., Del Río J.A., García-Cánovas F. 1989. Kinetic characterization of the inactivation process of two peroxidase isoenzymes in the oxidation of indolyl-acetic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 996, 7-12.

Acosta M., Del Río J.A., Arnao M.B., Sánchez-Bravo J., Sabater F., García-Carmona F., García-Cánovas F. 1988. Oxygen consumption and enzyme inactivation in the indolyl-3-acetic acid oxidation catalyzed by peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 955, 194-202.

Adam Z., Mayak S. 1984. Solubilization and partial purification on an enzyme converting 1-aminocyclopropane-1-carboxylic

acid to ethylene in plants. FEBS Lett. 172, 47-50.

Adam Z., Mayak S. 1986. Age-dependent discrimination between stereoisomers of 1-amino-2-ethylcyclopropane-1-carboxylic acid in carnation petals. Plant Physiol. 80, 1045-1047.

Adams D.O., Yang S.F. 1977. Methionine metabolism in apple tissue. Implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. Plant Physiol. 60, 892-896.

Adams D.O., Yang S.F. 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, 170-174.

Adlington R.M., Baldwin J.E., Rawlings B.J. 1983. On the stereochemistry of ethylene biosynthesis. J. Chem. Soc., Chem. Commun. (1983), 290-292.

Aharoni N., Lieberman M., Sisler H.D. 1979. Patterns of ethylene production in senescing leaves. Plant Physiol. 64, 793-800.

Aharoni N., Yang S.F. 1983. Auxin-induced ethylene production as related to auxin metabolism in leaf discs of tobacco and sugar beet. Plant Physiol. 73, 598-604.

Amrhein N.D., Breuing F., Eberle J., Skorupka H., Tophof S. 1982. The metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. In: "Plant growth substances 1982". Wareing P.F. (ed). Academic Press, Londres, pp. 249-258.

Amrhein N.D., Dorzok U., Kionka C., Kondziolka U., Skorupka H., Tophof S. 1984. The biochemistry and physiology of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid conjugation. In: "Ethylene.



Biochemical, physiological and applied aspects". Fuchs Y., Chalutz E. (ed). Nijhoff M., Junk W. Publishers, La Haya, pp. 11-20.

Amrhein N.D., Schneebeck D., Skorupka H., Tophof S., Stöckigt J. 1981. Identification of a major metabolite of the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in higher plants. *Naturwissenschaften* 67, 619-620.

Amrhein N.D., Wenkler D. 1979. Novel inhibitors of ethylene production in higher plants. *Plant Cell. Physiol.* 20, 1635-1642.

Anderson J.M. 1988. Jasmonic acid-dependent increases in the level of specific polypeptides in soybean suspension cultures and seedlings. *J. Plant Growth Regul.* 7, 203-211.

Apelbaum A., Burgoon A.C., Anderson J.D., Solomos T., Lieberman M. 1981a. Some characteristics of the system converting 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. *Plant Physiol.* 67, 80-84.

Apelbaum A., Wang S.Y., Burgoon A.C., Baker J.E., 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 Physiol.* 67, 74-79.

Apelbaum A., Yang S.F. 1981. Biosynthesis of stress ethylene induced by water deficit. *Plant Physiol.* 68, 594-596.

Arnao M.B., Casas J.L., Del Río J.A., Sabater F., Acosta M. 1990. Producción de etileno durante la oxidación de ACC catalizada por peroxidasa. Resúmenes del II Simposio Nacional sobre Maduración y Post-Recolección de frutos y hortalizas,

Lérida, p. 21.

Arteca R.N., Bachman J.M., Mandava N.B. 1988. Effects of indole-3-acetic acid and brassinosteroid on ethylene biosynthesis in etiolated mung bean hypocotyl segments. *J. Plant Physiol.* 133, 430-435.

Baker J.E., Wang C.Y., Lieberman M., Hardenburg R. 1977. Delay of senescence in carnations by rhizobitoxine analogs and sodium benzoate. *HortSci.* 12, 38-39.

Balagué C., Pech J.C. 1985. Relationship between the activity of the ethylene-forming enzyme and the level of intracellular 2,4,-dichlorophenoxyacetic acid in pear cells cultures in vitro. *J. Plant Growth Regul.* 4, 81-89.

Balagué C., Sossountzov L., Petitprez M. 1983. Ultrastructural changes during senescence of pear fruit cells during auxin starvation. *Cytobios* 36, 53-63.

Baldwin J.E., Jackson D.A., Adlington R.M., Rawlings B.J. 1985. The stereochemistry of oxidation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1985), 206-207.

Barceló J., Nicolás G., Sabater B., Sánchez R. 1987. *Fisiología Vegetal*. Ed. Pirámide, Madrid, 823 pp.

Bardsley W.G., Leff P., Kavanagh J., Wright R.D. 1980. Deviations from Michaelis-Menten kinetics. The possibility of complicated curves for simple kinetic schemes and the computer fitting of experimental data for acetylcholin-esterase, acid phosphatase, adenosine deaminase, arylsulphatase, benzylamine oxidase, chymotrypsin, fumarase, galactose dehydrogenase,  $\beta$ -galactosidase, lactate dehydrogenase, peroxidase and xanthine oxidase. *Biochem J.* 187, 739-765.

- Barret G.C. 1962. Iodine as a "non-destructive" color reagent in paper and thin-layer chromatography. *Nature* 194, 1171-1172.
- Barrolier J. 1955. A ninhydrin reagent for quantitative amino acid determination. *Naturwissenschaften* 42, 416.
- Baur A.H., Yang S.F. 1972. Methionine metabolism in apple tissue in relation to ethylene biosynthesis. *Phytochemistry* 11, 3207-3214.
- Beyer E.M. 1975.  $^{14}\text{C}$ -Ethylene incorporation and metabolism in pea seedlings. *Nature* 255, 144-147.
- Beyer E.M. 1977.  $^{14}\text{C}_2\text{H}_4$ : Its incorporation and oxidation to  $^{14}\text{CO}_2$  by cut carnations. *Plant Physiol.* 60, 203-206.
- Beyer E.M. 1979a. Effect of silver ion, carbon dioxide and oxygen on ethylene action and metabolism. *Plant Physiol.* 63, 169-173.
- Beyer E.M. 1979b. [ $^{14}\text{C}$ ]Ethylene metabolism during leaf abscission in cotton. *Plant Physiol.* 64, 971-974.
- Beyer E.M. 1981. Ethylene action and metabolism. In: "Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables". Friend J., Rhodes M.J. (ed). Academic Press, Londres, pp. 107-121.
- Beyer E.M. 1984. Why do plants metabolize ethylene?. In: "Ethylene. Biochemical, physiological and applied aspects". Fuchs Y., Chalutz E. (ed). Nijhoff M., Junk W. Publishers, La Haya, pp. 65-74.
- Beyer E.M., Blomstrom D.C. 1979. Ethylene metabolism and its

possible physiological role in plants. In: "Plant growth substances 1979". Skoog F. (ed). Springer-Verlag, Berlín, pp. 208-218.

Beyer E.M., Morgan P.W., Yang S.F. 1984. Ethylene. In: "Advanced plant physiology". Wilkins M.B. (ed). Pitman Publishing Inc., Bath, Reino Unido, pp. 111-126.

Beyer E.M., Sundin O. 1978.  $^{14}\text{C}_2\text{H}_4$  Metabolism in morning glory flowers. *Plant Physiol.* 61, 896-899.

Billot J. 1983. Evolution des composés phénoliques au cours de la maturation de la poire "Passe-crassane". *Physiol. Vég.* 21, 527-535.

Biro R.L., Jaffe H.J. 1984. Thigmomorphogenesis: Ethylene evolution and its role in the changes observed in mechanically perturbed bean plants. *Physiol. Plant.* 62, 289-296.

Blau K., King G.S. 1978. Silylation. In: "Handbook of derivatives for chromatography". Heyden and Son Ltd., Londres, pp. 152-194.

Boller T., Gehri A., Mauch F., Vogeli U. 1983. Chitinase in bean leaves: Induction by ethylene, purification, properties and possible function. *Planta* 157, 22-31.

Boller T., Herner R.C., Kende H. 1979. Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Planta* 145, 293-303.

Borochoy A., Adam Z. 1984. On the role of membrane integrity in the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in carnation flowers. *FEBS Lett.* 173, 139-141.

Bousquet J.F., Thimann K.V. 1984. Lipid peroxidation forms

ethylene from ACC and may operate in leaf senescence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1724-1727.

Bouzayen M., Latché A., Alibert G., Pech J.C. 1988. Intracellular sites of synthesis and storage of 1-(malonylamino) cyclopropane-1-carboxylic acid in *Acer pseudoplatanus* cells. Plant Physiol. 88, 613-617.

Boyer N., De Jaegher G. 1986. Direct or indirect role of peroxidases in ethylene biosynthesis?. In: "Molecular and physiological aspects of plant peroxidases". Greppin H., Penel C., Gaspar T. (ed). University of Geneva, Ginebra, pp. 47-60.

Boyer N., Desbiez M.O., Hofinger M., Gaspar T. 1983. Effect of lithium on thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica*, ethylene production and sensitivity. Plant Physiol. 72, 522-525.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle on protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Brady C.J. 1987. Fruit ripening. Ann. Rev. Plant Physiol. 38, 155-178.

Brennan T., Frenkel C. 1977. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. Plant Physiol. 59, 411-416.

Bryant F., Overell B.T. 1953. Quantitative chromatographic analysis of organic acids in plant tissue extracts. Biochim. Biophys. Acta 10, 471-476.

Buhler D.R., Hansen E., Wang C.H. 1957. Incorporation of ethylene into fruits. Nature 179, 48-49.

Burg S.P. 1962. The physiology of ethylene formation. Ann.

Rev. Plant Physiol. 13, 265-302.

Burg S.P. 1973. Ethylene in plant growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 591-597.

Burg S.P., Clagett C.O. 1967. Conversion of methionine to ethylene in vegetative tissue and fruits. Biochim. Biophys. Res. Commun. 27, 125-130.

Burg S.P., Thimann K.V. 1960. Studies on the ethylene production of apple tissue. Plant Physiol. 35, 24-35.

Burroughs L.F. 1957. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid: A new aminoacid in perry pears and cider apples. Nature 179, 360-361.

Cameron A.C., Fenton C.A.L., Yu Y.B., Adams D.O., Yang S.F. 1979. Stimulation of ethylene production in plant tissues by 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. HortSci. 14, 178-180.

Castillo F.J., Penel C., Greppin H. 1984. Peroxidase release induced by ozone in *Sedum album* leaves. Plant Physiol. 74, 846-851.

Cook E.L., Van Staden J. 1988. Manipulating carnation petal senescence. II. The influence of benzyladenine on indole-acetic acid metabolism and ethylene production. J. Plant Physiol. 133, 470-474.

Cookson C., Osborne D.J. 1979. The effect of ethylene and auxin on cell wall extensibility of the semi-aquatic fern *Regnellidium diphyllum*. Planta 146, 303-307.

Chen Y.M., Wellburn A.R. 1989. Enhanced ethylene formation from red and Norway spruce exposed to acidic mists. Plant Physiol. 91, 357-361.

Cheverry J.L., Sy M.O., Pouliquen J., Marcellin P. 1988. Regulation by CO<sub>2</sub> of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid conversion to ethylene in climateric fruits. *Physiol. Plant.* 72, 535-540.

Chiang P.K., Cantoni G.L. 1977. Activation of methionine for transmethylation. Purification of the S-adenosylmethionine synthetase of Bakers' yeast and its separation into two forms. *J. Biol. Chem.* 252, 4506-4513.

Dagani R. 1984. Mechanism of ethylene synthesis clarified. *Science* (1984), 21-23.

Demole E., Lederer E., Mercier D. 1962. Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant de l'essence de jasmin. *Helv.* 45, 675-685.

Dodds J.H., Hall M.A. 1982. Metabolism of ethylene by plants. *Int. Rev. Cytol.* 76, 299-325.

Dominguez M., Vendrell M. 1988. Biosíntesis del etileno durante la maduración del plátano. En: "Maduración y Post-Recolección 88". Riquelme F., Parra M., Vendrell M. (ed). CSIC-CEBAS, Murcia, pp. 47-53.

Driess-Ecole D., Perbal G. 1987. Intracellular localisation of 3H-IAA in the apical bud of *Lycopersicon esculentum*. *J. Exp. Bot.* 38, 1362-1372.

Felix G., Meins F. Jr. 1987. Ethylene regulation of  $\beta$ -1,3,-glucanase in tobacco. *Planta* 172, 386-392.

Field F.H. 1970. Chemical ionization mass spectrometry. XII. Alcohols. *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 2672-2676.

Fishbein L., Cavanaugh M.A. 1965. Detection and paper chromatography of N-substituted hydroxy, 2-hydroxyethyl, 2-chloroethyl and N,N-bis(2-hydroxyethyl) derivatives. *J. Chromatog.* 20, 283-294.

Franklin D., Morgan P.W. 1978. Rapid production of auxin-induced ethylene. *Plant Physiol.* 62, 161-162.

Frenkel C. 1972. Involvement of peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase isozymes from pear, tomato and blueberry fruit in ripening. *Plant Physiol.* 49, 757-763.

Frenkel C., Mukai M.K. 1984. Possible role of fruit cell wall oxidative activity in ethylene evolution. In: "Ethylene. Biochemical, physiological and applied aspects". Fuchs Y., Chalutz E. (ed). Nijhoff M., Junk W. Publishers, La Haya, pp. 303-316.

Fukuyama T.T., Moyed H.S. 1964. Inhibition of cell growth by photooxidation products of indole-3-acetic acid. *J. Biol. Chem.* 239, 2392-2397.

Gane R. 1934. Production of ethylene by some ripening fruits. *Nature* 134, 1008.

Gardner H.W., Newton J.W. 1987. Lipid hydroperoxides in the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. *Phytochemistry* 26, 621-626.

Gaspar T. 1986. Integrated relationships of biochemical and physiological peroxidase activities. In: "Molecular and physiological aspects of plant peroxidases". Greppin H., Penel C., Gaspar T. (ed). University of Geneva, Ginebra, pp. 455-468.

Gaspar T., Kevers C., Bouillene H., Mazière Y., Barbe J.P.



1989. Ethylene production in relation to rose micropropagation through axillary budding. In: "Biochemical and physiological aspects of ethylene production in lower and higher plants". Clijsters H. et al. (ed). Kluwer Academic Publishers, Holanda, pp. 303-312.
- Gaspar T., Penel C., Castillo F.J., Greppin H. 1985. A two-step control of basic and acidid peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol. Plant.* 64, 418-423.
- Gaspar T., Penel C., Thorpe T., Greppin H. 1982. Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Université de Génève, Ginebra, 324 p.
- Geballe G.T., Galston A.W. 1982. Ethylene as an effector of wound-induced resistance to cellulase in oat leaves. *Plant Physiol.* 70, 788-790.
- Giovanelli J., Datko A.H., Mudd S.H., Thompson G.A. 1983. In vivo metabolism of 5'-methylthioadenosine in *Lemna*. *Plant Physiol.* 71, 319-326.
- Gordon S.A., Weber R.P. 1951. Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiol.* 26, 192-195.
- Grambow H.J. 1986. Pathway and mechanism of the peroxidase-catalyzed degradation of indole-3-acetic acid. In: "Molecular and physiological aspects of plant peroxidases". Greppin H., Penel C., Gaspar T. (ed). University of Geneva, Ginebra, pp. 31-41.
- Grierson D., Kear R.J., Thompson J.R., García-Mora R. 1982. Stimulation of in vitro RNA synthesis by pretreating plants with auxins is due to auxin-induced ethylene production. *Z. Pflanzenphysiol.* 107, 419-426.

Grob K., Matile P. 1980. Compartmentation of ascorbic acid in vacuoles of horseradish root cells. Note on vacuolar peroxidase. *Z. Pflanzenphysiol.* 98, 235-243.

Guy M., Kende H. 1984a. Ethylene formation in *Pisum sativum* and *Vicia faba* protoplasts. *Planta* 160, 276-280.

Guy M., Kende H. 1984b. Conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by isolated vacuoles of *Pisum sativum* L. *Planta* 160, 281-287.

Hanley K.M., Meir S., Bramlage W.J.. 1989. Activity of ageing carnation flower parts and the effects of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid-induced ethylene. *Plant Physiol.* 91, 1126-1130.

Henkeshoven J., Dernick R. 1985. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6, 103-112.

Hoffman N.E., Yang S.F., Ichiara A., Sakamura S. 1982a. Stereospecific conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid into ethylene by plant tissues. Conversion of stereoisomers of 1-amino-2-ethylcyclopropane-1-carboxylic acid to 1-butene. *Plant Physiol.* 70, 195-199.

Hoffman N.E., Yang S.F., McKeon T. 1982b. Identification of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid as major conjugate of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor in higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104, 765-770.

Honma M., Shimomura T. 1978. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agric. Biol. Chem.* 42, 1825-1831.

Hoyle M.C. 1977. High resolution of peroxidase-IAA oxidase isoenzymes from horseradish peroxidase by isoelectric focusing. *Plant Physiol.* 60, 787-793.

Hume R.J., Lovell P.H. 1983. Role of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in the control of female flowering in *Cucurbita pepo*. *Physiol. Plant.* 59, 324-328.

Hyodo H., Tanaka K. 1986. Inhibition of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase activity by polyamines, their related compounds and metabolites of S-adenosylmethionine. *Plant Cell. Physiol.* 27, 391-398.

Imaseki H., Yoshii H., Todaka I. 1982. Regulation of auxin-induced ethylene biosynthesis in plants. In: "Plant growth substances 1982". Wareing P.F. (ed). Springer-Verlag, Berlin, pp. 259-268.

Jansen E.F. 1964. Metabolism of labeled ethylene in the avocado. *J. Biol. Chem.* 239, 1664-1667.

Jerie P.H., Hall M.A. 1978. The identification of ethylene oxide as a major metabolite of ethylene in *Vicia faba* L. *Proc. R. Soc. London B.* 200, 87-94.

Jiao X.Z., Philosoph-Hadas S., Su L.Y., Yang S.F. 1986. The conversion of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid to 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in plant tissues. *Plant Physiol.* 81, 637-641.

Jiao X.Z., Yip W.K., Yang S.F. 1987. The effect of light and phytochrome on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid metabolism in etiolated wheat seedling leaves. *Plant Physiol.* 85, 643-647.

John P. 1983. The coupling of ethylene biosynthesis to a

trans-membrane electrogenic proton flux. FEBS Lett. 152, 141-143.

John R.A., Charteris A., Fowler L.J. 1978. The reaction of amino-oxyacetate with pyridoxal phosphate-dependent enzymes. Biochem. J. 171, 771-779.

Jones J.F., Kende H. 1979. Auxin-induced ethylene biosynthesis in subapical stem sections of etiolated seedlings of *Pisum sativum* L. Planta 146, 649-656.

Jones R.L. 1986. Gibberelic acid and auxin influence the secretion of peroxidase. In: "Molecular and physiological aspects of plant peroxidases". Greppin H., Penel C., Gaspar T. (ed). University of Geneva, Ginebra, pp. 295-308.

Junta de Andalucía. 1988. El libro verde del aceite de oliva virgen de Andalucía. 37 pp.

Kacperska A., Kubacka-Zebalska M. 1985. Is lipoxygenase involved in the formation of ethylene from ACC?. Physiol. Plant. 64, 333-338.

Kang B.G., Newcomb W., Burg S.P. 1971. Mechanism of auxin-induced ethylene production. Plant Physiol. 47, 504-509.

Kende H., Boller T. 1981. Wound ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in ripening tomato fruit. Planta 151, 476-481.

Kenten R.H. 1955. The oxidation of indolyl-3-acetic acid by waxpod bean root sap and peroxidase systems. Biochem. J. 59, 110-121.

Kevers C., Coumans M., Coumans-Gillès M.F., Gaspar T. 1984. Physiological and biochemical events leading to vitrification

of plants cultured in vitro. *Physiol. Plant.* 61, 69-74.

Khan A.A., Prusinski J. 1989. Kinetin enhanced 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid utilization during alleviation of high temperature stress in lettuce seeds. *Plant Physiol.* 71, 733-737.

Kionka C., Amrhein N.D. 1984. The enzymatic malonylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in homogenates of mung-bean hypocotyls. *Planta* 162, 226-235.

Klement Z. 1965. Method of obtaining fluid from the intercellular spaces of foliage and the fluid's merit as substrat for phyto-bacterial pathogens. *Phytopathology* 55, 1033-1034.

Knypl J.S., Chylinska K.M. 1974. Removal of IAA oxidase inhibitors from carrot-root extracts by grinding with insoluble polyvinylpyrrolidone. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 166, 333-343.

Konze J.R., Jones J.F., 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 Physiol.* 66, 566-571.

Konze J.R., Kende H. 1979a. Interactions of methionine and selenomethionine with methionine adenosyltransferase and ethylene generating-systems. *Plant Physiol.* 63, 507-510.

Konze J.R., Kende H. 1979b. Ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in homogenates of etiolated pea seedlings. *Planta* 146, 293-301.

Konze J.R., Schilling N., Kende H. 1978. Enhancement of ethylene formation by selenoamino acids. *Plant Physiol.* 62, 397-401.

Ku H.S., Yang S.F., Pratt H.K. 1969. Ethylene formation from  $\alpha$ -keto- $\gamma$ -methylthiobutirate by tomato fruit extracts. *Phytochemistry* 8, 567-573.

Ku H.S., Yang S.F., Pratt H.K. 1970. Ethylene production and peroxidase activity during tomato fruit ripening. *Plant Cell. Physiol.* 11, 241-246.

Kushad M.M., Yelenosky G., Knight R. 1988. Interrelationship of polyamine and ethylene biosynthesis during avocado fruit development and ripening. *Plant Physiol.* 87, 463-467.

Lau O.L., John W.W., Yang S.F. 1978. Inactivity of oxidation products of indole-3-acetic acid on ethylene production in mung bean hypocotyls. *Plant Physiol.* 61, 68-71.

Lau O.L., Murr D.P., Yang S.F. 1974. Effect of 2,4-dinitrophenol on auxin-induced ethylene production and auxin conjugation by mung bean tissue. *Plant Physiol.* 54, 182-185.

Legge R.L., Thompson J.E. 1983. Involvement of hydroperoxides and an ACC-derived free radical in the formation of ethylene. *Phytochemistry* 22, 2161-2166.

Legrand B., Gaspar T., Penel C, Greppin H. 1976. Light and hormonal control of phenolic inhibitors of peroxidase in *Cichorium intybus* L. *Plant Biochem. J.* 3, 119-127.

Lieberman M. 1979. Biosynthesis and action of ethylene. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30, 533-591.

Lieberman M., Kunishi A.T., Mapson L.W., Wardale D.A. 1966. Stimulation of ethylene production in apple tissue slices by methionine. *Plant Physiol.* 41, 376-382.

Lieberman M., Mapson L.W. 1964. Genesis and biogenesis of ethylene. *Nature* 204, 343-345.

Liu Y., Su L.Y., Yang S.F. 1984a. Stereoselectivity of 1-aminocyclopropane carboxylate malonyltransferase towards stereoisomers of 1-amino-2-ethylcyclopropane-1-carboxylic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 235, 319-325.

Liu Y., Su L.Y., Yang S.F. 1984b. Metabolism of  $\alpha$ -aminoisobutyric acid in relation to metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Planta* 161, 439-443.

Liu Y., Su L.Y., Yang S.F. 1985. Ethylene promotes the capability to malonylate 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and D-amino acids in preclimateric tomato fruits. *Plant Physiol.* 77, 891-895.

Lizada M.C., Yang S.F. 1979. A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal. Biochem.* 100, 140-145.

López de la Puerta J. 1985. Nuestros aceites ante la C.E.E. *Agricultura* 635, 423-431.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Lürssen K., Naumann K., Schröder R. 1979. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an intermediate of the ethylene biosynthesis in higher plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 92, 285-294.

Lynch D.V., Sridaha S., Thompson J.E. 1985. Lipoxygenase-generated hydroperoxides account for the nonphysiological features of ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by microsomal membranes of carnations. *Planta*

164, 121-125.

Machácková I., Kevers C., Gaspar T. 1989a. Indirect or side-effects of aminoethoxy vinylglycine in ethylene biosynthesis. *Saussurea* 19, 125-128.

Machácková I., Ullmann J., Krekule J., Stock M. 1989b. Ethylene production and metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in a long-day plant, *Chenopodium murale* L., as influenced by photoperiodic flower induction. *J. Plant Growth Regul.* 8, 175-179.

Machácková I., Zmrhal Z. 1981. Is peroxidase involved in ethylene biosynthesis?. *Physiol. Plant.* 53, 479-482.

Manning K. 1985. The ethylene forming enzyme system in carnation flowers. In: "Ethylene and plant development". Roberts J.A., Tucker G.A. (ed). Butterworths, Londres, pp. 83-91.

Mapson L.W., Wardale D.A. 1972. Role of IAA in the formation of ethylene from 4-methylmercapto-2-oxo-butiric acid by peroxidase. *Phytochemistry* 11, 1371-1387.

Mato M.C., Vieitez A.M. 1986. Changes in auxin protectors and IAA oxidases during the rooting of chesnut shoots in vitro. *Physiol. Plant.* 66, 491-494.

Mattoo A.K., Achilea D., Fuchs Y., Chalutz E. 1982. Membrane association and some characteristics of the ethylene forming enzyme from etiolated pea seedlings. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105, 271-278.

Mattoo A.K., Lieberman M. 1977. Localization of the ethylene-synthesizing system in apple tissue. *Plant Physiol.* 60, 794-799.





Mayak S., Legge R.L., Thompson J.E. 1981. Ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by microsomal membranes from senescing carnation flowers. *Planta* 153, 49-55.

McKeon T.A., Yang S.F. 1984. A comparison of the conversion of 1-amino-2-ethylcyclopropane-1-carboxylic acid stereoisomers to 1-butene by pea epicotyls and by a cell-free system. *Planta* 160, 84-87.

McKeon T.A., Yang S.F. 1987. Biosynthesis and metabolism of ethylene. In: "Plant hormones and their role in plant growth and development". Davies P.J. (ed). Nijhoff M. Publishers, Dordrecht, Holanda, pp. 94-112.

McRae D.G., Baker J.E., Thompson J.E. 1982. Evidence for involvement of the superoxide radical in the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by pea microsomal membranes. *Plant Cell Physiol.* 23, 375-383.

Mehlitz A., Gierschner K., Minas T. 1963. Thin layer chromatographic separation of 2,4-dinitrophenylhydrazones. Differentiation of 2,4-dinitrophenylhydrazones of saturated aldehydes and ketones as well as of unsaturated carbonyl compounds by means of a color reaction, with potassium ferricyanide. *Chemiker-Ztg.* 87, 573-576.

Meyer A., Miersch O., Büttner C., Dathe W., Sembner G. 1984. Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *J. Plant Growth Regul.* 3, 1-8.

Miyazaki J.H., Yang S.F. 1987a. The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. *Physiol. Plant.* 69, 366-370.

Miyazaki J.H., Yang S.F. 1987b. Inhibition of the methionine cycle enzymes. *Phytochemistry* 26, 2655-2660.

Mousdale D.M.A., Knee M. 1981. Indolyl-3-acetic acid and ethylene levels in ripening apple fruits. *J. Exp. Bot.* 32, 753-758.

Mullins M.G. 1972. Auxin and ethylene in adventitious root formation in *Phaseolus vulgaris* (Roxb.). In: "Plant growth substances 1970". Springer-Verlag, Nueva York, pp. 526-533.

Murr D.P., Yang S.F. 1975a. Conversion of 5'-methylthioadenosine to methionine by apple tissue. *Phytochemistry* 14, 1291-1292.

Murr D.P., Yang S.F. 1975b. Inhibition of in vivo conversion of methionine to ethylene by L-canaline and 2,4-dinitrophenol. *Plant Physiol.* 55, 79-82.

Mussell H. 1985. Interaction between 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and IAA-oxidase from tomato foliage. *Phyton* 45, 55-60.

Nakajima R., Yamazaki I. 1979. The mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.* 254, 872-878.

Neljubow D. 1901. Ueber die horizontale nutation der stengel von *Pisum sativum* und einiger anderer. *Pflanzen Beith. Bot. Zentralbl.* 10, 128-239.

Nilsen H.G., Sagstuen E., Aarnes H. 1988. A cell-free ethylene-forming system from barley roots. *J. Plant Physiol.* 133, 73-78.

Osswald W.F., Schütz W., Elstner E.F. 1988. Indole-3-acetic acid oxidation and crocin bleaching by horseradish peroxidase. *Plant Physiol.* 86, 1310-1314.

Osswald W.F., Schütz W., Elstner E.F. 1989. Indole-3-acetic acid and p-hydroxyacetophenone driven ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid catalyzed by horseradish peroxidase. *J. Plant Physiol.* 134, 510-513.

Parups E.V. 1984. Free radical and free radical scavenger effects on indole-3-acetic acid levels and ethylene production. *Physiol. Plant.* 60, 149-153.

Peiser G.D., Wang T.T., Hoffman N.E., Yang S.F., Liu H.W., Walsh C.T. 1984. Formation of cyanide from carbon 1 of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during its conversion to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3059-3063.

Pilet P.E., Lavanchy P. 1969. Purification d'extraits peroxydasiques (racine de *Lens*) à activité auxines-oxydasique. *Physiol. Vég.* 7, 19-29.

Pirrung M.C. 1983. Ethylene biosynthesis. 2. Stereochemistry of ripening, stress, and model reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 7207-7209.

Pirrung M.C. 1986. Mechanism of a lipoxygenase model for ethylene biosynthesis. *Biochemistry* 25, 114-119.

Porter A.J.R., Borlakoglu J.T., John P. 1986. Activity of the ethylene-forming enzyme in relation to plant cell structure and organization. *J. Plant Physiol.* 125, 207-216.

Preger R., Gepstein S. 1984. Carbon dioxide-independent and -dependent inhibition of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in oat leaves. *Physiol. Plant.* 60, 187-191.

Raghavendra A.S., Reddy K.B. 1987. Action of proline on sto-

mata differs from that of abscisic acid, G-substances, or methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 83, 732-734.

Rama Rao N., Naithani S.C., Jasdanwala R.T., Singh Y.D. 1982. Changes in indoleacetic acid oxidase and peroxidase activities during cotton fibre development. *Z. Pflanzenphysiol.* 106, 157-165.

Rando R.R. 1974. Chemistry and enzymology of  $K_{cat}$  inhibitors. *Science* 185, 320-324.

Raskin I., Beyer E.M. 1989. Role of ethylene metabolism in *Amaranthus retroflexus*. *Plant Physiol.* 90, 1-5.

Rathmell W.G., Sequeira L. 1974. Soluble peroxidase in fluid from the intercellular spaces of tobacco leaves. *Plant Physiol.* 53, 317-318.

Ray P.M. 1956. The destruction of indoleacetic acid. II. Spectrophotometric study of the enzymatic reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 64, 193-216.

Riov J., Yang S.F. 1982. Autoinhibition of ethylene production in *Citrus* peel discs. Suppression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthesis. *Plant Physiol.* 69, 687-690.

Roberts J.A., Osborne D. 1981. Auxin and the control of ethylene production during the development and senescence of leaves and fruits. *J. Exp. Bot.* 32, 875-887.

Roberts J.A., Schindler C.B., Tucker G.A. 1984. Ethylene-promoted tomato flower abscission and the possible involvement of an inhibitor. *Planta* 160, 159-163.

Rohwer F., Mäder M. 1981. The role of peroxidase in ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Z.*

Pflanzenphysiol. 104, 363-372.

Romojaro F., Vaillant V., Latché A., Pech J.C. 1986. Influencia de los D-aminoácidos en la malonización del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y sobre la síntesis de etileno en manzana. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 26, 213-218.

Ruiz-Maya L. 1983. Métodos estadísticos de investigación. Instituto Nacional de Estadística, Madrid, 367 pp.

Sabater F., Acosta M., Sánchez-Bravo J., Cuello J., Del Río J.A. 1983. Indole-3-methanol as an intermediate in the oxidation of indole-3-acetic acid by peroxidase. *Physiol. Plant.* 57, 75-78.

Saftner R.A., Baker J.E. 1987. Transport and compartmentation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and its structural analog  $\alpha$ -aminoisobutyric acid, in tomato pericarp slices. *Plant Physiol.* 84, 311-317.

Sanders I.O., Smith A.R., Hall M.A. 1986. Ethylene metabolism and action. *Physiol. Plant.* 66, 723-726.

Sanders I.O., Smith A.R., Hall M.A. 1989. Ethylene metabolism in *Pisum sativum* L. *Planta* 179, 104-114.

Sandmann G., Boger P. 1980. Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. *Plant Physiol.* 66, 797-800.

Saniewski M., Czapski J. 1983. The effect of methyl jasmonate on lycopene and on  $\beta$ -carotene accumulation in ripening red tomatoes. *Experientia* 39, 1373-1374.

Saniewski M., Czapski J. 1985. Stimulatory effect of methyl

jasmonate on the ethylene production in tomato fruits. *Experientia* 41, 256-257.

Saniewski M., Nowacki J., Czapski J. 1987. The effect of methyl jasmonate on ethylene production and ethylene-forming enzyme activity in tomatoes. *J. Plant Physiol.* 129, 175-180.

Satler S., Thimann K.V. 1981. Le jasmonate de méthyle: Un nouveau et puissant promoteur de la sénescence des feuilles. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sér. B*, 293, 735-740.

Satoh S., Esashi Y. 1980.  $\alpha$ -Aminoisobutyric acid: A probable competitive inhibitor of conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. *Plant Cell Physiol.* 21, 939-949.

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. *Physiol. Plant.* 57, 521-526.

Satoh S., Esashi Y. 1984a. In vivo formation of 1-malonylamino-cyclopropane-1-carboxylic acid and its relationship to ethylene production in cocklebur seed segments: A tracer study with 1-amino-2-ethylcyclopropane-1-carboxylic acid. *Phytochemistry* 23, 1561-1565.

Satoh S., Esashi Y. 1984b. Identification and content of 1-malonylamino-cyclopropanecarboxylic acid in germinating cocklebur seeds. *Plant Cell Physiol.* 25, 583-587.

Satoh S., Yang S.F. 1989. Inactivation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase by L-vinylglycine as related to the mechanism-based inactivation of the enzyme by S-adenosyl-L-methionine. *Plant Physiol.* 91, 1036-1039.

Scrimgeour K.G. 1977. Chemistry and control of enzyme reactions. Academic Press, Londres, 633 pp.

Schlenk H., Gellerman J.L. 1960. Esterification of fatty acids with diazomethane on a small scale. Anal. Chem. 32, 1412-1414.

Schloss P., Walter C., Mäder M. 1987. Basic peroxidases in isolated vacuoles of *Nicotiana tabacum* L. Planta 170, 225-229.

Schneider E.A., Wightman F. 1974. Metabolism of auxin in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 25, 487-513.

Schwertner H.A., Morgan P.W. 1966. The role of IAA-oxidase in abscission control in cotton. Plant Physiol. 41, 1513-1519.

Shimokawa K. 1983. An ethylene forming enzyme in *Citrus unshiu* fruits. Phytochemistry 22, 1903-1908.

Smith A.M., Morrisson W.L., Nilham P.J. 1983. Ethylene enhances reactivity of superoxide with peroxidase to form the oxyferrous complex. Biochemistry 22, 1645-1650.

Smith A.R., Hall M.A. 1984. Biosynthesis and metabolism of ethylene. In: "The biosynthesis and metabolism of plant hormones". Crozier A., Hillman J.R. (ed). Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, pp. 201-239.

Smith T.A., Marshall J.H.A. 1988. Oxidation of aminoacids by manganous ions and pyridoxal phosphate. Phytochemistry 27, 1611-1613.

Steen D.A., Chadwick A.V. 1973. Effects of cycloheximide on indoleacetic acid-induced ethylene production in pea root tips. Plant Physiol. 52, 171-173.

Su L.Y., Liu Y., Yang S.F. 1985. Relationship between 1-aminocyclopropane-1-carboxylate malonyltransferase and D-amino acid malonyltransferase. *Phytochemistry* 24, 1141-1145.

Suttle J.C. 1988. Effect of ethylene treatment on polar IAA transport, net IAA uptake and specific binding of N-1-naphthylphthalamic acid in tissues and microsomes isolated from etiolated pea epicotyls. *Plant Physiol.* 88, 795-799.

Tan Z.Y., Thimann K.V. 1989. The roles of carbon dioxide and abscissic acid in the production of ethylene. *Physiol. Plant.* 75, 13-19.

Thimann K.V., Skoog F. 1934. On the inhibition of bud development and other functions of growth substances in *Vicia faba*. *Proc. Roy. Soc. B.* 114, 317-339.

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 protoplasts. *Physiol. Plant.* 75, 333-339.

Trebitsh T., Riov J. 1987. Inhibition of activity of the EFE by  $\alpha$ (*p*-chlorophenoxy)isobutiric acid. *J. Plant Growth Regul.* 5, 207-215.

Ueda J., Kato J. 1981. Promotive effect of methyl jasmonate on oat leaf senescence in the light. *Z. Pflanzenphysiol.* 103, 357-359.

Ursin V.M., Bradford K.J. 1989. Auxin and ethylene regulation of petiole epinasty in two developmental mutants of tomato, *diageotropica* and *epinastic*. *Plant Physiol.* 90, 1341-1346.



Vähätalo M.L., Virtanen A.I. 1957. A new cyclic  $\alpha$ -aminocarboxylic acid in berries of cowberry. *Acta Chem. Scand.* 11, 741-743.

Vendrell M. 1985. Effect of abscisic acid and ethephon on several parameters of ripening in banana fruit tissue. *Plant Sci.* 40, 19-24.

Venis M.A. 1984. Cell-free ethylene-forming systems lack stereochemical fidelity. *Planta* 162, 85-88.

Vinkler C., Apelbaum A. 1983. Ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in plant mitochondria. *FEBS Lett.* 162, 252-256.

Vinkler C., Apelbaum A. 1984. Conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in submitochondrial particles isolated from plants. *FEBS Lett.* 167, 64-68.

Vioque A., Albi M.A. 1975. Elementos trazas y abscisión de la aceituna. *Grasas y Aceites* 26, 73-78.

Vioque A., Albi M.A., Vioque B. 1978a. Abscisión de la aceituna. II. Purificación parcial del sistema enzimático ácido indolacético-oxidasa del olivo. *Grasas y Aceites* 29, 391-395.

Vioque A., Albi M.A., Vioque B. 1978b. Abscisión de la aceituna. III. Algunas propiedades del sistema enzimático ácido indolacético-oxidasa del olivo. *Grasas y Aceites* 29, 397-406.

Vioque A., Albi M.A., Vioque B. 1981. Role of IAA-oxidase in the formation of ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Phytochemistry* 20, 1473-1475.

Vioque A., Vioque B. 1985. Acción del sistema ácido indolacético oxidasa/peroxidasa del olivo sobre el ácido 1-aminoci-

clopropano-1-carboxílico. *Grasas y Aceites* 36, 35-41.

Vioque B. 1980. Aportaciones al conocimiento del proceso de abscisión de la aceituna. Tesis Doctoral. Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

Vioque B., López A., Castellano J.M., Albi M.A., Vioque A. 1986. Detection of soluble peroxidases by direct plant tissue isoelectric focusing. *Electrophoresis* 7, 392-393.

Vioque E., Maza M.P., Millán F. 1985. High-performance liquid chromatography of fatty acids as their p-phenylazophenacyl esters. *J. Chromatog.* 33, 187-192.

Wang H., Woodson W.R. 1989. Reversible inhibition of ethylene action and interruption of petal senescence in carnation flowers by norbornadiene. *Plant Physiol.* 89, 434-438.

Wang S.Y., Adams D.O. 1982. Chilling-induced ethylene production in cucumbers (*Cucumis sativus* L.). *Plant Physiol.* 69, 424-427.

Wang T.T., Yang S.F. 1987. The physiological role of lipoxygenase in ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in oat leaves. *Planta* 170, 190-196.

Weckx J., Vangronsveld J., Van Poucke M. 1989. Effect of paraquat on ethylene biosynthesis by intact green *Phaseolus vulgaris* seedlings. *Physiol. Plant.* 75, 340-345.

Weidhase R.A., Lehman J., Kramell H., Sembdner G., Parthier B. 1987. Degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and chlorophyll in senescing barley segments triggered by jasmonic acid methylester, and counteraction by cytokinin. *Physiol. Plant.* 69, 161-166.

White A., Handler P., Smith E.L. 1973. Principles of biochemistry. McGraw-Hill (ed). Nueva York, 1295 pp.

Wise R.R., Naylor A.W. 1988. Stress ethylene does not originate directly from lipid peroxidation during chilling-enhanced photooxidation. *J. Plant Physiol.* 133, 62-66.

Yamane H., Takagi H., Abe H., Yokota T., Takahashi N. 1981. Identification of jasmonic acid in three species of higher plants and its biological activities. *Plant Cell Physiol.* 22, 689-697.

Yamazaki I., Piette L.H. 1963. The mechanism of aerobic oxidase reaction catalyzed by peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 77, 47-64.

Yang S.F. 1967. Biosynthesis of ethylene. Ethylene formation from methional by horseradish peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 122, 481-487.

Yang S.F. 1974. The biochemistry of ethylene: Biogenesis and metabolism. *Recent. Adv. Phytochem.* 7, 131-164.

Yang S.F. 1981. Biosynthesis of ethylene and its regulation. In: "Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables". Friend J., Rhodes M.J. (ed). Academic Press, Londres, pp. 89-106.

Yang S.F., Hoffman N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35, 155-189.

Yip W.K., Jiao X.Z., Yang S.F. 1988. Dependence of in vivo ethylene production rate on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content and oxygen concentration. *Plant Physiol.* 88, 553-558.

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, 369-379.

Yoshii H., Imaseki H. 1982. Regulation of auxin-induced ethylene biosynthesis of inductive formation on 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase by ethylene. *Plant Cell Physiol.* 23, 639-649.

Yu Y.B., Adams D.O., Yang S.F. 1979. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 198, 280-286.

Yu Y.B., Adams D.O., Yang S.F. 1980. Inhibition of ethylene production by 2,4-dinitrophenol and high temperature. *Plant Physiol.* 66, 286-290.

Yu Y.B., Yang S.F. 1979. Auxin-induced ethylene production and its inhibition by aminoethoxyvinylglycine and cobalt ion. *Plant Physiol.* 64, 1074-1077.

Yung K.H., Yang S.F., Schlenk F. 1982. Methionine synthesis from 5-methylthioribose in apple tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104, 771-777.

Zimmerman P.W., Wilcoxon F. 1935. Several chemical growth substances which cause initiation of roots and other responses in plants. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 7, 209-229.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Filosofía y Letras

Curso 1984-85  
Asignatura de Historia del Arte  
Examen de Septiembre

~~Ala. Alba~~

~~Ala. Alba~~

~~Ala. Alba~~

~~[Signature]~~

~~Catalan~~

~~[Signature]~~



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672478