

EXPRESSÃO DA ENZIMA ÁCIDO 1-CARBOXÍLICO-1-AMINO CICLOPROPANO OXIDASE EM TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.), CULTIVAR KADÁ

ROMBALDI, Cesar V. ¹; CHAVES, Ana L. S. ¹; SILVA, Jorge A. ¹; LEMOS, Miriam R. B.; AYUB, Ricardo A. ²; BALAGUÉ, Claudine ³; PECH, Jean-Claude ³

¹ UFPEL/FAEM - Dept^o. Ciência e Tecnologia Agroindustrial - Campus Universitário - Caixa Postal, 354 - CEP 96010-900 - Tel. (0532) 75 7258 - Pelotas / RS - Brasil.

²UEPG/FA - Dept^o. Fitotecnia - Campus Universitário - Ponta Grossa / PR - Brasil.

³INPT / ENSAT - Laboratoire Éthylène et Maturation des Fruits - 147, Avenue de Muret
31300 Toulouse - França.

(Recebido para publicação em 30/11/95)

RESUMO

Estudou-se a produção de etileno, a expressão da enzima ACC (ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano) oxidase e as características físico-química de frutos de tomate, cultivar Kadá, não transformados e transformados geneticamente com o clone de ADN pMEL 1, em orientação antisense. Em tomates não transformados houve um aumento da produção de etileno de 2 nl.h⁻¹.g⁻¹ para 22 nl de etileno.h⁻¹.g⁻¹ quando os frutos passaram do estágio verde-maduro para vermelho. Já, em frutos provenientes de plantas transformadas, a produção de etileno não ultrapassou os 0,5 nl.h⁻¹.g⁻¹, qualquer que fosse o estágio de maturação. A baixa produção de etileno dos frutos deste genótipo se fez acompanhada da inibição da síntese da ACC oxidase, evidenciada pela técnica de "western blot", utilizando anticorpos policlonais específicos contra esta enzima. Apesar das marcantes diferenças fisiológicas, o ciclo de maturação e a composição físico-química básica dos frutos não apresentaram variações significativas.

Palavras-Chave: Etileno, ACC oxidase, Tomate, Anticorpos

ABSTRACT

EXPRESSION OF ACC (1-CARBOXILIC-1-AMINOCYCLOPROPANE) OXIDASE ENZYME ON ETHYLENE PRODUCTION IN TOMATO (*Lycopersicon esculentum* Mill.), KADÁ CULTIVAR. Ethylene production, ACC (1-carboxylic-1-aminocyclopropane) oxidase expression and physico-chemical characteristics were studied in tomato fruits from wild type plants of the Kadá cultivar and transgenic plants modified by pMEL 1 DNA, in antisense orientation. The production of ethylene increased of 2 nl.h⁻¹.g⁻¹ to 22 nl.h⁻¹.g⁻¹ during ripening of non transformed tomatoes. In transgenic tomato fruits, the ethylene production remained low, below 0,5

nl.h⁻¹.g⁻¹. By western blot technic, using especific policlonal antibodies, was demonstrated that the decrease of ethylene was accompanied by the inhibition of ACC oxidase. However, the self life and physico-chemical composition was not altered in the transgenic tomatoes.

Key Words: Ethylene, ACC oxydase, Tomato, Antibodies

INTRODUÇÃO

O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é a hortaliça mais consumida no mundo, devido à grande multiplicidade de uso e a seu aspecto, sabor e textura atraentes (Schuch *et alii*, 1991). No entanto, ele apresenta um processo de maturação/senescência acelerado, caracterizado por mudanças rápidas de coloração, textura, sabor e aroma. À semelhança do que ocorre com outros frutos como maçã, pêssego, pera e melão, no tomate, o processo de maturação/senescência é precedido de um incremento da síntese de etileno que, por sua vez, desencadeia um aumento na intensidade respiratória. Este fenômeno, chamado crise climática, é acompanhado de mudanças importantes a nível de expressão de genes que parecem ser a origem do processo de maturação (Slater *et alii*, 1985).

Vários clones de ADN, correspondentes a ARNm que se acumulam em abundância durante a maturação do tomate, foram isolados mas, inicialmente, somente os genes correspondentes à poligalacturonase (Grierson *et alii*, 1986) e à ACC (ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano) sintetase (Wang & Woodson, 1991) foram identificados. Estas descobertas, além de fornecerem dados importantes para a melhor compreensão dos fenômenos de expressão e regulação daqueles genes, constituem-se em fato de grande importância econômica, já que atualmente estão sendo cultivados, em escala comercial, tomates transgênicos

com baixa atividade da poligalacturonase (Pech *et alii*, 1994). Também, a nível laboratorial, dispõem-se de plantas de tomate transformadas com um clone de ADN correspondente à ACC sintetase, em orientação antisense (Pech *et alii*, 1993). É o regulador de crescimento etileno que está implicado na regulação destas mudanças metabólicas, por intermédio de uma cadeia de transdução de sinais. Vários trabalhos recentes enfocam este tema, porém os mecanismos ainda não são conhecidos (Adams & Yang, 1979; Abeles *et alii*, 1992; Kende, 1989, 1993; Pech *et alii*, 1994; Theologis, 1993; Yang & Hoffman, 1984).

Entretanto, se os avanços científicos permitiram que outras enzimas da via de biossíntese do etileno ou implicadas na processo de maturação de frutos já estejam bem caracterizadas e os genes respectivos isolados e clonados, pouco foi obtido em relação à ACC oxidase. Somente em 1991, Ververides & John conseguiram, pela primeira vez, extrair e dosar a atividade desta enzima *in vitro*. A partir de então, ela foi purificada em vários frutos; teve sua sequência parcialmente determinada; anticorpos policlonais foram obtidos e clones de ADN foram isolados (Balagué *et alii*, 1993; Dupille *et alii*, 1993; Hamilton *et alii*, 1991; McGarvey & Christoffersen, 1992; Pirung *et alii*, 1994).

Com a caracterização feita por Balagué *et alii* (1993) de um clone de ADN, denominado de pMEL I, correspondente à ACC oxidase de melão, iniciaram-se trabalhos de transformação genética, via *Agrobacterium tumefaciens*, em tomate e melão. Em ambos os casos, este clone foi inserido, em orientação antisense, num vetor binário (plasmídeo pGA 643). Resultados preliminares, altamente promissores, foram descritos por Ayub (1995) que obteve melões transgênicos com baixa produção de etileno e maior conservabilidade.

Dentro deste contexto, o presente trabalho visa estudar a evolução da maturação de frutos de tomate não transformados e transformados geneticamente com o clone pMEL 1 de melão em orientação antisense.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), cultivar Kadá, oriundos de plantas não transformadas e transformadas geneticamente com um clone de ADN, denominado pMEL1 (Balagué *et alii*, 1993), correspondente à ACC oxidase de melão, em orientação antisense. Os tomateiros foram cultivados em casa de vegetação, localizada no Campus da Universidade Federal de Pelotas - Capão do Leão - RS, no período de outubro de 1994 a março de 1995.

O amadurecimento foi acompanhado em função da evolução da coloração, determinando-se o ciclo total de maturação, a produção de etileno, a síntese da enzima ACC oxidase e a composição físico-química dos frutos.

Escala de coloração

A avaliação da coloração foi realizada utilizando-se uma escala previamente estabelecida por Pratt & Workman (1962), que classifica os frutos de tomate em:

- a) verde-imaturos: quando estão em fase de crescimento;
- b) verde-maduros: quando adquirem o tamanho máximo e a capacidade de amadurecer;
- c) "breaker": quando houver pigmentação amarelo-avermelhada em até 20% da superfície;
- d) vermelhos: quando apresentarem-se completamente avermelhados;
- e) senescentes: quando apresentam amolecimento avançado.

Produção de etileno

O etileno sintetizado pelos frutos de tomate foi dosado por cromatografia em fase gasosa, utilizando-se cromatógrafo a gás VARIAN 3300, de acordo com as recomendações descritas por Dupille *et alii* (1992). As amostras, contendo aproximadamente 1 Kg de frutos, foram acondicionadas, durante 1 hora, em frascos com capacidade de 5 litros, hermeticamente fechados após o que, coletou-se 1 ml da atmosfera gasosa para a dosagem do etileno. A produção deste regulador de crescimento foi expressa em nanolitros de etileno / hora / grama de matéria fresca ($\text{nl.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$).

"Western blot"

O "western blot" foi realizado a partir da metodologia descrita por Meyer *et alii* (1985), que compreende 4 etapas principais: 1) extração das proteínas; 2) separação eletroforética das proteínas em condições desnaturantes; 3) eletrotransferência das proteínas para membranas de nitrocelulose; 4) reações imunoquímicas de detecção da ACC oxidase.

Para a extração de proteínas totais, 5 gramas de tomate foram homogeneizados com uma solução de ácido tricloro acético a 15% (p/v), contendo 5% (v/v) de β -mercaptoetanol. Após 1 hora de incubação do material a 4°C, a mistura foi centrifugada a 20.000 g durante 30 minutos. O precipitado resultante foi lavado 5 vezes com uma solução de acetato de amônio 100 mM a -20°C dissolvido em metanol. Finalmente, o precipitado foi dissolvido no tampão Laemmli (Tris-HCl 25 mM, pH 6,5 contendo glicerol a 10%, p/v; β -mercaptoetanol a 5%, v/v; dodecil sulfato de sódio -SDS- a 2,3 %, p/v; e azul de bromofenol a 0,005%, p/v), de maneira a obter-se aproximadamente 1 μg de proteína. μl^{-1} .de tampão. A

dosagem do teor de proteínas foi determinada segundo metodologia descrita por Harlow & Lane (1988).

A separação eletroforética das proteínas foi efetuada em condições desnaturantes, utilizando, para cada amostra, 10 µg de proteínas, em gel de poli-acrilamida descontínuo.

O gel de concentração foi constituído de 4% (p/v) de N,N-metilenobisacrilamida, 0,1% (p/v) de SDS, 0,04% (v/v) de Temed, 0,03% (p/v) de persulfato de amônio dissolvidos num tampão Tris-HCl 125 mM, pH 6,8. Já o gel de separação, caracterizou-se por uma maior concentração de N,N-metilenobisacrilamida (12%) e de Tris-HCl (375 mM), pH 8,9.

A migração eletroforética das proteínas foi feita a 75V durante 30 minutos, aumentando-se a voltagem, em seguida, para 150V até o final do processo. O tampão de migração utilizado foi Tris 25 mM - glicina 192 mM (pH 8,3), contendo 0,01% (v/v) de SDS. A migração foi interrompida quando do início da saída do azul de bromofenol do gel de separação.

A eletrotransferência das proteínas para membranas de nitrocelulose 45 µm foi realizada durante 1,5 horas a 150V, num tampão Tris 25 mM - Glicina 192 mM (pH 8,3), contendo 20% (v/v) de metanol. Concluída esta etapa, as membranas foram submetidas às reações imunológicas, como segue: lavagem em água deionizada durante 20 minutos; incubação em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, contendo 350 mM de NaCl, 0,01% (p/v) de NaN₃ (TBS), 0,05% (v/v) de Tween 20 (TTBS) e 5% (p/v) de leite em pó desnatado, durante 1,5 horas; enxaguagem em TTBS; incubação neste mesmo tampão contendo 2% de leite em pó desnatado e os anticorpos anti-ACC oxidase (Dupille *et alii*, 1993) diluídos na proporção 1:10.000 (anticorpo : tampão), durante 2 horas; lavagem em TTBS; incubação com o anticorpo secundário anti-coelho, acoplado à fosfatase alcalina (Dako Laboratories), diluído 1:2.000 num tampão TTBS-2% de leite em pó desnatado, durante 1 hora e, finalmente, lavagem em TTBS e revelação utilizando o 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato e o nitro azul tetrazólio (BCIP/NBT-Vector Laboratories) como substratos.

Análises físico-químicas e de rendimento industrial

Os tomates colhidos em cada estágio de maturação foram submetidos, após descascamento, às análises de pH, acidez total, sólidos solúveis, açúcares redutores, sólidos insolúveis em etanol e matéria seca, seguindo-se as recomendações descritas por Goitia *et alii* (1995).

Análise estatística

O experimento foi realizado segundo um delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. A comparação de médias foi efetuada através do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de etileno e o ciclo de maturação dos frutos de tomate, não transformados e transformados, estão representados na Figura 1. Houve um constante incremento na produção de etileno quando os frutos de tomate não transformados passaram do estado verde-imaturo (2 nl.h⁻¹.g⁻¹) e verde-maturo (2 nl.h⁻¹.g⁻¹) para os estágios mais avançados, "breaker" (18 nl.h⁻¹.g⁻¹) e vermelhos (22 nl.h⁻¹.g⁻¹) (Figura 1A). Slater *et alii* (1985) demonstraram que, durante estes estágios de maturação, há a indução de mais de 300 ARNm. Dentre estes, não mais de uma dezena foram caracterizados (Kende, 1993), destacando-se os correspondentes às enzimas celulase, poligalacturonase, pectinametilesterase, ACC sintetase e ACC oxidase (Fernandez-Maculet & Yang, 1992; Grierson *et alii*, 1986; Kende, 1993, Slater *et alii*, 1985). A indução da síntese destas duas últimas enzimas explicaria o aumento da produção do etileno (Kende, 1993).

Quando os frutos atingiram a fase de senescência, caracterizado pelo amolecimento generalizado dos tecidos, houve uma redução marcante na produção de etileno, atingindo valores da ordem de 7 nl.h⁻¹.g⁻¹. Este comportamento fisiológico é característico na maioria dos produtos climatéricos (Kende, 1993).

Entretanto, quando se analisa a produção de etileno dos tomates transformados, qualquer que seja o estágio de maturação, os valores são extremamente baixos, não ultrapassando 0,5 nl.h⁻¹.g⁻¹. Esta produção de etileno é similar àquela verificada em tecidos com comportamento não climatérico (frutos não climatéricos, folhas, pecíolos, embriões, etc...) e não injuriados (Abeles *et alii*, 1992; Adams e Yang, 1979; Kende, 1989). Estes resultados indicam que a expressão do clone de ADN pMEL 1 de melão, introduzido em orientação antisense em plantas de tomate, é capaz de atenuar mais que 90% da produção de etileno dos frutos. O ciclo de maturação, entretanto, não foi afetado pela transformação (Figura 1B). A passagem do estágio verde-maturo para o senescente demandou 30 dias e 27 dias para os tomates não transformados e transformados, respectivamente. Resultados similares foram obtidos por Ayub (1995), Hamilton *et alii* (1990) e Schuch *et alii* (1991).

A

B

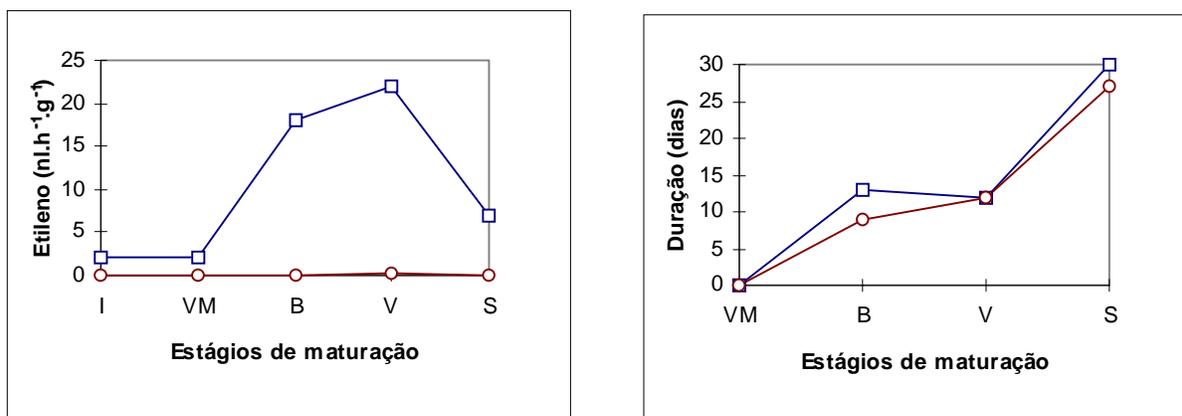


Figura 1. Produção de etileno (A) e duração do ciclo de maturação (B) de frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Kadá, transformados (o — o — o) e não transformados (• — • — •). (I) Tomates verde-imaturos; (VM) verde-maduros; (B) "breakers"; (V) vermelhos; (S) senescentes.

Na Figura 2, está representado o perfil, em "western blot", da proteína ACC oxidase. Semelhantemente à produção do etileno, há um aumento marcante na quantidade desta enzima durante a maturação dos frutos de tomate não transformados. Ressalta-se, no entanto, a presença da ACC oxidase em frutos verde-imaturos (Figura 2A), que se caracterizam pela ausência de gel locular e pela incapacidade de amadurecer após a colheita. Este resultado é coerente com o fato de que todos os tecidos vegetais produzem etileno (Adams & Yang, 1979), mas discordante com os resultados obtidos por Hamilton *et alii* (1990) que indicam uma ausência total de ARNm correspondentes à ACC oxidase em frutos de tomate em estágios anteriores ao verde-maduro. Esta controvérsia pode ser explicada por uma diferença de sensibilidade entre as técnicas de "western blot" e de "northern blot". É possível, também, que durante o processo evolutivo haja a expressão de diferentes isoformas da ACC oxidase, detectáveis pelos anticorpos policlonais anti-ACC oxidase, mas que não tenham homologia de sequência suficientemente alta para serem postas em evidência por hibridação com a sonda utilizada nos testes moleculares (Rombaldi *et alii*, 1994).

Quando os tomates não transformados atingem a fase de senescência, há uma redução na produção de etileno (Figura 1A), mas o nível da proteína ACC oxidase mantém-se elevado (Figura 2A). A redução da produção deste regulador de crescimento parece não estar associada à deficiência de substrato da ACC oxidase, pois foi verificado que o aporte de ACC ao meio não restaura a atividade enzimática (Brecht, 1987). Isto indica que a ACC oxidase perde a atividade enzimática durante a degradação-senescência celular, mas preserva sua sequência aminoacídica, já que os níveis desta proteína continuam elevados e o peso molecular conservado.

Em frutos de tomate transformados, apenas pequenas quantidades de proteína ACC oxidase foram

postas em evidência (Figura 2B), indicando a eficiência da técnica de transformação na inibição da expressão desta enzima. Estes resultados indicam que a atenuação da produção de etileno deste material se faz pela inibição da síntese da ACC oxidase.

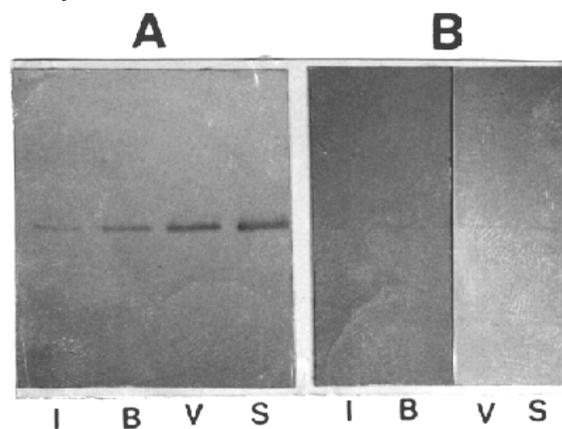


Figura 2. Perfil, em "western blot", da ACC oxidase durante a maturação de frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), cultivar Kadá, não transformados (A) e transformados (B). (I) Tomates verde-imaturos; (B) "breakers"; (V) vermelhos; (S) senescentes.

Pela análise dos resultados apresentados na Tabela I pode-se verificar que, para os dois genótipos estudados, afora a acidez total, as demais características de controle de qualidade analisadas, não apresentaram variações significativas. Os valores de pH obtidos, situados entre 3,76 e 3,96, são considerados adequados, tanto para o consumo *in natura* quanto para o processamento industrial dos tomates. Do ponto de vista tecnológico, a faixa de pH mais adequada para o processamento fica entre 3,5 e 4,3 (Goitia *et alii*, 1995).

TABELA 1 - Análise físico-química de tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill), cultivar Kadá, transformados e não transformados, após o descascamento¹

Características	Tomates não transformados	Tomates transformados
pH	3,85 a ²	3,69 a
Acidez total (meq NaOH/100ml)	6,64 a	7,56 b
Sólidos solúveis (°Brix)	4,20 a	4,34 a
Matéria seca (%)	5,82 a	5,91 a
Sólidos insolúveis em álcool (%)	1,86 a	1,91 a
Renda de descascamento (%)	89,90 a	89,80 a

¹. Os resultados apresentados correspondem a uma média aritmética simples de 5 repetições.

². Médias seguidas por letras distintas, na mesma linha, diferem entre si ao nível de probabilidade de 5%, pelo teste de Duncan.

Os sólidos solúveis apresentaram-se como os constituintes majoritários da matéria seca dos frutos, não havendo diferenças significativas entre os tomates transformados e não transformados. Eles representam, em média, 4,27% do peso dos frutos e cerca de 70% dos sólidos totais ou matéria seca. Associados aos teores de sólidos insolúveis em álcool e à renda de descascamento, estes dados permitem inferir sobre os rendimentos industriais durante o processamento de tomate. Assim, após eliminada a casca, que representa, em peso, cerca de 10% dos frutos, os fatores intrínsecos ao produto que determinam o rendimento industrial e as características reológicas, são os teores de sólidos solúveis, de matéria seca e de sólidos insolúveis em álcool. Goitia *et alii* (1995) citam, por exemplo, que frutos apresentando uma relação SIA (sólidos insolúveis em álcool)/ MS (matéria seca) x 100 superior a 30, conferem aos frutos boas características reológicas e/ou permitem obter subprodutos pastosos de alta consistência. Os frutos aqui analisados apresentaram uma relação SIA/MS x 100 de 32.

A acidez total, apesar de ser mais elevada em frutos de tomate transformados, ainda permanece dentro dos valores médios citados na literatura (Schuch *et alii*, 1991; Goitia *et alii*, 1995). Esta maior acidez dos frutos transformados se deve, provavelmente, a uma menor intensidade respiratória dos frutos.

CONCLUSÕES

Os resultados permitem concluir que o aumento da produção de etileno durante a crise climatérica de frutos de tomates se faz acompanhada da síntese da enzima ACC oxidase.

A transformação de plantas de tomate com o clone de ADN pMEL I, em orientação antisenso, permite inibir a síntese da ACC oxidase e, por consequência, a do etileno.

Uma redução da produção de etileno em 90% não é suficiente para prolongar o ciclo de maturação de tomates, quando mantidos na planta.

A composição físico-química básica não é afetada pela redução da produção de etileno.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELES F. B., MORGAN P. W., SALTVEIT M. E. Jr. Ethylene in plant biology. San Diego. Academic Press, 1992, 414 pp. 2 ed.
- ADAMS D. O., YANG S. F. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, n.76, p170-174, 1979.
- AYUB, R. Transformation génétique du melon. Toulouse: ENSAT, 1995, 135p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular Vegetal), Institut National Polytechnique de Toulouse, 1995.
- BALAGUÉ C., WATSON C. F., TURNER J., ROUGÉ P., PICTON S., PECH J.-C., GRIERSON D. Isolation of a ripening wound-induced cDNA from *Cucumis melo* L. encoding a protein with homology to the ethylene-forming enzyme. *Eur. J. Biochem.*, n. 276 p27-34, 1993.
- BRECHT J.K. Locular gel formation in developing tomato fruit and the initiation of ethylene production. *HortScience*, n.22, p476-479, 1987.

- DUPILE E., ROMBALDI C. V., LELIÈVRE J. M., CLEYET-MAREL J. C., PECH J. C., LATCHÉ A. Purification, properties and partial amino-acid sequence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase from apple fruits. *Planta*, n.190, p65-70, 1993.
- FERNANDEZ-MACULET J. C. & YANG S. F. Extration and partial characterization of the ethylene-forming enzyme from apple fruit. *Plant Physiol.*, n.99, p751-754, 1992.
- GOITIA, A.E., QUESTA, A.G.; RANA, E.; RODRIGUEZ, S. C. Nuevos cultivares de tomate: su aptitud para uso industrial. *La alimentacion Latinoamericana*, n.207, p26-31, 1995.
- GRIERSON D., TUCKER G.A., KEEN J., RAY J., BIRD C.R., SCHUCH W. Sequencing and identification of a cDNA clone for tomato polygalacturonase. *Nucl. Acid. Res.*, n. 14, p8595-8603, 1986.
- HAMILTON A. J., LYCETT G. W., GRIERSON D. Antisens gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature*, n. 346, p284-287, 1990.
- HAMILTON A. J., BOUZAYEN M., GRIERSON D. Identification of a tomato gene for the ethylene forming enzyme by expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, n. 88, p7434-7437, 1991.
- HARLOW E., LANE D. Antibodies - A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988, 689p.
- KENDE H. Enzymes in ethylene biosynthesis. *Plant Physiol.*, n. 91, p1-4, 1989.
- KENDE H. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, n.44, p283-307, 1993.
- MCGARVEY D. J. & CHRISTOFFERSEN R. E.. Characterization and kinetic parameters of ethylene-forming enzyme from avocado fruit. *J. Biol. Chem.*, n. 267, p5964-5967, 1992.
- MEYER Y., GROSSET J., CHARTIER Y., CLEYET-MAREL J.C. Preparation by two-dimensional electrophoresis of proteins for antibody production: Antibodies against proteins whose synthesis is reduced by auxin in tobacco mesophyl protoplasts. *Electrophoresis*, n. 9, p704-712, 1988.
- PECH J.C., LACHE A., BALAGUE C. Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene. Kluwer publisher. NL., 1993, 385p.
- PECH J.C., BALAGUE C., LACHE A., BOUZAYEN M. Postharvest physiology of climacteric fruits : recent developments in the biosynthesis and action of ethylene. *Sci. Alim.*, n. 14, p3-15, 1994.
- PIRRUNG M.C., KAISER L.M., CHEN J. Purification and properties of the apple fruit ethylene-forming enzyme. *Biochemistry*, n. 32, p7445-7450, 1993.
- PRATT, H. K. & WORKMAN, M. Studies on the physiology of tomato fruits. III. The effects of ethylene on respiration and ripening behaviour of fruits stored at 20°C after harvest. *Proc. Hort. Sci.*, n.81, p467-478, 1962.
- ROMBALDI C.V., BELFAIZA M., RAYNALD J., LACHE A., PECH J.C. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in ripening fruits: cellular and tissular localization. In: International Symposium on Postharvest Physiology, Pathology and Technologies for Horticultural Commodities, 1994, Agadir, Marrocos, 1994, p35-39.
- SCHUCH, W.; KANCZLEER, J.; ROBERTSON, D.; HOBSON, G.; TUCKER G.; GRIERSON, D.; BRIGHT, S.; BIRD, C. Fruit quality characteristics of transgenic tomato fruit with altered polygalacturonase activity. *Hort Science*, n. 12, p1517-1520, 1991.
- SLATER A., MAUNDERS M. J., EDWARDS K., SCHUCH W., GRIERSON D. Isolation and characterization of cDNA clones for tomato polygalacturonase and other ripening related proteins. *Plant. Mol. Biol.*, n. 5, p137-147, 1986.
- THEOLOGIS A. What a gas ! *Current Biology*, n. 3, p369-3371, 1993.
- VERVERIDIS P. & JOHN P. Complete recovery *in vitro* of ethylene-forming enzyme activity. *Phytochemistry*, n. 30, p725-727, 1991.
- WANG H. & WOODSON W.R. A flower senescence-related mRNA from carnation shares sequence similarity with fruit ripening-related mRNAs involved in ethylene biosynthesis. *Plant Physiol.*, n. 96, p1000-1001, 1991.
- YANG S. F. & HOFFMAN N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, n. 35, p155-189. 1984.